نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۰۸-۲۹۷

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 297-308

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های عمده *Meloidogyne* و پراکنش آن‌ها در باغ‌های انار استان‌های خراسان

نفیسه کتولی[۱]- عصمت مهدیخانی مقدم[۲]*- رضا اقنوم[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳

چکیده

انار از محبوب‌ترین درختان میوه و یکی از مهم‌ترین محصولات صادراتی در ایران است. نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از بیمارگرهای جدی در انار می‌باشند. به منظور بررسی پراکنش آلودگی باغ‌های انار به گونه‌های نماتد ریشه گرهی، طی سال‌های ۹۴ و ۹۵، تعداد ۱۹۵ نمونه خاک و ریشه از مناطق عمده تحت کشت انار در استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی جمع‌آوری گردید. پس از استخراج، شناسایی گونه‌ها با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت سنجی لارو، ماده‌ی بالغ و شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده صورت گرفت. همچنین برای اولین بار در استان شناسایی گونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SCAR انجام گرفت. گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* شناسایی شدند. آغازگرهای Inc-14 قطعه ۳۹۹bp را برای گونه *M. incognita*، ar قطعه ۴۲۰bp را برای گونه *M. arenaria* و Jav قطعه ۶۷۰bp را برای گونه *M. javanica* نشان داد. آلودگی درختان انار به نماتد ریشه‌گرهی تقریبا در اغلب شهرستان‌ها مشاهده گردید اما شدت آلودگی بسیار متغیر می‌باشد. درصد آلودگی باغ‌های انار به نماتد ریشه گرهی به ترتیب در شهرستان‌های بردسکن ۱۹/۹۳٪، بجستان ۱۲/۳٪ خلیل آباد۶/۹٪، فردوس ۵/۴ ٪ ، کاشمر ۴/۳٪، تربت حیدریه ۳/۵٪، نهبندان ۱/۳٪، مانه ۱/۱٪ و جاجرم ۰/۸٪ برآورد شده است. بالاترین درصد آلودگی به نماتد ریشه گرهی با ۵۷/۵ ٪ در باغ‌های انار شهرستان بردسکن (بخش انابد روستای فاطمیه) مشاهده گردید و گونه *M. incognita* نژاد دو بیشترین پراکنش را در باغ‌های انار استان نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انار، آغازگر اختصاصی SCAR، *M. incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica*

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) از قدیمی‌ترین میوه‌های دانه‌دار و یکی از مهم‌ترین میوه‌های اقتصادی است، که در بسیاری از مناطق مختلف گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا با بیش از ۱۰۰۰ رقم کشت می‌گردد. شواهد تاریخی دال بر این است که ایران مرکز تنوع و پیدایش انار بوده است (۵ و ۳۲). ایران بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده انار در دنیاست و سطح زیر کشت آن در کشور ۸۹۰۰۰ هکتار و میزان تولید سالیانه آن بیش از ده هزار تن می‌باشد (۳). در بین کشورهای تولیدکننده انار، ایران به دلیل تنوع ارقام، کیفیت مرغوب، زیبایی ظاهری و رنگ درخشان حبه‌های آن جایگاه ویژه‌ای دارد (۱۶).

نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) انگل داخلی ساکن، یکی از مهم‌ترین گروه‌های انگل گیاهی بوده که گسترش جهانی داشته و دارای دامنه میربانی با بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی می‌باشد. تا کنون بیش از ۱۰۰ گونه از این جنس توصیف شده است، که مهم ترین گونه‌ها از نظر اقتصادی گونه‌های گرمسیری *M. incognita* ، *M. javanica*، *M. arenaria* و گونه معتدل *M. hapla* می‌باشند (۲۰). انار یکی از گیاهان حساس نسبت به‌گونه‌های مختلف نماتد ریشه گرهی است. در ایران گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* از باغ‌های انار استان اصفهان، یزد و گونه*M. javanica* ، *M. incognita* و *M. hapla* از باغ‌های انار استان فارس و گونه *M. arenaria* ازروی انار گیلان گزارش شده است (۲ و ۲۱). گونه *M. javanica* از خاک اطراف ریشه درختان انار در شهرستان‌های

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mahdikhani-e@um.ac.ir)
۳- استادیار مرکز تحقیقات و آموزش خراسان رضوی، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مشهد

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.84054

تهران، شمیرانات، ساوه و قم و گونه *M. incognita* از شهرستان‌های ساوه و قم گزارش شده است (۱۸ و ۲۲) . مهم‌ترین خسارت نماتد ریشه گرهی در انار ایجاد گال در ریشه و در قسمت‌های هوایی علائمی مشابه کمبود مواد غذایی از جمله کاهش یا توقف رشد، ضعف عمومی، زردی برگ‌ها، ریزش برگ‌های فوقانی، خشک شدن تدریجی سرشاخه و در نهایت منجر به مرگ تدریجی درخت می‌گردد (۱۹ و ۳۰). متاسفانه در ایران تا کنون آمار دقیقی از کاهش محصول انار بر اثر نماتد ریشه گرهی گزارش نشده است اما در کشور هندوستان کاهش عملکرد ناشی از نماتد ریشه گرهی *M. incognita* ۱۷/۳ درصد گزارش شده است (۱۴). این نماتد به عنوان مشکل جدی در بیشتر کشورهایی که انار کشت می‌شود گزارش شده است. با توجه به جایگاه ایران در بازار جهاتی صادرات انار، شناسایی آفات و بیماری‌ها جهت مبارزه و افزایش عملکرد آن بسیار حائز اهمیت است.

متاسفانه، بخاطر مورفولوژی حفظ شده بالایی که بین گونه‌های *Meloidogyne* وجود دارد، تمایز گونه‌های این جنس همیشه مورد چالش بوده است. بطور سنتی، گونه‌های *Meloidogyne* بر پایه خصوصیات مورفولوژیک، الگوهای آنزیمی وآلودگی در میزبان‌های گیاهی شناسایی می‌شوند (۱۰). اما خصوصیات مورفولوژیکی، تحت شرایط محیطی مختلف و میزبان‌های متفاوت، متغیر هستند (۱۳ و ۲۴) در نتیجه روش‌های شناسایی توسعه پیدا کرده و در نهایت، روش‌های مبتنی بر DNA به یک جایگزین جذاب تبدیل شده است. این روش‌ها به دلیل اینکه سریع، بسیار قابل اعتماد و از مکان یا مرحله زندگی نماتد مستقل هستند، بکار می‌روند. (۱ و ۲۴). توسعه در روش‌های مولکولی برای شناسایی چهار گونه مهم نماتد ریشه گرهی، هدف بسیاری از تحقیقات بوده است. اولین روش برای شناسایی نماتدهای ریشه گرهی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR [1] توسط هریس و همکاران (۱۹) گزارش گردید، در این روش DNA میتوکندریایی با استفاده از یک لارو سن دوم در آب مقطر و اضافه کردن به داخل واکنش PCR بسط و گسترش داده شده است. این روش بعدها توسط پاور و هریس (۲۷) توسعه پیدا کرد، بطوری‌که پرایمرهایی از نواحی داخلی کدهای بین ژنی میتوکندریایی، ناحیه سیتوکروم اکسیداز دو [2] و 16S rRNA را برای شناسایی پنج گونه از جنس *Meloidogyne* طراحی کردند. مارکرهای مولکولی متفاوتی از نواحی مختلف DNA شامل زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی [3] مارکر 18S و قطعات توسعه یافته زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی [4] مارکر 28S D2D3 (۲۷)، ناحیه بین ژنی IGS، ناحیه داخلی رونویسی و DNA میتوکندریایی، برای شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* توسعه یافته است (۱۵). در حال حاضر، روش‌های مولکولی RAPD [5]، SCAR [6]، RFLP [7]، نشانگرهای دی‌ان‌ای‌های ماهواره‌ایی، سنجش Real-time PCR و توالی‌یابی DNA برای شناسایی نماتدهای ریشه گرهی کاربرد دارند (۳۳ و ۳۵).

مارکرهای DNA از لحاظ روابط نقش مهمی را ایفا می‌کنند. همینطور توالی برخی از ژن‌ها مانند SSU 18S و LSU 28S و ITS در گونه‌های نماتدریشه گرهی بسیار حفاظت شده هستند و تشخیص گونه‌ها مخصوصا برای سه گونه گرمسیری رایج *M. incognita*, *M. javanica*, و *M. arenaria* بر اساس این توالی‌ها بسیار دشوار است (۹، ۱۳ و ۲۳). همینطور نتایج مشابه نشان داده است که توالی ناحیه LSU D2-D3 توانایی جدا کردن این سه گونه را از بقیه گونه های *Meloidogyne* دارد اما قادر به تفکیک و تمایز بین سه گونه اصلی *M. incognita*, *M. javanica* و *M. arenaria* نیست. لذا نشانگر SCAR به عنوان یک ویژگی مولکولی ارزشمند در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه گرهی ذکر شده است (۳۷). در واکنش PCR-RAPD باندهایی را که برای یک گونه به صورت اختصاصی هستند توالی‌یابی می‌کنند و از روی این توالی‌ها، آغازگرهایی را که طول بیشتری نسبت به آغازگرهای RAPD دارند و می‌توانند به صورت اختصاصی در واکنش PCR عمل کنند، طراحی می‌کنند. این توالی-های اختصاصی به نام SCAR- Primer معروفاند. اندازه این آغازگرها بلندتر از آغازگرهای RAPD بوده و اختصاصی‌تر عمل می کنند. این آغازگرها حساسیت کمتری نسبت به آغازگرهایRAPD به تغییر شرایط واکنش دارند و می‌توانند DNA استخراج شده از توده تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ را تکثیر نمایند. بنابراین این روش به سن و مرحله رشدی نماتد بستگی ندارد و می‌تواند برای شناسایی سه گونه عمده به صورت سریع، قابل اعتماد و همیشگی استفاده شود (۱۱). زیلسترا و همکاران (۳۷) بعد از انجام واکنش RAPD و با استفاده از توالی‌یابی باندهای اختصاصی که برای هر گونه پیدا کردند، جفت آغازگرهای اختصاصی SCAR را برای گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* طراحی کردند. این آغازگرها بر پایه روش SCAR و با توجه به آنالیز RAPD معرفی شده‌اند و دارای توانایی بالایی در تشخیص تعدادی از گونه‌های *Meloidogyne* می‌باشند.

هدف از این بررسی شناسایی گونه‌های عمده نماتد ریشه‌گرهی با روش‌های مرفولوژیک و مولکولی، با پرایمرهای اختصاصی SCAR و تعیین پراکنش آنها در باغ‌های انار استان‌های خراسان رضوی، جنوبی و شمالی بوده است.

1- Polymerase chain reaction
2- cytochrome oxidase subunit II
3- Small subunit rDNA
4- Large subunit rDNA
5- Random amplified polymorphic DNA
6- Sequence characterized amplified region
7- Restriction fragment length polymorphisms

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، تکثیر و شناسایی نماتد

نمونه‌برداری در سال‌های ۹۴ و ۹۵ در شهریور ماه، از باغ‌های عمده تحت کشت انار شهرستان‌های استان خراسان رضوی (شهرهای تربت حیدیه، فیض آباد، بجستان، بردسکن، کاشمر، خلیل آباد و سبزوار)، خراسان جنوبی (فردوس، نهبندان) و خراسان شمالی (مانه و جاجرم)، از خاک و ریشه درختان انجام شد. نمونه‌ها در بسته‌های دو کیلوگرمی با مشخصات کامل به آزمایشگاه منتقل گردید. از ریشه‌های گال‌دار جهت استخراج لارو سن دوم، ماده‌های بالغ و توده تخم به منظور شناسایی استفاده گردید. کیسه‌ی تخم به گلدان حاوی نشای گوجه فرنگی رقم حساس رد کلود[1]، برای تکثیر و خالص‌سازی گونه‌ی نماتد، اضافه شد. پس از تهیه اسلاید با روش دگریسه (۹)، شناسایی گونه‌ها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لارو سن دوم، ماده بالغ و خصوصیات کوتیکولی نقوش انتهای بدن ماده‌ها، با میکروسکوپ Olympus مدل BH2 مورد بررسی قرار گرفت. تعیین نژاد از طریق آزمون میزبان‌های افتراقی (گوجه فرنگی، توتون، پنبه، هندوانه، بادام زمینی، فلفل)، بر اساس روش پیشنهادی بارکر و همکاران (۶) انجام شد.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA و شناسایی گونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز PCR، چندین روش مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت پس از ارزیابی کیفی DNA استخراج شده با الکتروفورز افقی، روش سیلوا و همکاران (۲۹) برای استخراج DNA از تخم و لارو سن دوم و روش یی و همکاران (۳۴) با کمی تغییرات برای استخراج از ماده بالغ به شرح ذیل انجام گرفت. در روش سیلوا و همکاران، ابتدا ۳۰-۵۰ میکرولیتر لارو سن دوم، تخم و یا مخلوط تخم و لارو سن دوم معلق در آب مقطر دوبار سترون، درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. لوله‌های حاوی نماتد در نیتروژن مایع قرار گرفت. سپس نمونه با سوزن مناسب کاملا ساییده و له شد. ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (100Mm Tris-Hcl Ph 8,1/4M NaCl,20 Mm EDTA, 3% CTAB,1% β-mercaptoethanol) به میکروتیوب‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در مرحله بعد در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و فاز رویی به لوله جدید منتقل گردید. سپس هم حجم آن مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل ۲۴:۱ اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز رویی به لوله جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ده دقیقه در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. رسوب حاصل پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ و سانتریفوژ مجدد در دمای محیط خشک و سپس در ۲۰-۳۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار سترون حل گردید.

برای استخراج DNA از ماده بالغ با استفاده از روش یی و همکاران، ابتدا یک عدد ماده بالغ در آب مقطر استریل چند بار شستشو داده شد و سپس این نماتد روی یک لام استریل قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از بافر TE (Tris-EDTA buffer) شامل (10 mM Tris, pH :8, with HCl, 1 mM EDTA) به نماتد ماده اضافه شده و توسط یک لامل استریل این نماتد کاملا له شد. سپس برای جمع کردن محتویات له شده‌ی روی لام، ۵۰ میکرولیتر دیگر از بافر به لام اضافه کرده و در نهایت محتویات روی لام با کمک سمپلر جمع‌آوری و درون میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتر در فریزر نگهداری شد.

انجام واکنش PCR و توالی‌یابی

برای تکثیر DNA در واکنش PCR از گونه‌های مختلف نماتد، از آغازگرهای اختصاصی Inc-K14-R /Inc-K14-F/ JavR/ JavF و arF /ar R استفاده شد (جدول ۱). این آغازگرها برای هر گونه یک قطعه مشخص جفت بازی را در کلیه جمعیت‌های گونه تکثیر کرده و در نهایت گونه را از بقیه متمایز می‌کنند. آغازگرها از شرکت ماکروژن کره جنوبی تهیه و توالی آنها در جدول ۱ ذکر شده است. در واکنش PCR برای جلوگیری از خطاهای احتمالی در هنگام برداشتن مقادیر کم مواد و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، اقدام به تهیه محلول پایه[2] گردید. واکنش PCR برای هر جفت آغازگر در جدول ۲ بیان شده است. پس از اتمام واکنش PCR، ۳ میکرولیتر از محصول PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱ ٪ در بافر TEB[3] بارگیری شد. چاهک کنترل منفی شامل تمام مواد به غیر از DNA می‌باشد و چاهک اول برای تخمین اندازه قطعات تولیدی نشانگر Ladder بارگیری گردید.

تعیین پراکنش آلودگی به گونه‌های *Meloidogyne* در باغ‌های انار استان‌های خراسان

برای تعیین جمعیت لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی در خاک، نمونه‌های جمع آوری شده از یک باغ با هم مخلوط و ۲۰۰ گرم آن وزن گردید. استخراج نماتدها از خاک با روش سینی و سانتریفوژ انجام

1- Red cloud

2- Stock solution

3- Tris Borate EDTA

گرفت (۳۲). لاروهای استخراج شده با استفاده از پتری مدرج شمارش گردید. برای تعیین درصد آلودگی در باغ، تعداد درختانی که علایم آلودگی را نشان دادند شمارش و نسبت به کل درختان باغ محاسبه گردید.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی SCAR مورد استفاده برای شناسایی سه گونه عمده *Meloidogyne* به همراه توالی و اندازه باند

Table 1- SCAR primer for identification of major Meloidogyne with sequence and band size

نام پرایمر Primer name	گونه‌ها Species	توالی پرایمرها Primer Sequences (5'-3')	محصول پی سی آر PCR product (bp)	منابع Reference
Far Rar	*M. arenaria*	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC TCGGCGATAGACACTACAAACT	420	Zijlstra et al. (2000)
Fjav Rjav	*M. javanica*	GGTGCGCGATTGAACTGAGC CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC	670	Zijlstra et al. (2000)
Inc-K14-F Inc-K14-R	*M. incognita*	GGGATGTGTAAATGCTCCTG CCCGCTACACCCTCAACTTC	399	Randig et al. (2002)

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش PCR برای سه جفت آغازگر Inc-14، ar و Jav (Adam *et al*, 2007)

Table 2- Thermal program of PCR reaction for three of primer Inc-14, ar, Jav

واسرشت اولیه Initial denaturing	واسرشت Denaturing	اتصال Annealing 35 cycles	گسترش Extension	گسترش نهایی Final extension	
		64°C (Fjav/Rjav) 61°C (Far/Rar) 6۲°C (Inc-K14-F/Inc-K14-R)			
94°C 2 min	94°C 30 secs	30 secs	72°C 90 secs	72°C 7 min	4°C 60 min

نتایج و بحث

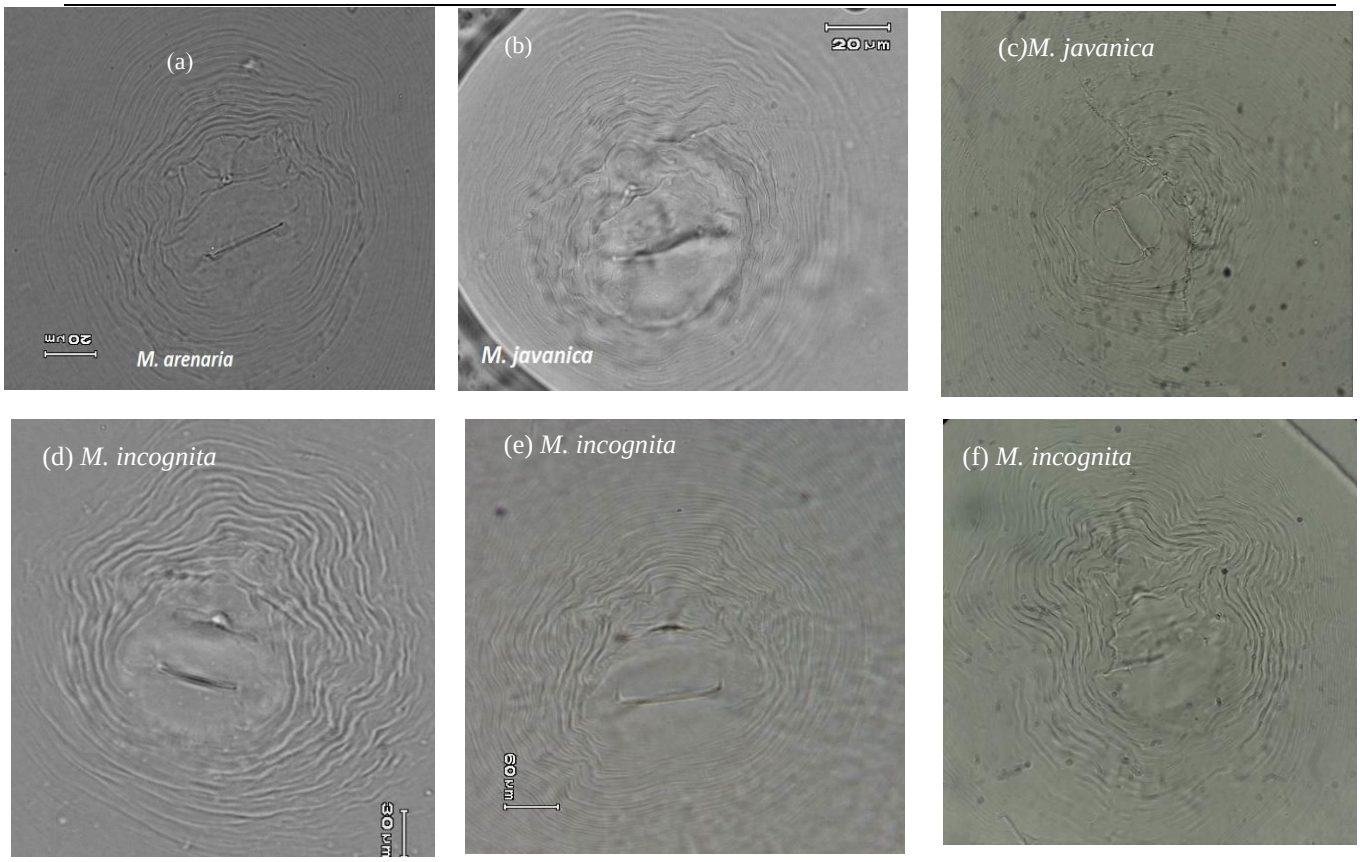
مشاهدات و بررسی‌های میدانی طی دوسال نمونه‌برداری از باغ های انار گویای این واقعیت است که نماتد ریشه گرهی در باغ‌های انار استان در حال گسترش بوده و خسارت قابل توجهی به درختان انار خصوصا درختان جوان وارد می‌کند. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که گونه غالب (گونه‌ای که بیشترین فراوانی را دارد) در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی *M. incognita* نژاد دو و در استان خراسان شمالی گونه *M. javanica* می‌باشد. گونه *M. incognita* برای تعیین نژاد تحت کشت میزبان‌های افتراقی قرار گرفت، این گونه در ریشه گیاهان توتون، فلفل، گوجه فرنگی و هندوانه به خوبی گال تولید کرده در حالی‌که در میزبان‌های بادام زمینی و پنبه هیچ گره‌ای مشاهده نشد. در نتیجه نژاد دو برای این گونه قطعی گردید.

با توجه به نتایج بدست آمده از خصوصیات ریخت‌سنجی (جدول ۳) و مشخصات لارو سن دوم و نقوش انتهای بدن نماتدهای ماده بالغ (شکل ۱)، سه گونه عمده *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* شناسایی شد که مشخصات آن با شرح جپسون (۱۴) مطابقت دارد. درگونه *M. incognita* ماده‌ی بالغ گلابی شکل و سفیدرنگ، با گردن مشخص و برجسته، استایلت ظریف به طول ۱۴/۵ تا ۱۶ میکرومتر با گره‌های گرد و به سمت جانبی بدن. شبکه کوتیکولی در این گونه در گروه ۶ بوده و تنوع بالایی را نشان می دهد. مشخصه اصلی این گروه شیارهای بیضی شکل با کمان پشتی بلند و مربعی و در بعضی موارد گرد، خطوط سطوح جانبی بدن نا مشخص و گاهی بوسیله شیارهای شکسته و چنگال مانند مشخص می‌شود. شکل کمان پشتی متغیر بوده و در قسمت نوک تخت و پخ می‌باشند. طول شکاف فرج ۱۷/۵ تا ۲۴/۵ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۸ تا ۲۲ میکرومتر می‌باشد. لاروسن دوم کرمی شکل متوسط تا نسبتا بلند بوده، سر همطراز بدن، استایلت ظریف به طول ۱۰ تا ۱۲/۵ با گره‌های برجسته و متمایل به عقب بدن می‌باشد. دم مخروطی با طول۳۳ تا ۵۴/۵ میکرومتر و هیالین به اندازه ۹/۵ تا ۱۲ میکرومتر می‌باشد. شکل نقوش انتهایی بدن ماده بالغ در این گونه تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد (شکل ۱). درگونه *M. javanica*، ماده بالغ نسبتا گرد و درشت، با گردن مشخص، استایلت ظریف به طول ۱۴/۵ تا ۱۷/۲ میکرومتر با کمی خمیدگی به سمت پشتی. شبکه کوتیکولی این گونه در گروه ۵ قرار می‌گیرد، با انتهای گرد تا بیضی شکل با خطوط جانبی مشخص و واضح به صورت دو شیار موازی و حاشیه‌ای که شیارها را قطع کرده و بطور مشخصی شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می‌کند. طول شکاف فرج ۲۲ تا ۲۵ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۵ تا ۱۷ میکرومتر می‌باشد.

جدول ۳- مشخصات ریخت‌سنجی لارو سن دوم از گونه‌های نماتد ریشه گرهی جمع‌آوری شده از شهرستان‌های: گونه*M. incognita* از بردسکن- انابد، گونه*M. javanica.* از جاجرم و گونه *M. arenaria* از بجستان

Table 3- Morphometric characterize of second stage juvenile on root knot nematode species collected from cities: *M. incognita* of Bardaskan- Anabad, *M. javanica* of Jajarm and *M. arenaria* of Bajestan

فاکتوراندازه گیری Measurement factor	*Meloidogyne javanica* (n=15)	*Meloidogyne incognita* (n=15)	*Meloidogyne arenaria* (n=15)
طول بدن (L) (Body length)	436 (416-456)	412.2 (392-436.5)	428 (400-445)
طول دم (Tail length)	53.6 (49-61.5)	46.2 (33-54.5)	51.4 (42-58.5)
طول هیالین (Hyaline Length)	13.5 (12-15)	10.83 (9.5-12)	12.8 (10.5-14.7)
طول استالت Stylet length	11.4 (10.5-12.8)	10.8 (10-12.5)	10.8 (10.2-11.5)
DGO	3.4 (2.5-4)	2.7 (2.5-3.5)	3.4 (2.8-3.9)
a	33.26 (30.5-34.8)	25.37 (23.75-26.96)	34.6 (30-38.2)
c	8.7 (8.3-9.2)	8.38 (7.6-10.05)	6.9 (6.2-7.5)

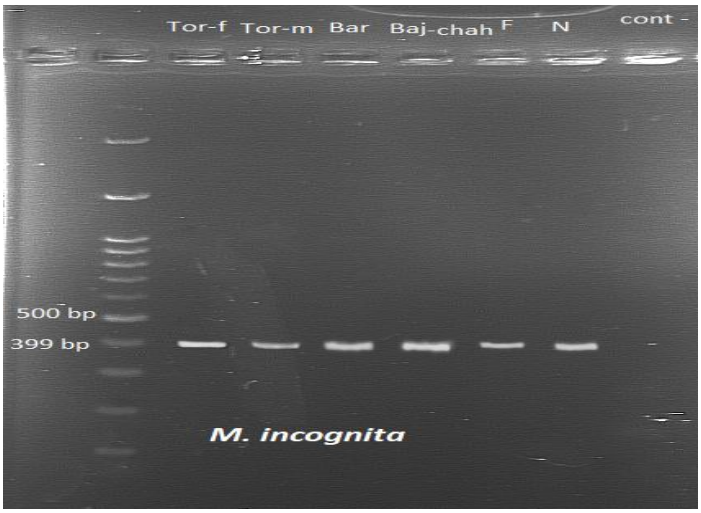


شکل ۱- تنوع در شکل نقوش انتهایی کوتیکولی ماده بالغ سه گونه a) *M. arenaria* (بجستان)، b) *M. javanica.* (جاجرم)، c) *M. javanica.* (مانه)، d) *M. incognita* (تربت حیدریه-فیض آباد)، e) *M. incognita* (کاشمر) و f) *M. incognita* (بردسکن- انابد) جدا شده از ریشه‌های انار با بزرگنمایی 100x

Figure 1- Diversity of Perineal pattern in mature female of three species of a) *M. arenaria* in Bajestan, b) *M. javanica* a Jajarm, c) *M. javanica* in Maneh, d) *M. incognita* in Torbat Heidariye-feya Abad, e) *M. incognita in* Kashmar, f) *M. incognita* in Bardaskan- Anabad,) exctracted on pomegranate roots. 100x

لارو سن دوم کرمی شکل نسبتا بلند، سر همطراز بدن، استایلت ظریف با گره‌های گرد و متمایل به ناحیه‌های جانبی بدن است. سطوح جانبی بدن دارای چهار شیار طولی مشخص، دم به طول ۴۹ تا ۶۱/۵ میکرومتر وهیالین به طول ۱۲ تا ۱۵ میکرومتر با شیارهای درشت در انتهای دم می‌باشد. در گونه *M.arenaria*، ماده‌ها گلابی شکل با گردن مشخص، استایلت به طول ۱۵ تا ۱۶/۸ میکرومتر با گره‌های گرد و متمایل به عقب بدن. شبکه کوتیکولی انتهای بدن گرد یا بیضی شکل با کمان پشتی کوتاه و معمولا فشرده، شیارها نسبتا عریض و جدا از هم و غالبا صاف، خطوط سطوح جانبی بدن معمولا بوسیله شیارهای دوشاخه و چنگال مانند و شکسته مشخص می‌شوند. شبکه کوتیکولی این گونه در گروه اصلی ۴ قرار می‌گیرد. طول شکاف فرج ۲۲/۵ تا ۲۴ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۴/۲تا ۱۸/۴ میکرومتر می‌باشد. لارو سن دوم کرمی شکل با استایلت ظریف به طول ۱۰/۲ تا ۱۱/۵ میکرومتر، دم باریک به طول ۴۲ تا ۸۵/۵ میکرومتر با انتهای گرد می‌باشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی با نشانگرSCAR، بررسی های ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی را در مورد سه گونه شناسایی شده تایید کرد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SCAR شناسایی سه گونه عمده نماتد ریشه گرهی باغ‌های انار از استان‌های خراسان برای اولین بار انجام گرفت. DNA تمام نمونه‌های استخراج شده از استان با هر سه آغازگر بررسی شد و نتایج بدست آمده با شناسایی بر اساس مشخصات مورفومتری مطابقت داشت. در آزمایشات مولکولی آغازگرهای Inc-14 و ar یک باند غیر اختصاصی تولید می‌کردند که با تغییر دمای اتصال برای هر دو جفت آغازگر در محدوده دمایی ۵۸ تا ۶۴ درجه سانتی‌گراد در دستگاه گرادیانت مناسب‌ترین دما برای اتصال مشخص شد (جدول ۲)، در نتیجه باند غیر اختصاصی محو شده و تنها یک باند اختصاصی تشکیل گردید. آغازگر Inc-14 یک قطعه ۳۹۹ جفت بازی را برای گونه *M. incognita* تشکیل داد. از تمام مناطق آلوده‌ای که این گونه استخراج و با بررسی‌های ریخت سنجی و ریخت‌شناسی شناسایی گونه انجام شده بود، ازآغازگر Inc-14 برای تایید شناسایی گونه استفاده شد (شکل ۲).

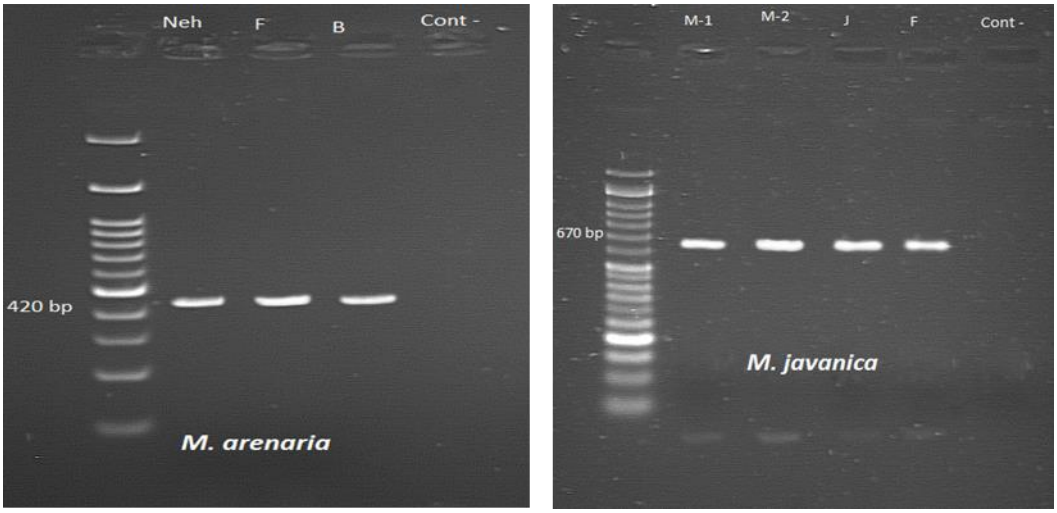


شکل ۲- تکثیر باند ۳۹۹ جفت بازی با استفاده از آغازگر اختصاصی Inc-14 جهت شناسایی *M. incognita* به ترتیب نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، جدایه‌های مناطق Tor-f: تربت حیدریه -فیض آباد ، Tor-m: تربت حیدریه-سه راه مهنه، Bar: بردسکن، Baj-chah: بجستان -چاه پالیز، F: فردوس -باغستان و N: نهبندان- شوسف و cont- :کنترل منفی

Figure 2- Amplification of 399 bp bands using specific primer Inc-14 for identification of *M. incognita* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from Tor-f : Torbat Heidaryeh-Feyzabad, Tor-m : Torbat Heidaryeh- Serah Mehne, Bar: Bardaskan, Baj-Chah: Bajestan- Chahpaliz, F: Ferdows-Baghestan, N: Nehbandan- shusf, control -

نتایج بدست آمده از شناسایی این گونه‌ها از ریشه انار با نتایج بشیری و همکاران (۷) که برای اولین بار با استفاده از این آغازگر گونه *M.incognita* را از ریشه درختان کیوی شناسایی کرده بودند، همخوانی دارد. آغازگر ar یک قطعه ۴۲۰ جفت بازی را برای گونه *M.arenaria*، و آغازگر Jav یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی را برای گونه *M. javanica* در همه جدایه‌ها تکثیر نموده و جمعیت‌ها را از یکدیگر متمایز می‌کنند (شکل ۳). نتایج این بررسی با نتایج جنگ و همکاران (۳۶) در چین، همخوانی دارد. آنها سه گونه اصلی نماتد

ریشه گرهی را از بین ۲۱ جمعیت توتون با استفاده از نشانگر SCAR با موفقیت شناسایی کردند. همچنین توصیه کردند که با استفاده ترکیبی از توالی DNA و SCAR می توان گونه‌های دیگر نماتد ریشه گرهی را بطور دقیق شناسایی کرد. میره کی و همکاران (۲۵) با استفاده از کیت‌های مولکولی، DNA را از مخلوط کیسه تخم و لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی از گلخانه‌های خیار استان کهگیلویه و بویر احمد جدا کرده و با استفاده از سه جفت آغازگر inc, ar و jav مورد شناسایی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که در هر ۱۰ جمعیت مورد مطالعه تنها قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر javf/javr تکثیرگردیده و در نهایت *M. javanica* را به عنوان گونه شایع در این منطقه گزارش کردند. همچنین عسکریان و همکاران (۴) ۱۰۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه گرهی از نقاط مختلف پسته کاری استان کرمان و مزارع داوران رفسنجان را جمع‌آوری کرده و پس از خالص‌سازی و شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم ، DNA ژنومی کلیه جمعیت‌ها را استخراج کرده و با کمک جفت آغازگرهای Mjavf / Mjavr وOPARjav / OPAFjav تکثیر دادند. در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica* یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر OPARjav / OPAFjav و یک قطعه ۱۶۰۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mjavf / Mjavr تکثیر داد، این قطعات در گونه *M. incognita* و *M. arenaria* و آب که به عنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شده بودند تکثیر نشد. لذا به نظر می رسد کاربرد این جفت آغازگرها در قیاس با خصوصیات ریخت‌شناسی به تشخیص سریعتر گونه *M. javanica* منجر شود.



شکل ۳- A) تکثیر باند ٤٢٠ جفت بازی با استفاده از نشانگر اختصاصی ar جهت شناسایی *M. arenaria* به ترتیب نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، جدایه های مناطق: Neh نهبندان، F فردوس و B بجستان، -cont کنترل منفی. B) تکثیر باند ٦٧٠ جفت بازی با استفاده از نشانگر Jav جهت شناسایی *M. javanica* به ترتیب نشانگر مولکولی، جدایه ها از مناطقM-1 مانه برج زنکانلو وM-2 مانه، J جاجرم وF فردوس، کنترل منفی بدون باند

Figure 3- A) Amplification of 420 bp bands using specific primer ar for identification of *M. arenaria* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from: Neh: Nehbandan, F:Ferdows and B: Bajestan, control -. B) Amplification of 420 bp bands using specific primer Jav for identification of *M. javanica arenaria* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from: M-1 : Maneh- Bourj zankanlu, M-2: Maneh, J: Jajarm, F: Ferdows and control – no band

با مقایسه نتایج به دست آمده از این بررسی و نتایج تحقیقات مشابه، می توان استفاده از آغازگرهای اختصاصی را برای شناسایی سه گونه اصلی نماتد ریشه گرهی، به عنوان یک روش سریع، دقیق و قابل اطمینان پیشنهاد نمود.

پس از شناسایی گونه‌های غالب در هر منطقه، درصد آلودگی هر منطقه از سه استان خراسان رضوی، جنوبی و شمالی به نماتد ریشه گرهی محاسبه گردید (جدول ۳). بیشترین میزان آلودگی باغ‌ها به این نماتد در شهرستان‌های بردسکن و بجستان مشاهده شد. بالاترین درصد آلودگی به نماتد ریشه گرهی در باغ انار شهرستان بردسکن در بخش انابد در روستای فاطمیه چاه شماره ۱ با ۵۷/۵ درصد مشاهده گردید. بالا بودن شدت آلودگی و خسارت نماتد در تعدادی از باغ‌های این منطقه بسیار زیاد بوده بطوری‌که تمام درختان در حال خشک شدن می‌باشند. در شهرستان‌های مانه و جاجرم برخلاف تصور بخش کشاورزی در منطقه مبنی بر عاری بودن باغ های انار از نماتد ریشه گرهی، این نماتد استخراج گردید ولی کمترین میزان آلودگی را نشان داد. بیشترین درصد آلودگی باغات به ترتیب در استان‌های خراسان رضوی در شهرستان‌های بردسکن ۱۹/۹۳ ٪، بجستان ۱۲/۳ ٪، خلیل آباد ۶/۹ ٪، کاشمر ۴/۳ ٪، تربت

حیدریه ۳/۵ ٪، خراسان جنوبی در شهرستان‌های فردوس ۵/۴ ٪ و نهبندان ۱/۳ ٪، و در شهرستان‌های مانه ۱/۱ ٪ و جاجرم ۰/۸ ٪ از خراسان شمالی گزارش گردید (جدول ۳). استان خراسان رضوی با توجه به بالا بودن سطح کشت انار، آلودگی بیشتری را نشان داد. بنظر می‌رسد نماتد ریشه گرهی برخلاف تصور در اغلب باغ‌های انار استان در حال گسترش و خسارت می‌باشد. لذا با توجه به ارزش غذایی و صادراتی انار و جهت جلوگیری از گسترش بیشتر این نماتد توصیه می‌گردد کنترل و مبارزه با این نماتد در دستور کار مدیران قرار گیرد.

جدول ۳- مناطق نمونه‌برداری آلوده به نماتد ریشه گرهی، درصد آلودگی وگونه‌های استخراج شده از هر منطقه به تفکیک استان، شهرستان و بخش

Table 3- Sampling area infected of root-knot nematode, Infection percentage and species extracted from each area by province, city and district.

مناطق نمونه‌برداری- استان Sampling region-province	شهرستان City	بخش District	درصد آلودگی باغ Percentage of infection	گونه‌های نماتد شناسایی شده Identified nematode species
خراسان رضوی (Razavi Khorasan)	تربت حیدریه (Torbat Heydarieh)	فیض اباد (Feyzabad)	1.5	*M. incognita*
		مه ولات (Mahvelat)	2.4	*M. incognita*
		سه راه مهنه۱ (Serah Mehne 1)	2.7	*M. incognita*
		سه راه مهنه۲ (Serah Mehne 2)	7.5	*M. incognita*
	خلیل آباد (Khalilabad)	ابراهیم آباد (Ebrahimabad)	2.08	*M. incognita*
		حاشیه جاده (Roadside)	11.8	*M. incognita ,M. javanica*
	کاشمر (Kashmar)	بالا ولایت (Balavelayat)	1.6	*M. incognita*
		حاشیه جاده (Roadside)	7.08	*M. incognita*
		انابد- فاطمیه چاه ۴ (Anabad-Fatemiyeh 4)	16.9	*M. incognita*
	بردسکن (Bardaskan)	انابد- فاطمیه چاه ۱ (Anabad-Fatemiyeh 1)	57.5	*M. incognita*
		انابد- باب الحکم (Anabad-Babolhekam)	0.8	*M. incognita, M. arenaria*
		انابد-محمدخان (Anabad-Mohammadkhan)	21.16	*M. incognita*
		انابد- فاطمیه چاه ۶ (Anabad-Fatemiyeh 6)	37.5	*M. incognita*
		انابد (Anabad)	3.25	*M. incognita*
		شفیع آباد (Shafie Abad)	2.4	*M. incognita*
		چاه پالیز (Chahpaliz)	32	*M. incognita. M. arenaria*
		جزین (Jazin)	9.4	*M. incognita*
	بجستان (Bajestan)	صلح آباد (Solhabad)	4.3	*M. incognita*
		انارستان حومه شهر (Pomegranate Roadside)	17.2	*M. incognita, M. arenaria*

M. incognita	2.5	چاه نظم (Chahnazm)		
M. incognita, M. arenaria	8.6	بجستان (Bajestan)		
M. incognita	6.8	باغستان علیا (Baghestan Olya)		
M. incognita	5.3	باغستان (Baghestan)		
M. incognita	3.1	دهستان (Dehestan)	فردوس (Ferdows)	خراسان جنوبی (Southern Khorasan)
M. incognita, M. javanica	6.5	فردوس (Ferdows)		
M. arenaria	1.3	محمد آباد (Mohammadabad)		
M. incognita, M. arenaria	2.1	شوسف (Shousf)	نهبندان (Nehbandan)	
M. incognita	0.7	نهبندان (Nehbandan)		
M. javanica	1.1	برج زنکانلو (Borj Zankanlu)	مانه (Maneh)	خراسان شمالی (Northern Khorasan)
M. javanica, M. incognita	1.2	مانه (Maneh)		
M. javanica , M. arenaria	0.8	جاجرم (Jajarm)	جاجرم (Jajarm)	

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جهت فراهم نمودن امکانات برای انجام این تحقیق، مرکز تحقیقات و جهاد کشاورزی مشهد، بردسکن، کاشمر، تربت حیدریه، بجستان، بجنورد و نهبندان و سایر بخش‌های شهرستان‌ها، جهت اطلاعات و تسهیل در فرایند نمونه‌برداری، ابراز می‌دارند.

منابع

1- Adam M.A.M., Phillips M.S., and Blok V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathology 56: 190 –197

2- Akhyani A. 1987. Important pest and diseases of pomegranates in Yazd and Isfahan provinces. Introduction to the Articles of the First Seminar on Pomegranate Problems in Iran. College of agriculture and natural resource of Tehran, Karaj. (In Persian)

3- Anonymous. 2005. Statistical Book of Agricultural of Iran. Iranian Statistical Centre, Tehran, Iran. (In Persian)

4- Askariyan H., Sharifnabi B., Oliya M., Mahdikhani Moghadam E., and Akhavan E. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* with use of morphometric and morphologic characterize and specific primer in Kerman Province. Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources. 47: 279-289. (In Persian)

5- Behzadi Shahrbabaki H. 1997. Genetic diversity of pomegranate genotypes in Iran. Agriculture Education Pub. (In Persian)

6- Barker K.R., Carter C.C., and Sasser J.N. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*, Plant. Pathology 4: 212-233

7- Bashiri S., Jamali S., and Gol Mohamadi M. 2012. Molecular Identification of Meloidogyne incognita nematode isolated from kiwifruit roots in northern Iran. 3rd Iranian agricultural Biotechnology Conference. Ferdowsi University of Mashhad.

8- De Ggrisse AT. 1969. Rediscription ou modification de quelques techniques utilisees dans letude des nematodes phytoparasitaries. Meddelingen Rijksfauculteit landbouwweteschappen Bull 34: 351-356.

9- De Ley I.T., Karssen G., De Ley P., Vierstraete A., Waeyenberge L., Moens M., and Vanfleteren J. 1999. Phylogenetic analyses of internal transcribed spacer region sequences within *Meloidogyne*. Journal of Nematology 31: 530–531.

10- Esser R.P., Perry V.G., and Taylor A.L. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). Proceedings of Helminthological Society of Washington 43: 138–150.
11- Fourie H., Zijlstra C., and Mcdonald A.H. 2001. Identification of root knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Journal Nematology 3: 675-680.
12- Jain R.K., Mathur K.N., and Singh R.V. 2010. Estimation of losses due to plant parasitic nematodes on different crops in India. Indian Journal of Nematology 37(2): 219-221.
13- Janssen T., Karssen G., Verhaeven M., Coyne D., and Bert W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. Scientific Reports 6: 22591.
14- Jepson S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes *Meloidogyne species*. CABI Publishing.
15- Jeyaprakash A., Tigano M.S., Brito J.A., and Dickson D.W. 2006.Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. Nematropica 36(1): 1-12
16- Hatamabadi Farahani M. 2015. Final report of research in determine distribution, severity of infection and identification of root knot nematode species in pomegranate orchards in Saveh city. Natural research and education center of Iran, Tehran. 31 p. (In Persian)
17- Hatamabadi Farahani M.,Ghalandar M., and Hoseininezhad A. 2018. Investigation of Distribution Root knot nematode in pomegranate orchards in Saveh city.23rd Iranian plant protection congress, Gorgan. P 725. (In Persian)
18- Hartman K.M., and Sasser J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. Pp. 69–77 *in* J. N. Sasser and Carter C.C.,. An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. II. Biology and control. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics
19- Harris T.S., Sandal L.J., Powers T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of Nematology 22: 518–527
20- Hunt D.J., and Hundoo Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. Pp: 55-97. *In*: R. N. Perry, M. Moens and J. L. Starr. Root-knot nematodes. CABI, Wallingford, UK.
21- Kargar Bideh A. 1989. Investigation of survey plant parasitic nematode in fruit trees (pomegranate, pistachio and almond) in Yazd province. MSc Thesis. Tarbiat Modarres University Faculty of Agriculture. 140 p. (In Persian)
22- Kheiry A., and Baruti SH. 1987. Introducing plant parasitic nematodes collected from soil around pomegranate roots. Introduction to the Articles of the First Seminar on Pomegranate Problems in Iran. College of agriculture and natural resource of Tehran, Karaj. P19. (In Persian)
23- Kiewnick S., Holterman M., van den Elsen S., van Megen H., Frey J.E., Helder J. 2014. Comparison of two short DNA arcoding 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.
24- Lunt D.H., Kumar S., Koutsovoulos G., and Blaxter M.L. 2014. The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics. Peer Journal 2: 1-25.
25- Mireh Ki K., Abdollahi M., Mohaghegh Dolat abadi M., and Ghezelbash N. 2014. Application of Morphological Characters and PCR- SCAR Markers for Identification of Dominant Species of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Glasshouses of Cold Region of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran .Agricultural biotechnology. (In Persian with English abstract)
26- Palomares Ruis J.E., Vovlas N., Troccoli A., LieBanas G., Landa B.B., and Castillo P. 2007. A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal sand dunes: *Meloidogyne dunesis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae). Journal of Nematology 39:190–202.
27- Powers T.O., and Harris T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 25: 1–6.
28- Powers T.O., Mullin P.G., Harris T.S., Sutton L.A., and Higgins R.S. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. Journal of Nematology 37: 226–235.
29- Silva A.T., Penna J.C.V., Goulart L.R., Santos M.A., and Arantes N.E. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* ichinohe assessed by RAPD markers. Genet. Mol. Biology 23: 323-329.
30- Shakeri M. 2003. Disease and Pest of Pomegranate. Tasbih Pub. 126 p. (In Persian)
31- Verma N., Mohanty A., and Lal A .2010.Pomegranate genetic resources and germplasm conservation: a Review. Fruit Vegetable Cereal Sci Biotechnol 4(2): 120-125.
32- Whitehead A.G., and Hemming J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annual Applied Biology 55: 25-38.
33- Ye W., Zeng Y., and Kerns J. 2015. Molecular characterization and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. PLoS ONE 10(1 1), e0143556.
34- Ye W., Robbins R.T., and Kirkpatrick T. 2019. Molecular characterization of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) from Arkansas, USA. Scientific Reports. 9:15680
35- Zeng Y., Ye W., and Kerns J. 2015. Molecular characterization and phylogenetic relationships of plant-parasitic nematodes associated with turfgrasses in North Carolina and South Carolina, USA. Plant Disease 99: 982–993.

36- Zeng J., Zhang Z., Wu X., Zeng Y., and Li Y. 2017. Distribution and Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. Parasitizing Flue-cured Tobacco in Yunnan, China. Plant Protect. Sci.
37- Zijlstra C., Donkers-venne D., and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assay. Nematology 2(8): 847-853.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 297-308

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۰۸-۲۹۷

Morphological and Molecular Identification of Major Species of *Meloidogyne* and Distribution there in Pomegranate Orchards in Khorasan Provinces

N. Katooli[1]- E. Mahdikhani Moghadam[2]*- R. Aghnoum[3]

Received: 11-11-2019
Accepted: 13-01-2020

Introduction: Pomegranate is one of the most popular fruit trees and one of the most important export productions in Iran. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the most damaging plant-parasitic nematodes of pomegranate, which cause root galls and disrupt the absorption and transfer of water and food, and eventually decrease the fruit growth. Root-knot nematodes *(Meloidogyne* spp.) are economically important plant parasites affecting a broad range of host plants, and thus far, 100 nominal species have been described. The development of molecular methods to identify the four major Root-knot nematodes including *M. incognita*, *M. arenaria*, *M.javanica* and *M. hapla* has been the goal of numerous studies. These species are morphologically similar, making identification difficult for the non-specialist. However, distinguishing them is important for utilizing appropriate crop rotations, managing resistance effectively and plant quarantine requirements. Therefore, some molecular methods for identification of Root-knot nematodes (RKN) species have been developed. Recently, a PCR method based on DNA has been widely used for the identification of nematodes. SCAR- Primers (Sequence characterized amplified region) were developed and are used routinely on a large number of samples with high sensitivity and specificity.

Materials and Methods: In order to investigate the infection of pomegranate orchards to *Meloidogyne* species, 115 soil and root samples were collected from major areas of pomegranate cultivation from Khorasan Razavi, Northern Khorasan and Southern Khorasan provinces, during 2015-2016. The highest area of pomegranate cultivation is located in Torbat Heydarieh, Bardaskan, Kashmar, Khalil Abad, Bajestan and Ferdows cities. After extraction of nematodes from root and surrounding soil, species identification was performed according to morphological and morphometric characteristics of second-stage juveniles, mature females and perineal pattern of females, and also using molecular methods and specific SCAR primers. For DNA extraction, the procedure proposed by Silva *et al*, who extracted DNA of second stage juvenile, was applied. In addition, the Atkin methods were employed for extracting DNA of mature female. The DNA was added into the PCR reaction with specific primer (SCAR), and then loaded in gel for further analyses.

Results and Discussion: Major species of root knot nematode were *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* in Khorasan provinces identified based on morphological and morphometric studies as well as SCAR primers. *M. incognita* showed a band about 399 bp with Inc-14 primer, *M. javanica* exhibited a band about 670 bp with Jav primer and *M. arenaria* showed a band about 420 bp with a ar primer. Infection of root knot nematode pomegranate was observed in almost all cities but the intensity of infection varied considerably. The highest percentage of infection on root-knot nematodes pomegranate orchards was observed in Bardaskan (Anabad section of Fatemieh village) with 57.5% and Bajestan (Chah Paliz village) with 32%. *M. incognita* has the highest distribution in pomegranate orchards. The highest percentage of infected orchards was estimated in Bardaskan (19.93%), Bajestan (12.3%), Khalil Abad (6.9%), Kashmar (4.3%), and Torbat Heidariyeh (3.5%) located in Khorasan Razavi provinces, Ferdows (5.4%) and Nehbandan (1.3%) in Southern Khorasan provinces, and Maneh (1.1%) and Jajarm (0.8%) situated in Northern Khorasan. *M. incognita* has the highest distribution in Khorasan Razavi and Southern Khorasan provinces, and *M. javanica* has the highest distribution in Northern Khorasan provinces. The differential host shows the race 2 of *M. incognita* in area.

Conclusion: Infection of root knot nematode pomegranate is growing and there is a need for accurate identification. Using molecular methods especially SCAR primers for identification of major species of root knot nematode is fast, accurate and reliable.

Keywords: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, Pomegranate, SCAR-Primer

1 and 2- Ph.D. Student of Plant Pathology and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahdikhani-e@um.ac.ir)
3- Seed and Plant Improvement Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran