



## بررسی مورفولوژیکی و مولکولی نماتد *Ditylenchus destructor* از دامنه اصفهان

طاهره شکیبافر<sup>۱\*</sup>، مجید اولیا<sup>۲</sup>، مسعود بهار<sup>۱</sup>، هادی کریمی پور فرد<sup>۳</sup>

- (۱) گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، tahereshakiba@gmail.com  
(۲) گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران  
(۳) بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۶

### چکیده

بیماری پوسیدگی غده یکی از مهم ترین بیماری های سیب زمینی در جهان است که در سال های اخیر این بیماری در مزارع سیب زمینی دامنه اصفهان گسترش یافته و خسارات قابل توجهی را وارد کرده است. غده های آلوده شکاف های سطحی داشته و در محل حفرات زیر پوست آنها جمعیتی از یک نوع نماتد پارازیت *Ditylenchus sp.* حضور داشت که با بررسی های میکروسکوپی و استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، این نماتدها به عنوان *Ditylenchus destructor* تشخیص داده شدند. با استفاده از جفت آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2 در آزمون PCR، قطعه DNA به طول ۹۵۰bp از ناحیه ITS ژنوم این نماتد تکثیر شد. بررسی الگوی برش قطعه DNA مزبور با آنزیم TaqI مشخص نمود که DNA در تمامی نمونه ها از یکنواختی ژنتیکی برخوردار است. با توالی یابی یکی از نمونه ها و هم ردیف سازی آن با توالی های ثبت شده از *D. destructor* در بانک ژن (NCBI) مشخص شد که توالی ژنوم نماتد دامنه با توالی های گزارش شده از سایر کشورها به میزان ۹۷-۹۹٪ شباهت دارد. با بررسی های مورفولوژیکی و مولکولی مشخص شد که نماتد *D. destructor* عامل پوسیدگی غده های سیب زمینی در منطقه دامنه می باشد. با توجه به اهمیت سیب زمینی چه از نظر اقتصادی و چه ارزش غذایی این محصول، شناسایی هر گونه عامل بیماریزای آن می تواند به بهبود کیفیت آن کمک شایانی نماید.

واژه های کلیدی: پوسیدگی غده سیب زمینی، نماتد، *Ditylenchus destructor*

### ۱. مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) متعلق به خانواده *Solanaceae*، گیاهی دو لپه، یکساله و علفی است که به علت تکثیر از طریق غده، ظرفیت بالقوه چند ساله بودن را دارد (Rajabi, 2000). سیب زمینی محصول آب و هوای

خنک می‌باشد و بهترین رشد را در دمای  $21^{\circ}\text{C}$  دارد. در اوایل رشد، روهای بلند، دمای خنک، نیتروژن زیاد و رطوبت یکنواخت خاک برای افزایش تولید غده مورد نیاز است (Khoshkhoy, 2008; Haverkort & Verhagen, 2008; et al., 2010).

عوامل بیماری‌زای زیادی سبب ایجاد آسیب به ریشه، ساقه، برگ و غده‌های سیب‌زمینی می‌گردد (Mehravaran, 1997; Mutua, 2014). نماتد پوسیدگی غده سیب‌زمینی به عنوان یکی از مهم‌ترین نماتدهای سیب‌زمینی باعث کاهش قابل توجه محصول در نقاط مختلف جهان شده و خسارات شدیدی را وارد می‌سازد (Lima, 2018; Winslow & Wills, 1972). این نماتد بیشترین آلودگی را در دمای  $15-20^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی ۹۰-۱۰۰٪ دارد و قادر به بقا در شرایط خشکی و رطوبت نسبی زیر ۴۰٪ نمی‌باشد (Hooker, 1981; Jensen, 1978).

نماتد مولد پوسیدگی غده سیب‌زمینی متعلق به جنس *Ditylenchus* از نظر تاکسونومیکی در سلسله *Animal*، شاخه *Nematoda* رده *Secerentea*، راسته *Tylenchida*، زیرراسته *Tylenchina*، بالاحانواده *Tylenchoidea* و خانواده *Anguinidae* قرار گرفته است (Filipjev, 1936). در این جنس تنها سه گونه *D. destructor*، *D. dipsaci* و *D. myceliophagus* به عنوان پارازیت‌های مهم اقتصادی شناخته شده‌اند (Dekker, 1991).

بیماری پوسیدگی غده اولین بار در ایران روی سیب‌زمینی، از کرج و برخی مناطق شمالی کشور جمع‌آوری و شناسایی شد (Kheiri, 1972). سپس این بیماری از استان‌های اصفهان، فارس، گلستان، فریمان خراسان، همدان، سمنان و تهران گزارش گردید (Salati et al., 2006; Giti et al., 2006; Akhyani & Naderi, 1986; Ahmadian, 2004; Sharafeh & Kheiri, 1989; Shojae et al., 2006; Tanha Maafi et al., 2005).

بیماری پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی به طور کلی علائم مشخصی را در مراحل رشد گیاه نشان نمی‌دهد. عفونت اولیه از طریق عدسک‌ها و پوست نزدیک چشم‌ها وارد غده‌های کوچک سیب‌زمینی می‌شود. نماتدها ابتدا فرورفتگی‌های کوچک زیر پوست غده‌های تازه ایجاد می‌نمایند که در آنها بافت کوچک سفید رنگی مشاهده خواهد شد. در این بافت معمولاً یک گروه کوچک از سلول‌های گرد سه تا چهارتایی وجود دارد که مملو از دانه‌های نشاسته می‌باشند. از طریق این مناطق عفونت‌های سطحی گسترش می‌یابند و بافت غده در مراحل برداشت به تدریج تیره و نازک شده و ترک بر می‌دارد. نماتدها در غده‌های برداشت شده زندگی نموده و با کاهش دما به صورت تخم، لارو یا بالغ وارد مرحله زمستان‌گذرانی می‌شوند. این نماتدها در غیاب بقایای میزبان، در خاک‌های سرد و خیس روی میزبان‌هایی مانند: علف‌های هرز و قارچ‌ها زنده می‌مانند و در فصل بهار مجدداً تخم‌گذاری می‌کنند و قادر به ایجاد بیماری هستند (Hooker, 1981).

نماتدهای جنس *Ditylenchus* sp. از نظر مورفولوژیکی به سختی قابل شناسایی می‌باشند. توانایی تشخیص اختلاف بین گونه‌های آن به علت وجود شباهت‌های بسیار نزدیک بین گونه‌ها دشوار بوده و تنها با روش‌های میکروسکوپی و کلیدهای شناسایی معتبر امکان‌پذیر می‌باشد (Hooper, 1973; Sturhan & Brzeski, 1991).

در سال‌های اخیر پیدایش روش‌های مولکولی و استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی، نقش مؤثری در طبقه‌بندی و تشخیص گونه‌های این جنس داشته است (Shokoohi et al., 2015; Marek et al., 2010; Jeszke et al., 2015).

بررسی دقیق نماتد عامل این بیماری در منطقه دامنه از نظر مورفولوژیکی و مولکولی حائز اهمیت است. (al., 2018; Varin et al., 1992; Wendt et al., 1993).

## ۲. مواد و روش‌ها

### \* جداسازی نماتد از غده‌های آلوده سیب‌زمینی

طی بازدید از ۹ مزرعه وسیع کنار هم دامنه، غده‌های سیب‌زمینی که علائم پوسیدگی به صورت شکاف‌های نامنظم در قسمت‌های سطح غده را نشان می‌دادند، انتخاب شدند. سپس این غده‌ها با آب معمولی شسته شده و مقداری از بافت سطحی آن‌ها به کمک اسکالپل استریل برش داده شد. مقدار ۲۰۰ گرم از این بافت‌ها وزن گردیده و با استفاده از روش الک و سانترفیوژ نماتدهای موجود در بافت‌های آلوده جدا شدند (Jenkins, 1964). از سوسپانسیون به دست آمده از نماتدهای استخراج شده یک میلی‌لیتر برداشته و با استفاده از اسلاید شمارش در زیر میکروسکوپ تعداد نماتدهای بافت آلوده غده در هر مزرعه محاسبه گردید (Coolen & D'Herde, 1972).

### \* بررسی مورفولوژیکی غده‌های سیب‌زمینی دارای علائم نماتی

از پتری محتوی نماتدها در آب مقطر استریل نماتدها جداسازی و به گلیسرین مایع انتقال داده شدند (De Grisse, 1969). به منظور مطالعه دقیق‌تر نماتدها از آن‌ها اسلاید دائمی تهیه شد (Damadzadeh, 2007). سپس با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر گونه آن‌ها تشخیص داده شدند (Hooper, 1973; Sturhan & Brzeski, 1991). با استفاده از میکروسکوپ دو چشمی مجهز به لوله ترسیم (Drawing tube) قسمت‌های مختلف بدن نماتد شامل: قسمت جلوی دستگاه گوارش (هم‌پوشانی مری با روده)، منفذ تناسلی، قسمتی از تخمدان، لوله عقبی رحم و دم در نماتد جنس ماده، دم و اسپیکول در نماتد جنس نر برای هشت نماتد ماده و سه نماتد نر ترسیم گردید.

### \* روش‌های مولکولی جهت شناسایی گونه نماتد

استخراج DNA از تک نماتد

استخراج DNA بر روی تعدادی از نماتدهای زنده جداسازی شده (به روش الک و سانترفیوژ) صورت گرفت. به این منظور، ابتدا یک نماتد را به کمک سوزن استریل از سوسپانسیون نماتدها برداشته و در کلاهک لوله اپنדרف ۰/۲ میلی‌لیتری محتوی دو میکرولیتر آب قرار داده و توسط سوزن له گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از بافر تجزیه کننده نماتد (100 µg/ml Protainase K, 1% IGPAL CA-630, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl: pH 8.0) به آن اضافه گردید. برای اطمینان از انتقال نماتد به ته لوله، چند ثانیه میکروفیوژ شد. این روش برای تعدادی از نماتدها انجام شد. سپس لوله محتوی نماتدها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند و بعد از آن به مدت دو ساعت در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  حمام بن ماری قرار داده شدند. نمونه‌ها جهت استفاده در واکنش PCR در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  منجمد شدند (Orui, 1996).

شناسایی نماتد پوسیدگی غده سیب‌زمینی بر اساس PCR

جهت تشخیص مولکولی نماتد جمع‌آوری شده از غده‌های سیب‌زمینی، واکنش PCR با جفت آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2 انجام گرفت. این جفت آغازگر عمومی در واقع از قسمتی از منطقه 18S ژنوم DNA ریوزومی (rDNA gene) شروع به تکثیر نموده و با عبور از مناطق ITS ژنوم نماتد، شامل زیر واحدهای ITS1, 5.8S, ITS2، و تکثیر قسمتی از منطقه 26S، توالی ژنوم نماتد را پوشش می‌دهند (Wendt et al., 1993).

انجام برش آنزیمی RFLP

از محصولات PCR که باندهای قوی بر روی ژل الکتروفورز ایجاد نموده بودند و با توجه به غلظت محصول تولید شده، شش تا نه میکرولیتر جهت انجام RFLP استفاده شده است. محصول PCR-RFLP با آنزیم برشی *TaqI*، در واکنش ۱۵ میکرولیتری به مدت دو ساعت با ولتاژ ۲۰۰ روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. برای سنجش سایز باندها در کنار نمونه‌ها از Ladder استفاده شد.

### \* تعیین توالی نوکلئوتیدی

به منظور توالی‌یابی نماتد، یکی از نمونه‌های استخراج شده از بافت آلوده غده که تک باند قوی در محصول PCR ایجاد نموده بود، جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. سپس میزان شباهت این توالی با توالی‌های موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۲ توالی از توالی‌های موجود در بانک ژن انتخاب شده و با استفاده از نرم افزار MEGA 5 درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم گردید. در کنار نمونه‌ها یک توالی از نماتد *D. dipsaci* به عنوان Out group قرار داده شد.

### ۳. نتایج و بحث

در بررسی نمونه‌های غده سیب‌زمینی از مزارع متفاوت منطقه دامنه، معلوم گردید که بیماری پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی در این منطقه وجود دارد.

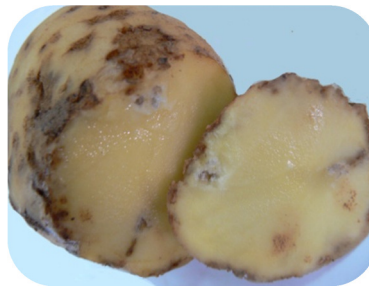
تشخیص نماتد پوسیدگی غده با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی

علائم بیماری پوسیدگی غده به صورت شکاف‌های نامنظم و متعددی در سطح سیب‌زمینی (شکل ۱) و حفره‌های سفید رنگی در بافت زیر پوست مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۱. شکاف‌های نامنظم روی سطح غده‌های آلوده سیب‌زمینی

Fig. 1. Cracked cleft on the surface of tuber-infected potato



شکل ۲. حفره‌های سفید در بافت زیر پوست سیب‌زمینی

Fig. 2. White cavities in tuber-infected potato flesh

بررسی و مقایسه قسمت‌های مختلف بدن ۸ نماتد ماده و ۳ نماتد نر استخراج شده از بافت آلوده غده با کلیدهای شناسایی معتبر مشخص نمود که نماتد جداسازی شده به گونه *D. destructor* تعلق دارد (جدول ۱). مقایسه مشخصات نماتدهای نر و ماده مورد بررسی نشان داد که برخی مشخصات نماتدهای منطقه دامنه (میانگین طول بدن، نسبت طول بدن به عرض بدن و نسبت طول بدن به طول دم) تا حدودی کمتر از مشخصات توصیف شده Hooper است؛ در حالیکه بر اساس کلید Sturhan & Brzeski در محدوده نمونه‌های توصیف شده بود.

جدول ۱. مقایسه میانگین اندازه‌گیری‌های نماتودهای جنس نر و ماده *D. destructor* منطقه دامنه با کلیدهای شناسایی معتبر N- تعداد نماتد، L- طول بدن، a- نسبت طول بدن به عرض بدن، b`- نسبت طول بدن به طول مری در حالت همپوشانی مری با روده، C- نسبت طول بدن به طول دم، %V- نسبت فاصله بین سر تا ولوا به طول بدن برحسب درصد، Stylet length- طول استایلت (اندازه‌گیری‌ها برحسب میکرون است).

Table 1. Measurements of *D. destructor* comparing with identification valid keys.

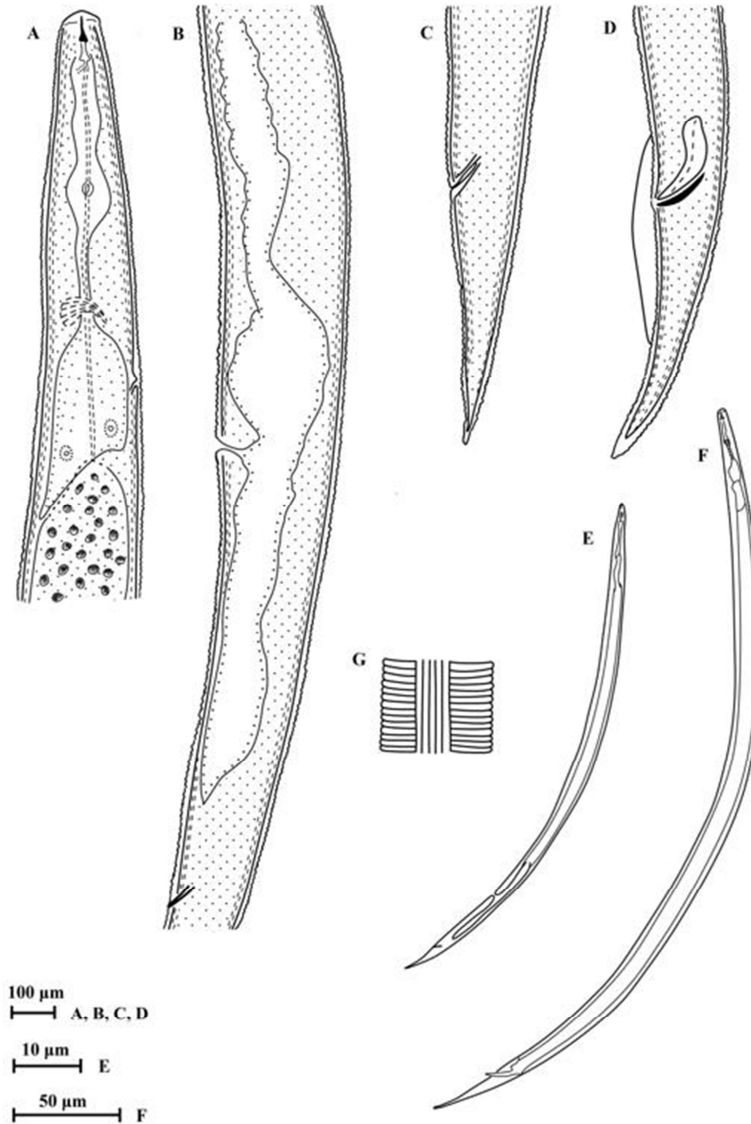
N- Number of nematodes, L- Body length, a- Body length/Body width, b`- Body length/Esophagus length, C- Body length/Tail length, %V- From head to Volva/Body length, Stylet length (all measurements are in Micron).

Original Characters For identification of <i>D. destructor</i>	Female Damaneh Isfahan	Male Damaneh Isfahan	Female Hooper (1973)	Male Hooper (1973)	Female Sturhan & Brzeski (1991)	Male Sturhan & Brzeski (1991)
N	8	3	-	-	-	-
L	900 (750-1090)	780 (660-900)	1070 (690-1890)	960 (760-1350)	(690-1890)	(630-1350)
a	30.44 (24.84-36.36)	31.99 (28.69-35.45)	32 (18-49)	35 (24-50)	(18-49)	(24-50)
b`	8.54 (6.14-10.20)	6.48 (5.64-8.03)	7 (4-12)	7 (4-11)	(4-12)	(4-11)
C	115.58 (13.28-18.29)	12.15 (11-14.06)	17 (9-30)	14 (11-21)	(14-20)	(11-21)
V%	83.31 (80-86.58)	-	80 (73-90)	-	(77-84)	-
Stylet length	11.12 (10-12)	11.16 (10-12)	-	-	(10-13)	(10-12)

پس از تأیید گونه نماتد قسمت‌های مختلف بدن نماتد نر و ماده *D. destructor* با استفاده از میکروسکوپ دوچشمی مجهز به لوله ترسیم روی کاغذ کالک طراحی شدند (شکل ۳).

با شمارش تعداد نماتدهای غده‌های آلوده با اسلاید شمارش در زیر میکروسکوپ معلوم گردید که میزان نماتدهای

*D. destructor* در غده‌ها بسیار زیاد است. نتایج حاصل از شمارش تعداد نماتدها در یک گرم بافت آلوده غده به همراه رقم سیب‌زمینی، تعداد مزارع، غده‌های مورد بررسی و آلوده در (جدول ۲) آورده شده است. این نتایج نشان داد که تعداد نماتد در بافت‌های آلوده بسیار زیاد است.



**شکل ۳.** قسمت‌های مختلف بدن جنس نر و ماده نماتد *D. destructor*

(A) قسمت جلوی بدن، استایلت و دستگاه گوارش (همپوشانی مری با روده) در قسمت پشتی، (B) منفذ تناسلی ماده، قسمتی از تخمدان و لوله عقبی رحم، (C) دم در نماتد جنس ماده، (D) دم و اسپیکول در نماتد جنس نر، (E) شکل کلی بدن نماتد جنس ماده، (F) شکل کلی بدن نماتد جنس نر، (G) سطوح جانبی در وسط بدن نماتد

**Fig. 3.** Body parts of *D. destructor*

A- The front part of body, stylet and digestive system (overlap), B- Vulva & part of ovary, C- Tail in male nematode, D- Tail and spicule in male nematode, E- Female body, F- Male body, G- Lateral lines

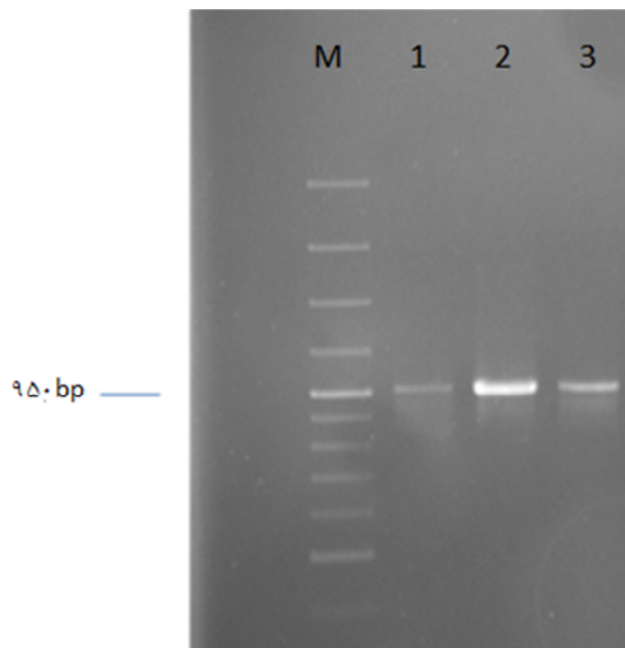
جدول ۲. بررسی تعداد نماتدهای *D. destructor* در بافت آلوده

**Table 2.** The number of *D. destructor* nematodes in the infected tissue

Fields	Cultivar of potatoes	The number of tuber examined	The number of infected tubers	Nematodes in per gram of infected tissue
1	Santana	40	20	30.18
2	Marfona	34	29	6.07
3	Marfona	20	14	270
4	Marfona	24	13	264.6
5	Marfona	25	20	88.8
6	Marfona/Agria	100	100	1333.5
7	Marfona	10	9	69.6
8	Oshinda	10	4	855.6
9	Difla	15	15	113.4

تشخیص نماتد پوسیدگی غده بر اساس روش‌های مولکولی

پس از این که گونه نماتد با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی *D. destructor* تشخیص داده شد، جهت تأیید تشخیص نماتدهای مورد بررسی در واکنش PCR با آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2 قطعه‌ای به طول ۹۵۰bp تکثیر شد. قطعات تکثیر شده به طور یکسان در همه نمونه‌های بافت غده مشاهده شد (شکل ۴).

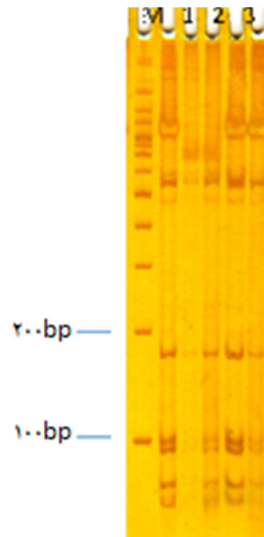


**شکل ۴.** تکثیر قطعه ۹۵۰bp در واکنش PCR با جفت آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2

M: مارکر، ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های نماتد *D. destructor* منطقه دامنه

**Fig. 4.** Amplification of 950bp band using rDNA1/ rDNA2 Primers  
M: Marker, 1, 2 & 3 *D. destructor* nematodes from Damaneh region

نتایج حاصل از واکنش برش آنزیمی با *TaqI* نشان داد که حداقل ۶ باندهای مشترک بین تمام نمونه‌ها وجود داشت که این دلالت بر وجود یکنواختی ژنتیکی بین نمونه‌ها دارد (شکل ۵). مقایسه نتایج برش آنزیمی گونه‌های دامنه با الگوی گزارش شده توسط محققین دیگر (Marek *et al.*, 2010; Quanxin & Heng, 2010; Wendt *et al.*, 1993) اختلاف اندکی در سایز قطعات ایجاد شده را نشان داد.



**شکل ۵.** الگوی برش آنزیمی محصول PCR نماتد تحت آنزیم برشی *TaqI*  
M: مارکر، ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های نماتد *D. destructor* منطقه دامنه

**Fig. 5.** Digestion of PCR product with *TaqI* restriction Enzyme  
M: Marker, 1, 2 & 3 *D. destructor* nematodes from Damaneh region

جهت اطمینان از گونه شناسایی شده، محصول PCR به دست آمده از نمونه دامنه تعیین توالی شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی نماتد منطقه دامنه با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که این توالی به میزان ۹۷-۹۹٪ با توالی‌های نماتد *D. destructor* جدا شده از سایر کشورها شباهت دارد (جدول ۳).

**جدول ۳.** مقایسه توالی ژنوم نماتد منطقه دامنه با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI

**Table 3.** Comparing the DNA sequence of Damaneh Nematode with those of *D. destructor* deposited from NCBI

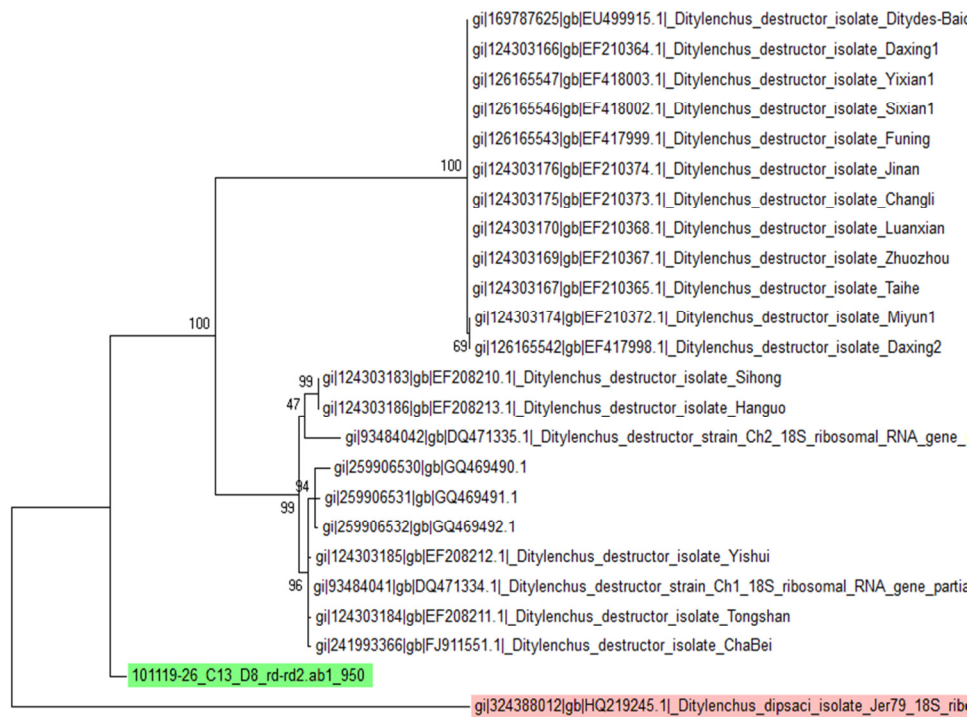
Accession	Description	Max Score	Total Score	Query Coverage	E Value	Max Ident
EF208213.1	<i>D. destructor</i> Isolate Hanguo 18S ribosomal RNA gene	1190	1682	96	0.0	99
EF208210.1	<i>D. destructor</i> Isolate Sihong 18S ribosomal RNA gene	1190	1680	96	0.0	99
GO469492.1	<i>D. destructor</i> Isolate Stu3 18S ribosomal RNA gene	1179	1632	96	0.0	98
EF208212.1	<i>D. detstructor</i> Isolate Yishui 18S ribosomal RNA gene	1179	1642	96	0.0	98
DQ471334.1	<i>D. destructor</i> Isolate CH1 18S ribosomal RNA gene	1179	1437	81	0.0	98
FJ911551.1	<i>D. destructor</i> Isolate ChaBei 18S ribosomal RNA gene	1173	1642	96	0.0	98
EF208211.1	<i>D. destructor</i> Isolate Tongshan 18S ribosomal RNA gene	1173	1636	96	0.0	98
GQ469491.1	<i>D. destructor</i> Isolate Stu2 18S ribosomal RNA gene	1163	1625	96	0.0	98
GQ469490.1	<i>D. destructor</i> Isolate Stu1 18S ribosomal RNA gene	1157	1612	96	0.0	97
DQ471335.1	<i>D. destructor</i> Isolate Ch2 18S ribosomal RNA gene	1157	1390	81	0.0	99
EF062574.1	<i>D. destructor</i> Isolate Des-3 18S ribosomal RNA gene	1096	1322	74	0.0	99
EF062573.1	<i>D. destructor</i> Isolate Des-2 18S ribosomal RNA gene	1096	1318	74	0.0	99
EF062572.1	<i>D. destructor</i> Isolate Des-1 18S ribosomal RNA gene	1090	1300	74	0.0	98

درخت فیلوژنتیکی نماتد منطقه دامنه با ۲۲ نماتد *D. destructor* با استفاده از نرم افزار MEGA 5 در (شکل ۶) ترسیم شده است.

با آزمایش‌های مورفولوژیکی و مولکولی عامل پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی در منطقه دامنه نماتد *Ditylenchus destructor* تشخیص داده شد. با توجه به اهمیت کشت سیب‌زمینی در اصفهان که تأمین کننده بخش عمده‌ای از محصول سیب‌زمینی در کشور است و نیز ارزش غذایی بالای سیب‌زمینی در جهان، بررسی و شناسایی هر گونه



عامل بیماریزای این محصول ضرورت زیادی دارد.



شکل ۶. درخت فیلوژنتیکی مربوط به ۲۲ نمونه نماتد *D. destructor* به دست آمده از بانک ژن در کنار نمونه منطقه دامنه (101119-26)

**Fig. 6.** Phylogenetic tree of 22 *D. destructor* nematodes deposited from NCBI gene bank and Damaneh sample (101119-26)  
Out group: *D. dispaci*

این مطالعه اولین بررسی جامع نماتد *Ditylenchus destructor* در منطقه دامنه اصفهان می باشد. با توجه به خسارات زیادی که این نماتد به مزارع این منطقه وارد کرده است. مدیریت کنترل این نماتد در منطقه دامنه اصفهان حائز اهمیت است.

#### ۴. تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید محترم بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی شهرکرد و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان صمیمانه تشکر می نمایم.

#### ۵. منابع

- Ahmadian, A. 2004. Report of tuber rot *D. destructor* in Khorasan province. *Proceeding of the 16<sup>th</sup> Plant Pathology Congress*, Tabriz, Iran, p. 211.
- Akhyani, A. & Naderi, A. 1986. Harmful nematodes on Isfahan and Chaharmahal Bakhtiari provinces. *Proceeding of the 8<sup>th</sup> Plant Pathology Congress*, Isfahan, Iran, p. 130.
- Coolen, W.A. & D`Herde, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematode from plant tissues. *Agricultural Research*, p. 77.

- Damadzadeh, M. 2007. *Nematology in Agricultural*. Andishe Gostar Press, Isfahan, Iran.
- De Grisse, A.T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisees dans L`etude des nematodes phytoparasitaires. *Meded Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen Gent*, 34: 351-369.
- Dekker, M. 1991. Manual of Agricultural Nematology, pp. 423-449, In: William, R.N. (Ed.) *Stem and bulb nematode Ditylenchus spp.* Beltsville Agricultural Research Center. U.S.
- Filipjev, I.N. 1936. On the classification of Tylenchinae. *Proceedings of the Helminthological Society*, Washington, U.S. p. 80-82.
- Giti, M., Kargarbideh, A. & Minasiyan, V. 2006. Plant Parasites Nematodes Tylenchida from the potato fields of Hamedan province. *Journal of Plant Pathology*, 43: 491-508.
- Haverkort, A.G. & Verhagen, A. 2008. Climate Change and Its Repercussions for the Potato Supply Chain. *Potato Research*, 51: 223-237.
- Hooker, W.J. 1981. *Compendium of potato diseases*. American Phytopathological Society Press, American, USA.
- Hooper, D.J. 1973. *Ditylenchus destructor C.I.H. Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes*. Commonwealth Institute of Helminthology Press, England, UK.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal floatation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692.
- Jensen, H.J. 1978. Interactions of nematodes and other organisms in diseases complexes. *Proceeding of the 2<sup>nd</sup> Nematode Planning Congress*, Lima, Peru.
- Jeszke, A., Dobsz, R. & Steplowska, A. 2015. A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus*. *Pest Management Science*, 71: 243-249.
- Kheiri, A. 1972. Plant Parasitic Nematodes (Tylenchida) from Iran. *Biologisch Jaarboek Journal*, 40: 224-239.
- Khoshkhoy, M., Sheibani, B., Rohani, V. & Tafazoli, A. 2010. *Principles of Horticulture*, Shiraz University Press, Shiraz, Iran.
- Lima, F., Mattos, V., Silva, E., Carvalho, M., Teixeira, R., Silva, J. & Correa, V. 2018. *Nematodes Affecting Potato and Sustainable Practices for Their Management*. Intech Open Press, London, UK.
- Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Mazakova, J. & Rysanek, P. 2010. Bioinformatics-assisted characterization of the ITS1-5.8S-ITS2 segments of nuclear rRNA gene clusters, and its exploitation in molecular diagnostics of European crop-parasitic nematodes of the genus *Ditylenchus*. *Plant Pathology*, 59: 931-943.
- Mehravaran, H. 1997. *Plant Pathology*. Orumiyeh University Press, Orumiyeh, Iran.
- Mutua, P.M. 2014. *Host-parasite interaction between the potato tuber rot nematode (Ditylenchus destructor), stem nematode (Ditylenchus dipsaci) and potato*. Ph.D. Thesis, University of Gottingen, Germany.
- Orui, Y. 1996. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: *Pratylenchidae*) in Japan by PCR-RFLP Analysis. *Applied Entomology and Zoology*, 31: 505-514.
- Quanxin, G. & Heng, J. 2010. Identification of *Ditylenchus destructor* from potatoes in Zhangjiakou, Hebei. *Plant Pathology*, 36: 117-120.
- Rajabi, A. 2000. *Potato Diseases*. Tehran University Press, Tehran, Iran.
- Salati, M., Barouti, S.H. & Shahedi, J. 2002. Report of the potato rot nematode *D. destructor* in Golestan province. *Proceeding of the 15<sup>th</sup> Plant Pathology Congress*, Kermanshah, Iran, p. 206.

- Sharafeh, M., & Kheiri, A. 1989. Investigation of potato tuber rot *D. destructor* in Fars province. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> Plant Pathology Congress*, Mashhad, Iran, p. 179.
- Shojae, M., Kargarbideh, A. & Deljoo, A. 2006. Investigation of the Biology of Potato Rot Disease and reaction of some cultivars. *Journal of Plant Disease*, 42: 577-595.
- Shokoohi, E., Iranpour, F., Swart, A., Fourie, H. & Panahi, H. 2018. Morphological and molecular characters of three *Ditylenchus* species from Iran. *Journal of Tropical Zoology*, 31: 118-130.
- Sturhan, D. & Brzeski, M.W. 1991. Stem and bulb Nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, R.W. (Ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Tanha Maafi, Z., Omati, F. & Parvizi, R. 2005. Internal parasites nematode and Population density in potato fields of Tehran, Semnan and west Azarbaijan. *Journal of Plant Diseases*, 41: 425-435.
- Varin, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, C.A. & Hamilton, R.I. 1992. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563-573.
- Wendt, K.R., Varin, T.C. & Webster, J.M. 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology*, 25: 556-563.
- Winslow, R.D. & Willis, R.J. 1972. *Nematode diseases of potato*. Academic Press, London, UK.

## Morphological and Molecular Investigation of *Ditylenchus destructor* nematode from Isfahan Province

Tahereh Shakibafard<sup>1\*</sup>, Majid Olia<sup>2</sup>, Masoud Bahar<sup>1</sup>, Hadi Karimipour Fard<sup>3</sup>

- (1)(\*) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran., tahereshakiba@gmail.com
- (2) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
- (3) Plant Protection Research Department, Kohgiluyeh and Boyerahmad Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yasouj, Iran

### Abstract

Potato tuber rot is a common and important disease in the world that has been recently occurred in potato fields of Damaneh in Isfahan province. Skins of the infected tubers are usually cracked containing *Ditylenchus* sp. parasite nematodes in tuber flesh. Using microscopic examination and valid keys of the specimen was identified as *Ditylenchus destructor* nematode. Molecular identification with PCR using general primer rDNA1/rDNA2 yielded a 950 bp DNA fragment corresponding to ITS region of the nematode samples. The *TaqI* digestion of fragment revealed the genetic homology among ITS region of the strains of *D. destructor* collected from Damaneh. Sequence analysis of this fragment and its alignment with the sequences deposited in NCBI database indicated that the ITS sequence of the nematode isolate from Damaneh has significant homology (97-99%) with the sequences of *D. destructor* reported from other countries. Based on morphological and molecular tests, *D. destructor* was identified as the cause of potato tuber rot in this region. it had sever damages on the potato fields. Regarding the economical and nutritional importance of potato, identification of any pathogen can help in improving the quality of this product.

**Keywords:** Potato tuber rot, Nematode, *Ditylenchus destructor*