

تعیین گونه و نژاد نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) به منظور تهیه جمعیت خالص برای آزمایش‌های به‌نژادی

لیلا صادقی^۱، سالار جمالی^{۱*}، مسعود نادرپور^۲، حبیب‌الله سمیع زاده لاهیجی^۳ و محمدرضا نقوی^۴

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲. موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۴. گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

*پست الکترونیکی مسئول مکاتبات: jamali@guilan.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۲ پذیرش علمی ۱۴۰۴/۰۳/۱۳ انتشار در سامانه: ۱۴۰۴/۰۳/۲۲

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی از مهم‌ترین عوامل تخریب سامانه ریشه در گیاهان بوده و عملکرد ارقام حساس را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. توسعه ارقام اصلاح‌شده با مقاومت قابل قبول در برابر گونه‌ها و نژادهای نماتد ریشه‌گرهی، از اهداف برنامه‌های به‌نژادی در دنیا می‌باشد. شرط لازم در انتخاب منابع مقاومت برای مدیریت این نماتد، شناسایی صحیح جمعیت آن در سطح گونه و نژاد می‌باشد. به همین منظور، در پژوهش حاضر، از مناطق سبزی و صیفی‌کاری استان‌های گیلان و کهگیلویه و بویراحمد نمونه‌های متعدد خاک و ریشه جمع‌آوری شد. سپس نماتدهای ریشه‌گرهی جداسازی و با استفاده از تک توده تخم روی رقم حساس ارلی اوربانا گوجه‌فرنگی خالص‌سازی و تکثیر گردیدند. بر اساس ویژگی‌های ساختاری الگوی کوتیکولی انتهای بدن افراد ماده و ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم، شناسایی اولیه صورت گرفت. در جهت تأیید خصوصیات ریخت‌شناسی، از آغازگر اختصاصی Ink-14 و F/R jav به عنوان نشانگر SCAR و آغازگر عمومی D2A/D3B از ناحیه 28SrDNA برای تکثیر اختصاصی و توالی‌یابی استفاده گردید. توالی‌های جدید به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه جهانی بانک ژن GenBank مقایسه شد. جمعیت‌های موجود با استفاده از میزبان‌های افتراقی نژاد، در سطح گونه به عنوان نژاد یک *Meloidogyne javanica* و نژاد دو *M. incognita* به ترتیب از دو استان کهگیلویه و بویراحمد و گیلان تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از این مطالعه در غربال‌گری منابع جدید مقاومت و توسعه ارقام با مقاومت اختصاصی در برابر نژادهای این دو گونه قابل استفاده خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: روش‌های مولکولی، شناسایی، میزبان افتراقی، نژاد، نماتد ریشه‌گرهی

Determination of species and races of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) for establishing pure populations in breeding trials

Leila Sadeghi², Salar Jamali^{1✉}, Masoud Naderpour², Habibollah Samizadeh Lahiji³ Mohamad Reza Naghavi⁴

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan Rasht, Iran.
2. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3. Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan Rasht, Iran.
4. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

✉Corresponding author E-mail: jamali@guilan.ac.ir

Received: 2024/12/22 Revised: 2025/06/03 Accepted: 2025/06/12

Abstract

The root-knot nematode (RKN) species cause substantial damages on roots of crops and decrease the yield of susceptible cultivars. Developing improved resistant cultivars, against species and races of root-knot nematodes, is the goal of breeding programs worldwide. Accurate identification of root-knot nematode species and races are prerequisites for the management of these pathogens. Accordingly, in the present study, several soil and root samples were collected from vegetable growing areas of Guilan and Kohgiluyeh and Boyer Ahmad provinces. The root-knot nematodes were isolated and each population was purified and cultured on the susceptible tomato cv. Early Urbana using single egg masses. Each population was morphologically identified based on perineal patterns and morphometrics of second-stage juveniles. To confirm morphological characteristics, SCAR primers Ink-14 and F/R jav, and universal primers D2A/D3B 28s rDNA were used for specific amplification and sequencing. The newly generated sequences were compared with previously deposited sequences at GenBank. The recovered species were identified as *M. javanica* and *M. incognita* from Kohgiluyeh and Boyer Ahmad and Guilan provinces, respectively based on differential host test. The results of the test revealed that the races of the recovered species belong to race one of *M. javanica* and race two of *M. incognita*, respectively. The obtained results of this study are useful in screening and developing new resources of resistance against root-knot nematodes.

Key words: Differential Host, Identification, Molecular Methods, Race, Root-knot Nematode

How to cite: Sadeghi L., Jamali S., Naderpour M., Samizadeh-Lahiji H. & Naghavi M. 2022. Determination of species and races of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) for establishing pure populations in breeding trials. Iranian Journal of Nematology 1(2), 233-246.

مقدمه

تنش‌های زیستی یک تهدید بالقوه در کشاورزی برای امنیت غذایی جهان محسوب می‌شوند. ظهور بیمارگرها و نژادهای جدید به علت تغییرات آب‌وهوایی و گرمایش زمین و فاکتورهای ژنتیکی برای به‌نژادگران یک چالش بزرگ بوده است (Figuerola et al. 2018). پارازیتسم نماتدهای انگل گیاهی، یکی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی روی محصولات کشاورزی است (Fuller et al. 2008).

نماتدهای انگل گیاهی بیمارگرهای اجباری هستند که باعث میلیاردها دلار خسارت سالانه در تولید کشاورزی در جهان می‌شوند (Ghule et al. 2014; Khan et al. 2021).

در این میان نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) به دلیل انتشار جهانی، دامنه میزبانی وسیع و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی در ردیف مهم‌ترین و خسارت‌زاترین عوامل بیماری‌زای گیاهی محسوب می‌شوند (Hussey & Mims 1990; Ghaderi et al. 2020). مهم‌ترین گونه‌های این گروه *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. javanica* هستند که به‌طور عمده در مناطق گرمسیری و گونه *M. hapla* در مناطق سرد و معتدل پراکنده‌اند (Williamson & Kumar 2006). گونه *M. javanica* یکی از گونه‌های شایع این جنس بعد از *M. incognita* دومین گونه مهم نماتد ریشه‌گرهی در جهان و مهم‌ترین گونه در ایران است و در خاک‌های شنی بسیار مشکل‌ساز می‌باشند (Taylor et al. 1982; Akhyani et al. 1984; Pathania et al. 2014).

روش شناسایی مبتنی بر صفات ریخت‌شناختی متداول بر اساس ویژگی‌هایی مانند طول بدن، ساختار محفظه دهانی و دم، اندام‌های جنسی و سایر صفات است (Nisa et al. 2022). این روش به دلیل نبود تنوع ظاهری در میان جنس‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، اغلب متخصصین را در شناسایی نماتدهای انگل گیاهی با چالش مواجه می‌نماید (Oliveira et al. 2011). از طرف دیگر در استفاده از ریخت‌شناسی در تشخیص و شناسایی گونه‌هایی که از نظر صفات ظاهری بسیار مشابه هستند اما هویت

ژنتیکی متفاوتی دارند، کارآیی چندانی ندارد. علاوه بر این، تنوع طبیعی ناشی از انعطاف‌پذیری فنوتیپی و گونه‌های پنهان، نژادها و پاتوتیپ‌ها شناسایی صحیح را بر اساس داده‌های ریخت-شناختی مبهم و دشوار می‌سازد.

برخی از گونه‌های *Meloidogyne* دارای نژادهایی هستند که با مجموعه‌ای از میزبان‌های افتراقی مطابق با آزمون میزبان افتراقی کارولینای شمالی قابل تشخیص هستند (Subbotin et al. 2021). آزمون میزبان افتراقی برای تشخیص چهار گونه *M. hapla*، *M. incognita*، *M. arenaria* و نژادهای میزبانی به‌ویژه در دو گونه اخیر معرفی شده است (Hartman & Stanton & O'Donnell 1998; Sasser 1985). آزمون ارقام افتراقی بر مبنای ترکیبی از واکنش‌های حساسیت و مقاومت به شش رقم لفل، پنبه، بادام زمینی، گوجه‌فرنگی، هندوانه و توتون استوار است (Taylor & Sasser 1978). پاسخ میزبان‌های افتراقی به جمعیت نماتد ریشه‌گرهی برای شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی نسبتاً قابل اعتماد است (Eisenback et al. 1981). با این حال این روش توانایی تفکیک جمعیت *M. javanica* از نژاد دو *M. arenaria* را ندارد.

در سال‌های اخیر روش‌های مبتنی بر DNA به عنوان روش‌های تکمیلی و یا جایگزین، موفقیت قابل‌توجهی در شناسایی گونه‌های نزدیک به هم داشته است (Powers et al. 2005; Subbotin et al. 2021). روش‌های مولکولی علاوه بر تکرارپذیری و سریع‌بودن، تحت تاثیر محیط نبوده و در هر مرحله از چرخه زندگی نماتد قابلیت به‌کارگیری دارد (Nisa et al. 2022). روش‌های اصلی مدیریتی مانند تناوب زراعی و ارقام مقاوم معمولاً اختصاصی گونه یا نژادهای نماتد هستند. بنابراین در به‌نژادی و توسعه یک رقم مقاوم به نماتد ریشه‌گرهی، هویت دقیق (یعنی گونه و نژاد) جمعیت نماتد مورد مطالعه باید شناخته شود. هدف از پژوهش حاضر شناسایی دقیق جمعیتی از نماتدهای ریشه‌گرهی با استفاده از روش‌های موجود به منظور دسترسی به جمعیت خالص و قابل اطمینان برای آزمایش‌های مقدماتی و پیشرفته در برنامه‌های توسعه ارقام مقاوم بود.



شکل ۱. ریشه آلوده به نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne incognita*) در لوبیا (عکس از نویسندگان)

Fig. 1. Root infected by *Meloidogyne incognita* in common bean (by authors)

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

به منظور دسترسی به جمعیت‌های نماتد ریشه‌گرهی از گلخانه‌های سبزی- صیفی دارای ریشه‌های با علائم آلودگی به این نماتد (شکل ۱)، در فصل زراعی ۱۳۹۸ از دو استان گیلان و کهگیلویه و بویراحمد نمونه‌برداری انجام و تعدادی نمونه خاک و ریشه به محل موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شد.

بررسی ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جمعیت‌های موجود

نمونه ریشه‌های آلوده بررسی و تک توده تخم (single egg mass) از آنها جدا شد. از گوجه فرنگی رقم Early Urbana برای خالص‌سازی، تکثیر و نگهداری جمعیت‌های نماتد استفاده گردید. برای به‌دست آوردن جمعیت خالص، تک توده تخم در مرحله دو تا چهار برگی گیاهچه‌ها در عمق سه سانتی‌متری در مجاورت ریشه رقم فوق قرار داده شد. در چهار هفته یک چرخه زندگی نماتد و تولید توده تخم در شرایط گلخانه با دمای متوسط ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۵ درصد تکمیل گردید. ریشه‌های آلوده در جریان ملایم آب در آزمایشگاه شسته شده و از نظر وجود گال و توده تخم در هر دو جمعیت مورد مطالعه به‌طور جداگانه زیر استرئومیکروسکوپ بررسی شدند. برای بررسی و مشاهده انتهای کوتیکولی بدن نماتد ماده، توده تخم به آرامی برداشته شده و با برش کوچکی روی گال، نماتد ماده بالغ (حداقل ۱۰ نمونه ماده بالغ) به‌طور تصادفی انتخاب و با یک برش در یک سوم انتهایی بدن، کوتیکول قسمت انتهایی نماتد ماده بالغ جدا شده و در اسید لاکتیک ۴۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. برای تشخیص الگوی کوتیکولی قسمت انتهایی اسلاید

میکروسکوپی تهیه (Taylor & Nestcher 1974) و شناسایی اولیه انجام شد.

مشخصات ریخت‌شناختی جمعیت خالص گونه‌های مورد مطالعه بر اساس کلید شناسایی (Jepson 1987) با استفاده از میکروسکوپ میکروس (Micros, Austria) مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت و از هر جمعیت، ۲۵ لارو سن دوم برای ریخت‌سنجی اندازه‌گیری شد. سپس میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات هر شاخص محاسبه و با شاخص‌های مهم تشخیص هر دو گونه مقایسه شد (Jepson 1987).

آزمون میزبان افتراقی

شناسایی چهار گونه مهم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*، *M. arenaria*، *M. hapla* (دو نژاد) و *M. incognita* (چهار نژاد) بر اساس آزمون میزبان افتراقی مطابق جدول ۱ توصیه شده است (Taylor & Sasser 1978; Subbotin et al. 2021).

یک تا دو بذر از ارقام مورد نظر (جدول ۱) برای اجرای آزمون در گلدان‌های با دهانه ۲۰ سانتی‌متر با مخلوطی از پرلیت، کوکوپیت و پیت ماس به نسبت ۱:۵:۰/۵ کشت شدند. برای هر رقم سه تکرار و یک شاهد منفی در نظر گرفته شد. در مرحله ۴-۶ برگی، در حدود ۵۰۰۰ تا ۶۰۰۰ لارو سن دو و تخم نماتد در پنج میلی‌لیتر آب استریل در عمق سه سانتی‌متری مجاور ریشه مایه‌زنی شدند. آزمون ارقام افتراقی در گلخانه‌ی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در دمای متعارف ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. گیاهان در فواصل زمانی منظم و برحسب نیاز با آب و کود کامل (Combifast, NPK 20-20-) تغذیه شدند.

جدول ۱. میزبان‌های افتراقی برای تفکیک گونه‌ها و نژادهای چهار گونه *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica* (دو نژاد) و *M. incognita* (چهار نژاد) (Taylor & Sasser 1978)

Table 1. Differential hosts for separation of species and races of *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* and *M. incognita* (Taylor & Sasser 1978)

گیاه Plant	گونه Species	رقم Variety
Cotton	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Deltapine 16
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	NC 95
Pepper	<i>Capsicum frutescens</i> L.	California wonder
Watermelon	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	Charleston Gray
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Florunner
Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Rutgers, Tiny Tim

۰/۱ حجم استات سدیم (۳ مولار و pH= ۵/۲) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰ دور بر دقیقه رسوب‌دهی شده و با الکل ۷۰ درصد شستشو شدند. رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل حل و کمیت و کیفیت DNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Nanodrap)ND-1000، بررسی شد.

از آغازگرهای عمومی 28S rDNA و اختصاصی SCAR برای شناسایی مولکولی استفاده شد. دمای اتصال هر جفت آغازگر بر اساس یک شیب دمایی تعیین و دمای اتصال مناسب برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf) انتخاب شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با Master Mix آماده (شرکت سیناکلون، ایران) با غلظت دو برابر (2X)، حاوی ۰/۰۸ واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، سه میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، انجام شد. واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۰/۵ میکرولیتر هر یک از آغازگرها (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، چهار میکرولیتر آب دیونیزه استریل و پنج میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه حرارتی واکنش PCR به این صورت بود: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، تکثیر DNA در ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه دمای اتصال در ۶۰ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بسط نهایی. محصول حاصل در ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

به دلیل عدم دسترسی به کنترل مثبت تاییدشده گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی و برای اطمینان از صحت قطعات تکثیر شده،

پس از گذشت ۵۰ تا ۵۵ روز از زمان تلقیح، واکنش ارقام نسبت به هر دو جمعیت نماتد ریشه‌گرهی، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. شاخص گال و توده تخم (Taylor & Sasser 1978) به صورت جداگانه بررسی شدند. تعداد گال یا توده تخم بیش از دو عدد و یا کمتر از دو به ترتیب واکنش مثبت و منفی در نظر گرفته شد. معمولاً واکنش حساسیت با توده تخم اندازه‌گیری می‌شود، گرچه مقادیر شاخص گال و توده تخم مشابه هستند، اما در بعضی مواقع شاخص توده تخم کوچک‌تر است که در این صورت برای تصمیم‌گیری نهایی از توده تخم استفاده شده است (Taylor & Sasser 1978).

شناسایی مولکولی

از ریشه‌های آلوده، توده تخم، نماتد ماده و لارو سن دوم به صورت جداگانه با استفاده از روش دانگ (Dong et al., 2001)، DNA ژنومی استخراج گردید. برای خرد و پودر شدن نمونه‌های ریشه از ازت مایع استفاده شد. بافر استخراج (Tris-HCl 100 mM pH=8.5; EDTA 50 mM pH= 8; NaCl 100 mM; SDS 10% 1%; 1, 4- Dithiothreitol 15 mM) به همراه یک میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰۰ μg/ml)، به نمونه‌ها اضافه شد و به دفعات توسط تیپ استریل فشار وارد نموده تا خرد و تکه تکه شوند. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. عصاره حاصل با فنل، کلروفرم، ایزوامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) تیمار و به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس در ۱۳۰۰ دور بر دقیقه رسوب‌دهی (Centrifuge machine, Model 5430R, Ependorf) شدند. فاز رویی به لوله‌های جدید منتقل و برای رسوب DNA به میزان هم‌حجم عصاره، ایزوپروپانول سرد و

توالی‌یابی توسط شرکت Bioneer (South Korea) انجام شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از برنامه جستجوی تشابه هم‌ردیفی نوکلئوتیدها در پایگاه توالی‌های بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه و زیرهم‌چینی با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن توسط نرم افزار آنالین هم‌ردیفی توالی‌های چندگانه توسط Clustalw انجام شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی

Table 2. The primers used for identification of root-knot nematode species

نام	نشانه‌گر	توالی	Annealing temperature	اندازه Size (bp)	منبع Reference
Name	Marker	Sequence (5'-3')			
Jav	SCAR	F-GGT GCG CGA TTG AAC TGA GC R-CAG GCC CTT CAG TGG AAC TAT AC	60	670	Zijlstra et al. (2000)
Inc-K14	SCAR	F-CCC GCT ACA CCC TCA ACT TC R-GGG ATG TGT AAA TGC TCC TG	60	399	Randig et al., (2001)
D2/D3	28S rDNA	F-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT R-TGC GAA GGA ACC AGC TAC TA	60	612	Ye et al. (2015)

نتایج و بحث

ارقام مقاوم به‌عنوان یکی از ایمن‌ترین و پایدارترین راهکارهای زیست‌محیطی برای مدیریت عوامل بیماری‌زای گیاهی شناخته می‌شوند (Vidhyasekaran 2007; Williamson & Kumar 2006). بدیهی است که شناسایی دقیق گونه عامل بیماری‌زا و بررسی تنوع ژنتیکی آن در منطقه، نخستین گام اساسی در تدوین و اجرای برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود. اهمیت این موضوع زمانی آشکار می‌گردد که با اتکا به گونه غالب و میزان بروز بیماری در مناطق مختلف، بتوان ارقام مقاوم و سازگار با شرایط محیطی هر منطقه را به‌طور هدف‌مند معرفی و به‌کارگرفت (Aydinli & Mennan 2016).

در پژوهش حاضر، نمونه‌های جمع‌آوری شده از دو استان گیلان و کهگیلویه و بویراحمد با تکیه بر خصوصیات ریخت-سنجی و مشخصات لارو سن دوم و الگوی کوتیکولی قسمت انتهایی بدن نماتدهای ماده بالغ و بر اساس شرح گونه توسط منابع معتبر (Eisenback et al. 1981; Taylor 1987; Jepson 1987) با مشخصات دو گونه مورد بحث مطابقت داشته و *M. javanica* و *M. incognita* تشخیص داده شدند (جدول ۳، شکل ۲-A-E). میانگین طول بدن نماتد ماده *M. incognita* نسبت به میانگین شرح اصلی گونه (Jepson 1987) یک میکرومتر اختلاف داشت. در حالی که میانگین اندازه طول بدن نماتد ماده جداسازی

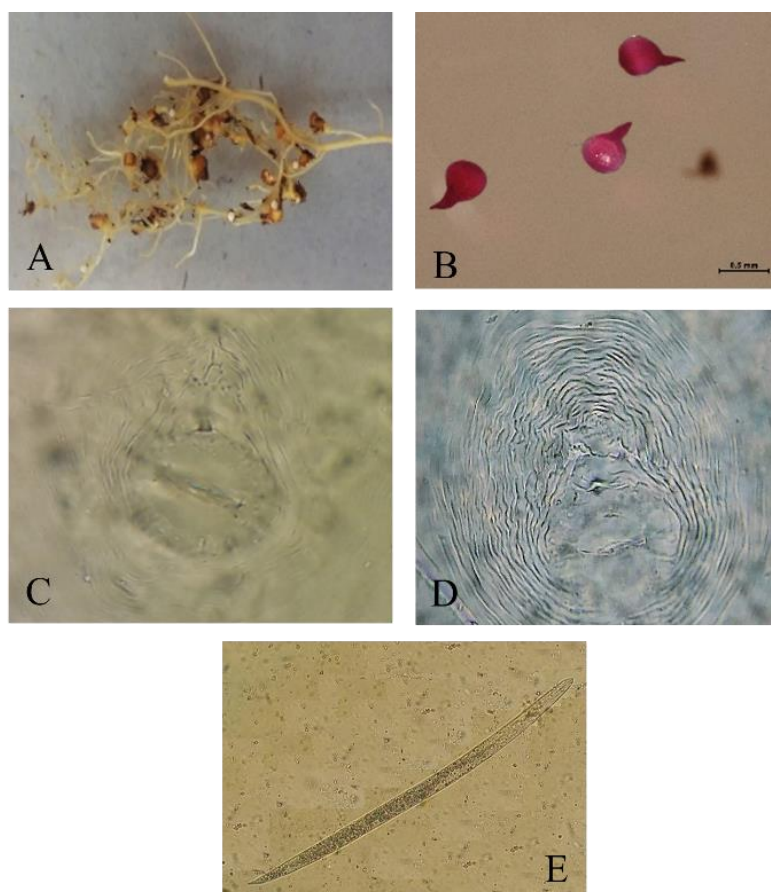
شده در مطالعه حقیقی و همکاران (2009) از گونه مورد بحث ۱۲ میکرومتر بیشتر بود. طول دم و طول ناحیه شفاف انتهایی دم در لاروهای سن دوم گونه مورد بحث از اندازه‌های شرح اصلی گونه (Jepson 1987) به ترتیب ۱/۷ و ۳/۷ میکرومتر بیشتر بود. طول ناحیه شفاف انتهایی دم لارو سن دوم در شرح گونه گزارش دیگری (Uysal et al. 2017) با میانگین ۱۱/۶ میکرومتر بوده و نسبت به شرح گونه *M. incognita* توسط حقیقی و همکاران (2009) اختلاف جزئی داشت (جدول ۳). طول بدن ماده *M. javanica* با ۷۸۰ میکرومتر از طول بدن ماده *M. incognita* بیشتر بود و عسکریان و همکاران (2009) طول بدن ماده گونه مورد بحث را به‌طور میانگین ۸۲۸/۳ میکرومتر گزارش کرده‌اند که بیشتر از طول بدن گونه مورد بحث می‌باشد.

ناحیه شفاف انتهایی دم لارو سن دوم به طول ۱۳ میکرومتر تاحدی از مقدار آن در *M. incognita* بیشتر بود. طول دم نسبتاً بلند (۵۲-۵۴) (۵۰±۱/۹۳(۴۶-۵۲) میکرومتر) و مشابه شرح گونه در گزارش عیسوند و همکاران (2020) بود. در حالی که طول دم لارو سن دوم در شرح گونه *M. javanica* در عسکریان و همکاران (2009) (۴۶-۵۷) ۵۲/۴ میکرومتر بوده است. طول استایلیت با ۱۱/۸ میکرومتر مشابه گزارش عسکریان و همکاران (2009) بود. مقاومت به نماتدها اغلب بر اساس صفت "تولیدمثل مؤثر نماتد" تعریف می‌شود. گیاهان مقاوم سطح پایینی از تولیدمثل را نسبت به ژنوتیپ‌های گیاهان حساس بروز می‌دهند.

جدول ۳. مشخصات ریخت‌سنجی *Meloidogyne incognita* نژاد دوم و *M. javanica* نژاد یک (اندازه‌ها در مقیاس میکرومتر می‌باشد).

Table 3. Morphometrics characters of *Meloidogyne incognita* race 2 and *M. javanica* race one (All measurements are in μm and in the form: mean $\pm$ sd (rang)).

مشخصات ریخت سنجی	لارو سن دوم	ماده	لارو سن دوم	ماده
Morphometric characters	J2	Female	J2	Female
<i>M. incognita</i> race 2	Present Study		Haghighi et al. 2009	
L	405 $\pm$ 20 (375 -440)	610 (505-700)	402.7 (373.2-412.5)	622 (512-721)
W	14 $\pm$ 0.7 (13-15)	415 (250 -520)	14.1 (12.1-15.5)	414 (231.5-522)
a	(28.2 -51.1) 47.8 $\pm$ 6.92	-	49.5 (27.2-55.5)	-
b	5.1 $\pm$ 0.31 (4.6 -5.5)	-	5.2 (4.8-5.4)	-
c	8.1 $\pm$ 0.5 (7.2 -8.4)	-	8.1 (7.6-8.7)	-
Tail/A.B.W.	5.6 $\pm$ 0.53 (4.7 -6.1)	-		
Stylet	11.7 $\pm$ 0.75 (10-12.5)	16.3 (16-17)	11.8 (10.6-12.4)	16.5 (16.3-16.9)
O	2.5 $\pm$ 0.53 (2-3)	3.5 (3-4)	2.8 (2.5-3.1)	3.9 (3.3-4.1)
Tail	(45. -55.1) 50.1 $\pm$ 2.60	-	52.1 (43.9-55.4)	-
Hyaline terminus length	12.6 $\pm$ 1.49 (10-15)	-	12.9 (10.6-14.2)	-
Anal body width	10.3 $\pm$ 0.82 (9-12)	-	10.3 (8.9-12.3)	-
<i>M. javanica</i> race 1	Present Study		Askarian et al. 2009	
L	405 $\pm$ 13 (368-410)	780 $\pm$ 88.2 (680-950)	410.8 (395-420)	828.3 (690-964)
W	10.5 $\pm$ 1.2 (9-12)	403.5 $\pm$ 48 (330-500)	10.8 (9-11)	463 (350-530)
a	41.1 $\pm$ 6.72 (27-53.2)	-	-	-
b	4.9 $\pm$ 0.25 (4.5-5.3)	-	-	-
c	7.9 $\pm$ 0.3 (7.8-8.7)	-	8.3 (7-9)	-
Tail/A.B.W.	5.5 $\pm$ 0.58 (4.8-6.3)	-	-	-
Stylet	11.81 $\pm$ 0.96 (10-13)	16.5 $\pm$ 1.1 (15-18)	11.4 (10.5-13)	16 (15.5-18)
O	3 $\pm$ 0.44 (2.5-4.1)	4.3 $\pm$ 1.1 (3-6)	3.2 (2.5-4)	4.6 (3-6)
Tail	50 $\pm$ 1.93 (46-52)	-	52.4 (46-57)	-
Hyaline terminus length	13 $\pm$ 1.7 (11-16)	-	13 (11-16)	-
Anal body width	10.5 $\pm$ 1.5 (8-13)	-	-	-



شکل ۲. مشخصات ریخت‌شناختی دو گونه *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne incognita*: A: توده تخم *M. javanica* روی ریشه آلوده. B: ماده بالغ *M. javanica*. C و D: به ترتیب الگوی کوتیکولی قسمت انتهایی بدن نماتد ماده بالغ در *M. javanica* و *M. incognita* (بزرگ‌نمایی 40X). E- لارو سن دوم *M. incognita* (بزرگ‌نمایی 10X).

Fig 2. Morphological features of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. A: Egg mass of *M. javanica* on infected root. B: Mature female of *M. javanica*. C and D: Perineal patterns morphology of adult females in *M. javanica* and *M. incognita*, respectively (40X). E- Second stage juvenile of *M. incognita* (10X).

اساس ترکیبی از واکنش‌های مقاومت و حساسیت به نماتد ریشه‌گرهی در ارقام خاصی از پنبه، توتون، فلفل، هندوانه، بادام-زمینی و گوجه‌فرنگی انجام می‌گیرد (Van der beek *et al.* 1999).

در مطالعه حاضر، سامانه ریشه ۵۰ تا ۵۵ روز پس از مایه‌زنی جدایه اول با ارقام پنبه، فلفل و بادام‌زمینی هیچ علائمی از وجود گال یا توده تخم نشان نداد (شکل ۳- C و D, F) و نتایج برهم-کنش به صورت واکنش ناسازگار در نظر گرفته شد. ارقام توتون و هندوانه نسبت به این نماتد واکنش سازگار و مثبت داشتند و گال‌ها و توده‌های تخم تشکیل شده در سامانه ریشه، قابل مشاهده بود (شکل ۳- B و E). رقم روتگرز گوجه‌فرنگی به عنوان شاهد و میزبان حساس به گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی واکنش سازگار با نماتد داشت (شکل ۳- A و جدول ۴). با توجه به الگوی

بازدارندگی از تولیدمثل منجر به کاهش تراکم جمعیت نماتد می‌گردد (Starr & Mercer 2009). اصطلاح "host race" اغلب به توانایی جمعیت‌های یک گونه نماتد در آلوده نمودن یک گونه یا ارقام خاصی از گیاهان میزبان اطلاق می‌شود که در طبقه‌بندی نژادها، پاتوتیپ‌ها یا بیوتیپ‌ها استفاده می‌شود. برخی از گونه‌های *Meloidogyne* دارای نژادهایی هستند که با مجموعه‌ای از میزبان‌های افتراقی مطابق با آزمون میزبان افتراقی کارولینای شمالی قابل تشخیص هستند (Subbotin *et al.* 2021).

به دلیل تنوعی که در دامنه میزبانی چهار گونه اصلی نماتد ریشه‌گرهی وجود دارد، مفهوم نژادهای میزبانی در گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی پیشنهاد شده است. نژادهای میزبانی در واقع مجموعه‌ای استاندارد از میزبان‌های افتراقی است که نژادهای چهار گونه مهم *Meloidogyne* را تشخیص و شناسایی می‌کنند (Hartman & Sasser 1985). آزمون میزبان‌های افتراقی بر

پنبه (رقم Deltapine 16) در تعیین نژاد دوم *M. incognita* تعیین کننده می‌باشد به طوری که در نژاد یک واکنش به توتون و پنبه منفی و در نژاد چهار به هر دو مثبت می‌شود. اما واکنش هر چهار نژاد به فلفل مثبت و به بادام زمینی منفی می‌باشد. در آزمون میزبان افتراقی نتایج غیرعادی که مطابق جدول میزبان افتراقی (Subbotin et al. 2021) نباشد، مشاهده نگردید و جمعیت های خالص سازی شده با نژاد یک *M. javanica* و نژاد دوم *M. incognita* مرتبط بودند (جدول ۴).

جدول واکنش میزبان افتراقی (Subbotin et al. 2021) جدایه مذکور با نژاد یک گونه *M. javanica* مطابقت داشت. ارقام توتون، فلفل و هندوانه نسبت به جدایه *M. incognita* برهم کنش سازگار داشته و شاخص توده تخم بر اساس روش تایلور و ساسر (Taylor and Sasser 1978) بیشتر از دو ارزیابی شد. در حالی که پاسخ ارقام پنبه و بادام زمینی منفی و برهم کنش ناسازگار بود و علائمی از تکثیر نماتد و ازدیاد جمعیت در ارقام و تکرارها مشاهده نگردید. در نتیجه الگوی واکنش *M. incognita* با ارقام افتراقی با نژاد دوم قطعی گردید. توتون (رقم NC95) و

جدول ۴. واکنش ارقام میزبان های افتراقی در پژوهش حاضر

Table 4. The reaction of differential host varieties in the present study

Variety Specie	Cotton	Tobacco	Pepper	Peanut	Watermelon	Tomato
<i>M. incognita</i>	1_	-	2+	-	+	+
Race one	-	+	+	-	+	+
Race two	+	-	+	-	+	+
Race three	+	+	+	-	+	+
Race four	+	+	+	-	+	+
<i>M. javanica</i>	-	+	-	-	+	+

¹ Susceptible ² Resistance host

مختلف لاروی و ماده بالغ و ریشه آلوده تکثیر نمود که نماینده گونه *Meloidogyne javanica* جمعیت تحت بررسی بود (شکل ۴-۱). نمونه مرتبط با گونه *Meloidogyne incognita* با آغازگر اختصاصی jav بدون تکثیر و با آغازگر اختصاصی Inc-K14 قطعه ۳۹۹ جفت بازی را تکثیر داد (شکل ۴-۲).

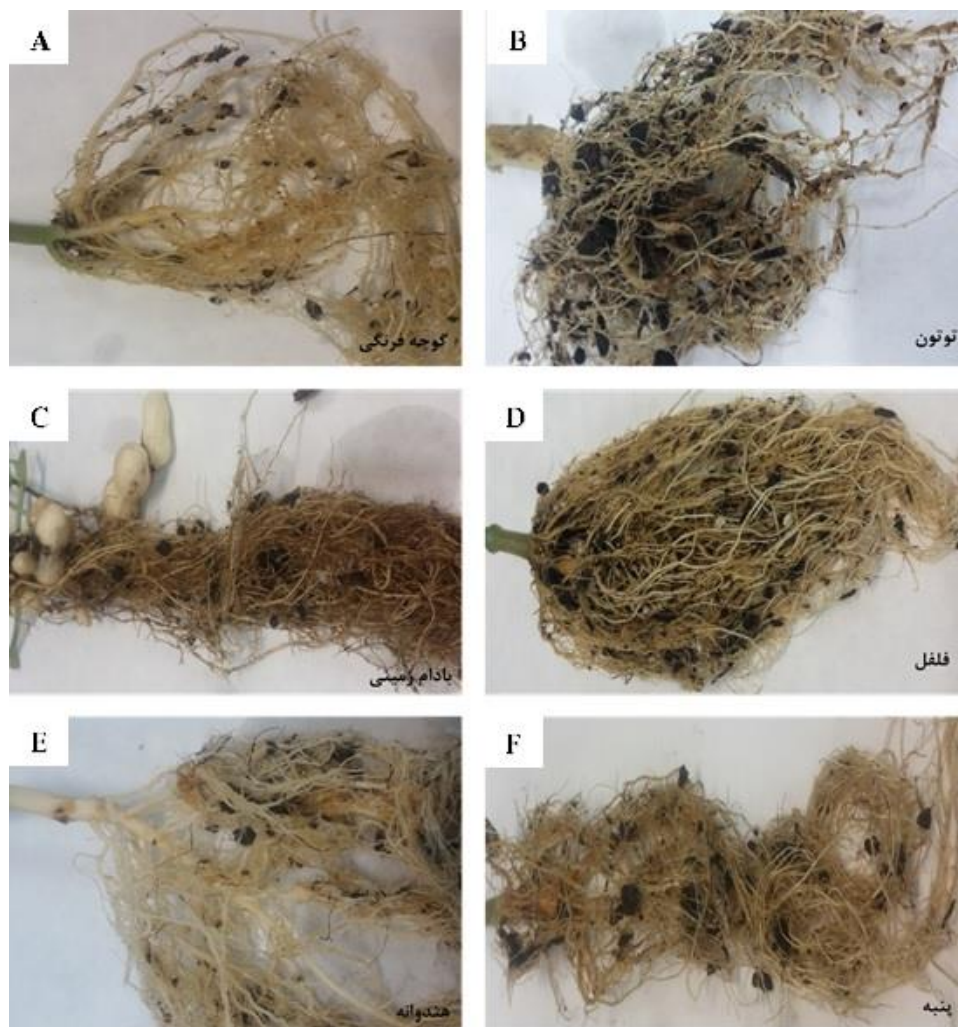
ثبت توالی قطعات تکثیر شده در پایگاه داده های ژنومی با رس شماره های PQ818756 و PQ818757 به ترتیب مرتبط با *M. javanica* و *M. incognita* ثبت و در دسترس می باشد. رس- شمار PQ466918 ثبت شده مربوط به تکثیر ناحیه 28S rDNA جمعیت *M. incognita* بیشترین درصد پوشش و همسانی (به ترتیب ۹۷، ۹۹/۳) را با رس شمار MT159685.1 از بانک ژن نشان داد. مقایسه توالی ۳۹۹ جفت بازی *M. incognita* با توالی MZ522721.1 موجود در بانک ژن ۹۲ درصد پوشش، ۱۰۰ درصد همسانی نشان داد. نتایج تعیین توالی قطعه ۶۷۰ جفت بازی اختصاصی جدایه *M. javanica* در مقایسه با توالی های بانک ژن، با ۹۵ درصد پوشش و ۸۹/۶۱ درصد همسانی با رس شمار MT408130.1 مورد تأیید قرار گرفت. ماهیت چند نسخه ای rDNA، تنوع و در عین حال، ثبات بین گونه ای و درون گونه ای قابل ملاحظه ای را برای اهداف تشخیصی فراهم نموده است

با توجه به تنوع گسترده در جنس *Meloidogyne* و نبود دامنه وسیع از میزبان های افتراقی برای تعیین گونه، پاتوتیپ و نژاد (های) موجود در هر گونه، امکان استفاده از این آزمون ها در مقیاس کلان برای گروه بندی های کوچک تر وجود ندارد. از طرف دیگر به دلیل دامنه میزبانی وسیع این جنس و عدم شناسایی مولکولی فاکتورهای میزبان در مقاومت به نماتد، بهینه سازی دقیق این آزمون ها در حال حاضر امکان پذیر نمی باشد (Stanton et al. 1997; O'Donnell 1998). با این حال بهینه سازی دامنه میزبانی، به ویژه برای توسعه یک سامانه مدیریتی با تکیه بر ارقام مقاوم و گیاهان غیرمیزبان ضرورت دارد (Fuller et al. 2008). در حال حاضر، آزمون ارقام افتراقی به عنوان ابزار تشخیصی در تنوع بین گونه ای نماتدهای ریشه گرهی و نیز برای تشخیص گونه های جدید یا جمعیت های مرکب از چند گونه قابل اجرا است (Moens et al. 2009).

روش های شناسایی مبتنی بر DNA اهمیت ویژه ای در تشخیص گونه و تبارزایی درون جنس و گونه خواهد داشت. هر دو جمعیت مورد مطالعه با آغازگر عمومی 28S D2a-D3b در واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعه ۶۱۲ جفت بازی تکثیر نمودند (شکل ۴-۲). آغازگر اختصاصی jav قطعه ۶۷۰ جفت بازی با DNA مراحل

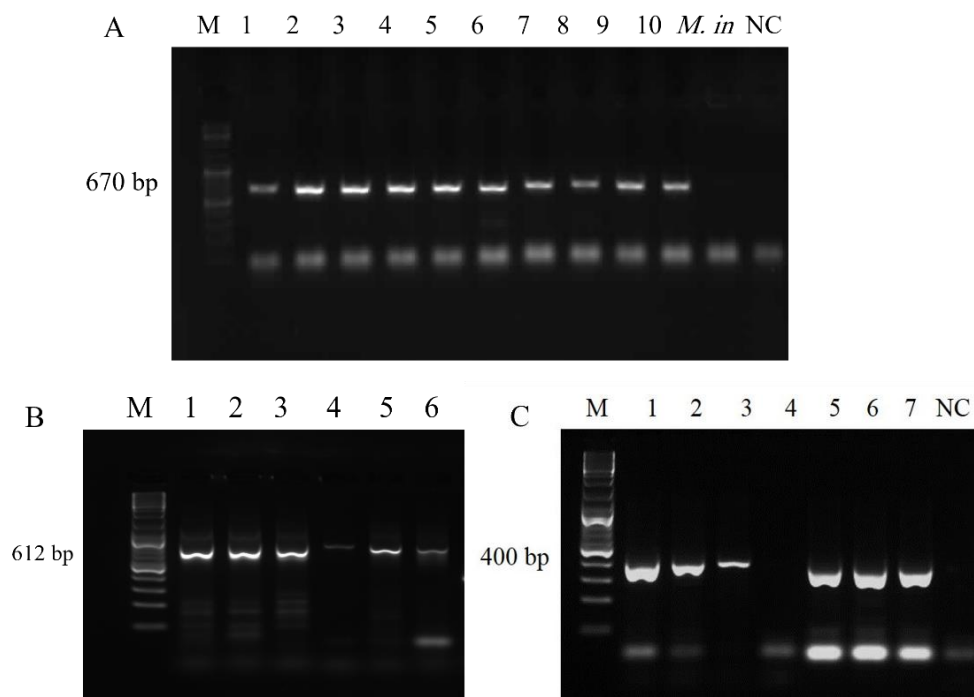
حفاظت‌شدگی بیشتری نشان می‌دهند (Moens et al. 2009; Kiewnick et al. 2014).

(Adam et al. 2007). اگرچه در توالی‌های بین مناطق سیسترون rDNA تنوع قابل‌ملاحظه‌ای دیده می‌شود، ولی نواحی کدکننده RNAهای ساختاری (18S، 28S و 5.8S) نسبت به نواحی بین ژنی رونویسی شده و غیر رونویسی شده (ITS، ETS و IGS)



شکل ۳. واکنش جمعیت خالص *Meloidogyne javanica* به ارقام افتراقی گوجه‌فرنگی (A)، توتون (B)، بادام‌زمینی (C)، فلفل (D)، هندوانه (E) و پنبه (F).

Fig. 3. Response of pure population of *Meloidogyne javanica* against differential varieties of tobacco, tomato, pepper, peanut, cotton and watermelon.



شکل ۴. A: تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی با نشانگر SCAR اختصاصی گونه *Meloidogyne javanica* شماره ۱-۳ نمونه‌های استخراج شده از ریشه گیاه آلوده، ۴-۶ تک نماتد ماده بالغ، ۷-۹ تک لارو سن دو و شماره ۱۰ توده تخم *Meloidogyne incognita* و NC شاهد و کنترل منفی. B: تکثیر قطعه ۶۱۲ جفت بازی ناحیه 28S rDNA. شماره ۱-۳ مربوط به جمعیت *M. incognita* و ۴-۶ مربوط به جمعیت *M. javanica* (C) تکثیر اختصاصی قطعه ۳۹۹ جفت بازی جمعیت *M. incognita* با نشانگر SCAR، شماره ۱-۳ ریشه گیاه آلوده، شماره ۴ جدایه مرتبط با *M. javanica* و عدم تکثیر با آغازگر اختصاصی Inc-K14. شماره‌های ۵-۷ تک نماتد ماده بالغ، تک لارو سن دو و توده تخم جدایه *M. incognita* و M: خطکش ژنومی Mix (Fermentase) از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز. NC: کنترل منفی.

Fig. 4. A: Amplification profile of SCAR marker (670 bp), M for *Meloidogyne javanica*, lines 1-3 from infected root, 4-6 female, 7-9 J2 and line 10 egg mass. M in. for *Meloidogyne incognita* and NC for Negative control. B: Profile marker of amplified (612 bp) 28S rDNA (lines 1-3) from *M. incognita* and 4-6 for *M. javanica* C) Profile of SCAR marker Inc-k14 (399 bp) for *M. incognita*, lines of 1-3 for infected root, line 4 for *M. javanica* and not amplified with Inc-k14 marker, lines of 5-7 for female, J2 and egg mass of *M. incognita*, M for ladder marker Mix (Fermentase) showing 100-10000 bp, and NC: negative control.

حاصل از تک توده تخم کاهش یابد (Garcia & Sanchez- Puerta 2012; Aydinli & Mennan 2016). مطالعات، الگوی نقوش کوتیکولی در گونه *M. ethiopica* را بسیار متغیر نشان داده و تشابه زیادی با *M. arenaria* و *M. incognita* دارد (Strajnar et al. 2009; Conceicao et al. 2012).

آزمون میزبان افتراقی بر اساس توانایی تکثیر جمعیت در میزبان خاص که منجر به تمایز گونه‌ها و نژادهای چهار گونه عمده نماتد ریشه‌گرهی می‌شود، معایب و محدودیت‌هایی دارد که ارزش و اعتبار آزمون را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از جمله این‌که آزمون شامل سایر گونه‌های جدید نماتد ریشه‌گرهی نمی‌شود و یا بر مبنای آن قابل تمایز نیست. دامنه محدود میزبان‌ها مانع از ایجاد تنوع در دامنه میزبانی گسترده می‌شود (Moens et al. 2009). امکان شناسایی جمعیت‌های پرآزار در

نشانگرهای SCAR به لحاظ اختصاصی بودن و توانایی تفکیک گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی، به‌عنوان نشان‌گری با قدرت تمایز بالا توصیه شده‌اند (Zijlstra et al., 2000) و در مطالعات مختلفی کارآیی نشان‌گرهای SCAR در شناسایی دو گونه عمده نماتد ریشه‌گرهی به اثبات رسیده است (Zeng et al. 2017; Katooli et al. 2020). در این مطالعه، بررسی جمعیت‌های هر دو گونه بر اساس الگوی نقوش کوتیکولی نتایج مشابه با مطالعات قبلی داشت و در جداسازی جمعیت‌های نماتد ریشه‌گرهی به عنوان اولین گام بسیار مفید بود و نتایج آزمون میزبان افتراقی و مولکولی را نیز پشتیبانی نمود (Handoo et al. 2004; Munera et al. 2010; Behdani et al. 2017). با این حال برخی از محققان معتقد هستند که ارزش و اعتبار این ویژگی مهم نماتدهای ریشه‌گرهی ممکن است با ایجاد تنوع در جمعیت

های به‌نژادی ارقام مقاوم مبتنی بر نژاد اختصاصی نیز بسیار موثر خواهد بود.

این مطالعه نشان می‌دهد اتخاذ یک رویکرد چندبعدی برای گونه‌های *Meloidogyne* spp در رسیدن به هدف خاص از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافع در داده‌های ارائه‌شده بین نویسندگان وجود ندارد.

سپاس‌گزاری

این پژوهش بخشی از رساله دکتری در قالب طرح مصوب به شماره ۷-۰۸-۰۸-۹۵۱۰۲ در موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی بوده است. بدین وسیله نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت ثبت و شناسایی ارقام گیاهی موسسه مذکور جهت فراهم نمودن امکانات لازم ابراز می‌نمایند.

ارقام مقاوم وجود ندارد و جمعیت‌های نماتد در گروه‌هایی ممکن است قرار گیرد که منعکس‌کننده تنوع واقعی نباشد (Robertson et al. 2009). در مطالعات قبلی جمعیت‌هایی از *M. arenaria* و *M. incognita* وجود داشته است که متعلق به هیچ کدام از نژادهای توصیف شده نبودند و نیاز به تعریف نژادهای جدید وجود داشت (Stanton & O'Donnell 1998; Robertson et al. 2006) با این حال میزبان‌های افتراقی می‌تواند در شناسایی جمعیت‌های ناشناخته مفید واقع گردد.

در سال‌های اخیر اهمیت نشانگرهای مولکولی به دلیل سرعت و حساسیت بالا در شناسایی گونه‌های نماتدهای انگل گیاهی به‌ویژه در مراحل مختلف چرخه نماتد بسیار برجسته شده است. روش‌های شناسایی مولکولی در بهبود شیوه‌های مدیریتی نماتد ریشه‌گرهی در ارتباط با ارقام مقاوم، تناوب زراعی و سایر اشکال مدیریت که به شناسایی صحیح گونه‌های نماتد بستگی دارد، کمک قابل‌توجهی نموده است. نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر بر اساس روش‌های متنوع به‌منظور رسیدن به یک شناسایی دقیق از دو گونه نماتد ریشه‌گرهی است. درک ویژگی‌های تولیدمثلی جمعیت‌های نماتد و همچنین شناسایی صحیح آنها علاوه بر اتخاذ راهبردهای مدیریتی خاص در توسعه برنامه-

References

- Adam M.A.M., Phillips M.S. & 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.
- Akhiani A., Mojtahedi H. & Naderi A. 1984. Species and physiological races of root-knot nematodes in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 20: 57-70. (In Persian with English summary).
- Askarian H., Sharifnabi B., Olia M., Mahdikhani-Moghadam E. & Akhavan A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* using morphological and morphometrical characters and species-specific primers. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 13, 279-290. (In Persian with English summary).
- Aydinli G. & Mennan S. 2016. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from green houses in the Middle Black Sea region of Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 40, 675-685.
- Behdani M., Afshar F.J. & Mirzaee M.R. 2017. First report of *Meloidogyne javanica* on *Berberis vulgaris* in Iran. *Pakistan Journal of Nematology* 35, 155-156.
- Conceicao I.L., Tzortzakakis E.A., Gomes P., Abrantes I. & da Cunha M.J. 2012. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 134, 451-457.
- Dong K., Dean R.A., Fortnum B. A. & Lewis S. A. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica*. *Nematropica* 31, 273-282.
- Eisenback J.D., Hirschmann H., Sasser J.N. & Triantaphyllou A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Raleigh, North Carolina, USA.
- Eisvand P., Farrokhi Nejad R. & Azimi S. 2020. First report of *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 from tangerine tree in Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 42, 81-95. (In Persian with English summary).
- Figuerola M., Hammond Kosack K.E. & Solomon P.S. 2018. A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular Plant Pathology* 19 (6), 1523-1536.

- Fuller V.L., Lilley C.J. & Urwin P.E. 2008. Nematode resistance. *New Phytologist* 180, 27-44.
- Garcia L.E. & Sánchez-Puerta M.V. 2012. Characterization of a root-knot nematode population of *Meloidogyne arenaria* from Tupungato (Mendoza, Argentina). *Journal of Nematology* 44, 291-301.
- Ghaderi R., Dehghan A.A., Hesar A.M. & Karegar A. 2020. Genetic intraspecific diversity of *Meloidogyne javanica* parasitizing vegetables in southern Iran. *Journal of Nematology* 52, 1-13.
- Ghule T.M., Singh A. & Khan M.R. 2014. Root knot nematodes: threat to Indian agriculture. *Popular Kheti* 2(3), 126-130.
- Haghighi H., Jahani M., Razavi S.E., Rahnama K. & Taheri A.H. 2009. Isolation of *Meloidogyne incognita* Kofoed & White, 1919 race 2 from olive in Golestan area. *Journal of Plant Production Research* 16 (4), 163-170. (In Persian with English summary).
- Hartman K.M. & Sasser J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In Barker, K.R. Carter, C.C. and Sasser J.N. (Ed), *An advanced treatise on Meloidogyne* (pp. 69-77). N.C. State University.
- Handoo Z.A., Nyczepir A.P., Esmenjaud D., Van Der Beek J.G., Castagnone-Sereno P., Carta L.K., ... & Higgins, J.A. 2004. Morphological, molecular, and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *Journal of Nematology* 36 (1), 20-35.
- Hussey R.S. & Mims C.W. 1990. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 156, 9-18.
- Jepson S.B. 1987. *Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Wallingford, CAB International.
- Katooli N., Moghadam E.M. & Aghnoum R. 2020. Morphological and molecular identification of major species of *Meloidogyne* and distribution there in pomegranate orchards in Khorasan provinces. *Iranian Plant Protection Research* 34 (3), 297-308. (In Persian with English summary).
- Khan A., Aiman S.I., Baber Y., Hassan F., Usman H. M., Sohail M. A. & Abbas A. 2021. An overview of root-knot nematodes and their management. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 9 (1), 35-40.
- 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.
- Mennan S, Aydinli G. & Kati T. 2011. First report of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) infecting parsley in Turkey. *Journal of Phytopathology* 159, 694-696.
- Moens M., Perry R.N. & Starr J.L. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry R.N., Moens M. & Starr J.L. (Ed.), *Root knot nematodes* (pp. 1-17). Wallingford. CAB International.
- Munera G.E, Bert W., Karssen G., Couvreur M., Waeyenberge L., Vierstraete A. & Decraemer W. 2010. Morphological and molecular characterisation of *Meloidogyne* populations associated with Andean fruits and *Musa* plants in Colombia. *Nematropica* 40, 121-162.
- Nisa R.U., Tantray A.Y. & Shah A.A. 2022. Shift from morphological to recent advanced molecular approaches for the identification of nematodes. *Genomics* 2, 1-13.
- Oliveira C.M.G.D., Monteiro A.R. & Blok V.C. 2011. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology* 36, 65-73.
- Pathania A., Sharma S.K. & Sharma P.N. 2014. Common bean. In Singh M., Singh Bisht. I. & Dutta M. (Ed.), *Broadening the genetic base of grain legumes* (pp. 11-50). New Delhi, Springer.
- Powers T.O., Mullin P.G., Harris T.S., Sutton L.A. & Higgins R.S. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology* 37, 226-235.
- Randig O., Leroy F., Bongiovanni M. & Castagnone-Sereno P. 2001. RAPD characterization of single females of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *European Journal of Plant Pathology* 107, 639-643.
- Robertson L., Diez- Rojo M.A., Lopez-Pérez J.A., Piedra-buena A., Escuer M., Lopez-Cepero J., ... Bello A. 2009. New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* from horticultural region of Spain. *Plant Disease* 93, 180-184.
- Robertson L., Lopez-Pérez J.A., Bello A., Díez- Rojo M.A., Escuer M., Piedra-buena A., Ros C., ... Martínez C. 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. hapla* and *M. arenaria* population from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L). *Crop Protection* 25, 440-445.
- Stanton J., Hugall A., & Moritz C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Fundamental and Applied Nematology* 20, 261-268.

- Stanton J.M. & O'Donnell W.E. 1998. Assessment of the North Carolina differential host test for identification of Australian populations of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Australasian Plant Pathology* 27(2), 104-111.
- Starr J.L. & Mercer C. 2009. Development of resistant varieties. In Perry R.N., Mones M. & Starr J. (Ed.), *Root-knot nematodes* (pp. 326-335). Wallingford, CAB International.
- Strajnar P., Sirca S., Geric Stare B. & Urek G. 2009. Characterization of the root-knot nematode, *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, from Slovenia. *Russian Journal of Nematology* 17, 135-142.
- Subbotin S.A., Palomares-Rius J.E.P. & Castillo P. 2021. *Systematics of root-knot nematodes* (Nematoda: *Meloidogynidae*). Volume 14 of *nematology monographs and perspectives*. Brill.
- Taylor A.L. & Sasser I.N. 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes* (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics.
- Taylor A.L., 1987. *Identification and estimation of root-knot nematode species in mixed populations* (No. 12). Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry.
- Taylor A.L., Sasser J.N. & Nelson, L.A. 1982. *Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of Meloidogyne species in agricultural soils*. Raleigh, North Carolina, U.S.A.
- Taylor D.P. & Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20, 268-269.
- Van der Beek J.G., Maas P.T., Janssen G.J.W., Zijlstra C. & Van Silfhout C.H. 1999. A pathotype system to describe intraspecific variation in pathogenicity of *Meloidogyne chitwoodi*. *Journal of Nematology* 4, 386-392.
- Vidhyasekaran P. 2007. *Fungal pathogenesis in plants and crops: Molecular biology and host defense mechanisms*, 2nd edition. CRC Press.
- Williamson V.M. & Kumar A. 2006. Nematode resistance genes in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22, 396-403.
- Uysal G., Söğüt M.A. & Elekçioğlu İ.H. 2017. Identification and distribution of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) in vegetable growing areas of lakes region in Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 41(1), 105-122.
- Ye W., Zeng Y. & Kerns J. 2015. Molecular characterization and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turf grasses in North Carolina, USA. *Plos One*, 10, 1-16.
- Zeng J., Zhang Z., Wu X., Zeng Y. & Li Y. 2017. Distribution and molecular identification of *Meloidogyne* spp. parasitizing flue-cured tobacco in Yunnan, China. *Plant Protection Science* 54, 183-189.
- Zijlstra C., Donkers-Venne D., & Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2, 847-853.