



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰

doi 10.22055/ppr.2021.17127

تعیین مشخصات ریخت‌شناسی و مولکولی گونه *Pratylenchus mediterraneus* (Tylenchomorpha: Pratylenchidae) Corbett, 1983 از ایران

عباس عبدالحانی^۱ و صدیقه عظیمی^{*۲}

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- *نویسنده مسوول: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۱

چکیده

در این مطالعه، جمعیتی از جنس *Pratylenchus* در ارتباط با درختان گز از منطقه حفاظت شده کرخه بدست آمد. مطالعات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مولکولی این جمعیت بر اساس توالی دو ناحیه D2-D3 از ژن 28S rRNA و ژن ITS rRNA نشان داد این جمعیت متعلق به گونه *P. mediterraneus* می‌باشد. این جمعیت دارای ماده‌هایی به طول ۴۳۱ تا ۵۵۱ میکرومتر با کیسه ذخیره اسپرم پر و استایلت به طول ۱۵ تا ۱۶/۵ میکرومتر می‌باشد. نرهای جمعیت به دست آمده فعال بوده و دارای بدن به طول ۳۳۱ تا ۴۸۵، استایلت به طول ۱۴/۸ تا ۱۵ و اسپیکول به طول ۱۶/۲ تا ۱۹ میکرومتر می‌باشند. در آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی‌های ناحیه D2-D3 ژن 28S rRNA، توالی جمعیت ایرانی به همراه توالی‌های دیگری از گونه *P. mediterraneus* و تعدادی از توالی‌هایی که به گونه *P. thornei* تخصیص داده شده‌اند، در یک کلاد قرار گرفتند. این کلاد در ارتباط خویشاوندی نزدیک با کلادی است که توالی‌های متعددی از گونه *P. thornei* را در بر گرفته است. در آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی‌های ژن ITS rRNA، توالی جمعیت ایرانی به همراه توالی‌های دیگری از گونه *P. mediterraneus* در یک کلاد قرار گرفتند. این کلاد در ارتباط خویشاوندی نزدیک با کلادی است که توالی‌های متعددی از گونه *P. thornei* را در بر گرفته است. ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و توصیف جمعیت ایرانی این گونه در تحقیق حاضر برای اولین بار ارائه گردید.

کلید واژه‌ها: ریخت‌سنجی، فیلوژنی، *Pratylenchus thornei* ITS D2-D3 LSU

دبیر تخصصی: دکتر مجید پدرام

Citation: Abdolkhani, A., & Azimi, S. (2021). Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 (Tylenchomorpha: Pratylenchidae) from Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(3): 91-105. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17127>.

مقدمه

مناطق حفاظت شده با اهداف گوناگونی مانند حفاظت از زیستگاه‌های طبیعی به منظور حفظ تنوع زیستی گیاهی و جانوری در این زیستگاه‌ها، در سراسر جهان تأسیس شده‌اند (Bruner et al., 2001). مناطق حفاظت شده مراکز اصلی تلاش برای حفاظت از طبیعت و خدماتی است که برای انسان‌ها ارائه می‌دهند از جمله تأمین منابع غذایی، حفظ سفره‌های آب زیرزمینی، تأمین داروهای گیاهی و محافظت در برابر اثرات بلایای طبیعی (Dudley and Stolton, 2008). منطقه حفاظت شده و پارک ملی کرخه واقع در استان خوزستان، ۱۶۰۷۲ هکتار مساحت داشته و پوشش گیاهی آن شامل درختان، درختچه‌ها و بوته‌های یکساله است. اشکوب بالایی منطقه را درختان پده و گز تشکیل داده و اشکوب میانی را درختچه‌هایی نظیر سریم، بنگله، لگجی، بید، علف مار و تمشک اشغال کرده و اشکوب تحتانی را انواع گیاهان لگومینوز و گرامینه تشکیل می‌دهند (Anonymous, 2021). نماتدهای مولد زخم ریشه از جنس *Pratylenchus* Filipjev, 1936، انگل‌های داخلی مهاجر و از جمله شایع‌ترین نماتدهای انگل گیاهی هستند که به محصولات کشاورزی خسارت می‌زنند (Subbotin et al., 2008). گونه‌های جنس *Pratylenchus* به دلیل دامنه میزبانی وسیع و انتشار آن‌ها در شرایط مختلف آب و هوایی سرد، معتدل و گرمسیری، از نظر خسارت اقتصادی پس از نماتدهای مولد ریشه گرهی و نماتدهای مولد سیست قرار می‌گیرند. شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Pratylenchus* به دلیل تعدد گونه‌ها در این جنس، تعداد اندک ویژگی‌های ریخت‌شناسی که منجر به تشخیص در سطح گونه می‌گردد و تنوع درون گونه‌ای زیاد در برخی از ویژگی‌ها، بسیار مشکل است (Castillo and Vovlas, 2007).

در طی بررسی نماتدهای انگل گیاهی منطقه حفاظت شده کرخه در استان خوزستان، جمعیتی از جنس *Pratylenchus* به دست آمد. مطالعه ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مولکولی آن نشان داد که این جمعیت متعلق به گونه *P. mediterraneus* Corbett, 1983

می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف تشریح مشخصات جمعیت ایرانی گونه *P. mediterraneus* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، همچنین بررسی مولکولی آن با استفاده از توالی‌های ناحیه D2-D3 از ژن 28S rRNA و ژن ITS rRNA و بررسی روابط فیلوژنی جمعیت ایرانی با سایر جمعیت‌های این گونه و گونه‌های دیگر جنس *Pratylenchus* صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، استخراج و تهیه اسلاید میکروسکوپی

نمونه‌برداری‌هایی در سال ۱۳۹۹ از خاک اطراف ریشه درختان گز (*Tamarix gallica* L.)، در منطقه حفاظت شده کرخه صورت گرفت. جهت استخراج نماتدهای کرمی شکل از خاک از روش جنکینز (Jenkins, 1964) و روش سینی (Whitehead and Hemming, 1965) استفاده شد. پس از استخراج نماتدها، تثبیت و انتقال آن‌ها به گلیسرین با روش تکمیل شده‌ی دگریس (De Grisse, 1969) انجام پذیرفت. سپس از نماتدهای جدا شده، اسلایدهای میکروسکوپی دائمی تهیه گردید. اندازه‌گیری و ترسیم گونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus CX31 مجهز به لوله‌ی ترسیم صورت گرفت. همچنین تصاویر دیجیتالی نماتدها با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 مجهز به دوربین دیجیتال Olympus DP12 تهیه شد. فتوپلیت با استفاده از نرم افزار فتوشاپ تهیه گردید. شناسایی در سطح گونه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و با استفاده از منابع معتبر انجام گرفت.

استخراج DNA، تکثیر نواحی ژنی و توالی‌یابی

برای استخراج DNA از نماتدهای مورد بررسی، یک عدد نماتد ماده انتخاب شد، شستشو داده شد و در لام موقت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی گردید. سپس نماتد مورد نظر به حدود ۷ میکرولیتر بافر TE (حاوی 10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA با pH 9.0) روی یک لام سترون منتقل و با استفاده از یک لامل و با فشار تیپ پلاستیکی له شد. سپس لامل حذف شد و ۲۰ میکرولیتر بافر

ارسال گردیدند. در صورت موفقیت آمیز بودن توالی یابی قطعه‌ی تکثیر یافته، کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی با استفاده از نسخه 6.1.2 برنامه کروماس^۱ مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت. توالی‌های بدست آمده در مطالعه حاضر با شماره دسترسی MZ562793 برای ژن 28S rRNA و شماره دسترسی MZ566844 برای ژن ITS rRNA در بانک ژن به ثبت رسیدند.

بررسی‌های فیلوژنی

توالی‌های به دست آمده طی این مطالعه با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه گردید (Nblast) یا آزمون جستجوی بلاست). سپس توالی‌های جدید همراه با توالی‌های تاکسون‌های دیگری که از بانک ژن انتخاب شده بودند با کمک برنامه‌ی Clustal X2 با استفاده از مقادیر پیش فرض، زیرهم چینی شدند (<http://www.clustal.org/>). ویرایش الانمنت حاصله به صورت دستی با استفاده از نرم افزار مگا^۲ نسخه‌ی شش (Tamura et al., 2013) انجام شد. برای انجام آنالیزهای فیلوژنی بر اساس روش بیس^۳، مدل تکاملی GTR + G + I با استفاده توام از دو نرم افزار * PAUP (Swofford, 2002) و MrModeltest2 (Nylander, 2004) و بر اساس معیار حمایتی آکائیک (Akaike-supported model) انتخاب شد. نسخه 3.1.2 نرم افزار مستر بیس^۴ (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)، جهت ترسیم درخت‌های فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تعیین توزیع احتمالات پسین^۵، سه میلیون نسل از درخت‌های تصادفی ایجاد و در هر صد نسل، یک درخت نمونه برداری شد. پس از تکمیل آنالیزهای مربوطه، ۲۵ درصد از درختان جمع آوری شده سوزانده شد و باقی مانده به صورت درخت اجمالی ۵۰ درصد همراه با مقادیر مربوط به حمایت شاخه‌ای ارائه شد. مقادیر بیشتر از

به آن اضافه گردید و بافر حاوی نماد له شده با کمک سمپلر در میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری جمع آوری گردید. دو نمونه به این روش تهیه شد و نمونه‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) نگهداری شدند (Pour Ehtesham et al., 2021). برای تکثیر قطعه D2-D3 از ژن 28S rDNA، از آغازگر رفت (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') و آغازگر برگشت D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') استفاده شد (Nunn, 1992). برای تکثیر ناحیه ITS از آغازگر رفت rDNA1 (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-) و آغازگر برگشت rDNA1.58S (3'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3') استفاده شد (Subbotin et al., 2000).

واکنش PCR با حجم ۳۰ میکرولیتر برای هر منطقه ژنی انجام شد. مخلوط PCR در هر تیوب حاوی مسترمیکس = ۱۵ میکرولیتر، DNA استخراج شده = ۳ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت از هر کدام = ۱ میکرولیتر و آب میلی کیو = ۱۰ میکرولیتر بود. مراحل چرخه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت شش دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه بود و در نهایت، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بررسی تشکیل باند توسط الکتروفورز با تهیه ژل آگارز یک درصد و بارگذاری محصولات PCR در ژل آگارز انجام شد (Pour Ehtesham et al., 2021). باقی مانده محصول PCR همراه با آغازگرهای رفت و برگشت جهت تعیین توالی به مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک تهران

1- Chromas

2- Mega

3- Bayesian analysis

4- Mr Bayes

5- Posterior Probabilities

۱۲۰ تا ۱۳۰ میکرومتر، تخمک‌ها در یک و یا دو ردیف، کیسه ذخیره اسپرم گرد تا بیضی، اغلب حاوی اسپرم و به ندرت خالی از اسپرم، واژن به طول ۵/۵ تا ۷ میکرومتر، فرج به صورت شکافی در یک سوم انتهایی بدن، کیسه عقبی رحم با طولی در حدود برابر عرض بدن در ناحیه شکاف تناسلی. دم تقریباً مخروطی، با انتهای گرد تا نیمه گرد و فاقد شیار. فاسمیدها کوچک، تقریباً در نیمه دم و در حدود ۱۱ تا ۱۲ میکرومتر از مخرج قرار دارند.

نور: متداول در جمعیت، بدن کرمی شکل و باریک، پس از تثبیت به اشکال مختلف. از نظر شکل ظاهری در قسمت جلوی بدن شبیه ماده‌ها، دم در آن‌ها مخروطی و نوک تیز. آلت تناسلی خمیده به سمت شکمی، گوبرناکولوم ساده، دارای کمی انحناء و بورسا تا انتهای دم کشیده می‌شود.

ملاحظات

بر اساس کلیدهای ارائه شده توسط کاستیلو و واولاس (Geraert, Castillo and Vovlas, 2007) و گرات (Geraert, 2013)، ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جمعیت به‌دست آمده از این جنس، با گونه *Pratylenchus mediterraneus* مطابقت نشان داد. جمعیت ایرانی گونه در مقایسه با شرح اصلی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت هرچند در تحقیق حاضر، میانگین طول بدن در نرها کمی کوتاه‌تر بود (۴۰۸ در مقابل ۴۷۵ میکرومتر).

این گونه نخستین بار در ارتباط با شبدر برسیم (*Trifolium alexandrinum* L.) از فلسطین توصیف گردید (Corbett, 1983). همچنین در ارتباط با گندم در فلسطین (Orion and Shlevin, 1989)، نخود و عدس در سوریه (Greco et al., 1992)، نخود در الجزایر و مراکش، باقلا، نخود و عدس در تونس (Di Vito et al.,

۲۰۱۵) درصد احتمال پسین روش بیس^۱، روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شد. فایل‌های خروجی نرم‌افزار فیلوژنی نام‌برده با استفاده از نرم‌افزار دندروسکوپ^۲ نسخه 3.2.8 مشاهده گردید (Huson and Scornavacca, 2012). درخت‌های فیلوژنی نهایی با کمک نرم‌افزار کورل^۳ نسخه‌ی ۱۷ ترسیم شدند.

نتایج

جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983

جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲

مشخصات

ماده: بدن کرمی شکل، پس از تثبیت به اشکال مختلف خمیده، S شکل تا بی‌نظم. پوست دارای حلقه‌های عرضی ظریف، عرض حلقه‌ها ۰/۹ تا ۱/۳ میکرومتر در اواسط بدن. باندهای جانبی دارای چهار شیار طولی، شیارهای بیرونی کمی کنگره‌دار، شیارهای داخلی در اواسط بدن به شکل‌های مختلف و گاهی دارای شش شیار. ناحیه سر در امتداد بدن، دارای سه شیار عرضی، شبکه کوتیکولی سر قوی، حاشیه خارجی آن تقریباً به اندازه دو شیار به داخل بدن امتداد یافته. استایلت قوی، گره‌های استایلت مشخص، گرد و کمی متمایل به جلو. همیزونید به طول حدود کمتر از دو شیار عرضی و به فاصله تقریباً یک شیار عرضی جلوتر از روزنه دفعی-ترشچی. حباب میانی مری بیضی شکل با درجه مشخص به طول ۱۱ تا ۱۲/۶ و عرض ۱۰/۳ تا ۱۱/۳ میکرومتر، لوله ثانویه مری کوتاه که حلقه عصبی آن را فراگرفته، غده‌های مری دارای همپوشانی نسبت به روده از سمت شکمی به طول حدود یک و نیم تا دو برابر عرض بدن. سیستم تناسلی ماده دارای یک تخمدان که به سمت جلوی بدن امتداد یافته، به طول

1- Bayesian Posterior Probabilities
2- Dendroscope
3- CorelDRAW software

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌سنجی *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 از استان خوزستان، ایران، و مقایسه با داده‌های ارائه شده در شرح اصلی آن توسط کوربت (Corbett, 1983). اندازه‌ها بر حسب میکرومتر و به شکل میانگین ± انحراف معیار (دامنه) می‌باشند.

Table 1. Morphometrics of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 from Khuzestan province, Iran, and their comparison with the original data given by Corbett (1983). All measurements are in μm and in the form: mean \pm SD (range).

Character	Khuzestan province		Corbett, 1983	
	Females	Males	Females	Males
n	10	8	10	5
L	469.2 \pm 48.5 (431-551)	408.0 \pm 50.4 (331-485)	513 (428-577)	475 (431-542)
a	25.5 \pm 2.4 (23.2-30.0)	25.2 \pm 2.7 (22-29)	27 (24-31)	31 (27-35)
b	5.4 \pm 0.6 (5.0-6.6)	4.7 \pm 0.5 (4.6-5.7)	6.4 (5.2-7.6)	6.0 (5.6-6.3)
b'	4.1 \pm 0.5 (3.7-4.4)	4.2 \pm 0.6 (3.2-5.0)	4.3 (3.9-4.7)	4.4 (4.1-4.6)
c	18.8 \pm 1.8 (17.0-21.6)	18.0 \pm 1.3 (17-20)	21 (17-25)	20 (18-22)
c'	2.3 \pm 0.3 (2.0-2.6)	2.6 \pm 0.1 (2.0-2.8)	-	-
V	80.1 \pm 1.5 (78.0-81.7)	-	78.5 (77-80)	-
Lip region height	4.0 \pm 0.5 (3.3-4.4)	3.1 \pm 0.1 (3.0-3.3)	-	-
Lip region width	8.3 \pm 0.7 (6.5-8.5)	6.5 \pm 0.2 (6.0-6.5)	-	-
Stylet length	16.0 \pm 0.5 (15.0-16.5)	15.0 \pm 0.2 (14.8-15.0)	15 (14-16)	14 (13-15)
Conus length	7.7 \pm 0.4 (7.5-8.5)	7.5 \pm 0.3 (7-8)	-	-
Knobs height	2.3 \pm 0.4 (2.0-2.5)	1.8 \pm 0.2 (1.5-2.0)	-	-
Knobs width	4.2 \pm 0.1 (3.9-4.2)	4 \pm 0.1 (3.2-4.0)	-	-
DGO	3.7 \pm 0.4 (3.2-4.2)	2.7 \pm 0.2 (2.5-3.0)	1.0-3.3	-
Excretory pore from anterior end	78.1 \pm 4.5 (74-81)	68.2 \pm 4.8 (62-75)	74 (65-84)	73 (64-83)
Anterior end to nerve ring	64.1 \pm 2.3 (62.3-67.2)	55.0 \pm 3.5 (54-57)	-	-
Anterior end to end of pharyngeal gland	116.3 \pm 7.7 (109.2-117.0)	98.0 \pm 5.9 (91-109)	-	-
Post-uterine sac	19.3 \pm 3.1 (15.5-25.0)	-	18-25	-
Body width	17.8 \pm 1.2 (16-20)	16.0 \pm 0.9 (15.0-17.5)	-	-
Vulval body width	16.5 \pm 0.7 (14.5-18.0)	-	-	-
Anal body width	10.0 \pm 0.5 (9.6-10.8)	12.9 \pm 0.7 (11.5-14.0)	-	-
Tail length	24.3 \pm 2.3 (21-27)	22.5 \pm 1.3 (20-24)	-	-
Tail annuli number	19.5 \pm 2.4 (17-23)	-	15-22	-
Spicule length	-	17.4 \pm 0.5 (16.2-19.0)	-	17 (16-18)
Gubernaculum length	-	5.2 \pm 0.8 (4.0-5.7)	-	5 (4.4-5.5)
Bursa length	-	30.4 \pm 2.6 (26.0-32.5)	-	-

فیلوژنی مستقل به کار رفتند. درخت حاصل از این توالی‌ها در شکل ۴ ارائه شده است. در این درخت، اکثر توالی‌های جمعیت‌های مختلف گونه *P. thornei* از مناطق مختلف جهان در یک کلاد قرار گرفتند. همچنین، تعدادی از توالی‌هایی که در درخت قبل نیز حضور داشتند، در یک کلاد با *P. mediterraneus* قرار گرفتند.

از ژن ITS rRNA نیز یک توالی برای جمعیت ایرانی گونه *P. mediterraneus* به دست آمد. آزمون جستجوی بلاست با استفاده از این توالی نشان داد که این توالی با توالی دیگری از این گونه با شماره دسترسی FR692307 موجود در بانک ژن، بیشترین یکسانی توالی‌ها را دارد (۹۲/۴۴ درصد). روابط فیلوژنی توالی جدید نام‌برده همراه با ۶۹ توالی دیگر از جنس *Pratylenchus* و دو توالی از جنس *Bursaphelenchus* به عنوان توالی خارجی، در شکل ۵ ارائه شده است. در درخت حاصل، توالی نام‌برده جدید به همراه توالی‌های دیگری از گونه *P. mediterraneus* در یک کلاد قرار گرفتند. این کلاد در رابطه خویشاوندی نزدیک با کلادی است که تعداد متعددی از توالی‌های گونه *P. thornei* را در بر دارد.

بحث

گونه *P. mediterraneus* طی مطالعه جهت شناسایی نماتدهای انگل گیاهی در منطقه حفاظت شده کرخه، به دست آمد و مورد شناسایی قرار گرفت. این گونه شباهت بسیار زیادی با گونه *Pratylenchus thornei* دارد ولی با داشتن استایلت کمی کوتاه‌تر و متداول بودن جنس نر و نیز کیسه ذخیره اسپرم فعال در ماده‌ها از گونه اخیر قابل تفکیک است (Corbett, 1983). از طرف دیگر، تفاوت جزئی در طول استایلت دو گونه، به دلیل مشابه بودن دامنه طول استایلت در جمعیت‌های مختلف برای تفکیک دو گونه نام‌برده کافی نیست.

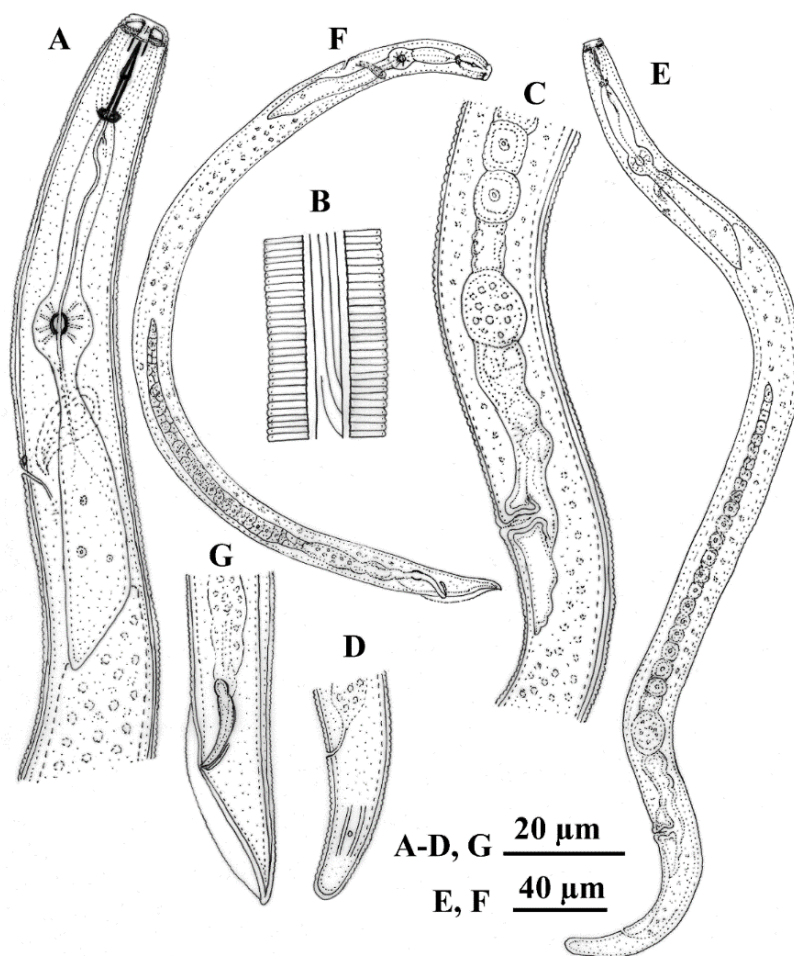
گونه *Pratylenchus dunensis* De la Peña, Moens, Van Aelst and Karssen, 2006 نیز شباهت بسیار زیادی با گونه‌های *P. agilis* Thorne & Malek, 1968 و *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) دارد.

(1994) و گل داودی در کره جنوبی گزارش گردیده است (Choi et al., 2006). گونه مورد مطالعه در ایران در ارتباط با درخت گردو گزارش گردیده است (Barooti, 2006) ولی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و توصیف جمعیت مطالعه شده ارائه نشده است. مشخصات جمعیت ایرانی گونه *P. mediterraneus* در تحقیق حاضر برای اولین بار ارائه گردید.

نتایج مطالعات مولکولی و تشریح روابط فیلوژنی

توالی‌یابی قطعه تکثیر شده D2-D3 از یک فرد نماتد ماده منجر به خوانش یک قطعه به طول ۷۲۷ نوکلئوتید شد. آزمون جستجوی بلاست با استفاده از این توالی نشان داد که این توالی، بیشترین یکسانی تعداد نوکلئوتیدها را با توالی یک جمعیت دیگر از این گونه با شماره دسترسی MH796979 به مقدار ۹۹/۸۶ داشت که قبل تر در این پایگاه به ثبت رسیده بود.

روابط فیلوژنی توالی جدید همراه با ۷۳ توالی دیگر از جنس *Pratylenchus* و دو توالی از جنس *Meloidogyne* به عنوان تاکسون‌های گروه خارجی مورد بازسازی قرار گرفت. انتخاب تاکسون‌های خارجی بر اساس مطالعات مشابه قبلی صورت گرفت (Nguyen et al., 2019) و Movahedifar and Azimi, 2020). نتایج این بررسی در شکل ۳ ارائه شده است. در درخت حاصل، توالی نام‌برده جدید به همراه توالی‌های دیگری از گونه *P. mediterraneus* و تعدادی توالی که به گونه *P. thornei* Sher & Allen, 1953 تخصیص داده شده‌اند در یک کلاد قرار گرفتند (کلاد A). این کلاد در رابطه خویشاوندی نزدیک با کلادی است که تعداد متعددی از توالی‌های گونه *P. thornei* را در بر دارد (کلاد B). جهت بررسی بیشتر روابط فیلوژنی دو گونه *P. mediterraneus* و *P. thornei*، و با توجه به این که تعدادی از توالی‌های تخصیص داده شده به گونه *P. thornei* در درخت بازسازی شده قبلی در یک کلاد با گونه *P. mediterraneus* قرار گرفتند، تعداد ۴۴ توالی از هر دو گونه و دو توالی از گونه *P. zae* Graham, 1951 به عنوان توالی‌های خارجی برای ترسیم یک درخت



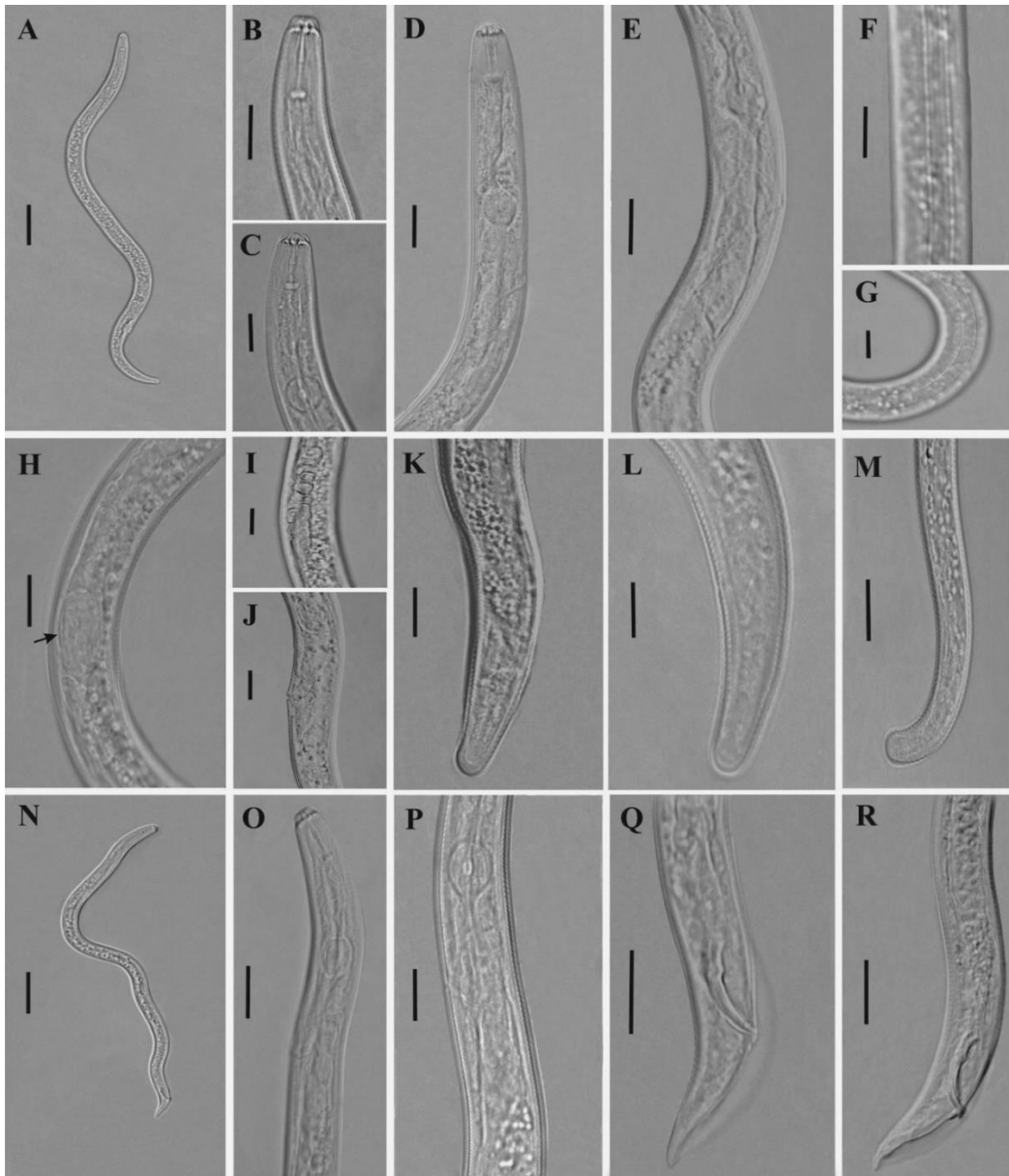
شکل ۱- جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983: ماده (A-E)، نر (F, G). A: مری، B: باند جانبی در وسط بدن، C: ناحیه فرج و کیسه ذخیره اسپرم، D: دم، E, F: نمای کلی بدن، G: انتهای بدن.
Figure 1. Iranian population of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983. Female (A-E), Male (F, G). A: Pharynx, B: Lateral field at mid-body, C: Vulva region and spermatheca, D: Tail, E, F: Entire body, G: Posterior body region.

Movahedifar and Azimi, Nguyen et al., 2019
 و 2020 (Troccoli et al., 2021).

در مطالعه فیلوژنی انجام شده حاضر، توالی D2- D3 از ژن 28S rDNA جمعیت مورد مطالعه، در یک کلاد به همراه توالی‌های دیگری از جمعیت‌های گونه *P. mediterraneus* قرار گرفت (کلاد A در شکل ۳). این وضعیت قبلاً در مطالعات دلوچا و همکاران، سابوتین و همکاران و موحدی فر و عظیمی (De Luca et al., 2004 و Subbotin et al., 2008) و Movahedifar and Azimi, 2020 نیز مشاهده شده است.

Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941، *P. neglectus* (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 و *P. scribneri* Steiner in Sherbakoff & Stanley, 1943 دارد، ولی با داشتن جنس نر به تعداد فراوان در مقابل (بدون جنس نر یا به تعداد نادر)، از این گونه‌ها تفکیک شده است (De la Peña et al., 2006).

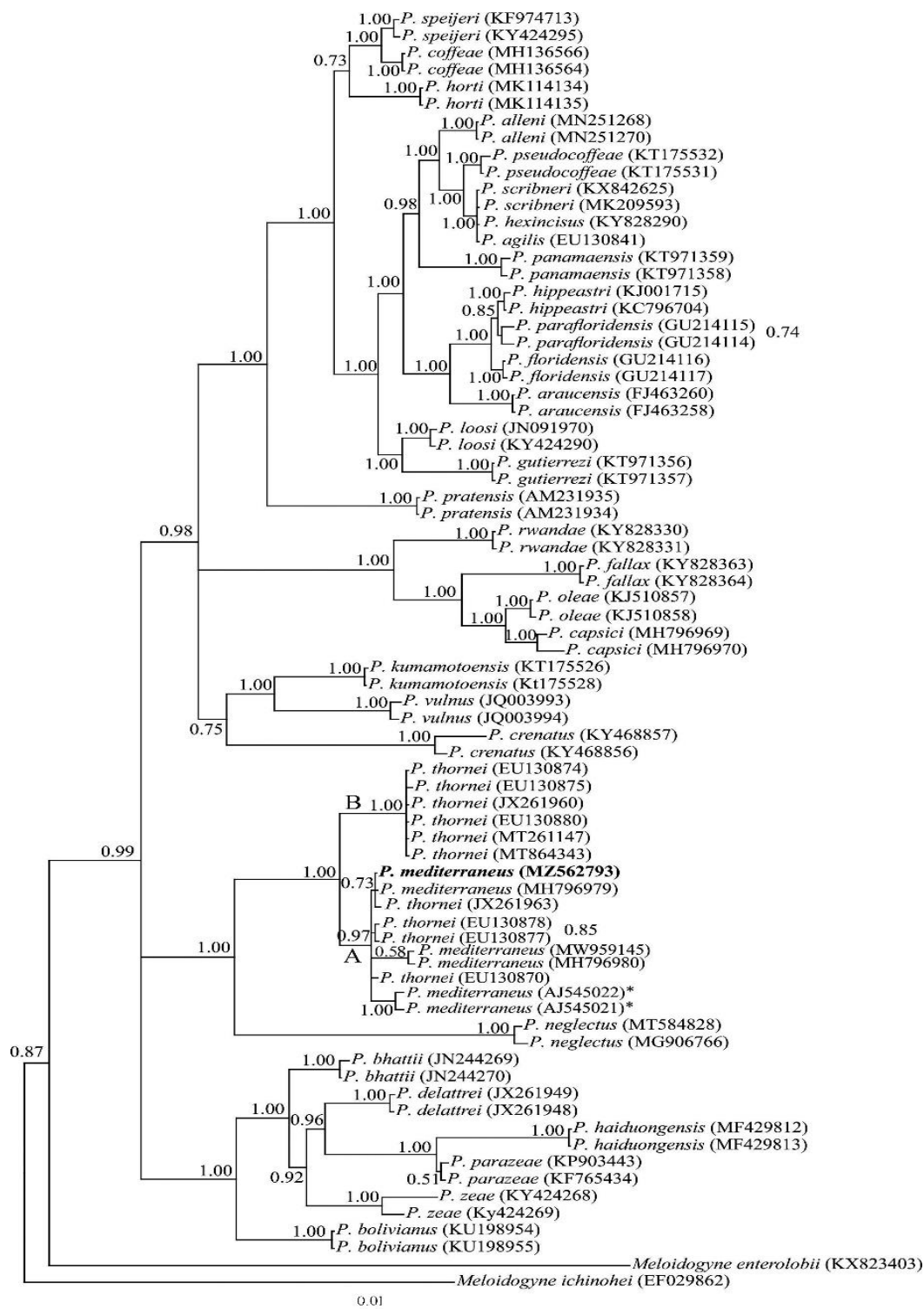
در مطالعات مولکولی بر اساس ژن‌های 28S rRNA یا ITS rRNA نیز این گونه‌ها از همدیگر تفکیک شده‌اند (Troccoli et al., 2016، Subbotin et al., 2008).



شکل ۲- جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983: ماده (A-M)، نر (N-R). A و N: نمای کلی بدن، B-D و O: ناحیه جلویی بدن، E و P: بخشی از مری، F و G: باند جانبی در وسط بدن، H و I: بخشی از سیستم تناسلی (کیسه ذخیره اسپرم با فلش نشان داده شده است)، J: ناحیه فرج، K-M و Q-R: دم. (مقیاس: A و N: ۵۰ میکرومتر، B-M و O-R: ۱۰ میکرومتر)
Figure 2. Iranian population of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983: Female (A-M), Male (N-R). A, N: Entire body, B-D, O: Anterior region, E, P: Part of pharyngeal region, F, G: Lateral field at mid-body, H, I: Part of reproductive system (the arrow indicates the spermatheca), J: Vulval region, K-M, Q-R: tail. (Scale bars: A, N = 50 μ m; B-M, O-R = 10 μ m).

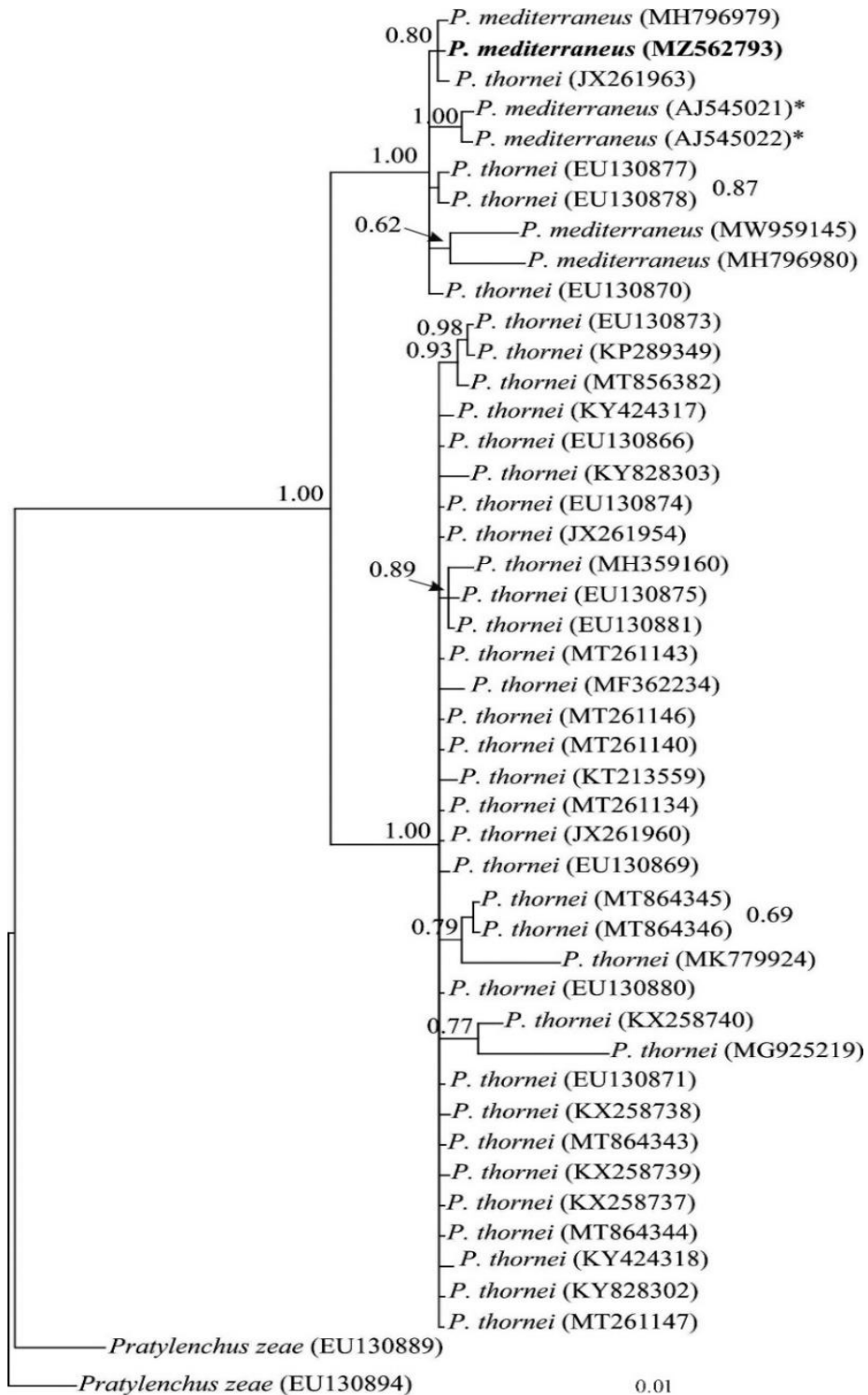
و یا داشتن کیسه ذخیره اسپرم فعال در ماده‌های آنها نامشخص است. از طرف دیگر، اکثر قریب به اتفاق توالی‌های 28S از جمعیت‌های *P. thornei* مطابق درخت شکل شماره ۴ در یک کلاد قرار می‌گیرند و این

اطلاعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی جمعیت‌های توالی‌یابی شده توالی‌های JX261963، EU130870، EU130877 و EU130878 که به گونه *P. thornei* تخصیص داده شده‌اند در دسترس نیست و وجود جنس نر



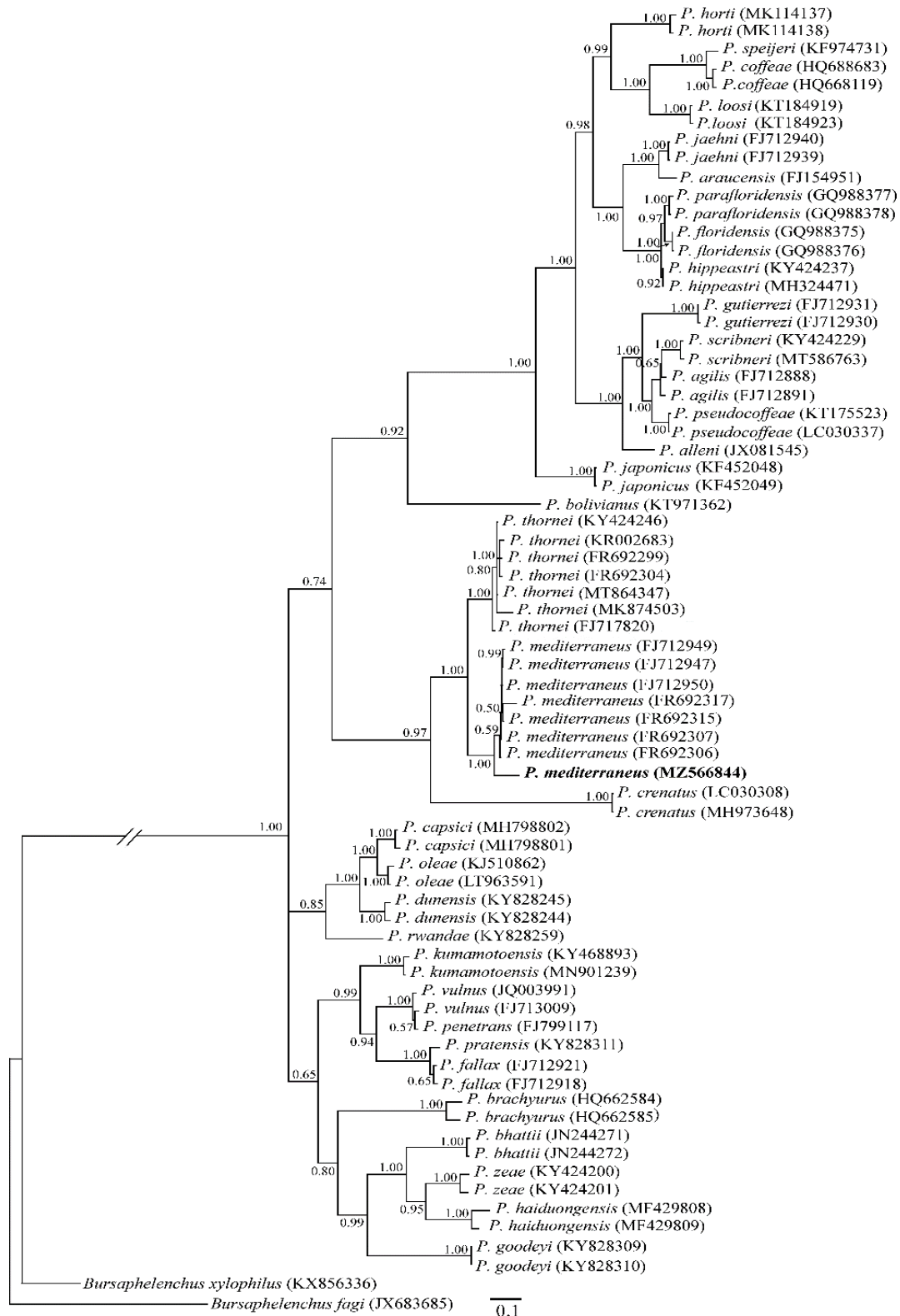
شکل ۳- درخت فیلوژنی بازسازی شده با استفاده از توالی ناحیه D2-D3 از ژن 28S rRNA جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 در استان خوزستان و توالی‌های جنس‌ها و گونه‌های دیگر به روش بیس (Bayes) بر اساس مدل تکاملی G + I + GTR. مقادیر بیشتر از ۰/۵۰ درصد احتمال پسین در روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده است. علامت ستاره نشان می‌دهد که آن توالی‌ها فقط مربوط به ناحیه D3 هستند.

Figure 3. Bayesian 50% majority rule consensus tree inferred using the D2-D3 domains of the 28S rRNA gene of Iranian population of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 from Khuzestan province and other genera and species under the GTR + G + I model. Bayesian posterior probability values more than 0.50 are given for appropriate clades. The asterisk indicates the used sequence only contains the D3 region.



شکل ۴- درخت فیلوژنی بازسازی شده با استفاده از توالی ناحیه D2-D3 از ژن 28S rRNA جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 در استان خوزستان و توالی‌های تخصیص داده شده به دو گونه *P. thornei* Sher & Allen, 1953 و *P. mediterraneus* به روش بیس (Bayes) بر اساس مدل تکاملی GTR + G + I. مقادیر بیشتر از 0.50 درصد احتمال پسین در روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده است. علامت ستاره نشان می‌دهد که آن توالی‌ها فقط مربوط به ناحیه D3 هستند.

Figure 4. Bayesian 50% majority rule consensus tree inferred using the D2-D3 domains of the 28S rRNA gene of Iranian population of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 from Khuzestan province and sequences assigned to two species *P. mediterraneus* and *P. thornei* Sher & Allen, 1953 populations under the GTR + G + I model. Bayesian posterior probability values more than 0.50 are given for appropriate clades. The asterisk indicates the used sequence only contains the D3 region.



شکل ۵- درخت فیلوژنی بازسازی شده با استفاده از توالی ژن ITS rRNA جمعیت ایرانی گونه *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 در استان خوزستان و توالی‌های جنس‌ها و گونه‌های دیگر به روش بیس (Bayes) بر اساس مدل تکاملی GTR + G + I. مقادیر بیشتر از ۰/۵۰ درصد احتمال پسین در روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده است.

Figure 5. Bayesian 50% majority rule consensus tree inferred using the ITS rRNA gene of Iranian population of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 from Khuzestan province and other genera and species under the GTR + G + I model. Bayesian posterior probability values more than 0.50 are given for appropriate clades.

ولی در ناحیه ITS rDNA با همین گونه دارای ۸۵ درصد یکسانی توالی بوده است که بیانگر میزان تفاوت قابل ملاحظه بین دو ناحیه ژنی بین دو گونه می‌باشد (Troccoli et al., 2021). توالی‌های ناحیه ITS rDNA نه تنها در میان جمعیت‌های مختلف یک گونه از نماتدهای مولد زخم ریشه بلکه حتی درون یک فرد نیز از تنوع بسیار بالایی برخوردار بوده‌اند به طوری که این مساله، طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه را با محدودیت‌های زیادی مواجه نموده است (Waeyenberge et al., 2009).

در آنالیز فیلوژنی با استفاده از این ناحیه اخیر، توالی‌های دو گونه *P. mediterraneus* و *P. thornei* در دو کلاسه جداگانه قرار گرفتند و این دو کلاسه رابطه خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند. این وضعیت قبلا در مطالعه (De Luca et al., 2011) نیز مشاهده شده است. آنچه مسلم است این است که چنانچه این دو گونه از هم مستقل باشند، در واقع نماینده دو گونه نهان هستند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در انجام این تحقیق (پژوهانه شماره SCU.AP99.638) تشکر و قدردانی می‌گردد.

امر نشان می‌دهد اعضای کلاسه A در هر دو درخت تصاویر ۳ و ۴ می‌توانند متعلق به گونه *P. mediterraneus* باشند.

دومین ناحیه ژنی توالی‌یابی شده برای این گونه، ناحیه ITS rDNA بود. آزمون بلاست این توالی نشان داد تفاوت قابل توجهی بین این توالی و توالی بعضی از جمعیت‌های دیگر این گونه وجود دارد. قبلا تنوع بالا در توالی این ناحیه در میان جمعیت‌های یک گونه از نماتدهای مولد زخم ریشه مشاهده گردیده است به طوری که چنین تنوع بالایی در سایر نماتدهای انگل گیاهی مشاهده نشده است (De Luca et al., 2011). میزان تنوع درون گونه‌ای مربوط به ناحیه ITS rDNA در جمعیت‌های مختلف گونه *P. zaeae* نیز تا ۹٪ درصد گزارش گردیده است (Troccoli et al., 2016). همچنین جمعیت‌های مختلف گونه *P. vovlasi* Troccoli, Fanelli, Castillo, Liébanas, Cotroneo and De Luca, 2021 در این ناحیه ژنی دارای ۹۷ درصد یکسانی توالی با یکدیگر بوده‌اند که از آن به عنوان تنوع درون گونه‌ای پایین یاد شده است. گونه *P. vovlasi* در بلاست ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA با گونه *P. pratensis* (De Man, 1880) Filipjev, 1936 دارای ۹۶ درصد یکسانی توالی بوده

REFERENCES

- Anonymous. 2021. General Department of Environmental Protection of Khuzestan Province, Department of Environment. Karkhe protected area. From <https://khuzestan.doe.ir/portal/home>
- Barooti, S. 2006. Identification of plant parasitic and predator nematodes fauna of walnut trees in north and central of Iran. 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, Iran. P. 320.
- Bruner, A. G., Gullison, R., Rice, E., and Da Fonseca, G. A. 2001. Effectiveness of parks in protecting tropical biodiversity. Science Journal, 291: 125-128.

- Castillo, P., and Vovlas, N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. Nematology Monographs and Perspectives 6 (Series Editors: Hunt, D.J. and Perry, R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill.
- Choi, D. R., Lee, J. K., Park, B. Y., Han, H. R., and Choi, Y. E. 2006. A new and one unrecorded species of *Pratylenchus* from Korea (Nematoda: Pratylenchidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 9: 5-9.
- Corbett, D. C. M. 1983. Three new species of *Pratylenchus* with redescription of *P. andinus* Lordello, Zamith & Boock, 1961 (Nematoda: Pratylenchidae). Nematologica, 29: 390-403.
- De Grisse, A. T. 1969. Redescription and modification of some techniques used in the study of nematodes phytoparasitaires. Mededelingen Rijksfacultiet Landbouw Wetenschappen Gent, 34: 351-369.
- De la Peña, E., Moens, M., Van Aelst, A., and Karssen, G. 2006. Description of *Pratylenchus dunensis* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with the dune grass *Ammophila arenaria* (L.) Link. Nematology 8: 79-88.
- De Luca, F., Fanelli, E., Di Vito, M., Reyes, A., and De Giorgi, C. 2004. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. European Journal of Plant Pathology, 110: 949-957.
- De Luca, F., Reyes, A., Troccoli, A., and Castillo, P. 2011. Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA. European Journal of Plant Pathology, 130: 415-426.
- Di Vito, M., Greco, N., Halila, H. M., Mabsoute, L., Labdi, M., Beniwal, S. P. S., Saxena, M. C., Singh, K. B., and Solh, M. B. 1994. Nematodes of cool-season food legumes in North Africa. Nematologia Mediterranea, 22: 3-10.
- Dudley, N., and Stolton, S. 2008. Defining protected areas: an international conference in Almeria, Spain. Gland, Switzerland: IUCN. 220 pp.
- Filipjev I. N. 1936. On the classification of the Tylenchinae. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 3: 80-82.
- Filipjev, I. N., and Schuurmans Stekhoven, J. H. 1941. A manual of agricultural helminthology. Leiden, The Netherlands, E. J. Brill.
- Geraert, E. 2013. The Pratylenchidae of the world: identification of the family Pratylenchidae (Nematoda: Tylenchida). Academia Press. Ghent, Belgium.
- Godfrey, G. H. 1929. A destructive root disease of pineapple and other plants due to *Tylenchus brachyurus*. Phytopathology 19: 611-629.
- Graham, T. W. 1951. Nematode root rot of tobacco and other plants. Bulletin 390. South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson Agricultural College, 25 pp.

Greco, N., Di Vito, M., and Saxena, M. C. 1992. Plant parasitic nematodes of cool season food legumes in Syria. *Nematologia Mediterranea*, 20: 37-46.

Huson, D. H., and Scornavacca, C. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, 61: 1061-1067.

Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692.

Movahedifar, E., and Azimi, S. 2020. New morphological observations on *Pratylenchus thornei* Sher & Allen, 1953 (Nematoda Pratylenchidae) based on the population from Iran. *Redia-Giornale Di Zoologia*, 103: 89-100.

Nguyen, H. T., Trinh, Q. P., Couvreur, M., Singh, P. R., Decramer, W., and Bert, W. 2019. Molecular and morphological characterisation of a new root-lesion nematode, *Pratylenchus horti* n. sp. (Tylenchomorpha: Pratylenchidae), from Ghent University Botanical Garden. *Nematology*, 21: 739-752.

Nunn, G. B. 1992. Nematode molecular evolution. Ph.D. Thesis, University of Nottingham, Nottingham, UK.

Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden. Available online at <https://github.com/nylander/MrModeltest2>.

Orion, D., and Shlevin, E. 1989. Nematicide seed dressing for cyst and lesion nematode control in wheat. *Journal of Nematology*, 21: 629-631.

Sher, S. A., and Allen M. W. 1953. Revision of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). *University of California Publications in Zoology*, 57: 441-470.

Pour Ehtesham, N., Azimi, S., and Pedram, M. 2021. First molecular characterisation of *Helicotylenchus abunaamai* Siddiqi, 1972 and *H. dihystra* (Cobb, 1893) Sher, 1961 (Tylenchomorpha: Hoplolaimidae) from Iran. *Russian Journal of Nematology*, 29: 11-22.

Rensch, D. 1924. *Aphelenchus neglectus* sp. n. eine neue parasitäre Nematodenart. *Sonderabdruck aus dem Zoologischen Anzeiger* 59: 277-280.

Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.

Sherbakoff, C. D., and Stanley, W. W. 1943. The more important diseases and insect pests of crops in Tennessee. *Tennessee Agriculture Experiment Station Bulletin* 186: 1-142.

Subbotin S. A., Perry, R., Warry, A., and Halford, P. 2000. Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitising solanaceous plants. *Nematology*, 2: 591-604.

Subbotin S. A., Ragsdale E. J., Mullens T., Roberts P. A., Mundo-Ocampo M., and Baldwin J. G. 2008. A phylogenetic framework for root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 491-505.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates. Sunderland, MA.

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.

Thorne, G., and Malek, R. B. 1968. Nematodes of the northern great plains. I. Tylenchida. South Dakota Agricultural Experimental Station, Technical Bulletin 31: 111 pp.

Troccoli, A., Subbotin, S. A., Chitambar, J. J., Janssen, T., Waeyenberge, L., Stanley, J. D., Duncan, L. W., Agudelo, P., Múnera Uribe, G. E., Franco, J., and Inserra, R. N. 2016. Characterisation of amphimictic and parthenogenetic populations of *Pratylenchus bolivianus* Corbett, 1983 (Nematoda: Pratylenchidae) and their phylogenetic relationships with closely related species. *Nematology*, 18: 651-678.

Troccoli, A., Fenelli, E., Castillo, P., Liébanas, G., Cotroneo, A., and De Luca, F. 2021. *Pratylenchus vovlasi* sp. nov. (Nematoda: Pratylenchidae) on raspberries in North Italy with a morphometrical and molecular characterization. *Plants*, 10: 1-15.

Waeyenberge, L., Viaene, N., and Moens, M. 2009. Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. *Nematology*, 11: 847-857.

Whitehead, A. G., and Hemming, J. R. 1965. A comparison of some quantitative methods for extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55: 25-38.



© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, 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/>).



Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 (Tylenchomorpha: Pratylenchidae) from Iran

A. Abdolkhani¹ and S. Azimi^{2*}

1. MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. *Corresponding Author: Assistant professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (s.azimi@scu.ac.ir)

Received: 23 July 2021

Accepted: 18 October 2021

Abstract

Background and Objectives

The Karkheh protected area is considered as one of the protected areas of Iran, which harbors a remarkable diversity of vegetation. A population belonging to the genus *Pratylenchus* was recovered and identified as *P. mediterraneus* during a survey on the biodiversity of the plant-parasitic nematodes in this region of Khuzestan province. This study aims to characterize the population based on the morphological and morphometric characteristics and evaluate its phylogenetic affinities using LSU D2-D3 and ITS rDNA sequences. Moreover, its phylogenetic relationships were investigated with other relevant genera and species.

Materials and Methods

Several soil samples were collected from the rhizosphere of tamarisk trees in Karkheh protected area. The centrifugal-floatation and tray methods were used for extracting the nematodes from the soil samples. The collected specimens were fixed and transferred to the pure glycerin after extracting the nematodes by using the modified De Grisse method. Then, permanent microscopic slides were prepared from the processed nematodes. The species was identified by using a light microscope equipped with a drawing tube based on the morphological and morphometric characteristics, and valid keys. The molecular phylogenetic analyses were performed by using partial sequences of the D2-D3 expansion segments of the large subunit, and internal transcribed spacer (LSU D2-D3 and ITS rDNA) regions based on the Bayesian inference under the GTR + G + I model.

Results

A population of the genus *Pratylenchus* was recovered in the present study. The morphological, morphometric and molecular studies based on the D2-D3 domains of the 28S and ITS rRNA gene indicated that the recovered population belongs to *P. mediterraneus*. The morphological, morphometric, and molecular data of the Iranian population of the species were presented for the first time in this study. In the phylogenetic tree inferred using the 28S rRNA gene sequences, the newly generated sequence of the Iranian population of *P. mediterraneus* formed a clade with other sequences of the species,

and some sequences assigned to *P. thornei*. All other sequences of *P. thornei* occupied a clade, in close phylogenetic relationship with the aforementioned clade. The newly generated sequence of the Iranian population formed a maximally supported clade with other sequences of the species in the phylogenetic tree inferred using the ITS rRNA gene.

Discussion

The two species *P. thornei* and *P. mediterraneus* are morphologically very similar and can mainly be separated from each other by presence/absence of male and a functional spermatheca. Their separation is further corroborated by using the partial sequences of 28S and ITS rDNA. The sequences of the two species form the separate clades, and the identification of some sequences occupying the same clade with the sequences of *P. mediterraneus* need further validations in lack of the morphological data.

Keywords: *D2-D3 LSU, ITS, morphometrics, phylogeny, Pratylenchus thornei*

Associate editor: M. Pedram (Ph.D.)

Citation: Abdolkhani, A., & Azimi, S. (2021). Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus mediterraneus* Corbett, 1983 (Tylenchomorpha: Pratylenchidae) from Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(3): 91-105. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17127>.