



Morphological and molecular characterization of *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 (Tylenchomorpha: Tylenchidae) from Iran

M. Rajabzadeh ¹, S. Azimi ^{*2}

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

Received: 5 January 2024

Revised: 2 February 2025

Accepted: 22 February 2025

Abstract

Background and Objectives:

Filenchus is one of the most diverse genera of the family Tylenchidae, with various feeding habits. The members of this genus feed on fungi in the soil and the epidermal cells of plant roots. A species belonging to *Filenchus* was recovered and identified during a survey on the fauna of the plant-parasitic nematodes from the soil around the roots of corn in the north of Khuzestan province (Dezful city). This study aimed to characterize the recovered population based on the morphological and morphometric characters and reconstruct its phylogenetic affinities using 18S rDNA and D2-D3 expansion segments of the 28S rDNA sequences. Additionally, the phylogenetic relationships of the Iranian population with other populations of the species and other species of *Filenchus* were investigated.

Materials and Methods:

Several soil samples were collected around the roots of corn fields in the north of Khuzestan province. The centrifugal-floatation and tray methods were used to extract the nematodes from the soil samples. The collected specimens were fixed, transferred to pure glycerin, and mounted on permanent microscopic slides. The species was recognized using an Olympus CX31 light microscope equipped with a drawing tube based on the morphological and morphometric characteristics, and valid keys. The nematode specimens were photographed using an Olympus BX51 microscope with a Tucsen Michrome 20 digital camera. The morphological and morphometric characters of the population were compared with other reported populations of the species. For molecular analyses, DNA was extracted from the studied nematodes. The DNA samples were stored at -20°C until used as a PCR template. Primers for amplification of 18S rDNA were forward SSUF22 and reverse SSUR13. Primers for D2-D3 expansion segments of the 28S rDNA amplification were forward D2Ab and reverse D3B. The polymerase chain reactions (PCRs) were performed to amplify the abovementioned loci. Amplification success was evaluated with electrophoresis on 1% agarose gel. The PCR products were subjected to sequencing. The newly obtained sequences of the studied species were deposited into the GenBank database (PQ803453-PQ803455). The molecular phylogenetic analyses were performed using a partial sequence of the 18S rDNA and D2-D3 expansion segments of the 28S rDNA based on the Bayesian inference under the GTR + G + I model.

Results:

A population of *Filenchus* was recovered in the present study. The morphological, morphometric, and molecular studies based on the 18S rDNA and D2-D3 expansion segments of the 28S rDNA indicated that the recovered population belongs to *F. vulgaris*. This population has females with a length of 630 to 722 μm , lateral field with four incisures, and stylet 10.5 to 11.2 μm long. Males were observed in fewer numbers than females, with spicules of 17.0 to 18.5 μm . In the phylogenetic tree inferred using the 18S rDNA sequences, the newly generated sequences of the Iranian population of *F. vulgaris* formed a clade with other sequences of *F. vulgaris* and sequences of other species of *Filenchus* and species of *Tylenchus* and *Neopsilenchus* genera. 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 28S rDNA gene. This clade included sequences of other species of *Filenchus* and species of the two genera *Tylenchus* and *Irantylenchus*. The molecular data of the Iranian population of the species were presented for the first time in this study.

Discussion:

The identification of most of the species of the genus *Filenchus* was based only on morphological and morphometric characteristics. Multiple phylogenetic analyses have shown that the genus *Filenchus* is polyphyletic. In the phylogenetic trees, the sequences of some populations of *F. vulgaris* are relatively far from each other and even in two different clades. With the increase of sequences of various species of the genus, especially from different populations that belong to different geographical regions, the grouping of populations and species may change, and the phylogenetic relationships between them might be more specific.

Keywords: *corn, DNA sequence, Khuzestan, morphometry, phylogeny*

Associate editor: R. Ghaemi (Ph.D.)

Citation: Rajabzadeh, M. & Azimi, S. (2025). Morphological and molecular characterization of *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 (Tylenchomorpha: Tylenchidae) from Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 48(1), 55-69. <https://doi.org/10.22055/ppr.2025.48697.1784>.



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴

doi 10.22055/ppr.2025.48697.1784

مشخصات ریخت‌شناسی و مولکولی *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 (Tylenchomorpha: Tylenchidae) از ایران

مژده رجب زاده^۱، صدیقه عظیمی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- * نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
(s.azimi@scu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

چکیده

در این مطالعه، جمعیتی از جنس *Filenchus* از خاک اطراف ریشه ذرت در شمال استان خوزستان (شهرستان دزفول) بدست آمد. مطالعات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مولکولی این جمعیت بر اساس توالی قسمتی از ژن 18S rDNA و ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA نشان داد که این جمعیت متعلق به گونه *Filenchus vulgaris* می‌باشد. این جمعیت دارای ماده‌هایی به طول ۶۳۰ تا ۷۲۲ میکرومتر، سطوح جانبی دارای چهار شیار طولی و استایلت به طول ۱۰/۵ تا ۱۱/۲ میکرومتر می‌باشد. نرها به تعداد کمتری نسبت به ماده‌ها در جمعیت مشاهده شدند که دارای اسپیکول به طول ۱۷ تا ۱۸/۵ میکرومتر می‌باشند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی جمعیت بدست آمده با برخی از جمعیت‌های گزارش شده این گونه از نقاط مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. روابط تبارزایی جمعیت ایرانی گونه مورد مطالعه با سایر گونه‌ها و جنس‌های tylenchid با استفاده از روش بیس (Bayesian inference) بازسازی گردید. در آنالیز تبارزایی با استفاده از توالی‌های ژن 18S rDNA، توالی‌های جمعیت ایرانی به همراه توالی‌های دیگری از گونه *F. vulgaris* و توالی‌هایی از سایر گونه‌های جنس *Filenchus* و گونه‌هایی از دو جنس *Tylenchus* و *Neopsilenchus* در یک گروه قرار گرفتند. در آنالیز تبارزایی با استفاده از توالی‌های ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA، توالی جمعیت ایرانی به همراه توالی‌های دیگری از گونه *F. vulgaris* و توالی‌هایی از سایر گونه‌های این جنس و گونه‌هایی از دو جنس *Tylenchus* و *Iranitylenchus* با حمایت شاخه‌ای بالا (BPP = 1.00) در یک گروه قرار گرفتند. بررسی مولکولی جمعیت ایرانی گونه *F. vulgaris* در پژوهش حاضر برای اولین بار ارائه گردید.

کلید واژه‌ها: تبارزایی، توالی DNA، خوزستان، ریخت‌سنجی، ذرت

دبیر تخصصی: دکتر راضیه قائمی

مقدمه

خانواده Tylenchidae Örley, 1880 حاوی جنس‌های متنوعی است که گونه‌های آن‌ها پراکنش وسیعی در سطح جهان دارند (Siddiqi, 2000). اعضاء این خانواده معمولاً در هر نمونه خاکی یافت می‌شوند و اغلب آن‌ها در خاک‌های غنی از جلبک و خزه، جمعیت بیش‌تری دارند (Siddiqi, 2000; Ferris & Bongers, 2006). این گروه با ویژگی‌های متعددی از جمله استایلت ضعیف و دم نخ‌ی شکل مشخص می‌شوند و به عنوان انگل‌های گیاهی ضعیف محسوب می‌گردند (Qing et al., 2017; Siddiqi, 2000).

جنس *Filenchus* Andrassy, 1954 متعلق به زیرخانواده Tylenchinae Örley, 1880 و یکی از متنوع‌ترین جنس‌های خانواده Tylenchidae است (Geraert, 2008; Bert et al., 2010). جنس *Filenchus* عادت‌های غذایی پیچیده و متنوعی دارد. از قارچ‌های موجود در خاک و یا قارچ‌های بیماری‌زای مختلف گیاهی در سطح ریشه گیاهان تغذیه می‌کند. چندین مطالعه نیز نشان داده‌اند که جنس *Filenchus* قادر است از ریشه‌های گیاهان تغذیه کند. این نماتدها اغلب از سلول‌های اپیدرمی تغذیه می‌کنند (Okada et al., 2005; Bert et al., 2010; Sawahata et al., 2012; Cerevkova et al., 2021). با وجود مرموز بودن رفتار تغذیه‌ای این نماتدها، اعضاء این گروه نقش زیست‌محیطی مهمی را به عنوان شاخص‌های سلامت خاک ایفا می‌کنند (Bongers & Bongers, 1998; Munawar et al., 2021).

برای جنس *Filenchus* ۹۵ گونه معتبر توسط گرات معرفی گردیده است (Geraert, 2008). پس از آن، سه گونه دیگر Bert, Okada, *F. fungivorus*, Tavernier, Borgonie & Houthoofd, 2010 *F. pseudodiscus* Mortazavi, Heydari, Abolafia, Castillo & Pedram, 2021 *F. multistriatus* Monemi, Atighi, Abolafia,

Castillo & Pedram, 2023 نیز برای این جنس توصیف گردیدند.

تعداد کل گونه‌های گزارش شده از جنس *Filenchus* در ایران ۳۰ گونه می‌باشد (Ghaderi et al., 2018; Mortazavi et al., 2021; Monemi et al., 2023). تاکنون پنج گونه متعلق به جنس *Filenchus* از استان خوزستان گزارش گردیده‌اند. گونه *F. hamuliger* Brzeski, 1998 از اطراف ریشه نی در حاشیه رود جراحی و در توابع بندر ماهشهر جداسازی شده است (Roshan-Bakhsh Ghanbari et al., 2016). گونه *F. orientalis* Xie & Feng, 1996 از خاک اطراف ریشه باقلا در شهرستان شوشتر (Azimi et al., 2016) و گونه‌های *F. andrassyi* (Szczygiel, 1969) *F. elegantulus* Raski & Andrassy, 1979 *F. sandneri* (Wasilewska, Geraert, 1987) *F. vulgaris* (Raski & Geraert, 1987) و *F. sandneri* (Raski & Geraert, 1987) و *F. vulgaris* (Raski & Geraert, 1987) از خاک اطراف ریشه گل مریم در شهرستان دزفول گزارش گردیده‌اند (Husseinvand et al., 2016).

شناسایی اغلب گونه‌های جنس *Filenchus* صرفاً بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی بوده است. از کل گونه‌های گزارش شده در ایران نیز فقط برای سه گونه، مطالعه مولکولی صورت گرفته است که شامل گونه *Filenchus annulatus* (Siddiqi & Khan, 1986) (Siddiqi & Khan, 1986) و دو گونه‌ای هستند که اخیراً از ایران توصیف گردیده‌اند (Mortazavi et al., 2021; Monemi et al., 2023). در طی بررسی نماتدهای انگل گیاهی ذرت در استان خوزستان، جمعیتی از جنس *Filenchus* به دست آمد. مطالعه ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مولکولی آن نشان داد که این جمعیت متعلق به گونه *F. vulgaris* می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور تشریح مشخصات جمعیت ایرانی گونه براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، همچنین بررسی مولکولی آن با استفاده از توالی‌های ژن

با دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) نگهداری شدند. برای تکثیر ژن 18S rDNA، از آغازگر رفت (5'- SSUF22 (3'- TCC AAG GAA GGC AGC AGG C) و آغازگر برگشت (5'- GGG CAT CAC SSUR13 (3'- AGA CCT GTT A) استفاده شد (Dorris et al., 2002). برای تکثیر قطعه D2-D3 از ژن 28S rDNA از آغازگر رفت (5'- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') و آغازگر برگشت (5'- TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') استفاده شد (De Ley et al., 1999).

واکنش PCR، با حجم ۳۰ میکرولیتر برای هر ژن انجام شد. مخلوط PCR در هر تیوب حاوی ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس، سه میکرولیتر DNA استخراج شده، از آغازگر رفت و برگشت هر کدام یک میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. مراحل چرخه PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴/۷ درجه سلسیوس برای ژن 18S rDNA و در دمای ۵۲/۵ درجه سلسیوس برای ژن 28S rDNA به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه بود و در نهایت، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس 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 et al., 2021). باقی‌مانده محصول PCR همراه با آغازگرهای رفت و برگشت جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال گردیدند. در صورت موفقیت آمیز بودن توالی‌یابی قطعه‌ی تکثیر یافته، کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی با استفاده از نسخه 6.1.2 برنامه کروماتوگرام^۲ مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت. توالی‌های بدست آمده در مطالعه حاضر با شماره دسترسی PQ803453 و PQ803454 برای ژن

18S rDNA و ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA صورت گرفت و بررسی روابط تبارزایی جمعیت ایرانی با سایر جمعیت‌های این گونه و گونه‌های دیگر جنس *Filenchus* انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، استخراج و تهیه اسلاید میکروسکوپی
نمونه برداری‌هایی از خاک اطراف ریشه‌ی ذرت (*Zea mays* L.)، در شمال استان خوزستان صورت گرفت. جهت استخراج نماتدهای کرمی شکل از خاک از روش جنکینز^۱ (Jenkins, 1964) و روش سینی (Whitehead & 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 Tucsen Michrome 20 تهیه شد. سپس با استفاده از نرم افزار فتوشاپ نسخه ۲۰۱۹، تصاویر نهایی بازسازی و تکمیل گردید.

استخراج DNA، تکثیر نواحی ژنی و توالی‌یابی

برای استخراج DNA از نماتدهای مورد بررسی، یک عدد نماتد ماده انتخاب گردید، شستشو داده شد و در لام موقت با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. 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 ۱۰ میکرولیتر بافر به آن اضافه گردید و بافر حاوی نماتد له شده با کمک سمپلر در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید (Jumaah & Azimi, 2024). نمونه‌ها در فریزر

نتایج

جمعیت ایرانی گونه *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985

جدول ۱ و شکل ۱

مشخصات

ماده: بدن کرمی شکل، پس از تثبیت دارای کمی خمیدگی در سطح شکمی و به شکل C باز. پوست دارای حلقه‌های عرضی ظریف، عرض حلقه‌ها ۰/۸ تا ۱/۵ میکرومتر در اواسط بدن. باندهای جانبی دارای چهار شیار طولی. ناحیه سر در امتداد بدن، کمی ذوزنقه‌ای شکل تا نیم کروی، به بلندی ۲/۴ تا ۴ میکرومتر و عرض پایه ۵ تا ۸ میکرومتر، دارای چهار تا پنج شیار عرضی بسیار ظریف، شبکه کوتیکولی سر ضعیف. استایلت ضعیف، گره‌های استایلت کوچک و تقریباً گرد. محل اتصال غده پشتی به مجرای مری به فاصله ۰/۹ تا ۱/۵ میکرومتر از گره‌های استایلت. حباب میانی مری بیضی شکل با دریچه مشخص به طول ۱۴ تا ۱۶ و عرض ۷/۵ تا ۹/۵ میکرومتر، لوله ثانویه مری نسبتاً طویل، حباب انتهایی تقریباً گلابی شکل به طول ۱۷ تا ۱۹ و عرض ۹ تا ۱۱ میکرومتر، نسبت به روده مماس. روزنه دفعی-ترشعی در مقابل لوله ثانویه مری و کمی قبل از شروع حباب انتهایی مری. سیستم تناسلی دارای یک تخمدان که به سمت جلوی بدن امتداد یافته، تخمک‌ها عمدتاً در یک ردیف، کیسه ذخیره اسپرم بیضی شکل، کمی مماس نسبت به محور لوله تناسلی، اغلب فاقد اسپرم، واژن مستقیم به طول ۵/۵ تا ۷/۵ میکرومتر، فرج به صورت شکافی، کیسه عقبی رحم با طولی در حدود برابر عرض بدن در ناحیه شکاف تناسلی. دم کشیده، بلند با انتهای نخی شکل و یا نوک تیز.

نو: به تعداد کمتری نسبت به ماده‌ها در جمعیت مشاهده شدند. از نظر شکل ظاهری شبیه ماده‌ها، اسپیکول و گوبرناکولوم به سمت شکمی خمیده، دم کشیده، بلند با انتهای نخی شکل و یا نوک تیز و بورسا محدود به ناحیه روزنه دفعی-تناسلی.

18S rDNA و شماره دسترسی PQ803455 برای ژن 28S rDNA در بانک ژن به ثبت رسیدند.

بررسی‌های تبارزایی

توالی‌های به دست آمده طی این مطالعه با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه (blastn) یا آزمون جستجوی بلاست) گردید. سپس توالی‌های جدید همراه با توالی‌های آرایه‌های دیگری که از بانک ژن انتخاب شدند با برنامه‌ی Clustal X2 با استفاده از مقادیر پیش فرض، زیرهم چینی شدند (Larkin et al., 2007). ویرایش زیرهم چینی حاصله به صورت دستی با استفاده از نرم افزار مگا^۱ نسخه‌ی هفت (Kumar et al., 2016) انجام شد. برای انجام آنالیزهای فیلوژنی بر اساس روش بیس^۲، مدل تکاملی GTR + G + I با استفاده توام از دو نرم‌افزار * PAUP (Swofford, 2002) و MrModeltest2 (Nylander, 2004) بر اساس معیار حمایتی آکائیک (Akaike-supported model) انتخاب شد. نسخه 3.1.2 نرم افزار مستر بیس^۳ (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)، جهت ترسیم درخت‌های فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تعیین توزیع احتمالات پسین^۴، چهار 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 جمع‌آوری شده سوزانده شد و باقی‌مانده به صورت درخت اجمالی ۵۰ درصد همراه با مقادیر مربوط به حمایت شاخه‌ای ارائه شد. مقادیر بیشتر از ۰/۵۰ درصد احتمال پسین روش بیس^۵، روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شد. فایل‌های خروجی نرم‌افزار فیلوژنی نام‌برده با استفاده از نرم‌افزار دندروسکوپ^۶ نسخه 3.2.8 مشاهده گردید (Huson & Scornavacca, 2012). درخت‌های فیلوژنی نهایی با کمک نرم‌افزار کورل^۷ نسخه‌ی ۲۱ ترسیم شدند.

5- Bayesian Posterior Probabilities = BPP
6- Dendroscope
7- CoreDRAW software

1- Mega
2- Bayesian analysis
3- MrBayes
4- Posterior Probabilities

ملاحظات

بر اساس کلید ارائه شده توسط گرات (Geraert, 2008)، ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جمعیت به‌دست آمده از این جنس، با گونه *F. vulgaris* مطابقت نشان داد. جمعیت ایرانی گونه در مقایسه با شرح و اندازه‌های ریخت‌سنجی ارائه شده در گرات (۲۰۰۸)، تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت.

این گونه در ایران از گیاهان متنوعی در مناطق مختلف کشور گزارش شده است که برخی از این گزارش‌ها همراه با شرح کامل گونه نیز بوده است (Ghaderi et al., 2018). این گونه در تحقیق حاضر، از خاک اطراف ریشه ذرت در شمال استان خوزستان، در شهرستان دزفول (GPS: 32°26'64.1"N, 48°45'12.7"E) جداسازی گردید. جمعیت به‌دست آمده از استان خوزستان در مقایسه با جمعیت گزارش شده توسط Karegar et al., 1995، از انگور در استان همدان و همچنین جمعیت‌های گزارش شده توسط Karegar & Geraert, 1998، از گیاهان مختلف در مناطق مختلف کشور دارای گوبرناکولوم بلندتری بود (۵/۸ تا ۶/۶ در مقابل ۲/۰ تا ۴/۵ میکرومتر). در مقایسه با جمعیت گزارش شده از ریشه چای در لاهیجان، از لحاظ شاخص a بیشتر (۳۸/۲ تا ۴۷/۷ در مقابل ۳۱/۶ تا ۳۷/۲)، شاخص V بیشتر (۶۱/۷ تا ۶۳/۸ در مقابل ۵۴/۶ تا ۶۰/۲) و طول مری بیشتر (۱۱۵ تا ۱۲۶ در مقابل ۹۶ تا ۱۱۵ میکرومتر) تفاوت داشت (Karegar & Geraert, 1995).

نتایج مطالعات مولکولی و تشریح روابط تبارزایی

از ژن 18S rDNA دو توالی (PQ803453 و PQ803454) به طول ۸۷۷ نوکلئوتید برای جمعیت ایرانی گونه *F. vulgaris* به‌دست آمد. آزمون جستجوی بلاست با استفاده از این توالی‌ها نشان داد که آن‌ها با توالی‌های دیگری از این گونه با شماره دسترسی ON123407 و KJ869307 موجود در بانک ژن، بیشترین یکسانی توالی را دارند (۹۹/۸۹ درصد). روابط فیلوژنی توالی‌های جدید نام‌برده همراه با ۶۰ توالی دیگر از خانواده Tylenchidae و دو توالی از بالاخانواده Aphelenchoidea (Fuchs, 1949 Thorne, 1937) به عنوان گروه خارجی با شماره‌های دسترسی EU306347 و HQ218323 مورد

بررسی قرار گرفت. انتخاب توالی‌های خارجی بر اساس مطالعه مشابه قبلی صورت گرفت (Azimi & Abdolkhani, 2023). نتایج این بررسی در شکل ۲ ارائه شده است. در درخت حاصل، توالی‌های نام‌برده جدید به همراه توالی‌های دیگری از گونه *F. vulgaris* و توالی‌هایی از سایر گونه‌های این جنس و گونه‌هایی از دو جنس *Tylenchus* Bastian, 1865 و *Neopsilenchus* Thome & Malek, 1968 در یک کلاد بزرگ با حمایت شاخه‌ای پایین (BPP = 0.58) قرار گرفتند.

توالی یابی قطعه تکثیر شده D2-D3 از ژن 28S rRNA منجر به خوانش یک قطعه به طول ۷۱۸ نوکلئوتید شد (PQ803455). آزمون جستجوی بلاست با استفاده از این توالی نشان داد که این توالی، بیشترین یکسانی نوکلئوتیدها را با توالی یک جمعیت دیگر از این گونه با شماره دسترسی MW082092 به مقدار ۹۹/۳۰ درصد داشت که قبل تر در این پایگاه به ثبت رسیده بود.

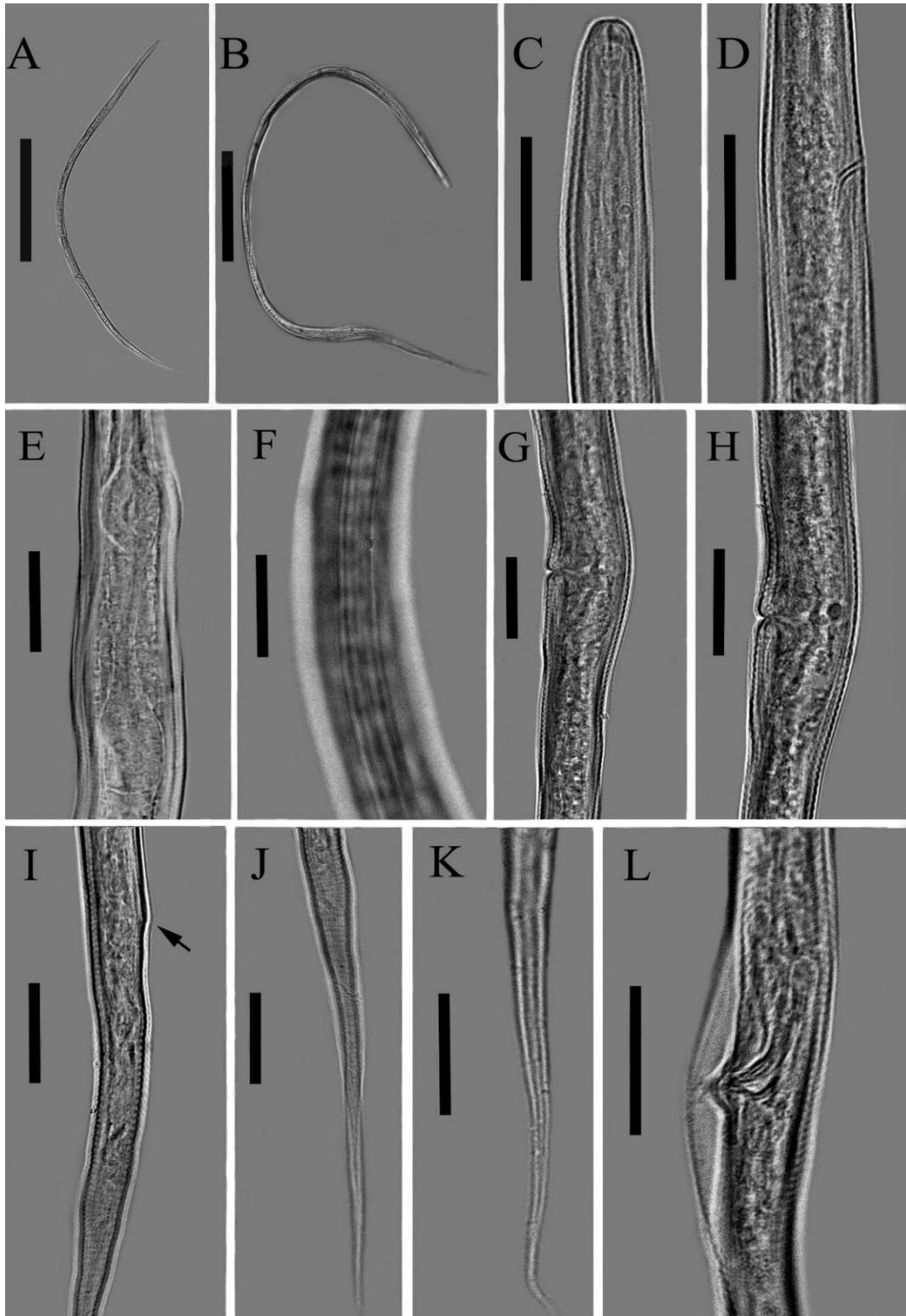
روابط فیلوژنی توالی جدید همراه با ۶۳ توالی دیگر از خانواده Tylenchidae و سه توالی از بالاخانواده Aphelenchoidea با شماره‌های دسترسی DQ328683، JF317247 و FJ998283 در بانک ژن، به‌عنوان گروه خارجی مورد بازسازی قرار گرفت. انتخاب توالی‌های خارجی بر اساس مطالعه‌های مشابه قبلی صورت گرفت (Pedram et al., 2018; Azimi, 2021). نتایج این بررسی در شکل ۳ ارائه شده است. در درخت حاصل، توالی نام‌برده جدید به همراه توالی‌های دیگری از گونه *F. vulgaris* و توالی‌هایی از سایر گونه‌های این جنس و گونه‌هایی از دو جنس *Tylenchus* و *Irantylenchus* Kheiri, 1970 در یک کلاد با حمایت شاخه‌ای بالا (BPP = 1.00) قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای مشابه، بررسی مولکولی این گونه از جمعیت جداسازی شده از کشور بلژیک بر اساس ژن‌های 18S rDNA و 28S rDNA صورت گرفته است (Qing et al., 2017). بر اساس منابع موجود، بررسی مولکولی این گونه در پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران صورت گرفت.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌سنجی *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 از خاک اطراف ریشه ذرت در استان خوزستان، ایران و مقایسه با دو جمعیت انتخاب‌شده. اندازه‌ها بر حسب میکرومتر و به شکل میانگین \pm انحراف معیار (دامنه) می‌باشند.

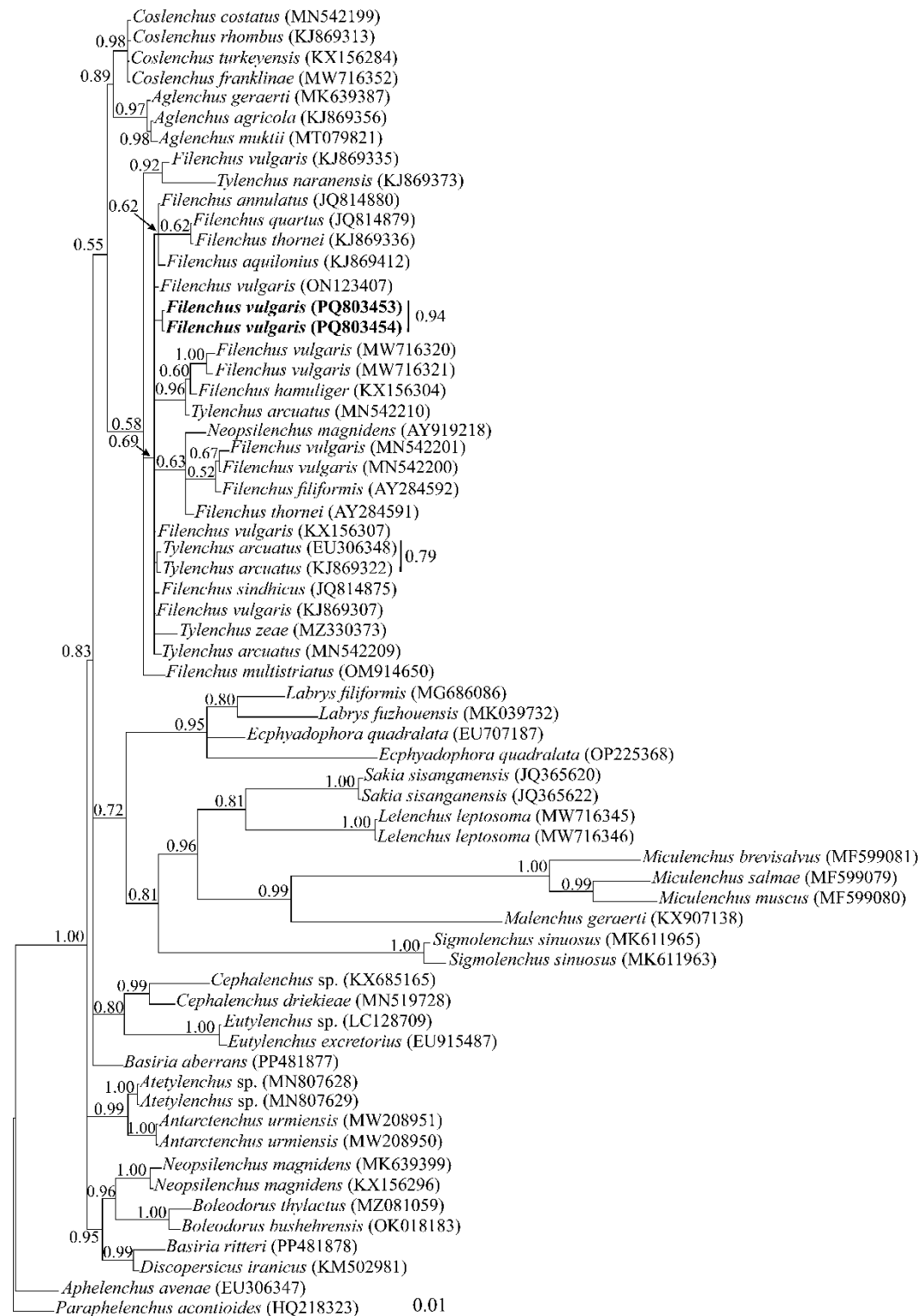
Table 1. Morphometric characteristics of *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 from the soil around the root of corn in Khuzestan province, Iran, and comparison with two selected populations. All measurements are in μm and in the form: mean \pm SD (range).

Character	Present study		Brzeski, 1963	Karegar et al., 1995	
	Female	Male	Female	Female	Male
n	8	2	27	43	7
L	684.4 \pm 32.4 (630-722)	634.9 \pm 6.5 (630-639)	520-810	660 \pm 80 (505-880)	635 \pm 60 (500-705)
a	41.3 \pm 2.1 (38.2-47.7)	43.2 \pm 3.9 (40.7-48.4)	29-42	38 \pm 4.1 (30-47)	38 \pm 2.8 (34-41)
b	5.5 \pm 0.3 (5.1-6.2)	5.5 \pm 0.3 (5.3-5.8)	4.7-7.0	5.8 \pm 0.4 (4.7-6.3)	5.6 \pm 0.4 (5.1-6.3)
c	4.7 \pm 0.2 (4.5-5.1)	4.6 \pm 0.5 (4.3-5.0)	4.2-5.7	4.4 \pm 0.7 (3.4-6.7)	4.5 \pm 0.6 (3.6-5.5)
c'	14.1 \pm 0.5 (13.5-15.0)	12.9 \pm 1.2 (12.1-13.8)	13	15 \pm 3.1 (9-23)	13 \pm 2.2 (10-18)
V	62.5 \pm 0.7 (61.7-63.8)	-	53-65	60 \pm 3.3 (54-69)	-
V'	79.2 \pm 0.9 (77.4-80.5)	-	-	79 \pm 2.0 (74-85)	-
Stylet length	11.0 \pm 0.3 (10.5-11.2)	10.8 \pm 0.4 (10.5-11.2)	10-12	9.5 \pm 1.0 (8-11)	9.5 \pm 0.7 (8.5-11)
MB	44.2 \pm 3.1 (39.8-48.9)	46.8 \pm 2.6 (44.9-48.7)	44	41 \pm 1.7 (37-46)	44 \pm 4.4 (36-50)
Pharynx length	122.1 \pm 3.5 (115-126)	113.5 \pm 7.4 (108-118)	114	115 \pm 13 (99-157)	113 \pm 12 (95-130)
Anterior end to excretory pore	92.7 \pm 3.9 (86-97)	85.4 \pm 6.0 (81-90)	92-102	86 \pm 11 (70-117)	-
Lip region-vulva	428.5 \pm 22.7 (392-460)	-	-	400 \pm 61 (280-600)	-
Lip region-anus	540.4 \pm 31.2 (493-581)	496.6 \pm 21.0 (481-511)	-	-	-
Vulva-anus distance	108.7 \pm 8.2 (97-118)	-	132	105 \pm 18 (72-153)	-
Body width	17.6 \pm 1.1 (15-19)	14.1 \pm 1.3 (13-15)	-	-	-
Anal body width	10.8 \pm 0.2 (10.0-11.5)	10.2 \pm 0.4 (10.0-10.5)	-	-	-
Vulval body width	18.4 \pm 1.2 (16.8-20.6)	-	-	-	-
Post-uterine sac	17.4 \pm 1.4 (14.5-18.6)	-	-	7-15	-
Tail/Vulva-Anus	1.2 \pm 0.1 (1.1-1.4)	-	1.0-1.1	1.5 \pm 0.3 (0.9-2.3)	-
Tail length	142.6 \pm 5.7 (133-148)	136.2 \pm 12.6 (127-145)	135	154 \pm 19 (104-193)	145 \pm 20 (117-175)
Spicules length	-	17.7 \pm 0.9 (17.0-18.5)	-	-	17 \pm 2 (14-20)
Gubernaculum length	-	6.2 \pm 0.4 (5.8-6.6)	-	-	4 \pm 0.6 (3.1-4.5)
Bursa length	-	37.5 \pm 0.9 (37-38)	-	-	-



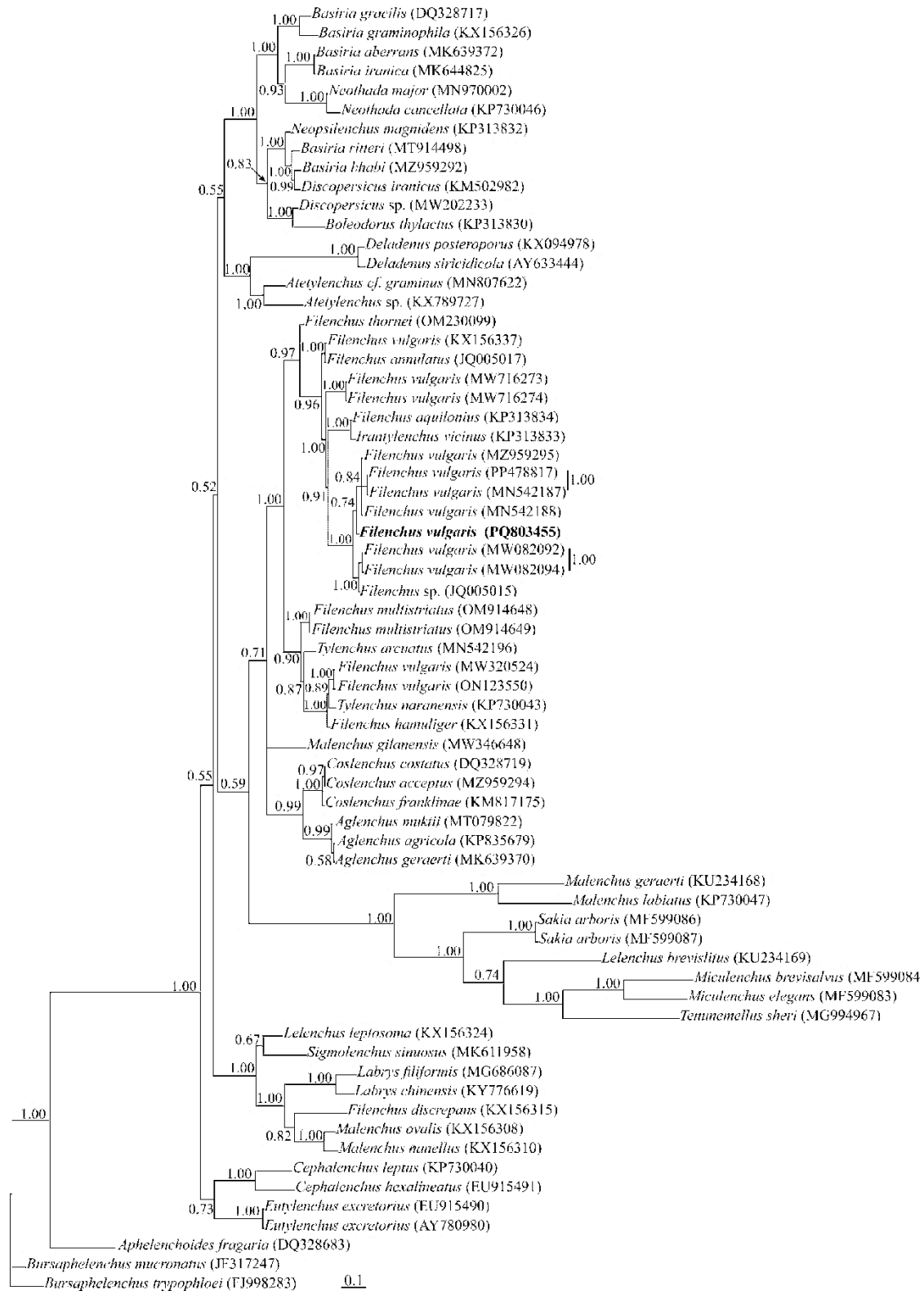
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ نوری از جمعیت ایرانی گونه *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbey & Lownsbey, 1985: ماده (A, C-K)، نر (B, L). A, B: نمای کلی بدن، C: ناحیه جلویی بدن، D: محل منفذ ترشچی، E: بخشی از مری، F: باند جانبی در وسط بدن، G-H: ناحیه فرج، I-L: ناحیه عقبی بدن (فلش محل مخرج را نشان می‌دهد). مقیاس: A: ۲۰۰ میکرومتر، B: ۱۰۰ میکرومتر و C-L: ۲۰ میکرومتر.

Figure 1. Light photomicrographs of Iranian population of *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbey & Lownsbey, 1985: Female (A, C-K), Male (B, L). A: Entire body, B-C: Anterior region, D: Excretory pore region, E: Part of pharyngeal region, F: Lateral field at mid-body, G-H: Vulval region, I-L: Posterior region (the arrows indicate the anus). Scale bars: A = 200 μ m, B: 100 μ m, C-L = 20 μ m.



شکل ۲- درخت فیلوژنی بازسازی شده با استفاده از توالی‌های ژن 18S rRNA جمعیت ایرانی گونه *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 در استان خوزستان و توالی‌های دیگری از خانواده Tylenchidae 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.

Figure 2. Bayesian 50% majority rule consensus tree inferred using the 18S rRNA gene of Iranian population of *Filenchus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 from Khuzestan province and other sequences of the family Tylenchidae under the GTR + G + I model. Bayesian posterior probability values more than 0.50 are given for appropriate clades.



شکل ۳- درخت فیلوژنی بازسازی شده با استفاده از توالی ناحیه D2-D3 از ژن 28S rRNA جمعیت ایرانی گونه *Filenchenus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 در استان خوزستان و توالی‌های دیگری از خانواده Tylenchidae 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.

Figure 3. Bayesian 50% majority rule consensus tree inferred using the D2-D3 domains of the 28S rRNA gene of Iranian population of *Filenchenus vulgaris* (Brzeski, 1963) Lownsbery & Lownsbery, 1985 from Khuzestan province and other sequences of the family Tylenchidae under the GTR + G + I model. Bayesian posterior probability values more than 0.50 are given for appropriate clades.

بحث

طی مطالعه نماتدهای انگل گیاهی ذرت در استان خوزستان، گونه *Filenchus vulgaris* به دست آمد که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. در میان گونه‌های جنس *Filenchus*، تفاوت واضح در شاخص‌هایی که به تشخیص گونه منجر می‌گردد پایین است. بسیاری از گونه‌های این جنس بدون توجه به تغییرات طبیعی توصیف شده‌اند که این مساله منجر به ارائه نظرات گیج‌کننده و حتی مخالف همدیگر در خصوص شناسایی گونه‌ها گردیده است (Bert et al., 2010). بررسی ژن‌های متعدد برای شفاف شدن روابط بین گونه‌های موجود در یک شاخه و همچنین بین گونه‌های شاخه‌های موجود در درخت‌های تبارزایی مفید است (Atighi et al., 2013).

آنالیزهای تبارزایی متعدد صورت گرفته بر اساس ژن 18S rDNA و ناحیه D2-D3 از ژن 28S rDNA نشان داده است که جنس *Filenchus* چندنیایی^۱ است (Bert et al., 2010; Atighi et al., 2013; Qing et al., 2017; Qing & Bert, 2019; Mortazavi et al., 2021; Monemi et al., 2023). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز با مطالعات صورت گرفته قبلی مطابقت دارد. نکته قابل توجه پراکندگی جمعیت‌های مختلف گونه *F. vulgaris* در هر دو درخت تبارزایی مربوط به ژن‌های مورد بررسی می‌باشد. توالی‌های برخی از جمعیت‌های مربوط به گونه مذکور با فاصله نسبتاً دوری از یکدیگر و حتی در دو تبار مختلف قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال توالی برخی از جمعیت‌های *F. vulgaris* با گونه‌های *F. hamuliger* و *Tylenchus arcuatus* Siddiqi, 1963 گروه‌بندی شدند در صورتی که توالی برخی از جمعیت‌های آن با

گونه‌های *Neopsilenchus magnidens* (Thorne, 1949) Thorne & Malek, 1968 *F. filiformis*، و *F. thornei* (Andrássy, 1954) Andrassy, 1963 در یک گروه قرار گرفتند. مشابه این وضعیت در گروه‌بندی گونه‌های جنس *Filenchus*، قبلاً در مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نیز گزارش گردیده است (Qing et al., 2017; Qing & Bert, 2019; Munawar et al., 2022).

موقعیت قرار گرفتن توالی‌های مربوط به جمعیت‌های مختلف یک گونه از جنس *Filenchus* در درخت‌های تبارزایی به صورت پراکنده در شاخه‌های مختلف، به احتمال وجود گونه‌های پنهان^۲ و یا شناسایی اشتباه گونه مربوطه نسبت داده شده است (Munawar et al., 2022). ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی برخی از جمعیت‌هایی که توالی‌های آن‌ها در بانک ژن به ثبت رسیده است در دسترس نمی‌باشد. از طرف دیگر بسیاری از گونه‌های جنس *Filenchus* بر اساس ویژگی‌های مولکولی بررسی نشده‌اند و توالی‌های آن‌ها موجود نمی‌باشد. با افزایش تعداد توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف جنس مذکور به ویژه از جمعیت‌های مختلف که متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی باشند، ممکن است نحوه گروه‌بندی جمعیت‌ها و گونه‌ها تغییر یافته و روابط تبارزایی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه از جنس مذکور و یا گونه‌های مختلف آن مشخص تر شود.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در انجام این تحقیق (پژوهانه شماره SCU.AP1403.638) تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Atighi, M. R., Pourjam, E., Pereira, T. J., Okhovvat, S. M., Alizadah, B. A., Mundo-Ocampo, M., & Baldwin, J. G. (2013). Redescription of *Filenchus annulatus* (Siddiqui and Khan, 1983) Siddiqi, 1986 based on specimens from Iran with contributions to the molecular phylogeny of the Tylenchidae. *Nematology*, 15, 129–141. <http://doi.org/10.1163/156854112X649819>

- Azimi, S. (2021). Description of *Basiria iranica* sp. nov. (Nematoda: Tylenchidae) from southwestern Iran and its phylogenetic relationships. *Annales Zoologici*, 71, 225–233. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2021.71.2.002>
- Azimi, S., & Abdolkhani, A. (2023). Description and molecular characterization of *Ditylenchus pedrami* n. sp. (Rhabditida: Anguinidae) from Iran. *Nematology*, 25, 181–193. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10213>
- Azimi, S., Mahdikhani-Moghadam, E., Rouhani, H., & Rajabi Memari (2016). First report of the nematodes *Filenchus orientalis* and *Hemicriconemoides californianus* on faba bean in Iran. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9, 44–50. <http://doi.org/10.1515/hppj-2016-0005>
- Bert, W., Okada, H., Tavernier, I., Borgonie, G., & Houthoofd, W. (2010). Morphological, morphometrical and molecular characterisation of *Filenchus fungivorus* n. sp., a fungivorous nematode from Japan in a most likely polyphyletic genus (Nematoda: Tylenchina). *Nematology*, 12, 235–246. <http://doi.org/10.1163/138855409X12470437876116>
- Bongers, T., & Bongers, M. (1998). Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, 10, 239–251. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00123-1)
- Brzeski, M. W. (1963). On the taxonomic status of *Tylenchus filiformis* Bütschli, 1873, and the description of *T. vulgaris* sp. n. (Nematoda: Tylenchidae). *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences*, 11, 531-535.
- Cerevkova, A., Renco, M., Miklisova, D., & Gomoryova, E. (2021). Soil nematode communities in managed and natural temperate forest. *Diversity*, 13 (7), 327. <https://doi.org/10.3390/d13070327>
- 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, P., Félix, M. A., Frisse, L. M., Nadler, S. A., Sternberg, P. W., & Thomas, W. K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1, 591–612. DOI: 10.1163/156854199508559
- Dorris, M., Viney, M. E., & Blaxter, M. L. (2002). Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology*, 32, 1507–1517. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00156-X)
- Ferris, H., & Bongers, T. (2006). Nematode indicators of organic enrichment. *Journal of nematology*, 38, 3–12.
- Geraert, E. (2008). *The Tylenchidae of the world: identification of the family Tylenchidae (Nematoda)*. Academia Press.
- Ghaderi, R., Kashi, L., & Karegar, A. (2018). *Plant-parasitic nematodes in Iran*. Science Reference in collaboration with the Iranian Society of Nematology, Shiraz.
- Huson, D. H., & Scornavacca, C. (2012). Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, 61, 1061–1067. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys062>

Husseinvand, M., Abdollahi, M., & Karegar, A. (2016). Description of some nematode species of Tylenchidae, associated with *Polianthes tuberosa* from Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 1953–1966.

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

Jumaah, A. M., & Azimi, S. (2024). First morphological and molecular characterization of *Psilenchus hilarulus* de Man, 1921 (Nematoda: Psilenchidae) from Iraq. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46, 57-69. <https://doi.org/10.22055/ppr.2024.46016.1731>

Karegar, A., & Geraert, E. (1995). The Genus *Filenchus* Andrassy, 1954 (Nemata: Tylenchidae) from Iran. *Belgian Journal of Zoology*, 125, 363–382.

Karegar, A., & Geraert, E. (1998). The genus *Filenchus* Andrassy, 1954 (Nemata: Tylenchidae) from Iran: species with four lateral lines. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 1, 1–22.

Karegar, A., Geraert, E., & Kheiri, A. (1995). Tylenchs associated with grapevine in the province of Hamadan, Iran. *Mededelingen Faculteit Landbouwkzllldige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, 60/3h, 1063–1086.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McWilliam, P. A., Valente, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

Monemi, Atighi, M. R., Abolafia, J., Castillo, P., & Pedram, M. (2023). Morphological and molecular characterization of *Filenchus multistriatus* n. sp. (Tylenchomorpha: Tylenchidae) and data on a known species of the genus from Bushehr province, southern Iran. *Journal of Nematology*, 55, 1–13. <http://doi.org/10.2478/jofnem-2023-0008>

Mortazavi, P., Heydari, F., Abolafia, J., Castillo, P., & Pedram, M. (2021). Morphological and molecular characterization of *Filenchus pseudodiscus* n. sp. from east Golestan province, north Iran; with an updated phylogeny of *Malenchus* Andrassy, 1968 (Tylenchomorpha: Tylenchidae). *Journal of Nematology*, 53, 1–14. <http://doi.org/10.21307/jofnem-2021-069>

Munawar, M., Castillo, P., & Yevtushenko, D. P. (2022). Description of *Filenchus* Species from Agroecosystem of Southern Alberta, Canada. *Agronomy*, 12, 690. <http://doi.org/10.3390/agronomy12030690>

Munawar, M., Yevtushenko, D. P., & Castillo, P. (2021). First report of three Tylenchidae taxa from Southern Alberta, Canada. *Horticulturae*, 7, 449. <http://doi.org/10.3390/horticulturae7110449>

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

Okada, H., Harada, H., & Kadota, I. (2005). Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1113–1120. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.010>

Pedram, M., Soleymanzadeh, M., Pourjam, E., & Mobasser, M. (2018). Observations on *Malenchus geraerti* n. sp. (Rhabditida: Tylenchidae), a morphological and molecular phylogenetic study. *Zootaxa*, 4369, 406–418. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4369.3.6>

Pour Ehtesham, N., Azimi, S., & 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. <https://doi.org/10.24411/0869-6918-2021-10002>

Qing, X., & Bert, W. (2019). Family Tylenchidae (Nematoda): an overview and perspectives. *Organisms Diversity and Evolution*, 19, 391–408. <http://doi:10.1007/s13127-019-00404-4>

Qing, X., Decramer, W., Claeys, M., & Bert, W. (2017). Molecular phylogeny of *Malenchus* and *Filenchus* (Nematoda: Tylenchidae). *Zoologica Scripta*, 46, 625–636. <http://doi:10.1111/zsc.12236>

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

Roshan-Bakhsh Ghanbari, A., Pourjam, E., & Pedram, M. (2016). Four nematode species of the infraorder Tylenchomorpha (Nematoda: Tylenchina) from Khouzestan Province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51, 445–459.

Sawahata, T., Nakamura, H., Okada, H., Sasaki, A., & Kanematsu, S. (2012). Nonlethal ectoparasitism of the mycophagous nematode *Filenchus discrepans* (Nematoda: Tylenchidae). *Nematology*, 14, 159–164. <http://doi.org/10.1163/138855411X584025>

Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida, Parasites of Plants and Insects*. 2nd ed., CAB International, Wallingford. 833 pp.

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

Whitehead, A. G., & Hemming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods for extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55, 25–38. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1965.tb07864.x>



© 2025 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/>).