استفاده از مشخصات ظاهری و نشانگر PCR- SCAR به‌منظور شناسایی نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) شایع در گلخانه‌های منطقه سردسیری استان کهگیلویه و بویراحمد

Application of Morphological Characters and PCR- SCAR Markers for Identification of Dominant Species of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Glasshouses of Cold Region of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran

کیومرث میره‌کی[۱]، محمد عبدالهی[۲*]، مصطفی محقق دولت‌آبادی[۳] و نجمه غزلباش[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۳/۲۸

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی، جنس *Meloidogyne*، از عوامل محدودکننده کشت محصولات صیفی، ازجمله گوجه‌فرنگی و خیار هستند. مبارزه با نماتدهای ریشه‌گرهی، مستلزم شناسایی دقیق آن‌ها است. به‌منظور شناسایی گونه شایع نماتد ریشه‌گرهی در ناحیه سردسیری استان کهگیلویه و بویراحمد (شهرستان‌های بویراحمد و دنا)، پس از جداسازی و خالص‌سازی نماتد و تکثیر آن بر روی رقم حساس گوجه‌فرنگی، براساس صفات ظاهری لارو سن دوم و نقوش انتهای بدن نماتد ماده بالغ، جدایه‌ها تشخیص داده شدند. به‌منظور تشخیص مولکولی، با استفاده از کیت، DNA ژنومی از مخلوط کیسه تخم و لارو سن دوم استخراج و با کمک سه جفت آغازگر اختصاصی inc، ar و jav انتخاب شده براساس تعیین توالی نواحی به‌دست آمده از نشانگر RAPD تکثیر شدند. در هر ۱۰ جمعیّت مورد بررسی یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر javf/javr تکثیر گردید ولی توسط آغازگرهای inc و ar که به‌ترتیب آغازگرهای اختصاصی *M. incognita* و *M. arenaria* می‌باشند، هیچ قطعه‌ای حاصل نشد. براساس مطالعات مولکولی و مشخصات ظاهری، گونه شایع ناحیه سردسیری استان، *M. javanica* تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: نماتد مولد غده، مورفولوژیک، مورفومتریک، نشانگر مولکولی

---

۱ و ۴. دانشجویان سابق کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج، یاسوج
۲. دانشیار نماتدشناسی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج، یاسوج
۳. استادیار ژنتیک دام، گروه علوم دام دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج، یاسوج
*: نویسنده مسوول Email: mdabdollahi@gmail.com
بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول به راهنمایی نگارنده دوم، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج

مقدمه

شناسایی نماتدهای انگل گیاهی در سطح گونه و نژاد برای خدمات مدیریتی, قرنطینه‌ای و مشاوره‌ای امری اساسی و اجتناب‌ناپذیر است. نماتدهای ریشه‌گرهی جنس *Meloidogyne* *گلدی* (Goeldi, 1892)، از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی است که تاکنون بیش از ۹۰ گونه از آن شرح داده شده است. چهار گونه، *چیتوود* (Chitwood, 1949) *کفوید و وایت* (Kofoid and White, 1919) *M. incognita*؛ *چیتوود* (Chitwood, 1949) *تریوب* (Treub, 1885) *M. javanica*؛ *چیتود* (Chitwood, 1949) *نیل* (Neal, 1889) *M. arenaria*؛ و *چیتود* (Chitwood, 1949) *M. hapla* انتشار جهانی داشته (*ایسنباک* و همکاران، ۱۹۸۱) (Eisenback *et al.*, 1981) و از لحاظ اقتصادی بسیار مهم و دارای دامنه میزبانی وسیعی در حدود ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ گونه گیاهی شامل سبزیجات، گیاهان زراعی و حتی برخی درختان است *آباد* و همکاران (Abad *et al.*, 2003).

در ایران، این نماتد برای اولین‌بار در سال ۱۳۳۵ توسط شریف از روی ریشه گوجه‌فرنگی در قصرشیرین مشاهده و گزارش شد *بهداد* (Behdad, 1982). *ابیوردی* و همکاران (Abivardi *et al.*, 1979) به‌منظور بررسی وجود این نماتد در مناطق مختلف استان فارس، ۶۹۵ نمونه از ۲۰۷ روستا جمع‌آوری کردند که مشخص گردید این نماتد در همه‌ی بخش‌ها و شهرستان‌های استان وجود دارد و در مجموع ۳۸ درصد از آلودگی نماتدی را در استان ایجاد کرده است. همچنین مشخص شد که بیشترین انتشار و پراکندگی مربوط به گونه *M. javanica* است که گسترش آن در مزارع به ۷۸ درصد بالغ می‌گردد. در درجه بعدی، گونه *M. incognita* با فراوانی ۱۷ درصدی و در نهایت گونه *M. hapla* با فراوانی ۵ درصدی قرار گرفتند. *اخیانی* و همکاران (Akhiani *et al.*, 1984) تحت پوشش پروژه بین‌المللی IMP، طی ۵ سال با همکاری موسسه باغبانی دانشگاه اصفهان و دانشگاه کارولینای شمالی برای شناسایی، بوم‌شناسی و مبارزه علیه نماتد مولد گره ریشه بر روی بیش از یک هزار نمونه بررسی‌های جامعی در سطح کشور انجام دادند. در این تحقیق مشخص گردید که گونه *M. javanica* رایج‌ترین گونه در سطح کشور است و پس از آن به‌ترتیب گونه‌های *M. incognita*، *M. hapla* و *M. arenaria* قرار دارند. همچنین نژاد ۲ گونه *M. incognita* و نژاد ۱ گونه *M. arenaria* در میان جمعیت‌ها غالب هستند.

برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها و نژادهای جنس *Meloidogyne*، علاوه‌بر خصوصیات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، سیتولوژیک، اکولوژیک و بیماری‌زایی بر روی میزبان‌های افتراقی، از روش‌های مولکولی نیز استفاده می‌شود. در تشخیص نماتدهای مولد گره ریشه، DNA کروموزومی، DNA میتوکندریایی و DNA ریبوزومی هر سه به‌عنوان ابزاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بررسی و مطالعه مستقیم ژنوتیپ نماتدها علاوه‌بر این که شناسایی آن‌ها را ممکن می‌سازد، منابع اطلاعاتی مهمی نیز جهت بررسی روابط تکاملی و خویشاوندی بین گروه‌های مختلف فراهم می‌سازد *زیجلسترا* و همکاران، (Zijlstra *et al.*, 2000).

کوران و وبستر (Curran and Webster, 1987) با استفاده از آنزیم محدودکننده EcoRI، DNA جمعیت‌های مختلف گونه‌های *M. hapla*، *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. javanica* را برش داده و تفرق ژنوتیپی آن‌ها را براساس اختلاف طول قطعات DNA مشخص نمودند. *سنیس* (Cenis, 1992)، DNA چهار گونه عمده *Meloidogyne* را با استفاده از روش PCR-RAPD مورد استفاده قرار داد. از طریق تجزیه RFLP توسط *زو* و همکاران (Xue *et al.*, 1993) و *هیات* و همکاران (Hiatt *et al.*, 1995)، گونه‌های *Meloidogyne* براساس DNA هسته‌ای تفکیک و تمایز یافته‌اند. *پلوکوین* و همکاران (Peloquin *et al.*, 1993) دو جدایه از *M. hapla* را با شناسایی ژنوم میتوکندریایی آن‌ها مورد بررسی قرار دادند. *فارگته* و همکاران (Fargette *et al.*, 1997) تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *Meloidogyne* و جمعیت‌های داخل یک گونه در مناطق گرمسیری را با استفاده از روش RFLP مورد بررسی قرار دادند. در گونه *M. arenaria* با این که نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی یکسان بودند، بیشترین تنوع درون گونه‌ای مشاهده شد ولی تنوع در گونه *M. incognita* و *M. javanica* کم بود. علی‌رغم این که نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی متفاوت جمع‌آوری شده بودند. *بلوک* و همکاران (Blok *et al.*, 1997a) توالی ناحیه IGS بین ژن‌های ۱۸s و ۵s DNA ریبوزومی گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. javanica* را با چندین جمعیت از گونه *M. mayaguensis* *راما و هیرشمن* (Rammah and Hirschmann, 1988) و یک جمعیت از *M. hapla* را به وسیله PCR مورد مقایسه قرار دادند. *بلوک* و همکاران (1997b) تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *Meloidogyne* در مناطق گرمسیری و جمعیت‌های داخل یک گونه را براساس روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند. در مورد گونه *M. arenaria* بیشترین تنوع داخل گونه وجود داشت که با تعداد کمی آغازگر اختصاصی قابل تشخیص بود. همچنین مشخص شد که بعضی از جمعیت‌های *M. arenaria* بسیار نزدیک به *M.*

javanica هستند. *زیجلسترا* و همکاران (2000) برای تفکیک سه گونه *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. javanica* در جمعیت‌های مخلوط، روش ITS-RFLP را به‌کار بردند.

دونگ و همکاران (Dong *et al.*, 2001) جهت طراحی و تولید آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های *M. incognita*، *M. hapla*، *M. arenaria* و *M. javanica* از روش RAPD-PCR استفاده کردند. آن‌ها ۲۶ جمعیت مختلف از کشورهای اروپایی و آفریقایی را توسط ۱۲۰ آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار دادند. چندشکلی‌های به‌دست آمده بین این تصادفی مورد بررسی قرار دادند. چندشکلی‌های به‌دست آمده بین این را کلون و تعیین توالی کردند و براساس توالی‌های به‌دست آمده آغازگر اختصاصی گونه تعیین گردید. *فوری* و همکاران (Fourie *et al.*, 2001) گونه‌های مختلف نماتد مولد گره ریشه را در افریقای جنوبی شناسایی و به‌وسیله روش‌های ITS-PCR و SCAR-PCR از یکدیگر تفکیک نمودند. *پاورز و هاریس* (Powers and Harris, 2005) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پنج گونه *Meloidogyne* را شناسایی کردند. *تیساروا* و همکاران (Tesarova *et al.*, 2008) جهت شناسایی اختصاصی گونه *M. incognita* از دیگر گونه‌های این جنس، از آغازگر ۲۰ نوکلیوتیدی اختصاصی گونه استفاده کردند و بعد از انجام واکنش PCR تولیدات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱ درصد، الگوی نواری ۵۰۲ جفت بازی را در جمعیت‌های مختلف *M. incognita* ایجاد کردند.

در ایران، *مهدیخانی‌مقدم* و همکاران (Mehdikhani Moghaddam *et al.*, 2006) با استفاده از PCR-RFLP بیست جمعیت از گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* را با یکدیگر مقایسه کردند. *عسکریان* و همکاران (Askarian *et al.*, 2006 and 2009) با استفاده از مورفولوژی، میزبانان افتراقی و همچنین روش‌های مولکولی RFLP و RAPD، نماتد ریشه‌گرهی انگل ریشه پسته، *M. javanica*، در استان کرمان را تشخیص دادند. با توجه به این که تاکنون از روش SCAR برای شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی استفاده نشده است و از طرف دیگر در استان کهگیلویه و بویراحمد نیز تعیین گونه غالب با استفاده از روش‌های دقیق شناسایی صورت نگرفته است، این تحقیق طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه گرهی از گلخانه‌های زیر کشت گوجه‌فرنگی در منطقه سردسیری استان جمع‌آوری شد. از نمونه‌های آلوده جهت استخراج لارو سن دوم و ماده‌های بالغ به‌منظور خالص‌سازی و تکثیر نماتد در گلخانه استفاده گردید. شناسایی گونه‌ی نماتد جدا شده از ریشه براساس مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لاروهای سن دو و همچنین خصوصیات نقوش کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها صورت گرفت *هارتمن و ساسر*، (Hartman and Sasser, 1985). پس از تفریخ تخم‌ها، جهت کشتن و ثابت کردن لاروهای سن دوم از روش تکمیل شده *دگریسه* (De Grisse, 1969) استفاده گردید. پس از تهیه اسلاید، مشخصات لاروهای سن دوم و شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده با استفاده از میکروسکوپ اولیمپوس مورد بررسی قرار گرفت.

در آزمایش مولکولی، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، براساس روش *زیجلسترا* و همکاران (2000) سه جفت آغازگر اختصاصی inc، ar و jav انتخاب شده براساس تعیین توالی نواحی به‌دست آمده از نشانگر RAPD تکثیر شدند. با کمک کیت استخراج DNA، از مخلوط لاروهای سن دوم و تخم هر کدام از جمعیّت‌ها DNA از ژنوم استخراج شد. پس از استخراج DNA، جهت ارزیابی کمی و کیفی DNA، از الکتروفوز افقی و اسپکتروفتومتر استفاده شد. در این روش با استفاده از دستگاه بیوفتومتر شرکت اپندورف (Eppendorf AG no. 613104423) میزان اسیدنوکلئیک هر نمونه مشخص شد. ابتدا به کمک آب مقطر سترون، دستگاه در عدد صفر تنظیم شد و سپس دو میکرولیتر از DNA هر نمونه با ۴۸ میکرولیتر آب مقطر سترون رقیق گردید و با اندازه‌گیری ضریب نوری در ۲۶۰ نانومتر برای اسیدنوکلئیک، غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

ضریب رقت ×۵۰ × مقدار جذب نور در ۲۶۰ نانومتر = غلظت DNA (ng/ul)

مناسب‌ترین نسبت جذب نور جهت انجام PCR عدد ۱/۷ تا ۱/۹ در نظر گرفته شد. پس از تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از هر نمونه، با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر مورد نیاز میزان غلظت DNA در تمام نمونه‌ها در حدود ۲۵ نانو گرم در میکرولیتر تنظیم گردید. پس از بهینه کردن کلیه پارامترهای مربوط به واکنش PCR، حجم نهایی مخلوط برای هر واکنش در آب دیونیزه ۳۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. میزان مورد نیاز هر یک از اجزاء در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری شامل: ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ پیکومول، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر رفت ۱۰ پیکومول، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت ۱۰ پیکومول، ۲۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و کیت لیوفیلیزه PCR است. توالی آغازگرهای

مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ آورده شده است کرجه و همکاران (Karajeh *et al.*, 2010).

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی: یک چرخه واسرشت اولیه به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشت ثانویه به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، بسط اولیه به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، یک چرخه بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، صورت پذیرفت. از ژل‌های آگارز و پلی‌آکریل‌آمید برای جداسازی قطعات تکثیر شده استفاده گردید. پس از تکمیل واکنش PCR، فرآورده‌های PCR به‌همراه سایز مارکر نردبانی 1kb (DNA ladder lambada 1kb) با محدوده ۳۰۰۰-۱۰۰ جفت‌باز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶٪ در بافر TBE 1X با ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۴ ساعت الکتروفورز گردید. عمل رنگ‌آمیزی در سه مرحله با سه محلول اسیداستیک ۱۰ درصد، نیترات‌نقره و کربنات‌سدیم انجام پذیرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل و ظهور باندها، عکس‌برداری در دستگاه UV Transilluminator انجام شد. در مورد ژل آگارز، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE بارگیری شد. برای تخمین اندازه‌ی قطعات تولیدی نشانگر (EcoRI Roche MIII) در اولین چاهک ژل بارگیری گردید. دستگاه الکتروفورز به منبع برق با ولتاژ ۱۰۰ ولت متصل و به‌مدت ۲ ساعت اجرا گردید. جهت رنگ‌آمیزی ژل، پس از اتمام الکتروفورز ژل به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم‌بروماید قرار گرفت. پس از شستشوی ژل با آب مقطر، تصویربرداری به طریق معمول و در دستگاه ژل‌داک به کمک نور ماوراءبنفش صورت گرفت.

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی SCAR مورد استفاده در شناسایی گونه و نژاد *Meloidogyne*

Table 1: Primers and their sequences used in identification of *Meloidogyne* species

نام آغازگر Primer	توالی (5' to 3') Sequence	اندازه SCAR بر حسب جفت باز (bp) Size of the SCAR
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420
Rar	TCGGCGATAGACATACAACT	
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGCC	1200
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAAG	
Fjav	GGTGCGCGATTGAACAGAGC	670
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC	

نتایج و بحث

براساس نتایج مطالعات ریخت‌سنجی (جدول ۲) و مشخصات لارو سن دو و نقوش انتهایی بدن نماتد ماده بالغ (شکل ۱)، گونه موجود در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی منطقه مورد بررسی، *M. javanica* تشخیص داده شد که مشخصات آن با شرح جیپسون (Jepsson, 1987) مطابقت دارد. در آزمایشات مولکولی، دو آغازگر ar و inc باندهای غیراختصاصی تولید کردند اما باندهای اختصاصی در نشانگر jav تکثیر نگردید. جفت آغازگر jav یک قطعه ۶۷۰ جفت‌بازی را در کلیه جدایه‌ها تکثیر نمود و جمعیّت‌های مورد بررسی را از دو گونه *M. incognita* و *M. arenaria* متمایز کرد (شکل ۲). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط *زیجلسترا* و همکاران (2000) مطابقت دارد. ایشان پس از استخراج DNA از توده تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ، با استفاده از جفت آغازگر OPQFjav/ OPARjav و تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی، گونه *M. javanica* را از دیگر گونه‌ها متمایز نمودند و ثابت کردند که این روش به سن و مرحله سنی نماتد بستگی ندارد و می‌تواند برای شناسایی سریع، قابل اعتماد و همیشگی این گونه مورد استفاده قرار گیرد.

آغازگر اختصاصی jav قطعه ۶۷۰ جفت بازی را تکثیر نمود (شکل ۳). این نتیجه با نتایج *دانگ* و همکاران (2001) مطابقت دارد. ایشان ۲۶ جمعیت مختلف نماتد ریشه‌گرهی را از کشورهای اروپایی و آفریقایی جمع‌آوری کردند و پس از استخراج DNA، با انجام واکنش PCR با آغازگر اختصاصی Mjavf/ Mjavr، قطعه ۶۷۰ جفت بازی را در جمعیّت‌های *M. javanica* به‌دست آوردند و بدین ترتیب گونه *M. javanica* را براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و فنوتیپ آنزیمی شناسایی نمودند. این آغازگرها روی جمعیت‌های دیگری از امریکای شمالی نیز آزمایش گردید و نتایج مشابهی را در برداشت. لذا این جفت آغازگر برای شناسایی گونه *M. javanica* در کتابخانه نماتدشناسی ثبت گردید. با توجه به نتایج این تحقیق، در کنار روش‌های ریخت‌شناسی که مشکل، وقت‌گیر و نیازمند مهارت و

توانایی زیاد می‌باشد و همچنین روش‌های بیوشیمیایی که وقت‌گیر است و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و از طرف دیگر نیازمند مقادیر نسبتاً فراوانی از موجود زنده و مرحله خاصی از چرخه نماتد هستند، می‌توان جهت شناسایی گونه *M. javanica* از این آغازگرها استفاده کرد.

جدول ۲: مشخصات ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لاروهای سن دوم گونه *Meloidogyne javanica* جداشده از گلخانه‌های منطقه سردسیری استان کهگیلویه و بویراحمد

Table 2: Morphometrical characteristics of adult female and second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*, isolated from glasshouses in cold regions of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province

پارامترها Parameter	لاروهای سن دوم Second stage juveniles	ماده بالغ Adult female
طول بدن Body length (L)	395-420	690-964
عرض بدن Body width (W)	9-11	350-530
نسبت طول بدن به عرض بدن Ratio of body length to body width	27.2-55.5	-
نسبت طول بدن به طول مری Ratio of body length to the length of the esophagus	4.8-5.4	-
نسبت طول بدن به طول دم Ratio of body length to tail length	7.6-8.7	-
نسبت طول دم به عرض دم در ناحیه مخرج Tail length, tail length to width ratio in the denominator	4.8-6.2	-
طول استایلت Stylet length	10.5-13	15.5-18
طول گره استایلت Length of stylet knob	1-1.6	2-3
عرض گره استایلت Width of stylet knob	2-2.4	2-5
فاصله محل ریزش غده پشتی مری از گره استایلت DGO	2.5-4	3-6
فاصله سر تا مجرای دفعی-ترشحی Head to Ex. Pore	-	42-47
فاصله سر تا وسط حباب میانی مری Head to center of MB	-	90-96
طول شکاف تناسلی Length of vulval slit	-	18-30
فاصله مخرج تا شکاف تناسلی Anus to vulva	-	12-32
فاصله بین دو فاسمید Distance between two phasmids	-	20-30
طول دم Tail length (TL)	46-57	-
طول ناحیه شفاف دم Hyaline length of tail	11-16	-
تعداد خطوط جانبی No. of lateral lines	4	-

* اندازه‌ها به جز نسبت‌ها به میکرومتر

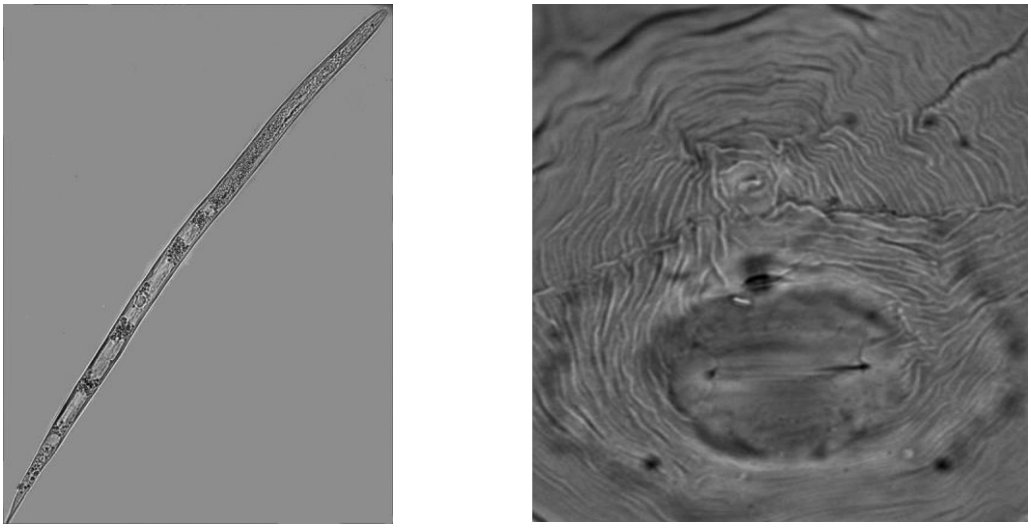
* measurements in micrometer

پژوهش‌های *عسکریان* و همکاران (2009) در کرمان نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد که تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی در مورد *M. javanica* گزارش شده است. با توجه به نتایج بررسی‌های *کرجه* و همکاران (Karajeh *et al.*, 2010)، که SCAR- PCR را به‌عنوان بهترین روش برای شناسایی گونه‌ها و نژادهای *Meloidogyne* ارزیابی کرده‌اند، این روش برای تشخیص گونه در جدایه‌های منطقه مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه نتایج به‌دست آمده در این آزمایش با آزمایشات انجام شده در سایر مناطق ایران بیانگر این است که این روش برای شناسایی گونه‌های جنس مناسب است لیکن این آغازگر برای تعیین تنوع درون گونه‌ای مناسب نیست زیرا قطعات تکثیر شده توسط این آغازگر در مناطق دور تفاوتی نشان نمی‌دهند. پیشنهاد می‌گردد که جمعیت‌های گونه *M. javanica* جدا شده از مناطق مختلف با استفاده از نشانگرهای

دیگری مورد مقایسه قرار گیرند تا تنوع احتمالی موجود در بین جمعیّت‌های مختلف مشخص گردد.

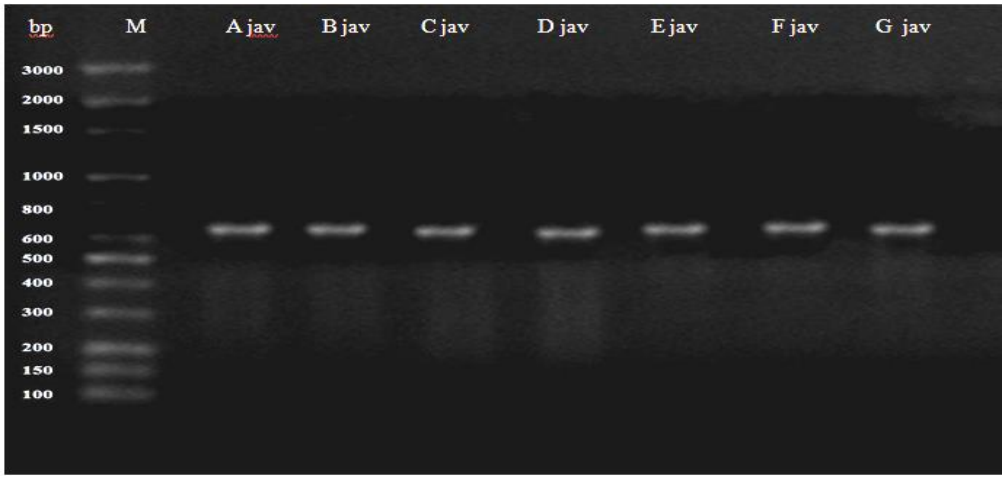
سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری خانم مهندس فرحناز ایمانی‌خواه که در مراحل مختلف تحقیق همکاری فراوان داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود. از داوران محترم مجله فنآوری زیستی در کشاورزی که با دقت فراوان مقاله را مطالعه کرده نکات بسیار ارزشمندی را یادآوری و به بهبود آن کمک بسیار ارزشمندی نمودند، نهایت سپاس را داریم.



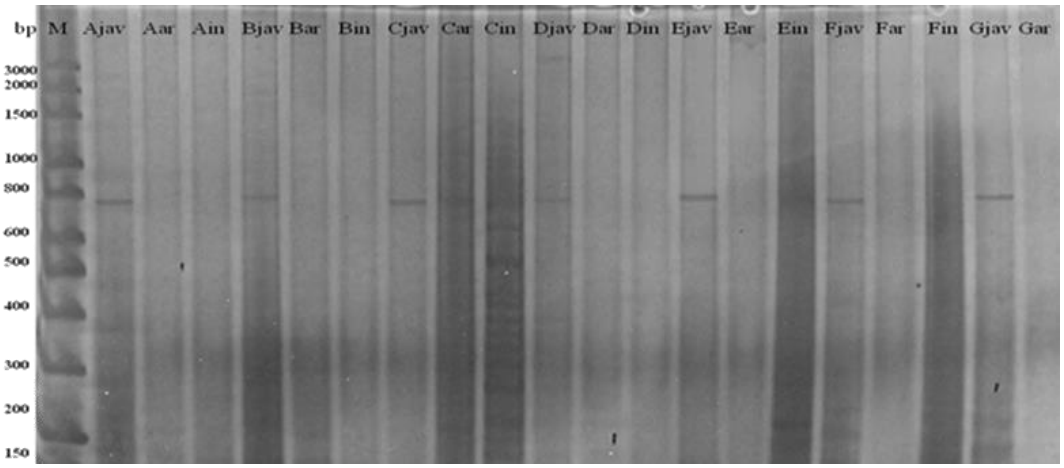
شکل ۱: نقوش کوتیکولی انتهای بدن (راست) و نماتد جوان سن دوم (چپ) نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* جمع‌آوری شده از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی مناطق سردسیری استان کهگیلویه و بویراحمد

Fig. 1: Second stage juvenile (left) and perineal pattern (right) of *Meloidogyne javanica*, isolated from tomato glasshouses in cold regions of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province



شکل ۲: تکثیر باند ۶۷۰ جفت بازی با نشانگر SCAR- PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی jav از جدایه‌های نماتد ریشه‌گرهی در ژل آگارز یک درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ A: جدایه مزدک؛ B: جدایه شرف‌آباد ۱؛ C: جدایه شرف‌آباد ۲؛ D: جدایه چنارستان؛ E: جدایه دشتروم؛ F: جدایه نره‌گاه؛ G: جدایه مختار

Fig. 2: Amplification of 670 bp bands in SCAR- PCR using specific primer jav from root-knot nematode isolates in 1% agarose gel. M: Molecular marker 100 bp; A: Mazdak isolate; B: Sharafabad isolate 1; C: Sharafabad isolate 2; D: Chenarestan isolate; E: Dashtroom isolate; F: Narehgah isolate; G: Mokhtar isolate



شکل ۳: تکثیر DNA الگو جدایه‌های نماتد ریشه‌گرهی با نشانگر SCAR- PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی in، ar و jav در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ A: جدایه مزدک؛ B: جدایه شرف‌آباد ۱؛ C: جدایه شرف‌آباد ۲؛ D: جدایه چنارستان؛ E: جدایه دشتروم؛ F: جدایه نره‌گاه؛ G: جدایه مختار

Fig. 3: Amplification of template DNA by SCAR- PCR using specific primers in, ar and jav from root knot nematode isolates in 6% polyacrylamide gel. M: Molecular marker 100 bp; A: Mazdak isolate; B: Sharafabad isolate1; C: Sharafabad isolate 2; D: Chenarestan isolate; E: Dashtroom isolate; F: Narehgah isolate; G: Mokhtar isolate

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.