

نخستین گزارش گونه‌ی *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 از

نارنگی در ایران

پیام عیسوند^۱، رضا فرخی نژاد^۲ و صدیقه عظیمی^{۳*}

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۲- استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۳- *نویسنده مسوول: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
(s.azimi@scu.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۱۸

چکیده

نماتد ریشه‌گرهی انگل اجباری گیاهان است که تعداد زیادی از گیاهان آوندی را در سراسر جهان مورد حمله قرار می‌دهد و از نظر اقتصادی بسیار مهم می‌باشد. در طی بررسی تنوع زیستی نماتدهای انگل گیاهی در باغ‌های مرکبات استان خوزستان در سال ۹۷-۱۳۹۶، یک جمعیت نماتد ریشه‌گرهی از نمونه خاک و ریشه نارنگی جمع‌آوری شد. ماده‌های بالغ و لارو سن دو از ریشه‌های آلوده استخراج گردید. بعد از کشتن و ثابت کردن نماتدها، اسلاید دائم تهیه شد. شناسایی گونه با استفاده از کلیدهای معتبر صورت گرفت. DNA ژنومی از لارو سن دو و ماده‌های بالغ استخراج گردید. DNA استخراج شده توسط جفت آغازگر ناحیه D2/D3 از ژن 28S و جفت آغازگرهای ناحیه 18S تکثیر و توالی‌یابی شد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و تجزیه و تحلیل فیلوژنی نواحی تکثیر شده، گونه *M. javanica* شناسایی گردید. تفاوت‌های ریخت‌شناختی جمعیت به‌دست آمده با سایر جمعیت‌های این گونه مورد بحث قرار گرفت. در این مطالعه دو قطعه ۷۹۹ جفت بازی توسط آغازگرهای ناحیه 28S و دو قطعه ۱۶۷۸ جفت بازی توسط آغازگرهای ناحیه 18S تولید شد. بر اساس منابع موجود، این اولین گزارش از آلودگی نارنگی به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* در ایران می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ریخت‌سنجی، ریخت‌شناختی، فیلوژنی، مرکبات، نماتد ریشه‌گرهی

مقدمه

مرکبات کل کشور حدود ۲۹۷۸۶۹ هکتار می‌باشد که ۲۵۷۳۱۰ هکتار درختان بارور مرکبات و ۴۰۵۵۸ هکتار غیربارور هستند. میزان تولید کل مرکبات کشور ۵۱۱۳۶۵۵ تن می‌باشد. استان خوزستان ۲/۵ درصد از اراضی بارور و ۱/۴۶ درصد سهم از تولید مرکبات کشور را دارا می‌باشد و از نظر میزان تولید، رتبه ششم را در بین استان‌های

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان هستند که فقط جنس‌های *Citrus*، *Poncirus* و *Fortunella* جنبه اقتصادی داشته و از اهمیت ویژه‌ای در کشورهای تولیدکننده مرکبات برخوردار هستند (Wu et al., 2014). سطح زیر کشت

تشخیص گونه‌های نماتدهای ریشه‌گرهی مورد استفاده قرار گرفت (Hyman, 1990, Adam et al., 2007). داده‌های ریخت‌شناختی در صورت ترکیب با داده‌های مولکولی، امکان بهتری برای شناسایی گونه را فراهم می‌کند. بهترین روش شناسایی، ترکیب اطلاعات ریخت‌شناختی، آیزوزایم، مولکولی، میزبان، تولیدمثل و تعداد کروموزوم است (Karssen and Moens, 2006). اولین مطالعه مولکولی برای شناسایی گونه‌های *M. hapla incognita* و *M. javanica* با استفاده از روش PCR-RFLP انجام شد (Harris et al., 1990). با تکثیر ناحیه بین سیتوکروم اکسیداز II و ژن 16S ریبوزوم میتوکندریایی، گونه‌های *M. incognita*، *M. hapla*، *M. javanica*، *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, و *arenaria* Santo & Finley, 1980 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آنزیم‌های محدود کننده شناسایی گردید (Powers and Harris, 1993). ناحیه ITS rDNA به عنوان ناحیه مناسب برای شناسایی گونه‌های مختلف *Meloidogyne* توصیف و با استفاده از این ناحیه، گونه‌های *M. incognita*، *M. hapla*، *M. javanica*، *M. arenaria*، *M. chitwoodi*، *M. konaensis* Eisenback, Bernard & Schmitt, 1995 و *mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988 و *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965 شناسایی گردید (Powers et al., 1997). با ترکیب روش‌های RFLP-PCR و SCAR-PCR، هفت گونه نماتد ریشه‌گرهی از هم تفکیک شدند (Adam et al., 2007). از روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی برای شناسایی جمعیتی از *M. arenaria* استفاده شده است (Skantar et al., 2008). هفت گونه *M. incognita*، *M. hapla*، *M. javanica*، *M. arenaria* و *M. fallax* Karssen, 1996 *chitwoodi*

تولیدکننده مرکبات به خود اختصاص داده است (Ahmadi et al., 2019). طیف وسیعی از نماتدهای انگل گیاهی همراه با فراریشه مرکبات گزارش شده است اما فقط تعدادی از آنها باعث خسارت به درختان مرکبات می‌شوند (Verdejo-Lucas and McKenry, 2004). نماتد ریشه‌گرهی اولین بار توسط برکلی^۱ (۱۸۵۵) در ارتباط با خیار گلخانه‌ای گزارش شد (Garcia and Sanchez-Puerta, 2012; Jones et al., 2013). معمولاً علائم قسمت‌های هوایی گیاه در اثر آلوده شدن به نماتد ریشه‌گرهی نادیده گرفته می‌شوند زیرا اغلب شبیه علائم ناشی از خشکسالی، کمبود مواد مغذی و یا سایر تنش‌های زیستی است (Coyne et al., 2014). نماتد ریشه‌گرهی مهم‌ترین نماتد انگل گیاهی در سراسر جهان است که کیفیت و عملکرد سالانه محصول را حدود ۱۵۷ میلیون دلار کاهش می‌دهد (Onkendi et al., 2014). تاکنون ویژگی‌های بیش از ۹۷ گونه *Meloidogyne* شرح داده شده است اما گونه‌های *M. arenaria*، (Neal, 1949) *M. incognita*، (Kofoid, 1889) Chitwood, 1949 *M. javanica*، (White, 1919) Chitwood, 1949 *M. hapla*، (Treub, 1885) Chitwood, 1949 *M. chitwoodi* از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین و گسترده‌ترین گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی هستند (Hunt and Handoo, 2009).

شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* عمدتاً بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی از جمله مشخصات شبکه کوتیکولی انتهای بدن، شکل مری در ماده‌ها و همچنین چندین ویژگی لاروسن دواست (Hunt and Handoo, 2009). در سال‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ روش‌های بیوشیمیایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و روش هضم آنزیمی به‌عنوان مکمل روش شناسایی برای

ریشه آلوده به نماتد ریشه گرهی از میزبان نارنگی در شهرستان دزفول جمع آوری گردید. برای تشخیص گونه، از انتهای بدن نماتد ماده برش تهیه گردید. برای این منظور ابتدا ریشه‌ها ۲۴ ساعت در آب قرار داده شدند. سپس ضمن بررسی نمونه‌های ریشه در زیر استرئومیکروسکوپ، تک کیسه تخم از گال‌های ریشه جدا و در مجاورت ریشه‌ی نشاء‌های گوجه‌فرنگی رقم حساس روتگرز قرار داده شدند. برای تکثیر جمعیت خالص مورد نیاز، نشاء‌های مایه‌زنی شده به مدت ۶۰ روز در شرایط مساعد گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و آبیاری مناسب نگهداری شدند. نماتدهای بالغ و کیسه تخم آنها از ریشه استخراج و درون یک تشتک پتری حاوی آب مقطر قرار داده شدند. نماتد ماده را روی یک صفحه پلاستیکی، طلق یا درون تشتک پتری قرار داده و سپس گردن نماتد توسط یک اسکالپل تیز برش داده شد. بعد از آن، قسمت برش داده شده توسط یک سوزن فشار داده شد تا محتویات بدن نماتد خارج گردد. کوتیکول برش داده شده را در اسید لاکتیک ۴۵ درصد قرار داده و کوتیکول توسط یک تیغ تیز از نیمه قطع شد و سپس برش به شکل یک مربع آراسته شد و به گلیسرین روی لام منتقل گردید (Hartman and Sasser, 1985). کیسه‌های تخم ماده‌ها به طور جداگانه در آب مقطر قرار داده شد. پس از تفریح تخم‌ها، جهت کشتن و ثابت کردن لاروهای سن دوم، از روش تکمیل شده دگریسه استفاده شد و اسلاید میکروسکوپی دائمی تهیه گردید (De Grisse, 1969). پس از تهیه اسلاید از لاروهای سن دوم و شبکه کوتیکولی انتهای بدن، با استفاده از میکروسکوپ Olympus CX31 مجهز به لوله ترسیم، مشخصات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنی:

برای استخراج DNA ابتدا یک نماتد ماده بالغ و یا لارو، ۳ تا ۴ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد و بعد مقدار ۸ تا ۱۰ میکرولیتر بافر AE (حاوی 10 mM Tris-Cl, 0.5 mM

enterolobii Yang & Eisenback, 1983 با استفاده از Multiplex PCR شناسایی گردید، این روش سریع بوده و باعث صرفه جویی در زمان می‌شود (Kiewnick et al., 2013). با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و تکثیر ناحیه ITS، ویژگی‌های درون‌گونه‌ای چند جمعیت *M. graminicola* مورد بررسی قرار گرفت که علی‌رغم تفاوت‌های ریخت‌شناختی، این جمعیت‌ها متعلق به گونه *M. graminicola* بودند (Salalia et al., 2017).

جمعیت دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* در ایران با استفاده از RFLP-PCR و آنزیم محدود کننده مورد مقایسه قرار گرفت (Mahdikhani-Moghadam et al., 2007). گونه *M. javanica* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی از استان کرمان شناسایی گردید (Askarian et al., 2009). دو گونه *M. javanica* و *M. cruciani* Garcia-Martinez, Taylor & Smart, 1982 با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی شناسایی گردید و تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای آنها مورد بررسی قرار گرفت (Rafiee et al., 2010). خصوصیات ریخت‌سنجی، ریخت‌شناسی و تنوع درون گونه‌ای *M. javanica* در شمال ایران مورد مطالعه قرار گرفته است (Hesar et al., 2011). هدف از مطالعه حاضر شناسایی ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جمعیتی از گونه *M. javanica* که برای نخستین بار از ریشه نارنگی در ایران استخراج شده بود و بررسی مولکولی آن بر اساس نواحی ژنی D2-D3 از 28S rDNA و 18S rDNA بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، استخراج و تهیه اسلاید میکروسکوپی از نماتد:

طی نمونه‌برداری‌هایی که در سال ۹۷-۱۳۹۶ از باغ‌های مرکبات استان خوزستان صورت گرفت، یک نمونه خاک و

برای واکنش PCR ابتدا واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. سپس سیکل‌های واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه تکرار گردید و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Pedram et al., 2011).

پس از انجام واکنش، از محصول PCR هر نمونه، سه میکرولیتر برداشته و با دو میکرولیتر از محلول رنگی مخلوط شد و روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

EDTA با pH = 9.0) بسته به اندازه نماتد روی یک لام سترون قرار گرفت و نماتد به آن منتقل شد. به آرامی یک لامل روی آن قرار گرفت و با ضربه زدن روی لامل، نماتد له شد. سپس بافر حاوی نماتد له شده با کمک سمپلر در میکروتیوپ ۰/۲ جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- نگهداری شدند (Pedram et al., 2011). در این تحقیق از سه جفت آغازگر D2/D3، 1813F/2646R و 988F/1912R استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱، نوع و مقادیر مواد به کار رفته در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۱: نام و توالی آغازگرهای به کار رفته جهت تعیین گونه نماتد ریشه‌گرهی

Table 1: Name and sequence of primers used for identification of the root-knot nematode

Primer	Sequence	Amplified fragment	Reference
D2A	5'-ACAAGTACCGTGAGGGGAAAGTTG -3'	750	Nunn, 1992
D3B	5'- TCGGAAGGAACCAGCTACTA -3'	750	Nunn, 1992
988F	5'- CTCAAAGATTAAGCCATGC -3'	1020	Holterman et al., 2006
1912R	5'- TTTACGGTCAGAACTAGGG -3'	1020	Holterman et al., 2006
1813F	5'- CTGCGTGAGAGGTGAAAT -3'	805	Holterman et al., 2006
2646R	5'- GCTACCTTGTTACGACTTTT -3'	805	Holterman et al., 2006

جدول ۲: نوع مواد و مقادیر به کار رفته در تهیه مخلوط پایه برای واکنش PCR

Table 2: Type of materials and quantities used in preparation of base mix for PCR

Component	The concentration of the base solution	The final concentration in the reaction tube	Values in 25 µl
PCR buffer	10X	1X	2.5 µL
MgCl ₂	25 mM	2.4 mM	1.5 µl
dNTPs	10 mM mix	0.4 mM	0.5 µl
Primers	10 Pm	0.4 Pm of each primer	1µl of each primer
Taq polymerase	5 Unit/µl	0.06 Unit/µl	0.5 µl
DNA template	-	-	4 µl
Distilled water	-	-	14 µl

P. neglectus, *Pratylenchus delattrei* Luc, 1958 (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans
P. thornei Sher & Allen, و Stekhoven, 1941
 1953 به عنوان تاکسون‌های غریبه و در آنالیز فیلوژنی ناحیه
P. scribneri Steiner, *P. neglectus* 18S، گونه‌های
P. thornei و in Sherbakoff & Stanley, 1943
 به عنوان تاکسون‌های غریبه انتخاب شدند.

نتایج

Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949
مشخصات

با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی لارو سن دو و نماتد ماده و با استفاده از کلید شناسایی Eisenback and Triantaphyllou (1991) جمعیت مورد مطالعه گونه *M. javanica* تشخیص داده شد.

ماده: ماده‌های بالغ گرد تا گلابی شکل، گردن مشخص، شیری‌رنگ، سر هم‌تراز با بدن با کلاهک مشخص، شبکه کوتیکولی سر با رشد متوسط، استایلت باریک و قسمت مخروطی آن به طرف پشتی خمیده می‌باشد. گره‌های استایلت تقریباً گرد و با طول ۱/۲ تا ۲/۲ و عرض ۳ تا ۳/۶ میکرومتر، حباب میانی مری بزرگ، گرد تا بیضی شکل و دارای دریچه هلالی شکل بزرگ با طول ۱۴ تا ۱۵/۵ و عرض ۸/۵ تا ۱۰ میکرومتر در مرکز، فرج و مخرج نزدیک به هم و در انتهای بدن، شبکه کوتیکولی انتهای بدن گرد تا بیضی شکل، کمان پشتی گرد و باریک تا کمی بلند، شیارها موج‌دار تا صاف، ممتد یا شکسته، انتهای دم غالباً مشخص و خطوط سطوح جانبی بدن به طور مشخص، شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می‌کنند و فاسمیدها کمی بالاتر از مخرج و در طرفین آن قرار دارند. پوست دارای شیارهای عرضی، منفذ دفعی-ترشچی جلوتر از حباب میانی مری و غالباً بعد از انتهای استایلت قرار دارد. دستگاه تناسلی

در یک چاهک هم، نمونه‌ای از نشانگر مولکولی به میزان چهار میکرولیتر وارد شد. جریان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۱۲۰ دقیقه در ژل، از قطب منفی که چاهک‌ها قرار دارند به قطب مثبت برقرار گردید. پس از پایان حرکت قطعات روی ژل الکتروفورز، جریان قطع و الکترودها جدا گردید. سپس ژل از بافر خارج و جهت مشاهده باند‌های هدف درون دستگاه قرار داده شد تا در زیر اشعه‌ی ماورای بنفش، باندهای مورد نظر مشاهده و عکس‌برداری شوند.

خالص‌سازی محصولات PCR، توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها:

باقی‌مانده محصول PCR همراه با ۲۵ میکرولیتر آغازگر رفت و ۲۵ میکرولیتر آغازگر برگشت به شرکت ماکروژن کره جنوبی جهت توالی‌یابی ارسال شد. پس از دریافت نتایج حاصل از توالی‌یابی، ویرایش و مونتاژ توالی‌ها از طریق نرم‌افزار BioEdit ver 4.0.6.2 و Chromas ver 2.1.6 انجام شد. سپس میزان شباهت توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های مربوط به جدایه‌های شناخته‌شده با انجام عملیات جستجوی بلاست مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Larkin et al., 2007) هم‌ردیف گردیدند. ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های این آزمایش با توالی‌های مربوط به گونه‌های تاییدشده و مرجع با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و بر اساس مدل تکاملی GTR + G + I با استفاده از نرم‌افزار مگا نسخه شش (Tamura et al., 2013)، مورد ارزیابی قرار گرفت و درختان فیلوژنی آن‌ها ترسیم گردید. ارزیابی بهترین مدل برای هر گروه توالی با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد. درصد تکرار کلادها در دو میلیون بار نمونه‌گیری کاذب (بوت استراپ)، در محل ریشه کلادها درج گردید. درخت‌های فیلوژنی نواحی 28S و 18S به‌دست آمده، حاصل از آنالیز روابط فیلوژنی به ترتیب ۶۵ و ۵۱ تاکسون از جمله سه تاکسون غریبه بودند. در آنالیز فیلوژنی ناحیه 28S گونه‌های

قابل تشخیص است. شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده مورد بررسی نیز به این گونه شباهت داشت. استایلت جمعیت مورد مطالعه شبیه *M. incognita* می‌باشد با این تفاوت که در جمعیت مورد بررسی، قسمت مخروط استایلت کمی به سمت پشتی خمیده است. جمعیت مورد مطالعه همچنین شباهت‌هایی با گونه‌های *M. hapla* و *M. cruciani* دارد ولی شبکه کوتیکولی انتهای بدن جمعیت مورد نظر به دلیل نداشتن نقاط کوتیکولی اطراف مخرج، به خوبی از این دو گونه متمایز می‌گردد (Eisenback and Triantaphyllou, 1991).

مشخصات و اندازه‌های افراد نمونه با شرح‌های ارائه شده توسط Mahdikhani-Moghadam et al. (2007) و Askarian et al. (2009) مطابقت داشت. با این حال، طول شاخص VS کوتاه‌تر (۱۳ تا ۱۴ در مقابل ۱۸ تا ۳۰ میکرومتر) بود. این گونه در ایران از مناطق مختلف کشور از میزبان‌های زیادی مانند: نارنج (خوزستان و کرمان)، بادام و انجیر (لرستان)، زیتون و پسته (فارس) و انگور (مرکزی، آذربایجان شرقی و اردبیل) گزارش شده است (Ghaderi et al., 2018). این گونه در این مطالعه، از ریشه نارنگی در شهرستان دزفول در استان خوزستان جداسازی و شناسایی گردید. بر اساس منابع موجود، این گونه برای نخستین بار از نارنگی در ایران گزارش می‌شود.

تفاوت نوکلئوتیدها بین و درون جمعیت گونه‌های به کار رفته در آنالیز فیلوژنی ناحیه 18S، از صفر تا ۱/۲ درصد بود. تفاوت بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* در این ناحیه ژنی از صفر تا ۰/۹ درصد بود. تفاوت نوکلئوتیدها بین و درون جمعیت گونه‌های به کار رفته در آنالیز فیلوژنی ناحیه 28S، از صفر تا ۱/۵ درصد بود. تفاوت بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* در این ناحیه ژنی از صفر تا یک درصد بود.

دارای دو لوله جنسی در هم پیچیده که به طرف جلوی بدن کشیده شده است (شکل ۱ و ۲) (جدول ۳).

لاروهای سن دوم: کرمی شکل با بدنی کوچک و باریک که پس از تثبیت شدن به صورت کشیده یا کمی خمیده در می‌آیند. پوست با شیارهای عرضی ظریف و سطوح جانبی با چهار شیار طولی، سر هم‌تراز بدن، استایلت باریک به طول ۹ تا ۱۲ میکرومتر، گره‌های استایلت گرد، دم مخروطی شکل و انتهای آن به طور ظریفی گرد شده با طول ۴۷ تا ۵۱ میکرومتر و هیالین به طول ۹ تا ۱۳/۵ میکرومتر می‌باشد (شکل ۱ و ۲) (جدول ۳).

نوز یافت نشد.

بررسی مولکولی

برای مطالعه مولکولی جمعیت مورد نظر، ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA و ناحیه 18S تکثیر، توالی‌یابی و جهت آنالیزهای فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت. توالی تکثیری ناحیه‌های 28S و 18S این گونه پس از ویرایش به ترتیب ۷۹۹ و ۱۷۶۰ نوکلئوتید داشت. در عملیات جستجوی بلاست، توالی‌های مربوط به ناحیه 28S این نمونه، ۹۹/۳۴ درصد شباهت نوکلئوتیدی با جدایه‌ی *M. javanica* (KX646188) و توالی ناحیه 18S این نمونه ۹۹/۸۲ درصد شباهت نوکلئوتیدی با جدایه‌ی *M. javanica* (MK390613) موجود در بانک ژن نشان دادند. روابط فیلوژنی گونه مورد مطالعه با گونه‌های دیگری از این جنس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

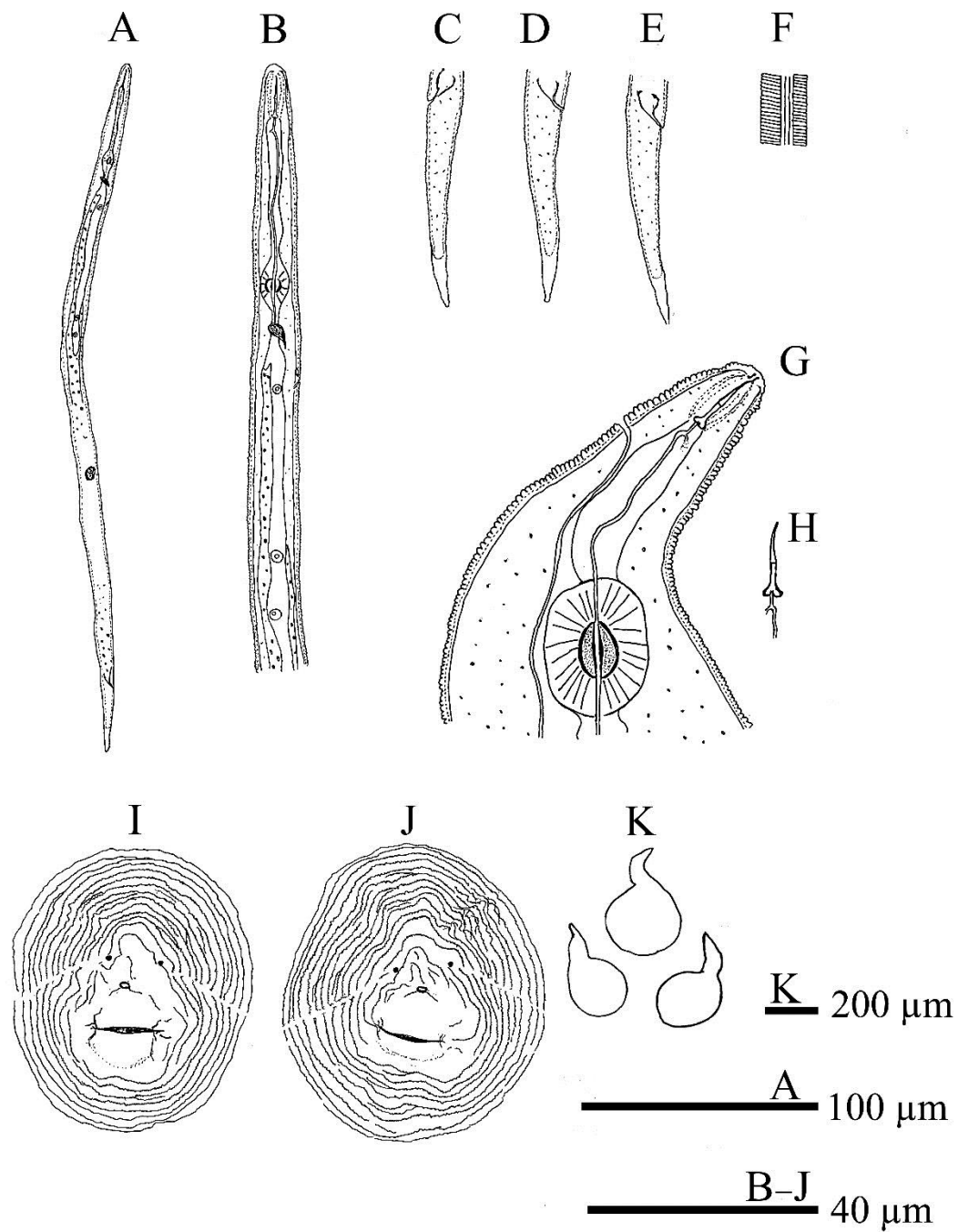
بحث و نتیجه‌گیری

شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده در گونه *M. javanica* به لحاظ داشتن دو خط موازی یکدیگر در سطوح جانبی بدن به طوری که این خطوط، شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به صورت واضحی به دو بخش پشتی و شکمی تقسیم می‌کند، از سایر گونه‌های این جنس

جدول ۳: ویژگی‌های ریخت‌سنجی *Meloidogyne javanica* جدا شده از ریشه‌های نارنگی در استان خوزستان (اندازه‌ها بر حسب میکرومتر می‌باشد)

Table 3: Morphometric characteristics of *Meloidogyne javanica* recovered from tangerine roots from Khuzestan province (All measurements are in μm)

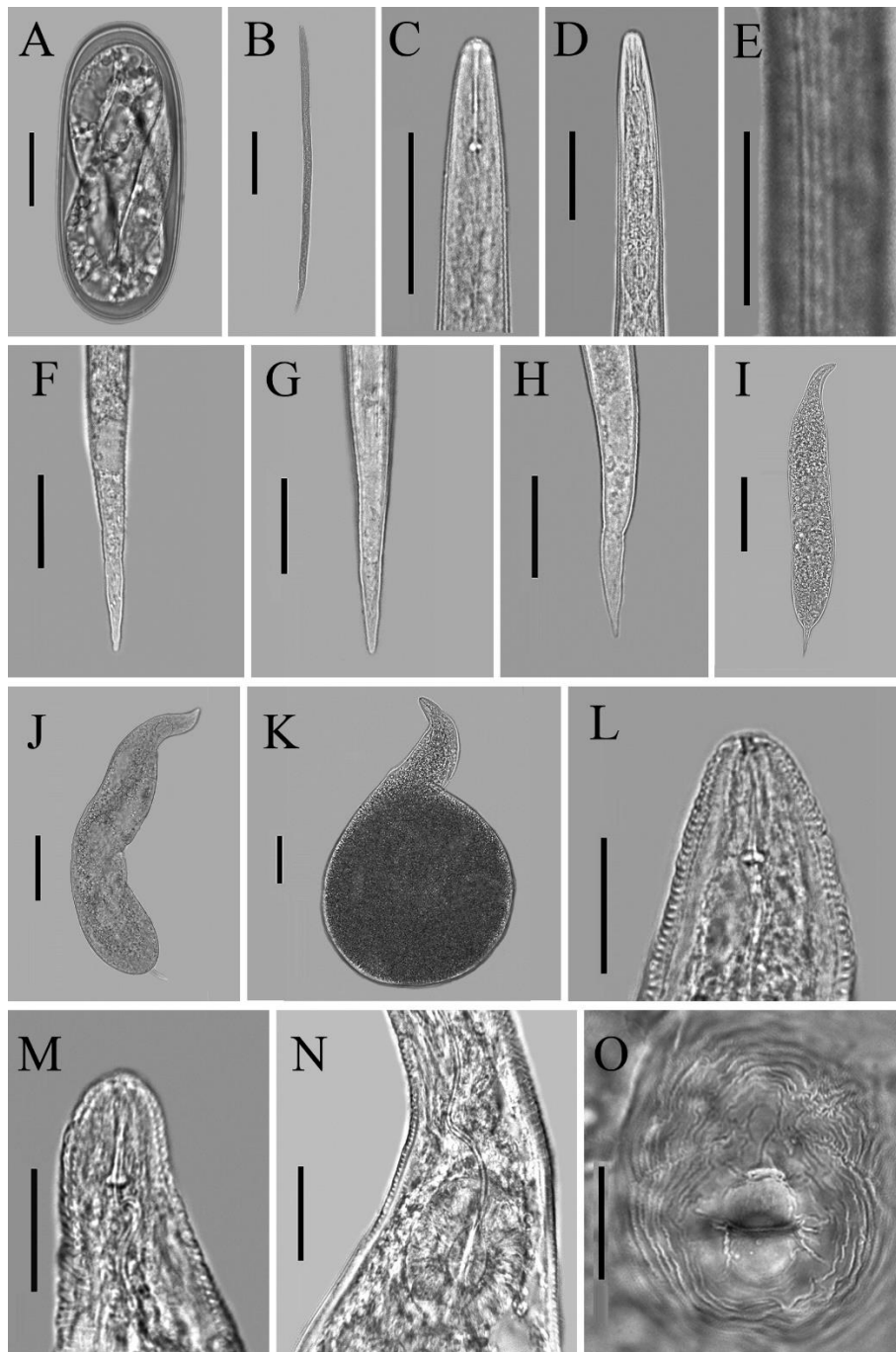
Character	Female	Second-stage juvenile
n	10	10
L	501 \pm 18.5 (463-524)	407 \pm 10.9 (392-425)
a	1.7 \pm 0.3 (1.2-2.6)	30.2 \pm 2.9 (24.6-33)
b	-	4.5 \pm 0.3 (4.2-5.3)
b'	-	3.4 \pm 0.3 (3.1-4.2)
c	-	8.3 \pm 0.4 (7.6-8.8)
c'	-	5.2 \pm 0.6 (4-6)
Greatest body diam.	274 \pm 17 (211-346)	13 \pm 0.3 (12.5-13)
Body diam. at anus	-	9 \pm 0.5 (8-10)
Head region height	-	2.3 \pm 0.1 (2.2-2.5)
Head region diam.	-	4.5 \pm 0.3 (4-5)
Stylet length	14.5 \pm 1.2 (13-16)	10.5 \pm 0.8 (9-12)
DGO	3.5 \pm 0.5 (3-4.5)	3 \pm 0.4 (3-4.5)
Head to Ex. Pore	40.5 \pm 8.3 (30-52)	75.5 \pm 2.1 (74-78)
Vulva slit length	14 \pm 0.4 (13-14)	-
Vulva-anus	11 \pm 0.2 (11-12)	-
Distance between two phasmids	13 \pm 0.1 (13-13.5)	-
Metacarpus length	32 \pm 2.5 (27-35)	-
Metacarpus diam.	28 \pm 4.5 (22-33)	-
Ant. end to end of gland lobe	166 \pm 5.8 (159-173)	-
Neck length	209 \pm 22.2 (186-232)	-
Hyaline tail	-	11.5 \pm 1.8 (9-13.5)
Tail length	-	49 \pm 1.9 (47-51)



شکل ۱: گونه *Meloidogyne javanica* لارو سن دو (A-F)، ماده (G-K). A و K: نمای کلی بدن، B و G: قسمت جلویی بدن،

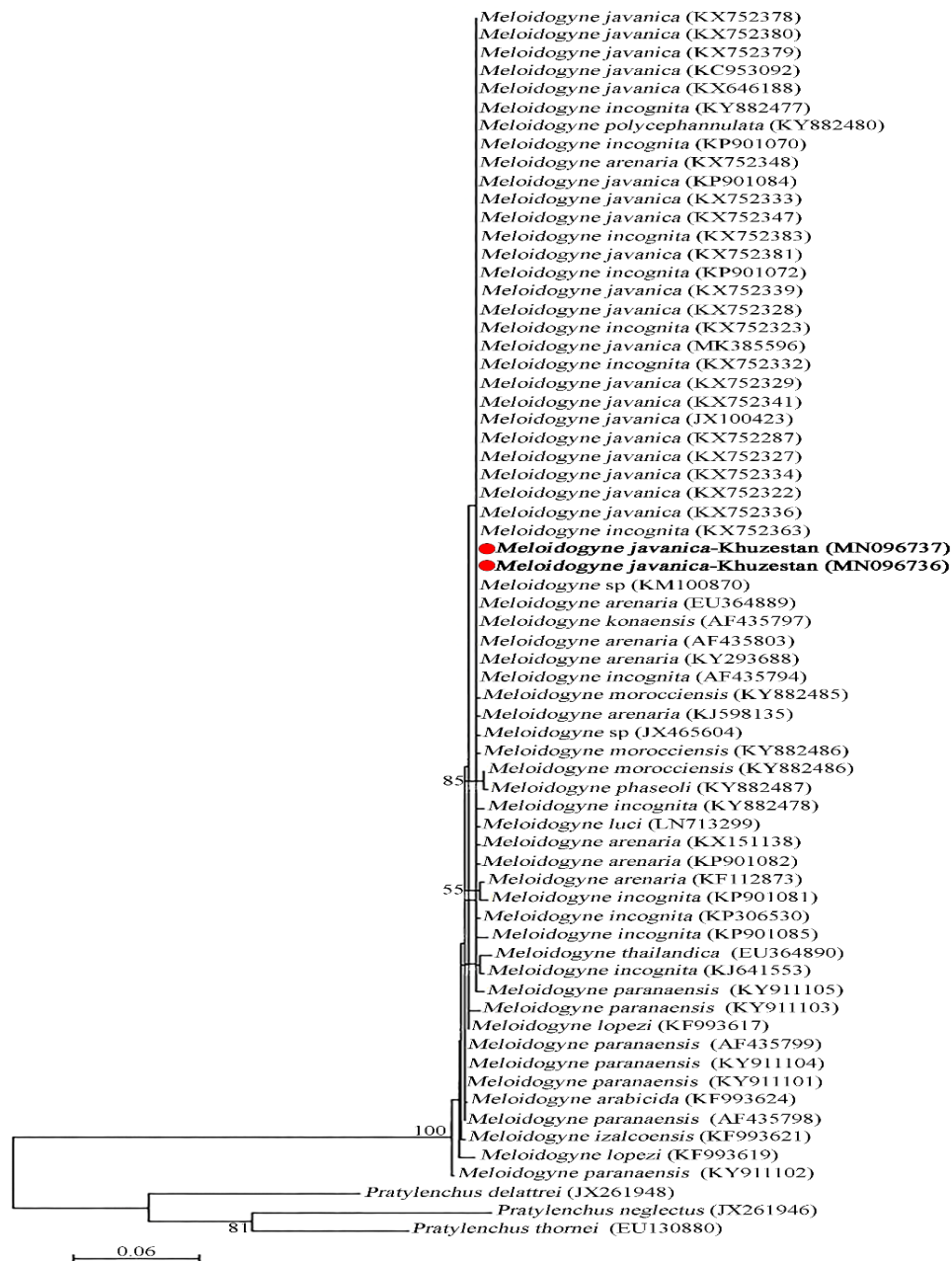
C-E: تنوع دم، F: سطوح جانبی در وسط بدن، H: استایلت، I و J: شبکه کوتیکولی انتهای بدن

Figure 1: *Meloidogyne javanica*: Second-stage juvenile (A-F), female (G-K). A & K: Entire body, B & G: Anterior region, C-E: Variations of tail shape, F: Lateral field at mid-body, H: Stylet, I & J: perineal pattern



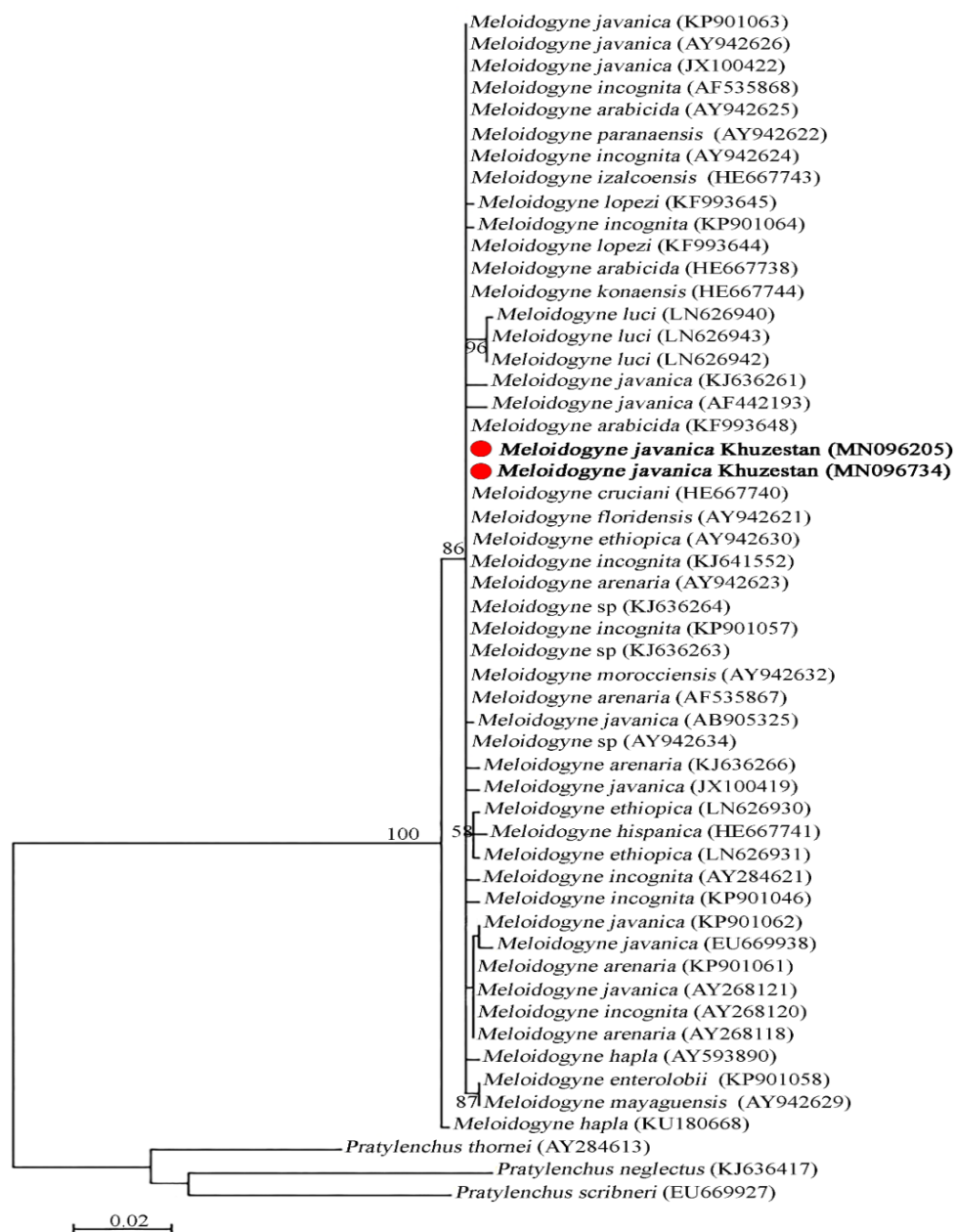
شکل ۲: گونه *Meloidogyne javanica*: تخم (A)، لارو سن دو (B-J) و ماده بالغ (K-O). B, I-K: نمای کلی بدن، C, D, L-N: قسمت جلویی بدن، E: سطوح جانبی در وسط بدن، F-H: تنوع دم و O: شبکه کوتیکولی انتهای بدن. (مقیاس: B, I-K: ۱۰۰ میکرومتر، A, C-H, L-O: ۲۰ میکرومتر)

Figure 2: *Meloidogyne javanica*: Egg (A), Second-stage juvenile (B-J) and adult female (K-O). B, I-K: Entire body, C, D, L-N: Anterior region, E: Lateral field at mid-body, F-H: Tail variation, O: Perineal pattern. (Scale bars: B, I-K = 100 μ m. A, C-H, L-O = 20 μ m)



شکل ۳- روابط فیلوژنی توالی‌های به دست آمده از گونه *Meloidogyne javanica* در این مطالعه با توالی‌های دیگری از این جنس، حاصل از تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه مربوط به ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA بر اساس مدل تکاملی GTR + G + I. مقادیر بیشتر از ۵۰ درصد، در روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده است

Figure 3: Phylogenetic relationships of the sequences obtained from *Meloidogyne javanica* in this study with other sequences of this genus, derived from analysis of the D2-D3 domains of the 28S rDNA gene under the GTR + G + I model. Bootstrap values more than 50% are shown at the nodes



شکل ۴- روابط فیلوژنی توالی‌های به دست آمده از گونه *Meloidogyne javanica* در این مطالعه با توالی‌های دیگری از این جنس، حاصل از تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه مربوط به ژن 18S بر اساس مدل تکاملی GTR + G + I. مقادیر بیشتر از ۵۰ درصد، در روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده است

Figure 4: Phylogenetic relationships of sequences obtained from *Meloidogyne javanica* in this study with other sequences of this genus, derived from analysis of 18S gene data under the GTR + G + I model. Bootstrap values more than 50% are shown at the nodes

نواحی ژنی، جهت شناسایی دقیق تر گونه‌های نماتد ریشه گرهی در استان خوزستان پیشنهاد می‌گردد.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب پژوهانه شماره SCU.AP98.406 در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

توالی ژنی ناحیه 28S و 18S بسیار محافظت شده هستند و تشخیص در سطح گونه، به خصوص برای سه گونه گرمسیری رایج از جمله *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* بر اساس این توالی‌ها دشوار است (De Ley, 1999; Blok and Powers, 2009; Kiewnick et al., 2014; Janssen et al., 2016). مطالعه حاضر نیز نواحی ژنی به کار رفته قادر به تفکیک دقیق گونه‌های مذکور نبود به همین دلیل بررسی سایر

REFERENCES

- Adam, M. A. M., Phillips, M. S., and Blok, V. C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56: 190-197.
- Ahmadi, K., Abadzadeh, H. R., Hatami, F., Hosseinpour, R., and Abdullah, E. H. 2019. *Agricultural Statistics 2018*. Tehran: Horticultural Products. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Deputy of Planning and Economics, ICT Center. P. 241. (in Farsi)
- Askarian, H., Sharifnabi, B., Olia, M., Mahdikhani-Moghadam, E., and Akhavan A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* using morphological and morphometrical characters and species specific primers. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 13: 279-290. (In Farsi with English abstract).
- Blok, V. C., and Powers, T. O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr (eds). *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 98-118.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M., and Claudius-Cole, B. 2014. *Practical plant nematology: A field and laboratory guide*. 2nd edition. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. P. 96.
- De Grisse, A. T. 1969. Redescription and modification of some techniques used in the study of nematodes phytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfacultiet Landbouw Wetenschappe Gent*, 34: 351-369.
- De Ley, I. T., Karssen, G., De Ley, P., Vierstraete, A., Waeyenberge, L., Moens, M., and Vanfleteren, J. 1999. Phylogenetic analyses of internal transcribed spacer region sequences within *Meloidogyne*. *Journal of Nematology*, 31: 530-531.

Eisenback, J. D., and Triantaphyllou, H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: W. R. Nickle (ed). Manual of Agricultural Nematology. Marcell Dekker, New York. pp. 191-274.

Garcia, L. E., and Sanchez-Puerta, M. V. 2012. Characterization of a root-knot nematode population of *Meloidogyne arenaria* from Tupungato (Mendoza, Argentina). Journal of Nematology, 44: 291-301.

Ghaderi R., Kashi L., and Karegar A. 2018. Plant-parasitic nematodes in Iran. Tehran, Iran: Science Reference in collaboration with the Iranian Society of Nematology.

Harris, T. S., Sandall, L. J., and Powers, T. O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of Nematology, 22: 518-524.

Hartman, K. M., and Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume II: Methodology. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, North Carolina. pp. 69-77.

Hesar, A. M., Moghaddam, E. M., and Maafi, Z. T. 2011. Morphometrical and genetic diversity of *Meloidogyne javanica* isolates from the north east of Iran. Journal of nematode morphology and systematics, 14: 1-11.

Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Holovachov, T. M. O., Bakker, J., and Helder, J. 2006. Phylum wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. Molecular Biology and Evolution, 23: 1792-1800.

Hunt, D. J., and Handoo, Z. A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr (eds). Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford. pp. 55-97.

Hyman, B. C. 1990. Molecular diagnosis of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology, 22: 24-30.

Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D., and Bert, W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. Scientific Reports, 6: 22591.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. R., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., and Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant pathology, 14: 946-961.

Karssen, G., and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In: R. N. Perry, and M. Moens, (eds). Plant nematology. CAB International. Wallingford. pp. 59-90.

Kiewnick, S., Holterman, M., van den Elsen, S., van Megen, H., Frey, J. E., and Helder, J. 2014. Comparison of two short DNA barcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives. *European Journal of Plant Pathology*, 140(1): 97-110.

Kiewnick, S., Wolf, S., Willareth, M., and Frey, J. E. 2013. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. *Nematology*, 15 (7): 891-894.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Mahdikhani-Moghadam, E., Kheiri, A., and Mohammadi, M. 2007. Molecular comparison of Iranian populations of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* with PCR-RFLP. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 10: 405-410. (in Farsi with English abstract).

Nunn, G. B. 1992. Nematode molecular evolution. PhD. Thesis, University of Nottingham, Nottingham, U.K.

Onkendi, E. M., Kariuki, G. M., Marais, M. and Moleleki, L. N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: A review. *Plant Pathology*, 68: 727-737.

Pedram, M., Pourjam, E., Ye, W., Atighi, M. R., Robbins, R. T. and Ryss, A. 2011. Description of *Bursaphelenchus mazandaranense* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) from Iran. *Russian Journal of Nematology*, 19: 121-129.

Powers, T. O., and Harris, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25: 1-6.

Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C. B., Flemming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B.A., and Harris, T. S. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29: 441-450.

Rafiee, H., Mahdikhani-Moghaddam, E., and Najafinia, M. 2010. Isolation of *Meloidogyne cruciani* from cucumber greenhouses in Jiroft region and evaluation of intra-species genetic diversity using RAPD-PCR marker. *Journal of Plant Protection*, 24 (1): 43-52. (in Farsi with English abstract).

Salalia, R., Walia, R. K., Somvanshi, V. S., Kumar, P., and Kumar, A. 2017. Morphological, morphometric, and molecular characterization of intraspecific variations within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology*, 49 (3): 254-267.

Skantar, A. M., Carta, L. K., and Handoo, Z. A. 2008. Molecular and morphological characterization of an unusual *Meloidogyne arenaria* population from traveler's tree, *Ravenala madagascariensis*. *Journal of Nematology*, 40: 179-189.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Verdejo-Lucas, S., and McKenry, M. V. 2004. Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Journal of Nematology*, 36 (4): 424-432.

Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., ... Rokhsar, D. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32 (7): 656-662.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

First report of *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 from tangerine tree in Iran

P. Eisvand¹, R. Farrokhi Nejad² and S. Azimi^{3*}

1. M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (s.azimi@scu.ac.ir)

(DOI): 10.22055/PPR.2019.15621

Received: 14 February 2020

Accepted: 7 June 2020

Abstract

Background and Objectives: The root-knot nematode is an obligatory plant parasite that attacks a large number of vascular plants worldwide and is economically important. The present study aimed to identify the *Meloidogyne javanica* species based on morphological, morphometric data and molecular characterization.

Materials and Methods: During a survey on the biodiversity of plant-parasitic nematodes in citrus orchards of Khuzestan province from 2017 to 2018, a root-knot nematode population was collected from soil and root samples of tangerine. Adults and the second-stage juveniles were extracted from the infected roots. After killing and fixing the nematodes, permanent slides were prepared. Species identification was performed using valid keys. Genomic DNA was extracted from both juvenile and adult females. The extracted DNA was amplified and sequenced by the primers of the D2-D3 expansion segments of the 28S rRNA gene and the 18S rRNA gene. The newly obtained sequences of the D2-D3 fragments of 28S and 18S rRNA gene sequences and additional sequences of relevant species were selected after a BlastN search and were aligned by Clustal X using the default parameters. The both phylogenetic analyses were evaluated under the GTR + G + I model with two million generations.

Results: *M. javanica* was identified based on morphological, morphometric data and phylogenetic analysis of amplified regions. The morphological differences of the recovered population in comparison with other populations were discussed. In this study, two 799 bp fragments were generated by the 28S rDNA gene region primers and two 1678 bp fragments were generated by the 18S rDNA gene region primers.

Discussion and conclusion: The perineal pattern of the studied female nematode is distinguished from the other species of this genus by having two parallel lines at the lateral surfaces of the body so that these lines clearly divide the perineal pattern into the dorsal and ventral parts. To the best of our knowledge, this is the first report of *M. javanica* in association with tangerine in Iran.

Keywords: *Citrus*, *Root-knot nematode*, *Morphometric data*, *Morphology*, *Phylogeny*