Morphological and molecular characteristics of the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofold White, 1919) Chitwood, 1949, in greenhouses of Herat and Farah provinces of Afghanistan

Introduction

Greenhouses are vital platforms for agricultural production, contributing significantly to food security. High yield potential and efficient land utilization are key advantages of greenhouse cultivation of tomatoes and cucumbers in Herat and Farah provinces of Afghanistan. The cultivation of greenhouse cucumbers and tomatoes is a relatively new practice in Afghanistan, particularly in the Herat region, resulting in limited knowledge about the pathogens affecting these crops. Detailed information on plant-parasitic nematodes impacting cucumbers, tomatoes, and various other crops in Afghanistan, particularly in the Herat region, remains limited. Each year, significant crop losses are caused by root-knot nematodes (*Meloidogyne spp*.). These challenges prompted the present study to identify root-knot nematode species associated with cucumber and tomato crops in these regions.

Materials and Methods

From 2019 to 2021, 40 soil and root samples were collected from greenhouses and fields in Herat and Farah provinces. After collection, soil samples were labeled and transported to the Plant Disease Research Laboratory, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, for analysis. Nine soil samples infested with root-knot nematodes were reared on tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Early Urbana) in the Plant Disease Research Greenhouse. After 60–65 days, nematode-infected plant roots were transferred to the Plant Disease Laboratory for species identification. Species characterization was performed using morphological and morphometric data of adult females and second-stage juveniles. Two populations (HJI1 from Harat and HJI2 from Farah Provinces) selected for more morphometric, morphological and molecular studies and comparisons. Molecular studies were conducted only for HJI1 & HJI2 populations and based on D2-D3 of 28S rRNA region.

Results and Discussion

Morphometric and morphological features of *M. incognita* distinguished this nematode from other species. For more detailed studies HJI1 & HJI2 populations were selected from Harat and Frah provinces, respectively. Both populations were similar to each other, morphologically. **Females:** Pear-shaped, white, with prominent neck, body length 700 to 900 µm, fine stylet 15 to 17 µm long, large and oval mid-esophageal bulb with a distinct valve. The perineal pattern oval to rounded, the dorsal arch high, rounded and sometimes rectangular, flatten at the tip or trapezoidal, the lines of lateral fields indistinct and sometimes with fork-like striae. The vulval slit 19 to 24 µm, its distance from the anus was 17 to 23 µm, and the phasmids visible. **Males**: not founded. **Second-stage juveniles:** Long, worm-shaped 330-450 µm, lateral field with four incisures. Stylet 10.5 to 14 µm, the conical part of the stylet is almost equal to the cylindrical part, and knobs prominent and round. The dorsal esophageal gland 2 to 3.5 µm below the stylet knobs. Tail conical, 33 to 56 µm long, hyaline region 10.5 to 14 µm. However, there are some overlaps in the morphometric and

morphological data of *Meloidogyne* spp., so sequencing of the D2-D3 region of 28S rRNA was used for more precise identification. The results grouped the studied species with tropical root-knot nematodes. A phylogenetic tree was constructed based on 31 sequences from the 28S ribosomal DNA region, including two sequences coded HJI1 and HJI2 from the present study, two sequences from *Pratylenchus penetrans* and *Radopholus similis* as outgroups, and 27 other sequences from the NCBI gene bank. In this tree, the sequences from the two populations HJI1 and HJI2 were placed in a monophyletic multilineage clade (clade A) that also includes sequences from other tropical root-knot nematode species, including *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. konaensis*, *M. paranaensis*, and *M. phaseoli*. Therefore, *M. incognita* was distinguished from other tropical root-knot nematode species by its trapezoidal, rounded, high and occasionally flattened dorsal arch, closely spaced striae that exhibit a very wavy to zigzag pattern, and the indistinct lateral field and sometimes marked by breaks in stria. This is the first study of morphometric, morphological and molecular characteristics of *M. incognita* species in Harat and Frah Provinces greenhouses of Afghanistan.

Conclusion

Preventing damage to greenhouse cucumber and tomato cultivation and improving crop yields requires an understanding of factors that reduce the quality and quantity of these crops. Root-knot nematodes are destructive plant-parasitic pathogens that reduce agricultural productivity, and threaten food security. Notably, *M. incognita* was isolated and identified from Herat and Farah provinces and two selected populations were similar. The high similarity between the two populations and the neighborhood of Herat and Farah provinces may indicate that the spread of *M. incognita* infections has been happen through plant exchanges without regard to their health. Therefore, it is necessary to observe plant quarantine in infected areas and greenhouses to prevent the spread of this pathogen. The obtained data and characteristics of this study can be used to facilitate future studies and more easily identifying *M. incognita* species.

Keywords: Cucumber, Farah province, Herat province, Root-Knote nematode, Tomato

بررسی خصوصیات نماتد ریشه‌گرهی جنوبی، ***Meloidogyne incognita*** **(Kofold White, 1919) Chitwood, 1949، در گلخانه‌های دو استان هرات و فراه افغانستان**

جلیل احمد دانشیار[۱]، عصمت مهدیخانی مقدم[۲*]، ساره بقائی راوری[۲]، فاطمه شکاری ماهونکی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۰۶

۱- گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرات، هرات، افغانستان
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

mahdikhani-e@um.ac.ir
https://doi.org/10.22067/JPP.2026.96430.1263

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از جمله عوامل بسیار خسارت‌زا در گیاهان گلخانه‌ای به‌شمار می‌روند که سبب کاهش کیفیت و کمیت محصول آنها می‌شوند. شناسایی دقیق گونه نماتدهای ریشه‌گرهی در مدیریت آنها نقش دارد. به این منظور، تعدادی نمونه خاک و ریشه از گلخانه‌های خیار و گوجه‌فرنگی استان‌های هرات و فراه افغانستان جمع‌آوری گردید. نماتدهای ریشه‌گرهی جمع‌آوری شده، جهت مطالعات بیشتر روی گوجه‌فرنگی خالص سازی و تکثیر شدند. تشخیص گونه با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌ها، لارو سن دوم و الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده (Perineal Pattern) صورت گرفت. در این نمونه‌ها گونه‌ی *Meloidogyne incognita* جداسازی و شناسایی گردید. از هر استان یک جمعیت (از استان هرات جمعیت HJI1 و از استان فراه جمعیت HJI2) برای بررسی و مقایسه خصوصیات ریخت‌سنجی و ریخت شناسی انتخاب شد. دو جمعیت مورد مطالعه از نظر خصوصیات مذکور شباهت بسیاری به هم داشتند. برای مطالعه ملکولی، قطعه‌ای از DNA مربوط به ناحیه DNA 28S D2/D3 ریبوزومی تکثیر و توالی‌یابی شد. پس از همردیف‌سازی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی، جمعیت‌های *M. incognita* (HJI1 وHJI2) با حمایت ۸۸ درصد در گروه نماتدهای ریشه گرهی گرمسیری قرار گرفتند و ویژگیهای مرفولوژیکی آن‌ها را از سایر گونه‌های گرمسیری جدا کرد. شباهت‌های زیاد دو جمعیت HJI1 وHJI2 و همجواری دو استان هرات و فراه این فرضیه را تقویت می کند که آلودگی گلخانه‌های این مناطق منشا یکسانی داشته باشند و در پی انتقال مواد گیاهی از یک استان به استان دیگر رخ داده باشد. لذا ضروری است که بحث بهداشت زراعی و قرنطینه در گلخانه‌ها مورد توجه قرار گیرد. ویژگیهای مرفولوژیکی و ملکولی بدست آمده در این مطالعه می توانند در شناسایی گونه *M. incognita* مورد استفاده قرار گرفته و تسهیل‌گر باشند.

کلیدواژه‌ها: استان فراه، استان هرات، خیار، گوجه‌فرنگی، *M. incognita*.

مقدمه

گلخانه‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بسترهای تولید محصولات کشاورزی، نقش مؤثری در تأمین امنیت غذایی دارند. بهره‌وری بالا و استفاده بهینه از زمین زیر کشت از جمله مزایای اصلی کشت گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی و خیار در استان‌های هرات و فراه به شمار می‌رود. نبود سردخانه‌های مناسب در این مناطق سبب شده تا تولید گلخانه‌ای این محصولات بتواند نیاز بازار را در خارج از فصل معمول کشت تأمین کند و در عین حال سود مناسبی برای گلخانه‌داران به همراه داشته باشد. بر پایه اطلاعات موجود، شمار قابل توجهی از گلخانه‌ها با مشارکت دولت، نهادهای حمایتی و کشاورزان در این استان‌ها ایجاد شده و محصولات اصلی آن‌ها شامل خیار، گوجه‌فرنگی و توت‌فرنگی است. در این میان، خیار و گوجه‌فرنگی بیشترین سهم را در افزایش درآمد سالانه گلخانه‌داران دارند (Omid et al., 2011).

نماتدها تقریبا ۹۰ درصد از موجودات پرسلولی را تشکیل می‌دهند، این موجودات بطور گسترده پراکنده بوده و از قابلیت سازگاری خوبی برخوردار هستند (Çetintaş et al., 2017). نماتدهای انگل گیاهی سبب خسارت در گیاهان شده و از طریق برهمکنش با سایر میکروارگانیسم‌ها مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها، عفونت‌های ثانویه در میزبانشان، ایجاد می‌کنند (Smant et al., 2018). خساراتی که توسط نماتدها ایجاد می‌شود، بدلیل اندازه میکروسکوپی آنها به راحتی از سایر عوامل قابل تشخیص نیست. نماتدها در خاک، ریشه و برگ گیاهان زندگی نموده و تهدید بزرگی برای کشاورزی محسوب می‌شوند، بطوری که خسارت سالانه آن‌ها در حدود ۱۵۷ میلیارد دلار گزارش شده است (Youssef et al., 2013). برخی از نماتدهای انگل گیاهی از طریق برهمکنش با سایر میکروارگانیسم‌ها مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها، عفونت‌های ثانویه در میزبانشان، ایجاد می‌کنند (Smant et al., 2018). یکی از مخرب‌ترین نماتدهای انگل گیاهی، جنس *Meloidogyne* می‌باشد (Kamran et al., 2014; Xiang et al., 2017). از نظر اقتصادی، انگل گیاهی خسارتزا و از جمله آفات زیان آور سبزیجات، غلات و حبوبات به شمار می‌رود (Anwar and McKenry, 2010; Castagnone-Sereno et al., 2013).

جنس *Meloidogyne* شامل بیش از ۱۰۰ گونه است که دامنه میزبانی برخی از آن‌ها حدود ۳۰۰۰ گونه گیاهی را دربر می‌گیرد (Hunt and Handoo, 2009). این نماتدها در سرتاسر جهان پخش بوده و به تمام محصولات کشاورزی (تجاری و غیر تجاری) در همه نقاط دنیا خسارت وارد می‌کنند (Lopes & Ferraz, 2016). نماتدهای ریشه گرهی از جمله نماتدهای انگل داخلی ساکن بوده که باعث تشکیل سلول‌های غول آسا در ریشه می‌شوند. سلول‌های غول آسا برای تغذیه و تکمیل چرخه زندگی نماتد ضروری هستند (Baldacci-cresp et al., 2015).

براساس منابع موجود چهار گونه این جنس شامل *Meloidogyne incognita*، *M. javanica*، *M. arenaria* و *M. hapla*، تقریبا ۹۵ درصد از کل آلودگی‌های ریشه گرهی، در اراضی کشاورزی را شامل می‌شوند. این پاتوژن‌های مهم موجب خسارت در حدود ۵ درصد، بر روی محصولات کشاورزی در سراسر جهان می‌شوند (Hussey & Janssen, 2002). گونه

M. incognita مهم‌ترین گونه از نظر اقتصادی است (Haygood *et al*., 1990; Carneiro *et al*., 2004; Ma *et al*., 2007; Ploetz, 2011).

با توجه به نوپا بودن کشت گلخانه‌ای گوجه فرنگی و خیار در کشور افغانستان و به ویژه در استان هرات، و احداث روز افزون گلخانه برای کشت این دو محصول و سعی بر افزایش تولیدات آن‌ها از طریق کاهش خسارت عوامل بیماریزا از جمله نماتدهای ریشه گرهی وجود دارد. قابل ذکر است که اطلاعات کامل و دقیق نسبت به شناخت نماتدهای انگل خیار و گوجه فرنگی و حتی سایر گیاهان در افغانستان و به‌طور خاص در هرات وجود نداشته و سالانه مقدار قابل توجهی از محصول توسط نماتدها به‌ویژه نماتدهای ریشه گرهی ازبین می‌رود. اولین قدم برای مدیریت نماتدهای ریشه گرهی شناسایی دقیق گونه‌ی آن‌ها است. بنابراین شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی گلخانه‌های خیار و گوجه‌فرنگی در استان هرات و فراه به عنوان مهم‌ترین هدف این تحقیق در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

در سال‌های زراعی ۱۳۹۸، ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ در فصول مختلف، با کمک گلخانه داران و کشاورزان تعداد ۴۰ نمونه خاک، به طور تصادفی از اطراف ریشه از عمق ۵ تا ۳۰ سانتی متری، از گلخانه‌ها و مزارع استان هرات و چند نمونه از استان فراه، جمع‌آوری گردید. بعد از انجام مرحله نمونه‌برداری (تهیه نمونه‌های یک کیلوگرمی) و ثبت مشخصات هر نمونه خاک، نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیقات بیماری‌های گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل و تا شروع کار استخراج نماتدها، نمونه‌های خاک در یخچال (دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند.

از نمونه های خاک و ریشه تعداد ۹ نمونه به نماتد ریشه‌گرهی آلوده بودند که از مناطق جبرئیل استان هرات (۵ عدد) و دار آباد استان فراه (۴ عدد) جمع آوری شدند. جهت تکثیر نماتد در سطح گلخانه، از نشاها گوجه‌فرنگی رقم ارلی اربانا که در مرحله ۶-۴ برگی، استفاده شد. گیاهچه‌ها به مدت ۶۰ تا ۶۵ روز در گلخانه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از مدت زمان ذکر شده ریشه گیاهان آلوده به نماتد جهت تشخیص به آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی انتقال یافت.

ریشه های آلوده زیر استرئو میکروسکوپ بررسی شدند. توده‌های تخم به کمک سوزن کنار زده شد و ماده های بالغ از ریشه بیرون آورده شدند. کیسه‌های تخم درون انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا تخم ها تفریخ شوند. لاروهای سن دوم پس از بیرون آمدن از تخم به روش دگریسه (De Grisse, 1969) تثبیت شده و از آنها پرپاراسیون دائمی تهیه گردید. بدن ماده بالغ در اسید لاکتیک برش داده شد (Taylor & Netscher, 1974). قسمت ابتدا و انتهای بدن آنها بر روی یک قطره گلیسرین در اسلایدهای جداگانه قرار گرفت و مطالعه گردید. در ماده‌ها طول و عرض بدن، اندازه گردن و استایلت، فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت، فاصله ابتدای بدن از دریچه حباب میانی مری، اندازه شکاف فرج، فاصله بین فرج تا مخرج و فاصله بین دو فاسمید اندازه‌گیری شد. برای لاروهای سن ۲، طول و عرض بدن، اندازه استایلت، فاصله

محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت، فاصله ابتدای بدن از دریچه حباب میانی مری، طول دم و اندازه ضخامت کوتیکولی انتهای دم (هیالین) بررسی شدند.

مطالعات ملکولی بر روی دو جمعیت از گونه *M. incognita* با کدهای HJI1 (مربوط به اســتان هرات) و HJI2 (مربوط به اســتان فراه) انجام شــد. یک نمونه نماتد ماده از هر جدایه انتخاب و به یک قطره کوچک از بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris-Cl، ۰,۵ میلی‌مولار EDTA؛ pH 9.0) روی یک لام تمیز منتقل و با اســتفاده از یک لامل تمیز له شــد. سو سپاند سیون با ا ضافه کردن ۵۰ میکرولیتر بافر TE جمع‌آوری شد. نمونه‌های DNA تا زمان ا ستفاده به عنوان الگوی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Pedram, 2019).

با اســتفاده از آغازگرهای D2/D3 ناحیه DNA 28S ریبوزومی جمعیتهای مورد مطالعه تکثیر گردید. PCR در دســتگاه ترمو سایکلر ®Biometra و تحت شرایط چرخه‌ای زیر انجام شد: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. محصول‌های PCR بدست آمده با استفاده از همان پرایمرهای مورد استفاده در PCR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند.

توالی‌های بدست آمده، با توالی های موجود در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مقایسه شدند. چند توالی از بانک ژن مذکور انتخاب و به همراه توالی های مربوط به دو جمعیت مورد مطالعه، به کمک نرم افزارهای MEGA، Clastal x2 و MrBayes v3.1.2 درخت تبارزایی رسم شد.

نتایج

نماتدهای ریشه‌گرهی استخراج شده از گلخانه‌های خیار و گوجه فرنگی استان‌های هرات و فراه، بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی به عنوان *M. incognita* شناسایی شدند. از هر استان یک جمعیت جهت مطالعه و مقایسه مرفولوژیکی و ملکولی انتخاب شدند. جمعیت مربوط به استان هرات HJI1 و جمعیت متعلق به استان فراه HJI2 نام گرفت. شایان ذکر است که این پژوهش نخستین گزارش از گونه *M. incognita* در استان‌های هرات و فراه افغانستان را ارائه می‌کند.

علائم بیماریزایی

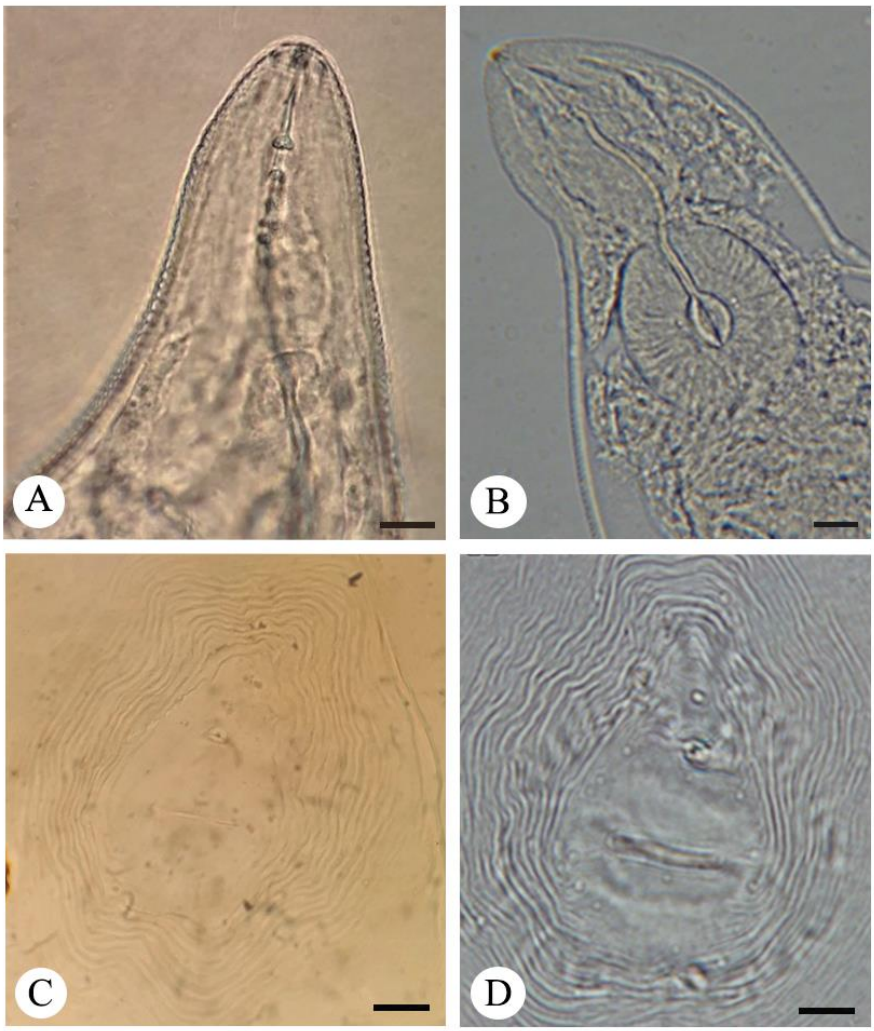
ریشه‌های آلوده خیار و گوجه‌فرنگی جمع آوری شده از گلخانه دارای گال‌های بزرگ و مرکب بودند که حاوی دو یا چند ماده بودند. بدن ماده‌ها به طور کامل یا بیشتر در داخل بافت گال فرو رفته بود.

مطالعات ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی

ویژگی‌های ریخت‌سنجی مربوط به ماده‌ها و لاروهای سن دوم جمعیت‌های هرات و فراه به همراه خصوصیات ریخت‌سنجی گونه *M. incognita* بر اساس مطالعات Whitehead (۱۹۶۸) و Monteiro و همکاران (۲۰۱۹) جهت مقایسه، به ترتیب در جدول‌های ۱و۲ آمده است.

مادهها:

گلابی شکل و سفید رنگ، دارای گردن برجسته، سر دارای دو یا سه شیار عرضی، استایلت ظریف با طول ۱۵ تا ۱۷ میکرومتر، حباب میانی مری بزرگ و بیضی شکل و با دریچه مشخص. در برش انتهایی بدن، کمان پشتی بلند و گرد و گاهی مستطیلی، خطوط سطوح جانبی بدن نامشخص و گاهی دارای شیارهای چنگال مانند، در بعضی از نمونهها، شیارها بسیار نزدیک به هم و با حالت موجی تا زیگزاکی که این حالت بیشتر در ناحیه پشتی و جانبی قابل مشاهده بود. شیارهای انتهای بدن در بعضی از نمونهها صاف تر و با فاصله بیشتری نسبت به هم قرار گرفته که توسط شیارهای ظریف و نزدیک به هم از یکدیگر جدا شدهاند. کمان پشتی اغلب در قسمت نوک تخت و پخ یا بصورت ذوزنقه ای بود. طول شکاف تناسلی ۱۹ تا ۲۴ میکرومتر، فاصله آن از مخرج ۱۷ تا ۲۳ میکرومتر و فاسمیدها قابل مشاهده بودند. تصویر قسمت ابتدایی و انتهایی بدن مادههای دو جمعیت HJI1 و HJI2 در شکل ۱ مشاهده میشود.



شکل ۱: ماده بالغ *Meloidogyne incognita* A : قسمت ابتدایی بدن ماده جمعیت HJI1؛ B: قسمت ابتدایی بدن ماده جمعیت HJI2؛ C: برش انتهایی بدن ماده بالغ جمعیت HJI1 و D: برش انتهایی بدن ماده بالغ جمعیت HJI2، (همه مقیاس ها = ۱۰ میکرومتر).

Figure 1: (♀) Mature female of *Meloidogyne incognita* A: Anterior part of HJI1; B: Anterior part of HJI2; C: Perineal pattern of HJI1; D: Perineal pattern of HJI2, (All scale bars = 10 µm).

جدول ۱: مشخصات ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ گونه *Meloidogyne incognita* در گلخانه‌های دو استان هرات و فراه افغانستان.

Table 1: Morphometric characteristics of females of *Meloidogyne incognita* in Cucumber and Tomato Greenhouses of Herat and Farah Provinces, Afghanistan.

مشخصات Characters	جمعیت هرات HJI1	جمعیت فراه HJI2	Whitehead (1968)	Tomato,Brazil Monteiro *et al.* (2019)
N	10	10	20	30
Body length	804±68.2 (700-900)	762±20.3 (720-790)	609 (500-723)	864±23.2 (700-1100)
Body width	524±47.9 (440-590)	526±24.1 (480-560)	415 (331-520)	684±14.2 (595-800)
Neck length	223±27.7 (190-275)	216.5±21.3 (180-240)	-	75-368 [c]
a[a]	1.53±0.05 (1.44-1.60)	1.45±0.07 (1.35-1.56)	-	1.3±0.1 (1.0-1.5) [d]
Stylet length	16.1±0.7 (15-17)	15.8±0.55 (15-16.5)	14.0 (13.0-16.0)	12.9±0.2 (12.0-14.0)
DGO[b]	3.2±0.63 (2-4)	3.45±0.45 (3-4)	3.0 (2.0-4.0)	3.6±0.1 (2.5-4.2)
Anteroir end to center of median bulb	68.3±8.7 (55-80)	66.9±4.2 (60-72)	-	
Vulval slit length	21.6±1.6 (19-24)	22.0±1.5 (20-24)	-	25.0±2.3 (19.3-27.4) [d]
Distance vulval slit to anus	19.3±1.2 (17-21)	19.8±1.5 (18-23)	-	-
Interphasmidial distance	23.6±2.5 (20-28)	22.5±2.6 (19-26)	-	-

a. نسبت طول به عرض بدن

b. فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت

c. Trinh, *et al*., (2023)

d. Perichi, *et al*., (2010)

نسخه پیش انتشار

نر: جنس نر یافت نگردید.

لارو سن دوم: نماتدهای کرمی شکل و بلند، سر دارای دو تا سه شیار عر ضی و همطراز بدن. طول ا ستایلت ۱۰/۵ تا ۱۴میکرومتر، قسمت مخروطی استایلت تقریبا برابر با قسمت استوانه ای و گره‌های آن برجسته و گرد می‌باشد. محل ریزش غده پشـــتی مری به فاصـــله ۲ تا ۳/۵ میکرومتر پائین تر از گره‌های اســـتایلت قرار دارد. دم مخروطی، طول آن ۳۳ تا ۵۶ میکرومتر، شیارهای انتهای دم در شت و اندازه هیالین ۱۰/۵ تا ۱۴ میکرومتر می‌با شد. فا سمیدها به سختی دیده می شوند. تصویر قسمت ابتدایی و انتهایی بدن لاروهای سن دوم دو جمعیت HJI1 و HJI2 در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۲: مشخصات ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم گونه *Meloidogyne incognita* در گلخانه‌های دو استان هرات و فراه افغانستان

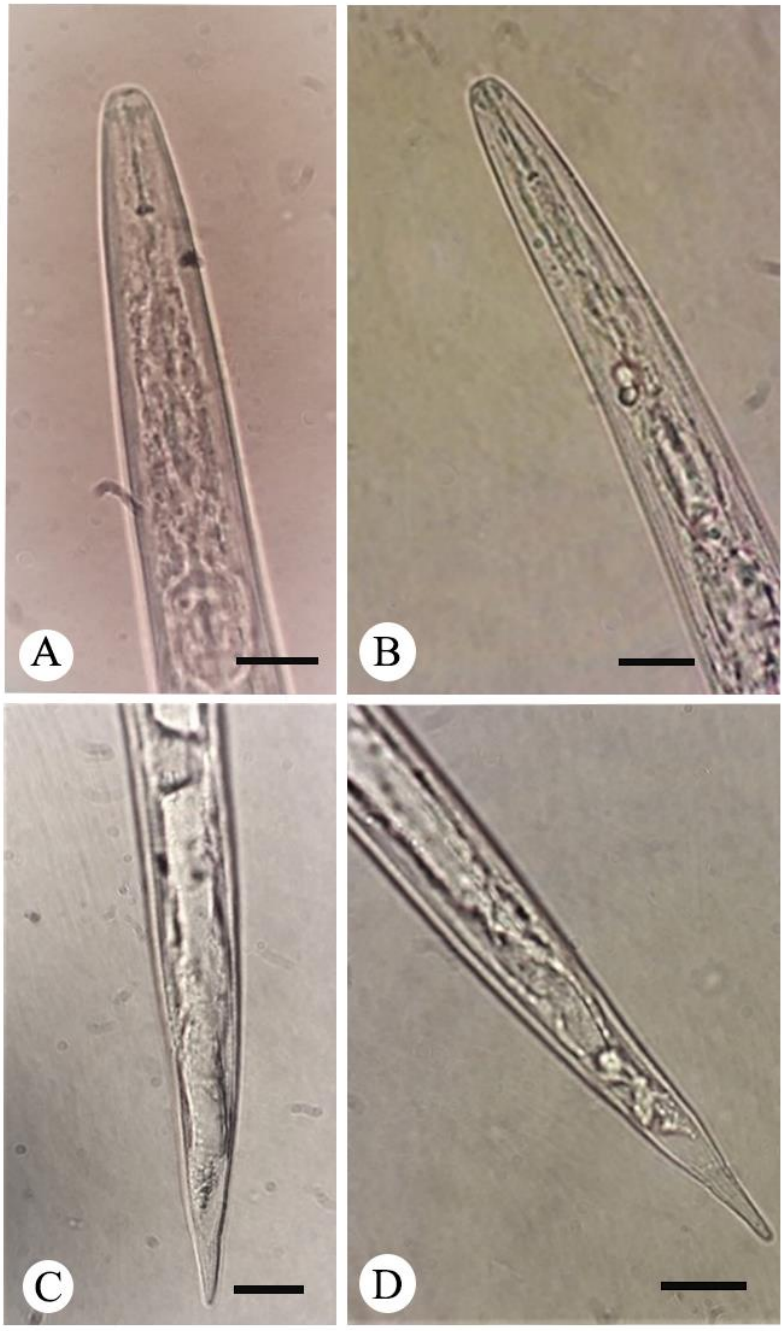
Table2: Morphometric characteristics of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in Cucumber and Tomato Greenhouses of Herat and Farah Provinces, Afghanistan.

مشخصات Characters	جمعیت هرات HJI1	جمعیت فراه HJI2	Whitehead (1968)	Tomato,Brazil Monteiro *et al.* (2019)
N	10	10	25	30
Body length	397±41 (335-450)	359±21 (330-390)	371 (337-403)	415±4.4 (330-470)
Body width	13.9±0.1 (12.5-15)	13.3±0.7 (12-14)	13.4±1.2 (11.6-16.1) [c]	20.1±0.2 (18.0-22.0)
a[a]	28.7±2.0 (25.9-31.2)	27.1±0.8 (25.6-28.1)	28.3 (24.9-31.5)	20.7±0.3 (16.5-23.7)
Stylet length	12.3±0.9 (11-14)	11.7±0.6 (10.5-12.5)	10.5 (9.6-11.7)	10.7±0.2 (9.0-17.0)
DGO[b]	2.6±0.5 (2.0-3.5)	2.7±0.4 (2.0-3.0)	2.5 ± 0.3 (1.9-2.6) [c]	2.3 ± 0.1 (1.8-3.0)
Tail length	47.1±7.0 (33.0-56.0)	42.2±4.0 (33.0-47.0)	46.0 (38.0-55.0)	53 ±7.8 (42.0-60.0)
Hyaline length	12.3±1.1 (11-14)	11.8±0.9 (10.5-13)	-	13.9 ± 0.2 (11.0-16.0)

a. نسبت طول به عرض بدن

b. فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیر گره‌های استایلت

c. Perichi, *et al*., (2010)



شکل ۲: لارو سن دوم *Meloidogyne incognita*
A : قسمت ابتدایی بدن لارو سن دوم جمعیت HJI1؛ B: قسمت ابتدایی بدن لارو سن دوم جمعیت HJI2؛ C: قسمت انتهایی بدن لارو سن دوم جمعیت HJI1 و D: قسمت انتهایی بدن لارو سن دوم جمعیت HJI2، (همه مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).

Figure 2: Second juvenile of *Meloidogyne incognita*
A: Anterior part of HJI1; B: Anterior part of HJI2; C: Posterior part of HJI1; D: Posterior part of HJI2, (All scale bars = 10 µm).

مطالعات ملکولی

توالی های DNA بدســت آمده با کدهای HJI1 و HJI2 به ترتیب دارای ۶۷۷ و ۶۸۳ جفت باز بودند و پس از مقایســه با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI با گونه‌های نماتدریشه‌گرهی گرمسیری شامل *M. incognita*، *M. javanica*، *M. arenaria*، *M. luci*، *M. morocciensis*، *M. konaensis*، *M. paranaensis* و *M. phaseoli* بیش از ۹۹ درصــد شباهت داشتند.

درخت تبارزایی بر اســاس ۳۱ توالی از ناحیه DNA 28S ریبوزومی، شــامل دو توالی با کدهای HJI1 و HJI2مربوط به مطالعه حا ضر ، دو توالی مربوط به گونه‌های *Pratylenchus penetrans* و *Radopholus similis* به عنوان برون گروه و ۲۷ توالی دیگر موجود در بانک ژن NCBI، ترسیم شد. در این درخت، توالی‌های دو جمعیتHJI1 و HJI2 در یک کلاد چند تباری تک‌نیا (کلاد A) قرار گرفته‌اند که شامل توالی‌هایی از سایر گونه‌های نماتد ریشه گرهی گرمسیری از جمله *M. incognita*، *M. javanica*، *M. arenaria* ، *M. luci*، *M. morocciensis*، *M. konaensis*، *M. paranaensis* و *M. phaseoli* نیز می‌شود. این کلاد حمایت ۸۸ درصد را دریافت کرد (شکل ۳).

شکل ۳: درخت تبارزایی براساس نرم‌افزار مستربیس از ناحیه DNA 28S ریبوزومی، که در آن دو جمعیت مورد مطالعه از *M. incognita* با نام‌های HJI1 و HJI2 در یک کلاد تک‌نیا (کلاد A) ، در کنار سایر گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی گرمسیری، با حمایت ۰،۸۸ قرار گرفته‌اند.

Figure 2: Phylogenetic tree of 28s rDNA based on MasterBase software, in which two studied populations of *M. incognita*, HJI1 and HJI2, are placed in a monophyletic clade (clade A), beside other tropical root-knot nematode species, with a support of 0.88.

بحث:

گال‌های روی ریشه بزرگ، مرکب و حاوی دو یا چند ماده بودند. بدن ماده‌ها به طور کامل یا بیشتر در داخل بافت گال فرو رفته بود. در مطالعات پیشین آمده است که چهار گونه اصلی نماتد ریشه‌گرهی شامل *M. arenaria*، *M. incognita*، *M. javanica* و *M. hapla*، گال‌های بزرگ و مرکب تولید می کنند اما تفکیک گونه بر اساس شکل ظاهری گال امکانپذیر نمی‌باشد و ممکن است میزان آلودگی بر شدت علائم تاثیر بگذارد (Jepson, 1987). به همین دلیل، ارزیابی خصوصیات مرفولوژیکی و در تکمیل آنها، ویژگیهایی ملکولی برای شناسایی گونه نماتد ریشه‌گرهی حائز اهمیت است.

گونه *M. incognita* با کمان پشتی ذوزنقه ای، گرد و بلند، شیارهای نزدیک به‌هم به حالت موجی تا زیگزاکی و مشخص نبودن خطوط سطوح جانبی بدن از سایر گونه‌های گرمسیری این جنس متمایز گردید. قابل ذکر است که لارو سن دوم دارای سر همطراز بدن و استایلت با گره‌های برجسته و گرد می‌باشد. در این بررسی گونه مذکور از ۹ خاک گلخانه‌های خیار و گوجه‌فرنگی منطقه جبرئیل استان هرات و استان فراه جمع‌آوری و شناسایی گردید. از هر استان یک جمعیت جهت مطالعه و مقایسه مرفولوژیکی و ملکولی انتخاب شدند. جمعیت مربوط به استان هرات HJI1 و جمعیت متعلق به استان فراه HJI2 نام گرفت.

خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی جمعیتهای مورد مطالعه شباهت زیادی با یکدیگر داشتند. اندازه‌ها، دامنه تغییرات و انحراف معیار جمعیت هرات (HJI1) نسبت به جمعیت فراه (HJI2) بیشتر بود. با این وجود، با اندازه‌های *M. incognita* در مطالعات پیشین (Whitehead, 1968; Monteiro et al., 2019) شباهت داشتند. طول بدن ماده ها با طول بدن جمعیت *M. incognita* مورد مطالعه از گوجه فرنگی در برزیل (Monteiro *et al*., 2019) شباهت داشت اما اندازه استایلت بزرگتر از مطالعات Whitehead, 1968; Monteiro et al., 2019 است. از طرف دیگر بر طبق کلید شناسایی تهیه شده توسط Subbotin و همکاران (2021)، فاکتور طول بدن ماده بالغ و طول استایلت آنها دو تا از فاکتورهای مهم در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه گرهی هستند. طبق نظر آنها طول بدن ماده بالغ *M. incognita* کمتر از ۸۵۰ میکرومتر و استایلت بین ۱۲ تا ۱۷,۵ میکرومتر می‌تواند باشد. این اندازه ها با جمعیت مورد مطالعه ما همخوانی دارد. چهار فاکتور مهم ریخت‌سنجی در تفکیک لاروهای سن دوم *M. incognita*، عبارتند از: طول بدن (کمتر از ۵۰۰ میکرومتر) ، طول استایلت (کمتر از ۱۴ میکرومتر) ، طول دم (بین ۳۵ تا ۶۰ میکرومتر) و اندازه هیالین (بین ۸,۵ تا ۱۵,۵ میکرومتر) (Subbotin et al., 2021) ، که با اندازهای جمعیت های مورد بررسی در این مطالعه همخوانی دارد.

توالی‌های DNA با کدهای HJI1 و HJI2 مربوط به ناحیه DNA 28S D2/D3 ریبوزومی و نسبتاً حفاظت شده هستند و در درخت تبارزایی دوجمعیت مورد بررسی کنار سایر گونه های نماتد ریشه گرهی گرمسیری قرار گرفتند که با نتایج Trineh, و همکارن (۲۰۲۳) و Kiewnick و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. این ناحیه ژنی فقط کمک می کند که گونه‌های

گرمسیری از سایر گونه ها تفکیک شوند (Kiewnick, et al.,2014) و برای تفکیک گونه های گرمسیری از هم باید از تلفیق مرفولوژی و ملکولی استفاده شود.

از آنجایی‌که گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی بیش از ۱۰۰ گونه است با استفاده از ژنD2-D3 LSU-rRNA این گونه از گونه های غیرگرمسیری جدا شد. تا مطالعه و بررسی راحت تر شود سپس گونه *M. incognita* با دلایل ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی زیر از سایر گونه ها تفکیک شد.

۱- نداشتن خطوط سطوح جانبی واضح در برش انتهایی ماده بالغ، جمعیت‌های *M. incognita* مورد مطالعه را از گونه های *M. javanica* و *M. cruciani* تفکیک کرد

۲- داشتن کمان پشتی بلند و زیکزاکی در برش انتهایی ماده بالغ، جمعیت‌های *M. incognita* مورد مطالعه را از گونه های *M. arenaria* و *M. morocciensis* تفکیک کرد همچنین طبق چک لیست ارایه شده توسط قادری و کارسن (۲۰۲۰) طول دم لاروهای سن ۲ در گروه که *M. incognita*به آن تعلق دارد (گروه ۴) بین ۴۰ تا ۵۰ است که میانگین طول دم در جمعیت هرات (HJI1) و جمعیت فراه (HJI2) به ترتیب ۴۷,۱ و ۴۲,۲ میکرومتر بود و در این گروه قرار می‌گیرد، اما *M. arenaria* ، *M. morocciensis*، *M. javanica* ، *M. cruciani*، *M. luci*، *M. kanoensis* و *M. phaseoli* در گروه ۵ قرار می گیرند که طول دم در آنها بین ۴۴تا ۶۰ است.

بنابراین جمعیتهای مورد مطالعه با مجموع ملاحظات مرفولوژیکی و ملکولی متعلق به گونه *M. incognita* بودند. از اندازه ها و ویژگیهای مورد مطالعه در این بررسی برای تسهیل در مطالعات بعدی و شناسایی راحتتر گونه *M. incognita* می‌توان استفاده نمود.

نتیجه‌گیری کلی:

جلوگیری از خسارات وارده به کشت گلخانه‌ای خیار و گوجه‌فرنگی و افزایش عملکرد محصول، مستلزم شناخت عوامل کاهش‌دهنده کیفیت و کمیت این دو محصول است. نماتدها از جمله مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی هستند که می‌توانند خسارت قابل توجهی به گیاهان وارد کنند. برای جلوگیری از خسارت وارده توسط این موجودات نیاز است تا ابتدا آن‌ها را شناسائی و بعداً اقدام به پیش‌گیری و مدیریت آن‌ها نماییم. نماتدهای ریشه گرهی به لحاظ اهمیت اقتصادی، از جایگاه ویژه ی برای شناسایی و مدیریت برخورداراند به طوریکه موجب طراحی پروژه‌های بین المللی شده اند. گونه ای مثل *M. incognita* دامنه میزبانی فراوانی دارد با تناوب کنترل نمی شود و مدیریت نیازمند استفاده از ارقام مقاوم است. بنابراین شناسایی دقیق گونه نماتد ریشه گرهی در مدیریت آن حائز اهمیت است. از سوی دیگر شباهت‌های زیاد بین دو جمعیت و همسایگی دو استان هرات و فراه می تواند حاکی از گسترش آلودگی نماتد ریشه‌گرهی به واسطه تبادلات گیاهی بدون توجه سلامت آنها باشد. از این رو شایسته است قرنطینه گیاهی در مناطق و گلخانه‌های آلوده رعایت شود تا از انتشار این پاتوژن جلوگیری به عمل آید.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی این پروژه با کد ۵۳۰۲۶ / ۳ قدردانی می نمایند. از کشاورزان و گلخانه‌داران ساکن استان های هرات و فراه افغانستان که در تهیه نمونه‌های گیاهی ما را همراهی نموده‌اند، سپاسگزاریم. از خانم دکتر کتولی به جهت مساعدت در انجام این مطالعه بسیار ممنونیم.

نسخه پیش انتشار

منابع

Anwar, S. A., & McKenry, M. V. (2010). Incidence and reproduction of *Meloidogyne incognita* on vegetable crop genotypes. *Pakistan Journal of Zoology, 42*, 135–141.

Baldacci-Cresp, F., Maucourt, M., Deborde, C., & Pierre, O. (2015). Maturation of nematode-induced galls in *Medicago truncatula* is related to water status and primary metabolism modifications. *Plant Science, 232*, 77–85.

Carneiro, R. M. D. G., Randig, O., Almeida, M. R. A., & Gomes, A. C. M. M. (2004). Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology, 6*, 109–123.

Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Perfus-Barbeoch, L., & Abad, P. (2013). Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology, 51*, 203–220.

Çetintaş, R., Kareem, K. H., & Nassar, H. A. (2017). Diagnosis of nematode populations found in chard, barley, and onion grown in North of Iraq and South of Turkey. *Doga Bilimleri Dergisi, 20*, 28.

De Grisse, A.T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques dans Letude des nematodes phytoparasitaires. Mede Rijks Fak Landb Wet Gent, 34: 351-369.

Ghaderi, R., & Karssen, G. (2020). An updated checklist of *Meloidogyne* Goldi, 1887 species, with a diagnostic compendium for second-stage juveniles and males. *Journal of Crop Protection, 9(2)*, 183–193.

Haygood, R. A., Saunders, J. A., & Miller, R. W. (1990). Widespread occurrence of *Meloidogyne incognita* on kiwifruit in the coastal areas of South Carolina. *Plant Disease, 74*, 81. *(Disease Note).*

Hunt, D. J., & Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification, and principal species. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. S. (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. xx–xx). Wallingford, UK: CABI.

Hussey, R. S., & Janssen, G. J. W. (2002). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In J. L. Starr, R. Cook, & J. Bridge (Eds.), *Plant resistance to parasitic nematodes* (pp. 43–70). CABI Publishing.

Jepson, S. B. (1987). *Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species).* CAB International.

Kamran, M., Javed, N., Khan, S. A., Jaskani, M. J., & Ullah, I. (2014). Efficacy of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne incognita* reproduction and growth of tomato. *Pakistan Journal of Zoology, 46,* 1651–1655.

Kiewnick, S., Holterman, M., van den Elsen, S., van Megen, H., Frey, J.E, & 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,* 97-110.

Lopes, E. A., & Ferraz, S. (2016). Importância dos fitonematoides na agricultura. In C. M. G. Oliveira, M. A. Santos, & L. H. S. Castro (Eds.), *Diagnose de fitonematoides* (pp. 1–10). Campinas: Millennium Editora.

Ma, K. C., Jo, Y. S., Kim, B. H., & Lim, D. G. (2007). Seasonal occurrence and aspects of root-knot nematodes in major kiwifruit cultivation areas of Korea. *Acta Horticulturae (ISHS), 753,* 719–724.

Omid, M., Ghojabeige, F., Delshad, M., & Ahmadi, H. (2011). Energy use pattern and benchmarking of selected greenhouses in Iran using data envelopment analysis. *Energy conversion and management*, *52*(1), 153-162.

Pedram, M. (2019). Two Ektaphelenchinae Paramonov, 1964 (Nematoda: Rhabditida) from Iran have tripartite stylet, with similar observations in other species. *Plos one*, *14*(5), e0215731.

Perichi, G., Crozzoli, R., & Alcano, M. (2006). First report of *Meloidogyne graminis* (Nematoda: Tylenchida) in Venezuela. Fitopatologia Venezolana 19, 17-18.

Ploetz, R. C. (2011). Tropical fruit crops and the diseases that affect their production. *Tropical Biology and Conservation Management, Vol. III.* [Online]. http://www.eolss.net/ebooks/Sample%2°Chapters/C20/E6-142-TA-05.pdf

Smant, G., Helder, J., & Goverse, A. (2018). Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *The Plant Journal*, *93,* 686–702.

Subbotin, S. A., Rius, J. E. P., and Castillo, P. (2021). Systematics of root-knot nematodes (Nematoda: Meloidogynidae). Boston: Brill.

Taylor, D. P., & Netscher, C. (1974). An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne spp.*

Trinh, Q. P., Le, T. M. L., Nguyen, T. D., & Nguyen, H. T. (2023). Morphologic, Morphometric, and Molecular Characterization of Vietnamese Populations of *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease*, *107,* 3693-3700.

Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., McInroy, J. A., & Lawrence, G. W. (2017). Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. *Plant Disease, 101*, 774–784.

Youssef, R. M., Kim, K.-H., Haroon, S. A., & Matthews, B. F. (2013). Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. *Experimental Parasitology, 134*, 266–274.

نسخه پیش انتشار

نسخه پیش انتشار