

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی بیماری‌شناسی گیاهی گرایش نematشناسی

بررسی مرفولوژیکی و مولکولی نماتدهای خانواده *Longidoridae* در
باغات پسته استان کرمان

استادان راهنما:

دکتر علی‌اکبر فدائی تهرانی

دکتر مجید اولیا

استاد مشاور:

مهندس محمدمهدی سجودی

پژوهشگر:

سمیه نامجو

اسفند ماه ۱۳۸۸



دانشکده کشاورزی

پایان نامه خانم سمیه نامجو جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی گرایش
نماتولوژی با عنوان بررسی مرفولوژیکی و مولکولی نمادهای خانواده Longidoridae در باغات پسته
استان کرمان

در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۴ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه عالی مورد تصویب نهائی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه دکتر با مرتبه علمی امضاء

۲. استاد راهنمای پایان نامه دکتر با مرتبه علمی امضاء

۳. استاد مشاور پایان نامه مهندس با مرتبه علمی امضاء

۴. استاد داور داخلی گروه دکتر با مرتبه علمی امضاء

۵. استاد داور خارجی گروه دکتر با مرتبه علمی امضاء

دکتر.....

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

فداوند متعال را سپاس می‌گوییم که توان و فرصت یادگیری به من عطا بخشید تا همپو قطره‌ایی از دریای بیکران علمش بهره‌مند شوم. بار پروردگارا مرا از تاریکی‌های جهل به سوی روشنایی‌های حقیقت هدایت کن ...

آکنون که تدوین این پایان‌نامه به اتمام رسید بر خود واجب می‌دانم که در برابر پدر و مادر مهربانم که سال‌هاست لطف و مهربانیشان گرمی‌بخش زندگی‌م بوده سر تعظیم و سپاس فرود آورده و بر دستان زحمت‌کش و پر مهرشان بوسه زده و از ایشان قدردانی نمایم.

تشکر ویژه من از اساتید فرزانه آقایان علی‌اکبر فدائی‌تهرانی و دکتر مجید اولیا می‌باشد که همواره از راهنمایی‌ها و حمایت ایشان بهره‌مند بودم. از استاد مشاور جناب آقای مهندس سجودی نیز تشکر و قدردانی می‌نمایم. هم‌چنین از سرکار خانم مهندس لری که نه تنها مرا در تدوین پایان‌نامه بلکه در تغییر تفکر و نگرش به زندگی راهنما بودند، کمال تشکر را داشته و از فداوند منان توفیق روزافزون ایشان را خواستارم.

از آقایان دکتر عبدالعسین جمالی و دکتر عبدالرحمن محمدقانی که داوری این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند، بی‌نهایت سپاس‌گزارم.

از مسئولین و کارکنان محترم واحد حفظ نباتات جهاد کشاورزی استان کرمان و هم‌چنین کارشناسان آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های بی‌دریغشان سپاس‌گزارم.

از فوهران عزیزم پونه و سیمین که در تمام مراحل زندگی حامی و پشتیبان من بوده‌اند و طی لین مسیر بدون زحمات ایشان میسر نبود، با تمام وجود سپاس‌گزارم.

از آقایان تاکیموتو، اکادا، مک‌کنری، رابینز و دوستان عزیزم گشسبی، زین‌العابدینی، خلکی، منگلی، موسی‌فواه، هاشمی، سیدین، عبدالهی، بیلگرامی، طاهری، نمازی و دهقانی و سایر عزیزانی که به من یاری رسانند صمیمانه تشکر می‌کنم.

کلماتم ناچیزند، این را زمانی فهمیدم که خواستم در مقامت سخن بگویم. سخن گفتن از تو کار آسانی نیست، چرا که تو خود غایت هر آنچه که می‌باید گفت هستی. ای باشکوه و با صلابت و ای تکیه‌گاه همیشه و هنوزم، پدرم! استواری را از تو آموختم. آنچه انگاشته‌ام را نثار آسمان زلال محبت می‌کنم.

نام تو که به آسمان خیالم خطور می‌کند، کلمات کوچک سرسپرده می‌شوند برای گفتن. آن‌گاه غنچه کلماتم گل می‌دهند و در کوچه تنگ جمالاتم عطر خوش گل نرگس می‌پیچد. ای فرشته‌ای که بهشت با تمام عظمتش در زیر پای توست. ای صبور بی‌مانند، مادرم! بوسه‌ای از جنس عشق بر دستانت می‌نشانم و آن‌چه در پیش روست را به تو و افق مهربانی‌ات تقدیم می‌کنم.

چکیده:

پسته یکی از محصولات کشاورزی مهم کشور ایران است که پیشینه‌ی تاریخی طولانی دارد. با شروع صادرات، این محصول در قرن جاری، ارزش اقتصادی و تجاری ویژه‌ای پیدا کرده است. درخت پسته توسط آفات و بیماری‌های گیاهی زیادی مورد حمله قرار می‌گیرد، که از میان آن‌ها بیماری‌های خاکزاد، از مهم‌ترین بیماری‌های پسته در دنیا می‌باشند. در بین عوامل خاکزاد نماتدهای انگل گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند. در بررسی فون نماتدهای انگل باغات پسته تا کنون چند جنس و گونه خسارتزا روی پسته گزارش شده است. در این تحقیق نتایج مربوط به پراکنش خانواده Longidoridae ارائه می‌گردد. به منظور تعیین پراکنش گونه‌های این خانواده، در سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ بیش از ۱۵۰ نمونه خاک از مناطق مهم پسته‌کاری استان کرمان جمع‌آوری شد و پس از حمل به آزمایشگاه، نماتدهای آن‌ها با روش سانتریفیوژ استخراج و قبل از انجام مراحل فیکس تعداد نماتدهای این خانواده در ۲۵۰ گرم خاک شمارش شد. سپس نماتدها با فرمالین ۴٪ تثبیت شده و از آن‌ها اسلایدهای دائمی تهیه گردید. نماتدها با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لوله ترسیم از لحاظ خصوصیات ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تهیه شرح کامل نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با گونه‌های موجود در منابع، گونه‌های *Longidorus africanus* با حداکثر جمعیت و پراکنش و *Xiphinema vuittenezi*، *Xiphinema pachtaicum* با متوسط جمعیت و پراکنش و *Xiphinema index* با حداقل جمعیت شناسایی شدند. گونه *Xiphinema oxycaudatum* نیز برای اولین بار از کرمان گزارش می‌شود. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گونه غالب، *Longidorus africanus*، DNA نه ایزوله مختلف از این نماتد استخراج و پس از انجام عمل PCR و تکثیر نواحی ITS، این ناحیه مورد توالی‌یابی قرار گرفت و داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف تحلیل شدند و درخت فیلوژنی آن‌ها ترسیم گردید، دندروگرام به دست آمده تفاوت‌هایی را در این نه ایزوله نشان داد. هم‌چنین توالی این نه جدایه با سایر گونه‌های *Longidorus* و جمعیت‌های آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه حاصل از این دندروگرام نیز نشان داد که می‌توان از این ناحیه به عنوان ابزاری مناسب برای تفکیک گونه‌های این جنس استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پسته، استان کرمان، Longidoridae، *Longidorus africanus*، *Xiphinema vuittenezi*، *Xiphinema pachtaicum*، درخت فیلوژنی و توالی ناحیه ITS.

فهرست مطالب

شماره صفحه	عنوان
۷	فصل اول - مقدمه
۷	۱-۱ ارزش غذایی
۸	۲-۱ مسائل و مشکلات پسته کاری
۹	۳-۱ اهداف پژوهش
۹	۴-۱ عناوین فصول
۱۰	فصل دوم - بررسی منابع
۱۰	۱-۲ جایگاه Longidoridae در طبقه بندی نماتدها
۱۱	۲-۲ آخرین وضعیت طبقه بندی Longidoridae
۱۲	۳-۲ تاریخچه و اهمیت نماتدهای Longidoridae در ایران
۱۳	۴-۲ مورفولوژی و آناتومی
۱۳	۱-۴-۲ خصوصیات کلی
۱۵	۲-۴-۲ خصوصیات متمایز کننده جنس های مهم از یکدیگر
۱۶	۵-۲ انتشار
۱۷	۶-۲ دامنه میزبانی گونه های مهم
۱۷	۷-۲ زیست شناسی و چرخه زندگی
۱۸	۸-۲ رابطه میزبان و بیمارگر
۱۸	۱-۸-۲ علائم
۱۸	۲-۸-۲ بیماری زایی و ایجاد خسارت
۲۱	۳-۸-۲ کسب ویروس و توانایی انتقال ویروس
۲۱	۴-۸-۲ انتقال ویروس و جایگاه های نگه داری
۲۲	۹-۲ اساس طبقه بندی و شناسایی نماتدهای لونجیدوریده
۲۳	۱-۹-۲ شناسایی بر پایه مورفولوژی
۲۳	۱-۱-۹-۲ خصوصیات اصلی لونجیدوریدها
۲۸	۲-۹-۲ شناسایی بر پایه نشانگرهای مولکولی
۲۹	۱-۲-۹-۲ تقسیم بندی روش های مولکولی
۲۹	۲-۲-۹-۲ ماکرومولکول های مورد استفاده در روش مولکولی
۳۱	۱۰-۲ کاربرد روش های مولکولی در شناسایی نماتدهای خانواده Longidoridae

۳۶	فصل سوم - مواد و روش‌ها
۳۶	۱-۳ نمونه برداری
۳۶	۲-۳ استخراج نماتدها
۳۷	۳-۳ شمارش نماتدها
۳۷	۴-۳ کشتن و ثابت کردن نماتدها
۳۷	۵-۳ تهیه اسلاید
۳۸	۶-۳ شاخص‌های اندازه‌گیری
۳۹	۷-۳ روش مولکولی
۳۹	۱-۷-۳ استخراج DNA
۳۹	۲-۷-۳ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
۴۱	۳-۷-۳ توالی‌یابی DNA
۴۱	۴-۷-۳ تجزیه و تحلیل اطلاعات
۴۲	۸-۳ ارزیابی خسارت در شرایط گلخانه
۴۳	فصل چهارم - نتیجه‌گیری و بحث
۴۳	۱-۴ مقایسه دو روش استخراج نماتد
۴۳	۲-۴ نتایج حاصل از پراکنش نماتدهای خانواده Longidoridae
۴۵	۳-۴ بررسی‌های مورفولوژیکی و مورفومتریکی
۴۵	۴-۴ خانواده Longidoridae Thorne, 1935
۴۵	۱-۴-۴ زیرخانواده Xiphinematinae
۴۵	۲-۴-۴ جنس <i>Xiphinema</i> Cobb, 1913
۴۶	۳-۴-۴ خصوصیات مشترک <i>X. americanum</i> -group
۴۷	۵-۴ گونه <i>X. pachtaicum</i> (Tulaganov, 1938) Kirjanova 1951
۵۱	۱-۵-۴ مناطق جمع‌آوری
۵۱	۲-۵-۴ بحث
۵۴	۶-۴ گونه <i>Xiphinema oxycaudatum</i> Bleve-Zacheo, 1979
۵۴	۱-۶-۴ محل جمع‌آوری
۵۴	۲-۶-۴ بحث
۵۷	۷-۴ گونه <i>X. vuittenezi</i> Luc, Lima, Wiecher and Flegg, 1964
۵۷	۱-۷-۴ محل جمع‌آوری
۵۸	۲-۷-۴ بحث
۶۱	۸-۴ گونه <i>X. index</i> Thorn and Allen, 1951
۶۲	۱-۸-۴ محل جمع‌آوری
۶۲	۲-۸-۴ بحث
۶۵	۹-۴ زیر خانواده Longidorinae Thorne, 1935

۶۵	<i>Longidorus</i> Micoletzky, 1922 جنس ۱-۹-۴
۶۵	<i>Longidorus africanus</i> , Merny, 1966 گونه ۱۰-۴
۶۶	محل جمع‌آوری ۱-۱۰-۴
۶۶	بحث ۲-۱۰-۴
۷۲	<i>Longidorus sp.</i> گونه ۱۱-۴
۷۲	محل جمع‌آوری ۱-۱۱-۴
۷۲	بحث ۲-۱۱-۴
۷۶	۱۲-۴ نتایج بررسی تنوع ژنتیکی گونه غالب (<i>Longidorus africanus</i>) در باغات پسته استان کرمان
۸۴	۱۳-۴ نتیجه‌گیری
۸۵	۱۴-۴ پیشنهادات

۸۶ منابع

۹۳ پیوست ۱

۱۰۴ پیوست ۲

فهرست اشکال

شماره صفحه	عنوان
۱۳	شکل ۱-۲ ساختار اسپیر در <i>Xiphinema sp.</i>
۱۴	شکل ۲-۲ قسمت‌هایی از بدن لونجیدوریدها
۱۵	شکل ۳-۲ دستگاه تولید مثل ماده و دستگاه تولید مثل نر
۲۰	شکل ۴-۲ تغذیه <i>Xiphinema sp.</i> از نوک ریشه
۲۶	شکل ۵-۲ محل اتصال مری به روده (کاردیا)
۳۱	شکل ۶-۲ ناحیه ار.ان.ای ریپوزومی
۴۲	شکل ۱-۳ گیاهچه‌های پسته پس از تلقیح توسط نماتد <i>Longidorus africanus</i>
۴۴	شکل ۱-۴ درختان با علائم زردی شدید در منطقه حاجی‌آباد کرمان
۴۴	شکل ۲-۴ درخت با علائم زردی شدید با جمعیت بسیار بالای نماتد <i>Xiphinema vuittenezi</i>
۴۸	شکل ۳-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>X. pachtaicum</i> (Tulaganov, 1938) Kirjanova, 1951
۵۰	شکل ۴-۴ تصاویر مربوط به <i>X. pachtaicum</i>
۵۳	شکل ۵-۴ <i>X. pachtaicum</i> جمع‌آوری شده از هفت باغ ماهان
۵۶	شکل ۶-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>Xiphinema oxycaudatum</i> Bleve-Zacheo, 1979
۵۶	شکل ۷-۴ تصاویر مربوط به <i>Xiphinema oxycaudatum</i>
۵۹	شکل ۸-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>Xiphinema vuittenezi</i> Luc, Lima, Wiecher and Flegg, 1964
۶۰	شکل ۹-۴ تصاویر مربوط به <i>Xiphinema vuittenezi</i>
۶۴	شکل ۱۰-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>X. index</i> Thorn and Allen, 1951
۶۴	شکل ۱۱-۴ <i>X. index</i> Thorn and Allen, 1951
۶۹	شکل ۱۲-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>Longidorus africanus</i> Merny, 1966
۷۰	شکل ۱۳-۴ نماتد اینترسکس و نر <i>Longidorus africanus</i>
۷۱	شکل ۱۴-۴ تصاویر مربوط به گونه <i>Longidorus africanus</i>
۷۴	شکل ۱۵-۴ ترسیم قسمت‌های مختلف <i>Longidorus sp.</i>
۷۵	شکل ۱۶-۴ تصاویر مربوط به <i>Longidorus sp.</i>
۷۶	شکل ۱۷-۴ مناطق نمونه‌برداری از جدایه‌های <i>Longidorus africanus</i>
۷۷	شکل ۱۸-۴ تشکیل باند با استفاده از آغازگرهای وراپین و همکاران (۱۹۹۲)
۷۷	شکل ۱۹-۴ تشکیل باند با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در Nested PCR
۷۹	شکل ۲۰-۴ دندروگرام حاصل از روش MP برای جمعیت‌های <i>Longidorus africanus</i>
۸۲	شکل ۲۱-۴ دندروگرام حاصل از روش MP برای جمعیت‌های <i>Longidorus africanus</i> و سایر جمعیت‌های این جنس

شکل ۴-۲۲ دندروگرام حاصل از روش MP برای جمعیت‌های *Longidorus africanus* و سایر جمعیت‌های این جنس ۸۳

فهرست جداول

شماره صفحه	عنوان
۲۲	جدول ۱-۲ تعدادی از گونه‌های دو جنس <i>Longidorus</i> و <i>Xiphinema</i> و ویروس‌های مرتبط با آن‌ها
۴۰	جدول ۱-۳ مخلوط واکنش PCR
۴۰	جدول ۲-۳ برنامه دستگاه Thermal cycler جهت انجام واکنش PCR
۴۰	جدول ۳-۳ آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR اول و دوم جهت تعیین توالی ناحیه ITS rRNA
۴۱	جدول ۴-۳ محل جمع‌آوری <i>Longidorus africanus</i> و کد دسترسی به توالی‌ها در شبکه اینترنت
۴۹	جدول ۱-۴ مقایسه خصوصیات مورفومتریکی جمعیت‌های Kirjanova 1951 (Tulaganov, 1938) <i>X. pachtaicum</i> در باغات پسته استان کرمان
۵۲	جدول ۲-۴ مقایسه مورفومتریکی بین گونه <i>X. fortuitum</i> و گونه مشکوک به <i>X. pachtaicum</i> از نمونه جمع‌آوری شده از هفت باغ ماهان
۵۵	جدول ۳-۴ مقایسه گونه <i>Xiphinema oxycaudatum</i> Bleve-Zacheo, 1979 جمع‌آوری شده از کرمان و مازندران
۵۸	جدول ۴-۴ مقایسه خصوصیات مورفومتریکی جمعیت‌های <i>X. vuittenezi</i> Luc, Lima, Weischer and Flegg, 1964 در باغات پسته استان کرمان
۶۳	جدول ۵-۴ خصوصیات مورفومتریکی جمعیت‌های <i>X. index</i> , Thorn and Allen, 1951 استان کرمان و جمعیت جمع‌آوری شده از کرج
۶۷	جدول ۶-۴ مقایسه خصوصیات مورفومتریکی جمعیت‌های <i>Longidorus africanus</i> Merny, 1966 در باغات پسته استان کرمان
۷۳	جدول ۷-۴ اندازه‌های مورفومتریکی جمعیت <i>Longidorus sp.</i> جمع‌آوری شده از منطقه حاجی‌آباد کرمان
۷۸	جدول ۸-۴ درصد هر یک از نوکلئوتیدها در جدایه‌های <i>Longidorus africanus</i> .
۸۱	جدول ۹-۴ فهرست گونه‌هایی که توالی ITS آن‌ها از بانک ژن NCBI دریافت شده است.

فصل اول

مقدمه

پسته یکی از تولیدات کشاورزی مهم کشور ما است که با نام ایران درآمیخته و پیشینه‌ی تاریخی طولانی دارد. با آغاز صادرات این محصول در قرن حاضر، ارزش اقتصادی و تجاری ویژه‌ای پیدا کرده است. پسته که به طلای سبز نیز مشهور است به عنوان یک محصول استراتژیک، جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات کشاورزی دارد. بخش زیادی از صادرات غیر نفتی کشور را پسته تشکیل می‌دهد. هم‌اکنون حدود ۵۵٪ از تولید و بیش از ۶۰٪ صادرات جهانی در اختیار کشور ایران است.

درخت پسته در ایران در گستره‌ایی با عرض جغرافیایی ۲۸ تا ۳۸ درجه شرقی و ارتفاع ۱۲۰۰ تا ۱۶۰۰ متر از سطح دریا قابل کشت است. بر اساس آمار سال زراعی ۱۳۸۴ سطح زیر کشت پسته در ایران ۴۵۰۰۰۰ هکتار است و سطح زیر کشت نهال و درختان بارور در استان کرمان ۳۳۳۳۰۰ هکتار است که بیشترین سطح زیر کشت پسته را به خود اختصاص داده است (عسکریان، ۱۳۸۴).

۱-۱ ارزش غذایی

دانش امروز برتری‌های پسته را از پاره‌ای جهات بر بسیاری از خوراکی‌های با انرژی و مناسب از جمله خاویار، میگو، گوشت قرمز و سفید، تخم مرغ، انواع حبوبات، کنجد، نارگیل، انجیر، کشمش، گردو، فندق، بادام و... به اثبات رسانیده است. در بسیاری از نوشته‌های علمی از پسته به عنوان غذایی خون‌ساز یاد شده است. این محصول میزان زیادی آهن قابل جذب برای خون دارد. افزون بر این مغز پسته به سبب داشتن رنگ سبز و مزه مناسب، در انواع خوراکی‌ها و شیرینی‌ها به کار می‌رود. میزان انرژی حاصل از ۱۰۰ گرم مغز پسته حدود ۶۲۶ کیلو کالری است (یزدانی و ابوسعیدی، ۱۳۸۳).

با توجه به اهمیت اقتصادی محصول پسته که علاوه بر تامین نیاز داخلی، با صادرات آن نیز می‌توان گامی ارزنده در پیشرفت اقتصادی کشور برداشت، لازم است که با تولید محصول با کیفیت مطلوب، جایگاه مناسبی برای آن ایجاد کرد. آشنایی با عوامل زنده مخرب و چگونگی مدیریت کنترل آن‌ها، از چالش‌های مهم در تأمین اهداف یاد شده می‌باشد.

۱-۲ مسائل و مشکلات مهم پسته کاری

امروزه بزرگترین خطری که بازارهای داخلی و خارجی پسته را تهدید می‌کند، بالا رفتن هزینه‌های تولید و پائین بودن بازده آن در واحد سطح است. خسارت سرمازدگی، گرم‌زدگی، علف‌های هرز، تغذیه نامناسب، بافت خاک و شوری آن، در حاشیه نواحی کویری ایران از چالش‌های مهم تولید این محصول است (حکم آبادی و جوانشاه، ۱۳۸۵). هم‌چنین درخت پسته توسط بسیاری از آفات و بیماری‌های گیاهی مورد حمله قرار می‌گیرد. تاکنون بیش از ۳۰ بیماری در جهان از پسته گزارش شده است که از میان آن‌ها بیماری‌های خاکزاد، اهمیت بیشتری دارند. بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته، بیماری ماسوی پسته، کپک زدگی ناشی از آسپرژیلوس، پژمردگی ورتیسیلیومی، خشکیدگی سرشاخه‌های درختان پسته، زنگ پسته و ریزبرگی درختان پسته از جمله بیماری‌هایی است که می‌توان به آن‌ها اشاره کرد (یزدانی و ابوسعیدی، ۱۳۸۳).

یکی از عوامل محدودکننده رشد و توسعه پسته، نماتدهای انگل گیاهی می‌باشند. هرچند نماتدهای انگل گیاهی می‌توانند در تمام قسمت‌های گیاه از جمله جوانه گل، برگ، ساقه و ریشه فعالیت کنند ولی عمده خسارت آن‌ها از طریق ریشه وارد می‌شود. این بیمارگرها تنوع زیادی در رفتار تغذیه‌ای از خود بروز می‌دهند. برخی از گونه‌ها فقط از بافت‌های خارجی گیاه تغذیه نموده و تعدادی به بافت‌های عمقی میزبان نفوذ می‌کنند. هم‌چنین بعضی از نماتدها میزبان خود را وادار به تولید منابع غذایی مخصوص می‌نمایند تا بتوانند روی آن‌ها زندگی کنند. نماتدها در جمعیت پایین معمولاً خسارت ناچیز ایجاد می‌کنند ولی در جمعیت‌های بالا، علاوه بر ایجاد خسارت فراوان، گاهی باعث از بین رفتن میزبان نیز می‌شوند. علاوه بر این بعضی از نماتدها مقاومت گیاه را در برابر بیماری‌های قارچی و باکتریایی کاهش می‌دهند بنابراین خسارت مضاعف یا چندگانه ایجاد می‌کنند. تعدادی نیز ناقل ویروس‌های بیماری‌زا در بین گیاهان می‌باشند (سمیعی، ۱۳۸۴).

نماتدهای انگل گیاهی با وارد کردن استایلت خود به داخل ریشه‌ها و سایر اندام‌های گیاهی، علاوه بر مصرف مواد غذایی با ترشح آنزیم‌های مختلف به درون گیاه، باعث اثرات متفاوت در میزبان خود می‌گردند. نماتدها در بیشتر باغ‌ها، خزانه‌ها و نهالستان‌ها انتشار دارند، در زمین‌های سبک و شنی که قطر خلل و فرج خاک زیاد است و امکان تحرک و تنفس بهتری برای نماتدها فراهم می‌شود، جمعیت این موجودات نیز بالا می‌رود. وجود دامنه میزبانی وسیع برای نماتدها از عوامل مهم دیگری است که سبب گسترش بیشتر این بیمارگرها می‌شود. در مناطقی که سال‌ها زیر کشت پسته می‌باشند و امروزه باغ‌هایی با درختان پیر را تشکیل می‌دهند، به احتمال زیاد این عوامل وجود دارند ولی به دلایل زیر کشاورزان به آن‌ها به دیده یک عامل خسارت‌زا نگاه نمی‌کنند:

- نشانه‌های بیماری چندان آشکار و ویژه نیست و پسته‌کاران آشنایی زیادی با این عوامل ندارند.
- نماتدها درختان پیر را ناگهانی یا به تنهایی از پا در نمی‌آورند.
- راه مبارزه قاطعی برای این پارازیت‌ها وجود ندارد.

علاوه بر خسارت مستقیم، زیان ناشی از هجوم نماتدها سبب آسیب‌پذیری درخت به آلودگی سایر عوامل بیماری‌زا مانند سرخشکیدگی می‌شود. گاهی آلودگی شدید درختان بزرگ منجر به خشکیدن کامل درخت می‌شود. کشاورزان با وجود خسارتی که نماتدها روی ریشه پسته و در پی آن رشد و تولید این درختان به وجود می‌آورند، به دلیل همانندی نشانه خسارت نماتدها با کمبود مواد غذایی و تنش آب، کوشش می‌کنند مشکل درختان خود را با آبیاری و کوددهی حل کنند. به دلیل وجود مسائل مختلف که به تعدادی از آن‌ها در بالا اشاره شد، در حال حاضر پژوهش‌چندانی روی کنترل نماتدها انجام نمی‌گیرد و هنگام احداث باغ نیز کنترلی بر آلودگی یا عدم آلودگی نهال‌ها و زمین بستر کاشت وجود ندارد و اقدامات بهداشتی لازم برای جلوگیری از گسترش این بیماری و انتقال آن

به باغ‌ها یا مناطق جدید پسته‌کاری صورت نمی‌گیرد. نهال‌های لازم برای احداث باغ از مکان‌های آلوده تهیه می‌شود. در زمینه اطلاع‌رسانی و انجام کارهای ترویجی در مورد این انگل‌ها نیز کوشش شایان توجهی انجام نشده است (یزدانی و ابوسعیدی، ۱۳۸۳).

در بررسی فون نماتدهای انگل باغات پسته تا کنون چند جنس و گونه خسارت‌زا روی پسته گزارش شده است. به طور کلی نماتدهای *Merlinius Xiphinema*، *Pratylenchus*، *Meloidogyne* در گیاه پسته از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (حق‌دل، ۱۳۸۴). به لحاظ گسترش باغات پسته در استان کرمان و هم‌چنین به منظور افزایش میزان عملکرد این محصول از طریق کاهش خسارات ناشی از عوامل بیماری‌زا، تحقیقاتی در زمینه شناسایی نماتدهای انگل گیاهی در این استان صورت گرفته است (حسینی پور، ۱۳۷۰). اما تحقیق جامعی در مورد آن‌ها انجام نپذیرفته است. در این تحقیق نتایج مربوط به بررسی و پراکنش نماتدهای خانواده Longidoridae ارائه می‌گردد.

۳-۱ اهداف پژوهش

پژوهش‌های انجام شده در زمینه شناسایی مناطق آلوده به نماتد در استان کرمان که عمده‌ترین منطقه پسته‌کاری در ایران است حکایت از آلودگی وسیع اکثر مناطق به نماتدهای مختلف می‌باشد. هر چند تاکنون چند گونه از نماتدهای خانواده Longidoridae از مناطق عمده پسته‌کاری استان کرمان گزارش شده است ولی پژوهش‌های محدودی در خصوص میزان آلودگی، تعیین گونه غالب در هر منطقه و بررسی تنوع از لحاظ مورفولوژیکی و ژنتیکی در هر گونه صورت گرفته است که در این مطالعه موارد ذکر شده مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

۴-۱ عناوین فصول

این پایان‌نامه مشتمل بر پنج فصل است که در فصل اول به بیان اهمیت و اهداف موضوع تحقیق پرداخته می‌شود. در فصل دوم به بررسی پیشینه‌ی تحقیقات انجام گرفته در این رابطه اشاره می‌شود. فصل سوم به چگونگی انجام پژوهش و مواد و روش‌های به کار گرفته شده، اختصاص می‌یابد و در فصل چهارم نتایج به دست‌آمده و مباحث مربوط به نتایج، مورد بررسی قرار می‌گیرند. در نهایت منابع مورد استفاده در این پژوهش ذکر خواهند شد.

فصل دوم

بررسی منابع

تقسیم‌بندی و گروه‌بندی نماتدها همانند سایر موجودات زنده با افزایش آگاهی و شناخت درباره انواع مختلف، آناتومی، مورفولوژی و بیولوژی آن‌ها، همواره دچار دگرگونی و تغییر بوده است به طوری که در منابع اولیه آن‌ها را به عنوان گروهی از کرم‌های گرد، طبقه‌بندی می‌کردند ولی در دهه اخیر سرانجام به عنوان شاخه جداگانه‌ای از جانوران پذیرفته شدند. با این حال تفسیر و جابه‌جایی تاکسون‌ها در درون شاخه هم‌چنان ادامه دارد. هرچند سال‌ها این شاخه براساس خصوصیات مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی به دو رده‌ی Adenophorea و Secernentea تقسیم می‌گردید ولی در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های مولکولی خصوصاً استفاده از توالی RNA ریبوزومی این تقسیم‌بندی تغییر کرده است و نماتدها در گروه‌های متفاوت با رده‌های قبلی قرار داده شده‌اند. این تغییرات شامل واحدهای دیگر رده‌بندی نیز شده است و نماتدهای گروه لونجیدوریده نیز از این قاعده مستثنی نیستند.

۲-۱ جایگاه Longidoridae در طبقه‌بندی نماتدها

بر اساس طبقه‌بندی مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی که نماتدها در دو رده Adenophorea و Secernentea قرار داده می‌شوند، نماتدهای لونجیدوریده در رده‌ی اول جای می‌گیرند که در ذیل به نحوه شکل‌گیری و طبقه‌بندی این گروه اشاره می‌شود.

اولین بار تورن (۱۹۳۵) زیر خانواده‌ی Longidorinae را برای جنس *Longidorus* پیشنهاد نمود. وی بعداً جنس‌های *Xiphinema* و *Longidorella* را به آن اضافه کرد. میل (۱۹۶۱)، جیراچپوری (۱۹۶۴) و صدیقی (۱۹۶۸) آنرا به عنوان خانواده معتبر در نظر گرفتند. صدیقی و همکاران (۱۹۳۶) جنس *Paralongidorus* را به این خانواده اضافه کردند و جنس *longidorella* را از آن جدا نمودند. دالماسو در سال ۱۹۶۹ زیر خانواده Xiphinematinae را برای جنس *Xiphinema* در این خانواده پیشنهاد کرد. در سال ۱۹۷۲ لوف و کومنس ضمن شرح اهمیت هسته‌های غدد مری در این گروه دو زیر خانواده *Lonigidorinae* و *Xiphinematinae* را در این خانواده پذیرفتند. در سال ۱۹۷۵ خان و احمد این گروه را به بالا خانواده با دو خانواده *Xiphinematidae* ارتقا دادند. در سال ۱۹۷۶ مونتوریو جنس جدید *Xiphidorus* را معرفی کرد. در سال

۱۹۷۸ خان و همکاران ضمن پذیرفتن این بالا خانواده، خانواده Xiphidoridae را برای جنس *Xiphidorus* و زیر خانواده Paralongidorinae را برای جنس *Paralongidorus* پیشنهاد کردند. در سال ۱۹۷۸ رابینز و وینر که قبلاً جنس *Californidorus* را معرفی کرده بودند، یک زیر خانواده جدید بنام Californidorinae را برای خانواده Longidoridae پیشنهاد و زیر خانواده Xiphinematinae را با Longidorina هم‌نام اعلام کردند. ولی جیراچپوری ضمن رد پیشنهاد مذکور آنرا متعلق به خانواده Nordiidae دانست و زیر خانواده مورد نظر را با Pungentinae هم‌نام و زیر خانواده‌ی Xiphinematinae را مجدداً معتبر اعلام کرد. در سال ۱۹۸۴ لوک و دوست طبقه‌بندی Longidorids را مورد تجدید نظر قرار دادند و تنها یک خانواده بدون زیر خانواده در این گروه مشخص نمودند. آن‌ها هم‌چنین جنس *Siddiqia* را با جنس *Paralongidorus* و جنس *Inagrius* را با جنس *Longidorioides* هم‌نام دانستند. کومنس در سال ۱۹۸۵ نیز تنها یک خانواده با دو زیر خانواده Longidorinae و Xiphinematinae را برای این گروه پذیرفت (فدائی‌تهرانی، ۱۳۸۲).

در تقسیم‌بندی انجام شده توسط جیراچپوری و احمد در سال ۱۹۹۲، Longidorids به صورت یک بالا خانواده (Longidoridea) با دو خانواده Longidoridae و Xiphinematidae در نظر گرفته شده‌اند. خانواده‌ی اول فقط دارای یک زیر خانواده با جنس‌های *paralongidorus* و *Longidorioides* و خانواده دوم دو زیر خانواده Xiphinematinae با جنس *Xiphinema* و Xiphidoridae با جنس *Xiphidorus* می‌باشد (فدائی‌تهرانی، ۱۳۸۲).

۲-۲ آخرین وضعیت طبقه بندی Longidoridae

(دیکرامر و رابینز، ۲۰۰۷)

Class:Enoplea

Subclass:Dorylaimia

Order:Dorylaimoidea

Superfamily:Dorylaimoidea

این خانواده شامل ۴۸۰ گونه است که دارای دو زیر خانواده به شرح ذیل می‌باشد:
زیر خانواده Longidorinae با دو قبیله Longidorini و Xiphidorini که در گروه اول سه جنس *longidorus* با ۱۴۴ گونه، *Longidoriodes* با ۱۳ گونه و *Paralongidorus* با ۷۲ گونه قرار دارد و در گروه دوم سه جنس *Australodorus* با یک گونه، *Paraxiphidorus* با سه گونه و *Xiphidorus* با ۸ گونه قرار گرفته‌اند. زیر خانواده Xiphinematinae تنها دارای یک جنس *Xiphinema* با ۲۴۰ گونه می‌باشد (دیکرامر و رابینز، ۲۰۰۷).

در حال حاضر توافقی در مورد وضعیت جنس *Longidoriodes* وجود ندارد. از بین جنس‌های موجود در این خانواده *Longidorus*، *Xiphinema* و *Paralongidorus* ناقل ویروس شناخته شده‌اند. مهم‌ترین خصوصیات تشخیصی Longidoridae در سطح جنس ساختار ادونتوآستایل و ادونتوفور، ساختار و موقعیت حلقه هادی،

اندازه و شکل منفذ آمفید و اندازه و موقعیت هسته‌های غدد مری است. خصوصیتی که در حد گونه مورد استفاده قرار می‌گیرند، اطلاعات مورفومتریکی هم‌چون شکل و اندازه‌ی کیسه آمفیدی و منفذ آن، ساختار و تنوع سیستم تولید مثل ماده (دی‌دلفیک، منودلفیک، سودومونودلفیک)، تفاوت در شکل و اندام‌های موجود در رحم *Xiphinema* و جنس‌های *Xiphidorini*، شکل دم در تمام مراحل سیکل زندگی و وجود یا عدم وجود جنس نر در این جنس‌ها می‌باشد (دیکرامر و رایبیز، ۲۰۰۷).

۳-۲ تاریخچه و اهمیت نماتدهای Longidoridae در ایران

اولین بار ایبوردی و همکاران (۱۹۷۰) *Longidorus sp* و *Xiphinema americanum* را از خاک اطراف ریشه مرکبات در فارس گزارش کردند. اشتورهان (۱۹۷۴) در مورد وجود و اهمیت جنس‌های *Xiphinema* *Paralongidorus* و *Longidorus* در ایران به عنوان ناقل ویروس‌های بیماری‌زا اشاره کرده است، ولی در این گزارش نامی از گونه‌های آن به میان نیامده است (فدایی‌تهرانی، ۱۳۸۲). مجتهدی و همکاران (۱۹۸۰) سه گونه از جنس *Xiphinema* به نام‌های *X. pachtaicum*، *X. index* و *X. vuittenezi* را از تاکستان‌های مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و معرفی نمودند. اشتورهان و باروتی (۱۹۸۳) نیز گونه *Longidorus iranicus* را از شمال و شمال غرب ایران روی میزبان‌های مختلف گزارش نمودند.

خیری و باروتی (۱۳۶۳) در نمونه‌های جمع‌آوری شده از خاک اطراف ریشه‌های انار و پسته از بهبهان و رفسنجان، مرکبات از بندرعباس، بم و جیرفت، هندوانه از دشت قزوین و گلایی و بادمجان از تهران گونه‌های *Longidorus africanus*، *L. siddiqi*، *L. vineacola* و *Paralongidorus L. murithi* را تشخیص دادند. حسینی‌پور (۱۳۷۰) در بررسی فون نماتدهای پارازیت گیاهی در باغات پسته استان کرمان، چهار گونه *L. africanus*، *X. index*، *X. pachtaicum* و *X. vuittenezi* را گزارش نمود.

فدایی‌تهرانی و خیری (۱۳۸۴) *Longidorus africanus*، *L. iranicus* و *L. pisi* را از خاک اطراف ریشه‌های گیاهان مختلف در مناطق مختلف گزارش نمودند. بر اساس این گزارش گونه *L. africanus* بیشتر در مناطق جنوبی و گونه *L. iranicus* بیشتر در نیمه شمالی کشور مشاهده شده است.

علی‌رمجی و همکاران (۱۳۸۵) نماتد *X. index* را از خاک اطراف ریشه توت و زردآلو در منطقه جیرفت و *X. pachtaicum* را از خاک ریشه زردآلو در منطقه دهبکری شهرستان جیرفت جداسازی و مورد شناسایی قرار دادند.

نیک‌نام و همکاران (۱۳۸۵) نیز در بررسی نمونه‌های خاک مزارع مغان (غلات)، خسروشهر (گوجه‌فرنگی) و مراغه (انگور) سه گونه لونجیدورید به نام‌های *Longidorus*، *Longidorus cerasus* Thorne, 1947 و *proximus* Sturhan and Agro, 1983 و *Longidorus profundrom* Hooper, 1966 را شناسایی کردند. قره‌خانی و همکاران (۱۳۸۶) با معرفی تعدادی از نماتدهای انگل گیاهی بالا خانواده *Criconematidae* و خانواده *Longidoridae* از باغ‌های استان کرمان، سه گونه از این خانواده به نام‌های *L. africanus*، *L. L. africanus* و *orientalis* *Xiphinema sp.* را گزارش کردند. پدram و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۰۹) نیز در بررسی نماتدهای خانواده *Longidoridae* در شمال غرب ایران دو گونه جدید به نام *Longidorus kheiri* و *Xiphinema iranicum* را گزارش کردند.