

مطالعه نماتودهای بیمارگر حشرات خانواده *Steinernematidae* و *Heterorhabditidae* در خراسان شمالی

۱. شکوفه کمالی؛ ۲. جواد کریمی*؛ ۳. ابراهیم شکوهی
۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان
(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۸)

چکیده

نماتودهای بیمارگر حشرات یکی از مهم‌ترین عوامل کنترل زیستی به‌شمار می‌روند. به دلیل کاربرد رو به رشد این گروه از بیمارگرها در دهه‌ی اخیر، شناسایی این عوامل بسیار حایز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق به منظور جداسازی نماتودهای بیمارگر احتمالی در خاک، نمونه‌برداری از سه زیستگاه مختلف منطقه‌ی بجنورد در سال ۱۳۹۰ انجام گرفت. در ادامه برای تعیین هویت گونه‌های بومی نماتودهای بیمارگر جمع‌آوری شده، از مشخصات ریخت-شناسی و ریخت‌سنجی به همراه داده‌های مولکولی و لقاح درون و بین‌گونه‌ای استفاده شد. با استفاده از تله‌گذاری با لارو پروانه موم خوار بزرگ، از بین ۵۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، پنج جدایه از دو جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* جداسازی گردید. تعیین مشخصات مولکولی با اتکا به مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی منجر به گروه‌بندی جدایه‌های *Steinernema* موسوم به Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 در گروه گونه‌ای "*feltiae*" و جدایه‌ی HBoj از جنس *Heterorhabditis* در گروه "*bacteriophora*" گردید. تحلیل نسب‌زایی داده‌های توالی ناحیه ژنی ITS نیز، تعلق جدایه‌ها به گروه‌های تعیین شده با مشخصات ریختی را تایید نمود. تبارنمای بازسازی شده براساس ناحیه ژنی ITS نشان داد جدایه‌های مربوط به گروه "*feltiae*" با سایر جدایه‌های این گروه در یک شاخه قرار می‌گیرند. همچنین جدایه‌ی HBoj با سایر جدایه‌های گونه‌ی *H. bacteriophora* در یک شاخه قرار گرفت. نتایج آزمون لقاح درون و بین‌گونه‌ای جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با گونه‌ی مرجع *Steinernema feltiae*، موید آن بود که جدایه‌ی اول (Boj1) به گونه‌ی *S. feltiae* تعلق دارد. سه جدایه‌ی دیگر (Boj7، Boj8 و Boj9)، به سایر گونه‌های جنس "*Steinernema*" تعلق داشتند.

کلیدواژگان: خراسان شمالی، رده‌بندی، ریخت‌شناسی، نسب‌زایی، نماتود بیمارگر حشرات، *ITS Heterorhabditis Steinernema*

مقدمه

Photorhabdus و *Xenorhabdus* باکتری‌های گرم منفی از خانواده‌ی Enterobacteriaceae می‌باشند، که به ترتیب با نماتودهای بیمارگر از خانواده‌ی Steinernematidae و Heterorhabditidae رابطه همزیستی اختصاص دارند (Adams and Nguyen 2002). این گروه از نماتودها دارای چهار سن لاروی می‌باشند که در این بین، تنها

نماتودهای بیمارگر به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک، در تنظیم طبیعی جمعیت برخی گونه‌های حشرات خاکزی و مخفی‌زی به‌کار برده می‌شوند. همکاری بین نماتودهای بیمارگر و باکتری‌های همزیست می‌تواند میزبان را در بازه‌ی زمانی کوتاه از پای درآورد.

در سال‌های اخیر، افزایش تعداد گونه‌های توصیف شده‌ی نماتودهای بیمارگر حشرات، منجر شده تا تلفیقی از داده‌های ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی، مولکولی و اطلاعاتی نظیر نتایج لقاح درون و بین‌گونه‌ای (آزمون دگرآمیزی) در مسیر شناسایی نماتودها لازم و ضروری باشد. در این بین، پیشرفتی که در روش‌های مولکولی حاصل شده، می‌تواند کمک بزرگی برای شناسایی نماتودها به تاکسونومیست‌ها نماید (Dorris et al. 1999, Adams et al. 2006).

امروزه شناسایی بسیاری از گونه‌های نماتودهای بیمارگر حشرات با استناد به داده‌های مولکولی تسهیل شده است (Stock and Hunt 2005, Stock 2009).

لقاح درون و بین‌گونه‌ای (آزمون دگرآمیزی) شیوه‌ای برای اثبات هویت گونه‌های نماتودهای بیمارگر حشرات است (Nguyen et al. 2006). با توجه به اهمیت روز افزون این گروه از عوامل در برنامه‌های کنترل بیولوژیک، در سال‌های اخیر تلاش‌های گسترده‌ای برای جداسازی نماتودهای بیمارگر حشرات در سراسر جهان صورت گرفته است.

در ایران نیز تلاش‌هایی برای جداسازی و معرفی نماتودهای بومی صورت پذیرفته است و تا کنون گونه‌های *Steinernema feltiae* Filipjeve، *S. carpocapsae* Weiser، *S. bicornutum* Tallosi، Peters and Ehlers، *S. kraussei* Steiner، *S. glaseri* Steiner و *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Parvizi et al. 1994, Karimi et al. 2009, Eivazian Kary et al 2009, Nikdel et al. 2010).

تحقیق حاضر در جهت جداسازی و شناسایی نماتودهای بیمارگر حشرات در زیستگاه‌های اطراف شهرستان بجنورد صورت گرفته است. در این بررسی نمونه‌برداری از سه زیستگاه مختلف صورت پذیرفت و نماتودهای بیمارگر از یک زیستگاه بازیافت و با استفاده از رویکرد مبتنی بر اطلاعات ژن ITS و همچنین مشخصات ریخت‌شناسی و لقاح درون و بین‌گونه‌ای شناسایی شدند.

لارو سن سوم موسوم به لارو آلوده کننده توانایی بقاء و پایداری در محیط خارج از بدن میزبان را دارد (Glazer and Lewis 2000).

لارو آلوده کننده در خاک، میزبان مناسب را یافته و از طریق منافذ طبیعی (روزنه‌های تنفسی، دهان، مخرج و سایر منافذ) و یا جلد بدن وارد بدن حشره‌ی میزبان می‌شود. زمانی که نماتود به هموسل میزبان نفوذ می‌کند، باکتری‌های همزیست را آزاد و حشره‌ی میزبان بعد از ۴۸ یا ۷۲ ساعت در اثر عفونت خونی یا توکسین می‌میرد. پس از تکمیل دو تا سه نسل نماتود در بدن میزبان، لارو آلوده کننده از درون لاشه خارج و میزبان جدیدی را به‌منظور ادامه‌ی نسل جستجو می‌کند (Lacey and Unruh 2005).

کنترل آفات در خاک با روش‌های کنترل بیولوژیک بسیار مشکل می‌باشد (Grewal et al. 2005). با وجود این، نماتودها با توجه به بروز رفتار جستجوگری متفاوت و همچنین سازگاری با خاک توانایی دستیابی و کنترل آفات خاکزی و مخفی‌زی را دارند (Canhilal and Carner 2006).

از دیگر ویژگی‌های مطلوب نماتودهای بیمارگر حشرات به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک می‌توان به دامنه‌ی میزبانی وسیع (راسته‌های گوناگون نظیر دوبالان، بال‌پولک‌داران، سخت‌بال‌پوشان، بال‌غشائیان، بال‌ریشک‌داران، سوسری‌ها، موربانه‌ها و ...)، توانایی کشتن میزبان در مدت زمان ۴۸ ساعت، امکان پرورش در محیط‌های غذایی مصنوعی، امکان ذخیره‌سازی با حفظ خاصیت آلوده‌سازی، عدم ایجاد مقاومت در میزبان و بی‌ضرر بودن برای محیط اشاره نمود (Georgis et al. 1991, Canhilal and Carner 2006).

بررسی نمونه‌های خاک در مناطق مختلف جهان نشان داده است، فراوانی نماتودهای بیمارگر حشرات با توجه به فصل، زیستگاه و ناحیه‌ی جغرافیایی متفاوت است. از مهم‌ترین عوامل موثر در توزیع و پراکنش نماتودهای بیمارگر می‌توان به رطوبت و بافت خاک، درجه حرارت و وجود میزبان‌ها اشاره نمود (Hominick 2002).

مواد و روش‌ها

موقعیت جغرافیایی منطقه و نمونه برداری خاک

به منظور جمع‌آوری نماتوئدهای بیمارگر حشرات در شهرستان بجنورد، تعداد پنجاه نمونه خاک از سه زیستگاه متفاوت موجود در سطح شهرستان طی ماه‌های شهریور تا آذر سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید. این منطقه از نظر موقعیت جغرافیایی در عرض شمالی ۲۷/۳۲ و طول شرقی ۵۷/۱۷ قرار دارد. مناطق مورد بررسی شامل چمن‌زارها، پارک‌ها و زمین‌های بایر بود.

نمونه برداری با فواصل چند متر از یکدیگر و در پروفیل صفر تا سی سانتی‌متری خاک صورت پذیرفت و نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از مخلوط نمودن خاک هر نمونه، مقداری خاک از هر نمونه به ظروف پلاستیکی استوانه‌ای درب‌دار به حجم دویست سی‌سی منتقل و سپس تعداد پنج لارو سن آخر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ به عنوان طعمه به هر ظرف اضافه شد (Bedding and Akhurst 1975). این ظروف در دمای محیط ۲۳ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی نماتوئدهای بیمارگر

ظروف حاوی نمونه خاک و لاروها در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در دوره‌ی زمانی ده روزه نگهداری شد. به منظور بهبود شرایط تحرک و زنده‌مانی نماتوئدهای بیمارگر احتمالی و نیز جلوگیری از خشک شدن خاک، روزانه هر ظرف تکان داده شد و به مقدار ده سی‌سی آب مقطر استریل اضافه گردید. لاروهای سن آخر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ هریک از ظرف‌ها، هر دو روز یک بار به منظور مشاهده‌ی آلودگی احتمالی به نماتود بررسی شد. لاروهای مرده با توجه به علائم و نشانه‌های آلودگی به نماتوئدهای بیمارگر به‌ویژه رنگ لاروهای سن آخر آلوده شده با نماتوئدها (قهوه‌ای، قرمز و آجری) به‌طور انفرادی به تله‌ی وایت منتقل شدند (White 1929). بعد از یک هفته، جمع‌آوری لاروهای آلوده کننده به شکل دو روز در میان در دوره‌ی زمانی ده روزه انجام گرفت (Kaya and Stock 1997).

لاروهای آلوده کننده جمع‌آوری شده، با استفاده از آب مقطر استریل، دو بار شستشو و در لوله‌های فالكون

(۱۵۰ سی‌سی) حاوی اسفنج خرد شده‌ی استریل در دمای ده درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. به‌منظور تایید بیماری‌زایی نماتوئدهای جمع‌آوری شده، آلوده‌سازی لاروهای پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ با استفاده از نماتوئدهای دوازده روزه دو مرتبه انجام شد.

شناسایی نماتوئدهای بیمارگر

مطالعه ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی

به‌منظور گروه‌بندی اولیه‌ی نماتوئدهای بیمارگر، میانگین طول بدن لاروهای آلوده کننده اندازه‌گیری شد (Adams and Nguyen 2002). برای تهیه‌ی افراد بالغ نسل یک و دو، ابتدا ده لارو سن آخر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ با استفاده از پنجاه لارو آلوده کننده آلوده‌سازی گردید. سپس تشریح لاروهای سن آخر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ در سومین، چهارمین و ششمین روز پس از آلوده‌سازی انجام شد. افراد ماده و نر نسل یک به ترتیب در سومین و چهارمین روز و همچنین افراد بالغ نسل دو در ششمین روز فراهم گردیدند.

نماتوئدها براساس روش دگریس ۱۹۶۹، در محلول تثبیت کننده I (۸۸ سی‌سی اتانول ۹۶+ ۱۰ سی‌سی فرمالدهید + ۱ سی‌سی اسید استیک + ۱ سی‌سی گلیسرین) که تا دمای ۸۰ درجه‌ی سلسیوس گرم شده بود در محیط الکل اشباع و دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای یک شبانه روز قرار داده شد، سپس چهار ساعت در تثبیت کننده II (۹۵ سی‌سی اتانول ۹۶+ ۵ سی‌سی گلیسرین) قرار گرفتند (De Grisse 1969). پس از تخلیه محلول دوم، نماتوئدها در محلول تثبیت کننده III (۵۰ سی‌سی اتانول ۹۶+ ۵۰ سی‌سی گلیسرین) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس حداقل برای چهار ساعت نگهداری شدند تا الکل موجود در محلول تثبیت کننده کاملاً تبخیر شود و نماتوئدها در گلیسرین خالص باقی بمانند. پس از تثبیت نماتوئدها، اسلاید میکروسکوپی با استفاده از پارافین و گلیسرین تهیه گردید. سپس به‌منظور بررسی ریخت‌شناسی و ترسیم شکل، بخش‌های مختلف بدن توسط میکروسکوپ نوری مجهز به لوله‌ی ترسیم (الیمپوس مدل BH2) اندازه‌گیری و داده‌های ریخت‌شناسی با کلیدهای شناسایی استاک و هانت تطبیق داده شدند (Stock and Hunt 2005).

تعیین مشخصات مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت ژنومی بایونیر با شماره کاتالوگ K3032 انجام شد (<http://www.bioneer.com>). بدین منظور از یک فرد نماتود بالغ (ماده) استفاده گردید. نماتودها به داخل میکروتیوپ ۱/۵ سی سی منتقل و پس از دو بار شستشو با آب مقطر دو بار استریل توسط ازت مایع خرد شدند. سپس ۱۸۰ میکرولیتر بافر TL و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به تیوب حاوی نمونه اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. بقیه مراحل استخراج با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در نهایت DNA استخراج شده برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)

در بررسی حاضر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) ناحیه‌ی ژنی ITS برای نمونه‌های جمع‌آوری شده انجام شد. به‌منظور تکثیر ناحیه‌ی ITS از دو جفت آغازگر مستقیم ۱۸S (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' و معکوس ۲۸S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3')

(Vrain et al. 1992) و AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' و TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر 10-X PCR-buffer، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (25mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۳ میکرولیتر Taq پلی‌مرز (5 U/ μ l)، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم (10 pmol/ μ l)، یک میکرولیتر آغازگر معکوس (10 pmol/ μ l) و سه میکرولیتر الگو DNA بود (چرخه‌ی حرارتی واکنش PCR و شرایط واکنش در جدول ۱ آمده است).

توالی‌یابی و بررسی روابط تبارشناسی

محصول PCR به‌منظور توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره (سنول، کره جنوبی) (<http://dna.macrogen.com>) ارسال گردید. کروماتوگرام توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit 7. 0. 5. 3 بررسی و در صورت نیاز ویرایش گردید (Hall 1999). همچنین رشته‌های مستقیم و معکوس با استفاده از نرم افزار DNA Baser (نسخه‌ی دوم) سرهم شدند. مقایسه‌ی توالی با داده‌های معتبر در بانک ژن (Gene bank) از طریق nBLAST انجام پذیرفت (www.ncbi.nlm.gov).

جدول ۱. شرایط واکنش PCR برای تکثیر ناحیه‌ی ژنی ITS در جدایه‌های نماتودهای جداسازی شده

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴	۴ دقیقه	۱
واسرشت	۹۴	۶۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۶	۹۰ ثانیه	۳۵
گسترش	۷۲	۶۰ ثانیه	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

برای آنالیز تبارشناسی، تعداد بیست و پنج توالی ITS برای جنس *Steinernema* و بیست و شش توالی ITS برای جنس *Heterorhabditis* از بانک ژن (NCBI) اخذ گردید. گونه‌ی *Pellioditis typica* Stefanski با شماره دسترسی AF036946 برای جنس *Heterorhabditis* دو گونه *S. neocurtillae* Nguyen and smart و *S. intermedium* Poinar به‌ترتیب با شماره دسترسی

برای جنس *Steinernema* AF122018 و AY230172 برای جنس *Steinernema* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شدند. در ادامه توالی‌های معتبر حاصل از nBLAST با توالی‌های حاصل از این بررسی با استفاده از نرم افزار ClustalW هم‌ردیف گردید (Thompson et al. 1994). تبارنمای Neighbor_Joining با استفاده از نرم افزار MEGA 5 بازسازی شد (Saitou and Nei 1987, Thompson et al. 1994, Tamura et al. 2007).

برای آنالیز تبارشناسی، تعداد بیست و پنج توالی ITS برای جنس *Steinernema* و بیست و شش توالی ITS برای جنس *Heterorhabditis* از بانک ژن (NCBI) اخذ گردید. گونه‌ی *Pellioditis typica* Stefanski با شماره دسترسی AF036946 برای جنس *Heterorhabditis* دو گونه *S. neocurtillae* Nguyen and smart و *S. intermedium* Poinar به‌ترتیب با شماره دسترسی

یک جمعیت با میانگین اندازه‌ی بین ۶۰۰ تا ۸۰۰ میکرومتر متعلق به گروه گونه‌ای "intermedium"، سه جمعیت با میانگین اندازه‌ی بین ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومتر متعلق به گروه گونه‌ای "feltiae" می‌باشد (Stock and Hunt 2005) (جدول ۲).

جدول ۲. گروه‌بندی اولیه توسط میانگین اندازه‌ی طول بدن لاروهای آلوده کننده حشرات جدایه‌های مربوط به جنس *Steinernema*

تعداد جمعیت	گروه گونه‌ای	جنس	میانگین طول بدن لارو آلوده کننده
یک	<i>intermedium</i>	<i>Steinernema</i>	۶۰۰ تا ۸۰۰
سه	<i>feltiae</i>	<i>Steinernema</i>	۸۰۰ تا ۱۰۰۰

جدایه مورد بررسی (گونه *Steinernema feltiae* Filipjev)

ماده نسل اول

دارای کوتیکول صاف، پس از تثبیت به شکل C قرار می‌گیرند. طول بدن^۱ در ماده‌های نسل اول (۶۲۱۰-۲۳۰۰ میکرومتر) و بزرگ‌تر از نسل دوم می‌باشد. سر^۲ کوتاه، قدامی و در امتداد بدن می‌باشد. محافظه‌ی دهانی^۳ کوتاه (۵۰ میکرومتر)، پهن به همراه دیواره‌ی کوتیکولی نامشخص می‌باشد. مری کوتاه و ماهیچه‌ای^۴، لوله‌ی اولیه مری^۵ سیلندری و طول آن حدود سه برابر لوله‌ی ثانویه مری^۶، حباب میانی مری^۷ اندکی متورم و فاقد دریچه، لوله‌ی ثانویه مری مشخص و به دنبال آن حباب انتهایی^۸ گلابی شکل حاوی دریچه‌ی سه لختی تحلیل یافته می‌باشد. طول حباب انتهایی^۹ ۳۰ میکرومتر و عرض آن ۲۸ میکرومتر می‌باشد. حلقه‌ی عصبی^{۱۰} معمولاً در مجاورت لوله‌ی ثانویه یا بخش جلویی حباب انتهایی قرار دارد. منفذ دفعی ترشچی^{۱۱} در ناحیه‌ی لوله ثانویه مری و در حدود ۶۰ درصدی از طول گردن^{۱۱} به فاصله حدود ۷۷ میکرومتر از ابتدای بدن قرار دارد (منفذ دفعی ترشچی معمولاً در بخش عقبی لوله‌ی اولیه مری قرار

فواصل نوکلئوتیدی با استفاده از روش دو متغیره‌ی Kimura محاسبه گردید (Kimura 1980). آزمون بوت استرپ (هزار تکرار) به منظور ارزیابی و محاسبه‌ی میزان پایداری شاخه‌های تبارنمای محاسبه شده استفاده گردید (Felsenstein 1985).

لقاح بین گونه‌ای و درون گونه‌ای (آزمون دگر آمیزی)

به منظور تایید هویت سه جدایه‌ی بومی در گروه گونه‌ای "feltiae" (جنس *Steinernema*) لقاح درون و بین گونه‌ای بین جدایه‌های بومی و گونه‌ی مرجع "S. feltiae" (فراورده‌ی تجاری Entonem) انجام پذیرفت. برای هر جدایه سی تکرار و ده شاهد در نظر گرفته شد. آزمایش در ظروف درب دار پلاستیکی (حجم ۸ میلی لیتر) پوشیده شده با کاغذ صافی مرطوب انجام شد. به ازای هر ظرف دو عدد لارو آلوده کننده (جدایه‌ی بومی و مرجع) و یک عدد لارو سن آخر پروانه‌ی موم خوار بزرگ قرار داده شد. سپس درب ظروف به طور کامل بسته شد تا از خشک شدن کاغذ صافی جلوگیری شود. ظروف با استفاده از یک نوار پلاستیکی محکم در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در دوره‌ی زمانی سه روزه نگهداری شد. پس از سپری شدن این زمان، لاروهای سن آخر پروانه‌ی موم خوار بزرگ بررسی و اجساد به شکل جداگانه به تله‌ی وایت انتقال یافتند (Kaya and Stock 1997).

نتایج

جداسازی نامتوذهای بیمارگر از خاک

از بین پنجاه نمونه خاک جمع‌آوری شده از سه زیستگاه مختلف اطراف شهرستان بجنورد، در پنج نمونه متعلق به یک زیستگاه (ضلع جنوبی و ۱۱ کیلومتری بجنورد) وجود نامتوذهای بیمارگر تایید شد. با توجه به علائم خاص آلودگی از قبیل رنگ لاروهای سن آخر آلوده شده با نامتوذا، بیمارگری و نحوه‌ی تکثیر، چهار جمعیت منسوب به Boj1, Boj7, Boj8, Boj9 متعلق به جنس *Steinernema* و جمعیت HBoj متعلق به جنس *Heterorhabditis* تشخیص داده شد.

شناسایی نامتوذهای بیمارگر بومی

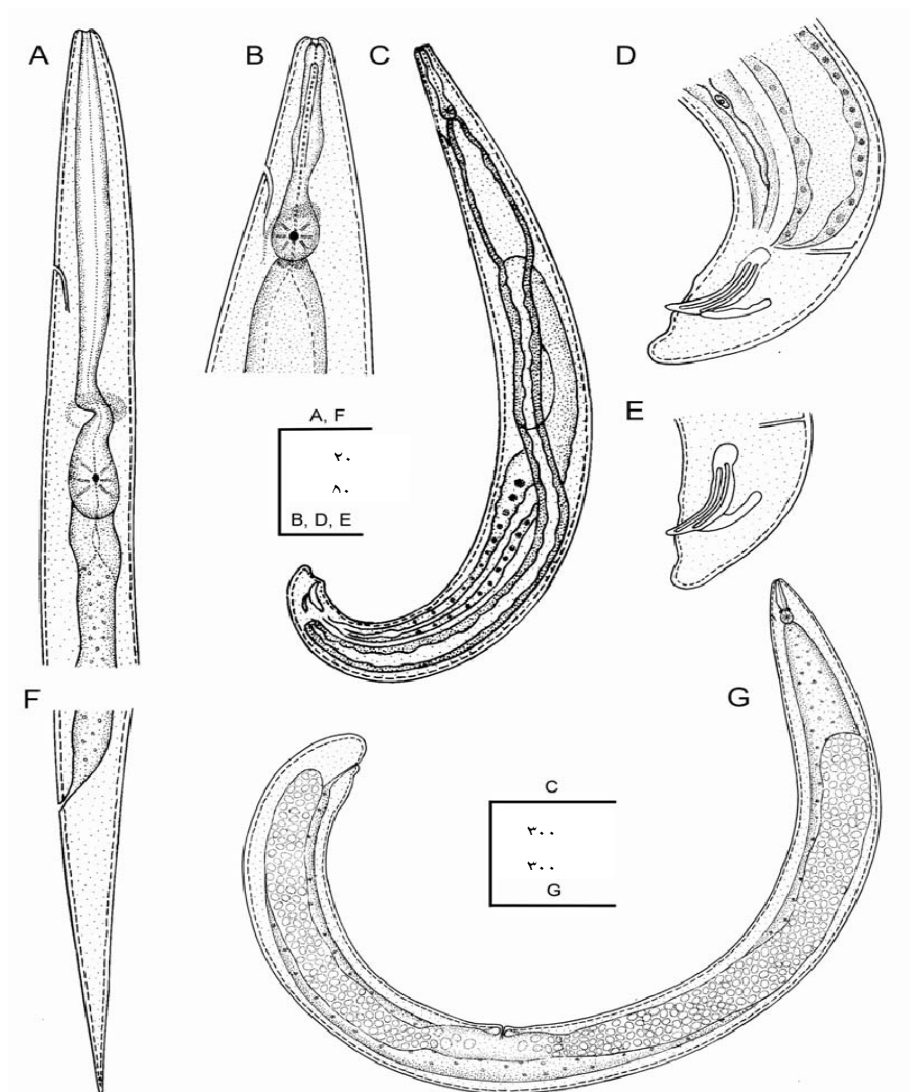
مطالعه ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی

میانگین اندازه‌ی طول بدن لاروهای آلوده کننده مشخص نمود که از بین پنج جمعیت جداسازی شده،

1. Body length
2. Head
3. Stoma
4. Pharynx
5. Procorpus
6. Isthmus
7. Median bulb
8. Terminal Bulb
9. Nerve ring to anterior end
10. Excretory pore
11. Neck

ماهیچه‌ای و حدود کمتر از نیمی از عرض بدن در همان ناحیه را اشغال نموده است. راست روده کمتر از عرض بدن در ناحیه‌ی مخرج می‌باشد. دم^۶ در ماده‌های نسل اول گرد و فاقد موکرون^۷ می‌باشد (شکل ۱) (جدول ۳).

دارد). حلقه‌ی عصبی در حدود ۸۰ درصدی از طول گردن و پایین‌تر از منفذ دفعی ترش‌چی قرار دارد. ماده‌ها دو تخمدانه^۱ و مجرای تخم‌بر^۲ توسعه یافته می‌باشد. منفذ تناسلی^۳ در بخش میانی بدن، برآمده و دارای اپیپتیگمای^۴ کوچک می‌باشد. واژن^۵ کوتاه، دارای دیواره



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی ترسیم مربوط به گونه *S. feltiae*

A: بخش جلویی لارو آلوده‌کننده، B: بخش جلویی نماتود نر، C: نمای کلی نماتود نر، D و E: دم نر، F: بخش عقبی لارو آلوده‌کننده، G: نمای کلی ماده

1. Ovary
2. Oviduct
3. Vulva to anterior end
4. Epiptygma
5. Vagina
6. Tail
7. Mucro

جدول ۳. مشخصات ریخت‌سنجی ماده‌ی نسل اول و لارو آلوده کننده چهار جدایه *S. feltiae*

Locality	لارو آلوده کننده (لارو سن سوم)							
	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد
Habitat	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک
n	۴	۴	۴	۴	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
Isolate	Boj1	Boj7	Boj8	Boj9	Boj1	Boj7	Boj8	Boj9
Body length	۲۳۰۰-۵۱۱۰	۴۳۹۰-۴۷۸۰	۴۲۰۰-۲۸۴۰	۳۹۹۰-۶۲۱۰	۷۵۰-۸۹۰	۸۹۰	۷۴۰-۸۹۰	۸۱۰-۹۰۰
	۴۰۵۲±۱۵۲۹	۴۵۳۰±۲۱۷	۳۵۲۹±۹۶۱	۵۱۰۰±۱۵۶۹	۸۳۳±۷۳		۸۴۰±۸۶	۸۷۰±۵۱
MBW	۱۸۵-۲۵۰	۲۵۰-۳۱۰	۲۳۰-۲۵۰	۱۸۲-۲۸۰	۲۰-۲۷	۳۰-۳۲	۲۵-۳۲	۲۲-۳۱
	۲۲۵±۳۵	۲۹۰±۳۴	۲۴۰±۱۴	۲۳۱±۶۸	۲۳±۳	۳۱±۱	۲۹±۳	۲۶±۴
Pharynx	۱۲۵-۱۸۲	۱۶۷-۱۷۵	۱۲۰-۱۷۲	۱۷۲-۱۸۰	۹۷-۱۳۰	۱۱۳-۱۲۶	۹۶-۱۲۶	۱۰۱-۱۱۵
	۱۵۷±۲۹	۱۷۰±۳	۱۴۶±۳۷	۱۷۹±۵	۱۱۸±۱۸	۱۱۹±۹	۱۱۱±۱۵	۱۰۶±۷
Excretory pore ant. end	۹۰-۱۱۰	۶۷-۸۵	۷۲	۷۲-۸۵	۴۸-۶۲	۶۴-۶۵	۵۲-۶۴	۵۸-۶۵
	۹۹±۱۰	۷۵±۸		۷۸±۸	۵۷±۷	۶۴±۰٫۷	۶۰±۶	۶۰±۳
Gubernaculum	-	-	-	-	-	-	-	-
Spicules	-	-	-	-	-	-	-	-
Tail	۳۷-۵۵	۴۲-۶۰	۳۲-۳۷	۳۵-۴۲	۶۰-۸۵	۷۴-۸۱	۷۴-۸۱	۸۰-۹۱
	۴۳±۱۰	۵۱±۸	۳۵±۳	۳۸±۵	۷۲±۱۲	۷۷±۴	۷۷±۳	۸۵±۵
Anus								
Vulva	۵۲-۷۷	۷۰-۹۰	۵۷-۸۷	۵۲-۷۰	-	-	-	-
	۶۳±۱۲	۸۹±۲۲	۷۲±۲۱	۶۱±۱۲	-	-	-	-
Vagina	۱۷-۳۲	۲۰-۲۷	۳۰	۱۵-۲۵	-	-	-	-
	۲۳±۸	۲۴±۳		۲۰±۷	-	-	-	-
Mucro	+	+	+	+				
D%*	۶۰٫۴-۷۲	۴۰-۴۸٫۵	۶۰	۴۲-۴۷٫۳	۴۶-۴۹	۵۱-۵۶	۵۰-۵۶	۵۰-۶۴
					۴۸±۱	۵۴±۳	۵۳±۲	۵۶±۶

*D%: نسبت فاصله‌ی منفذ دفعی ترشجی از ابتدای بدن به طول مری × ۱۰۰

سطوح جانبی نامشخص است. سر کوتاه، اندکی گرد و در امتداد بدن می‌باشد. محفظه‌ی دهانی کوتاه (۲۵ میکرومتر)، پهن به همراه دیواره‌ی کوتیکولی نامشخص می‌باشد. مری ماهیچه‌ای، لوله اولیه مری سیلندری و ۱/۵ برابر لوله‌ی ثانویه می‌باشد. حباب میانی مری اندکی متورم و فاقد دریچه، لوله‌ی ثانویه مری مشخص و به دنبال آن حباب انتهایی گلابی شکل حاوی دریچه سه لختی تحلیل یافته، به عرض ۲۹ میکرومتر و طول ۳۶٫۵ میکرومتر می‌باشد. حلقه‌ی عصبی در حدود ۷۰-۷۷ درصدی از طول گردن و معمولاً در مجاورت لوله ثانویه یا بخش جلویی حباب انتهایی قرار دارد. منفذ دفعی

ماده نسل دوم

ویژگی‌های کلی، مشابه ماده‌های نسل اول می‌باشد با این اختلاف که در نسل دوم طول بدن کوتاه‌تر، عرض بدن کمتر و سر کوتاه‌تر می‌باشد. همچنین اندازه‌ی دم در نسل دوم در مقایسه با نسل یک بلندتر، باریک‌تر و مخروطی می‌باشد.

نر نسل اول

بدن نematode پس از تثبیت به شکل J می‌باشد. بدن باریک و طول بدن در نرهای نسل یک (۱۷۶۰-۱۲۲۰ میکرومتر) بزرگ‌تر از نرهای نسل دو (۱۴۵۰-۱۰۱۰ میکرومتر) می‌باشد. سطح کوتیکول صاف، شیارهای

گوبرناکولوم^۵ بلند به طول ۲۲-۵۵ میکرومتر و حدود نصف اسپیکول، که ابتدای آن گرد و در انتها نوک تیز می‌باشد. دم مخروطی، در برخی نمونه‌ها گرد و دارا یا فاقد موکرون می‌باشند (شکل ۱) (جدول ۴).

ترش‌چی مشخص، در محل اتصال حباب میانی با ایسموس و به فاصله ۹۷-۶۲ میکرومتر از ابتدای بدن و حدود ۶۰ درصدی از طول گردن قرار دارد. بیضه^۱ دارای برگشتی، اسپیکول^۲ اندکی خمیده به طول ۶۷-۱۰۵ میکرومتر، فاقد بورس^۳، مانوبریوم^۴ صاف در برخی گرد،

جدول ۴. مشخصات ریخت‌سنجی نر نسل اول و دوم ۴ جدایه *S. feltiae*

Locality	نسل اول				نسل دوم			
	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد	بجنورد
Habitat	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک	خاک
n	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
Isolate	Boj1	Boj7	Boj8	Boj9	Boj1	Boj7	Boj8	Boj9
Body length	۱۴۹۰-۱۷۶۰	۱۴۵۰-۱۵۷۰	۱۲۲۰-۱۳۸۰	۱۲۴۰-۱۶۵۰	۱۰۱۰-۱۱۸۰	۱۱۰۰-۱۳۰۰	۱۳۴۰-۱۴۵۰	۱۳۵۰-۱۰۸۰
	۱۶۲۶±۱۳۵	۱۵۲۳±۶۴	۱۲۷۳±۹۲	۱۴۲۹±۲۰۷	۱۰۹۰±۸۵	۱۱۹۰±۱۰۱	۱۳۸۳±۵۸	۱۲۲۳±۷۸
MBW	۱۲۰-۱۵۰	۱۲۰-۱۴۰	۶۲-۹۷	۱۱۲-۱۳۷	۶۵-۹۲	۶۷-۹۵	۱۰۰-۲۳۴	۶۷-۱۰۷
	۱۳۵±۱۵	۱۲۶±۱۱	۸۳±۱۸	۱۲۵±۱۲	۷۵±۱۴	۸۲±۱۳	۱۵۴±۷۰	۸۱±۱۲
Pharynx	۱۵۰-۱۵۵	۱۳۵-۱۵۲	۱۱۲-۱۴۷	۱۰۵-۱۵۷	۱۲۰-۱۳۵	۱۱۲-۱۶۵	۱۱۲-۱۴۷	۱۴۷-۱۵۲
	۱۵۲±۲		۱۳۳±۱۸	۱۲۸±۲۶	۱۲۷±۷	۱۳۸±۲۶	۱۲۸±۱۷	۱۴۹±۲
Excretory pore ant. end	۹۰-۹۷	۹۰-۹۷	۸۵-۹۵	۸۷-۶۲	۵۵-۸۰	۶۷-۷۲	۹۲-۷۵	۹۱-۹۵
	۹۲±۴	۱۴۵±۹	۸۸±۵	۷۵±۱۲	۶۵±۱۳	۷۰±۳	۸۴±۸	۹۲±۲
Gubernaculum	۳۵-۴۷	۳۵-۵۵	۳۰-۴۰	۲۲-۴۲	۲۵-۳۲	۴۰-۴۵	۳۲-۴۰	۴۲-۳۲
	۴۱±۶	۴۳±۱۰	۳۷±۵	۳۰±۱۰	۲۸±۳	۴۲±۲	۳۵±۴	۳۷±۵
Spicules	۷۲-۸۷	۷۰-۱۰۵	۶۷-۷۰	۶۷-۷۲	۶۲-۷۰	۵۵-۷۵	۷۰-۸۲	۵۷-۷۲
	۷۹±۴	۸۵±۱۷	۶۸±۱	۶۹±۲	۶۵±۳	۶۶±۱۰	۷۸±۷	۶۴±۷
Tail	۳۰	۲۵-۳۰	۲۲-۳۰	۲۲-۲۷	۲۰-۲۵	۲۰-۳۵	۲۲-۳۰	۲۲-۳۲
	۳۰	۲۷±۲,۵	۲۶±۳	۲۵±۲	۲۲±۲	۲۶±۷	۲۶±۳	۲۹±۵
Anus	۳۲-۴۵	۴۰-۴۵	۳۵-۴۷	۳۰-۴۲	۲۷-۳۷	۳۲-۴۷	۳۵-۴۵	۳۰-۴۰
	۴۱±۶	۴۳±۲	۳۹±۷	۳۵±۶	۳۱±۵	۳۹±۷	۳۸±۵	۳۵±۵
Vulva	-	-	-	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucro	-	-	-	-	-	-	-	-
D%	۵۸-۶۳	۶۳-۶۶	۵۷-۷۵	۴۹-۷۱	۴۴-۶۲	۴۳-۶۰	۵۱-۸۲	۶۱-۶۲
	۶۰±۳	۶۵±۱	۶۶±۹	۶۰±۱۱	۵۰±۱۰	۵۱±۱۱	۶۷±۱۵	۶۱±۰,۵

*D%: نسبت فاصله منفذ دفعی ترش‌چی از ابتدای بدن به طول مری ۱۰۰×

1. Testis
2. Spicules
3. Bursa
4. Manubrium
5. Gubernaculum

نرهای نسل دوم

ویژگی‌های کلی مشابه نرهای نسل اول می‌باشد (جدول ۴).

لاروهای آلوده‌کننده

نمونه‌ها پس از تثبیت، معمولاً راست و در ناحیه‌ی شکمی اندکی خمیده هستند. بدن استوانه‌ای به طول ۹۰۰-۷۴۰ میکرومتر می‌باشد. بدن آنها از ابتدای مری تا انتهای بخش جلویی بدن^۱ و از فضای مجاور مخرج^۲ تا انتهای دم کمی باریک‌تر می‌شود. سر کوتاه و در امتداد بدن، شیارهای سطوح جانبی^۳ ۹ عدد، محفظه‌ی دهانی کوتاه، ناحیه‌ی لب صاف و در امتداد بدن، مری بلند و کشیده به طول ۹۶-۱۳۰ میکرومتر و دارای لوله اولیه مری گسترش یافته است. لوله اولیه مری ۴-۳ برابر لوله ثانویه مری می‌باشد. لوله ثانویه مری باریک و حباب انتهایی مری گلابی شکل دارای دریچه سه لختی تحلیل یافته می‌باشد. طول حباب انتهایی حدود ۱۷ میکرومتر و عرض آن حدود ۱۱ میکرومتر می‌باشد. حلقه‌ی عصبی مشخص، در حدود ۷۵-۸۰ درصدی از طول گردن و در ناحیه لوله ثانویه مری قرار گرفته است. منفذ دفعی ترشچی بین بخش جلویی بدن^۴ قرار گرفته و حدود ۶۵-۴۸ میکرومتر از ابتدای بدن فاصله دارد و در حدود ۴۸-۵۰ درصدی از طول گردن می‌باشد. کیسه‌ی باکتریایی توسعه یافته، در بخش جلویی روده، نزدیک کاردیای^۵ می‌باشد. راست روده حدود نیمی از عرض بدن در همان ناحیه را اشغال نموده است. دم مخروطی بلند (۹۱-۶۰ میکرومتر) و فاسمید نامشخص می‌باشد (شکل ۱) (جدول ۳).

نتایج نشانگر این بود که چهار جدایه‌ی Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با گونه‌ی *Steinernema feltiae* Filipjeve بیشترین نزدیکی را دارد. چهار جدایه‌ی Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 به‌عنوان گونه‌ی *S. feltiae* از خانواده‌ی Steinernematidae شناسایی گردید.

مشخصات مولکولی جدایه‌ها

تکثیر و توالی‌یابی نواحی ژنی ITS در جدایه‌ها نشان داد که طول ناحیه‌ی ITS برای جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8، Boj9 و HBoj به ترتیب ۹۱۶، ۹۱۶، ۹۱۶ و ۷۹۵ جفت باز (bps) می‌باشد. داده‌های مرتبط با توالی ناحیه‌ی ژنی ITS، گروه‌بندی اولیه و ریخت‌شناسی چهار جدایه‌ی فوق را تایید کرد.

تجزیه و تحلیل بلاست نوکلئوتیدی^۶ توالی‌های به‌دست آمده، بیانگر شباهت جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با گروه گونه‌ی "*feltiae*" جنس "*Steinernema*" و جدایه‌ی HBoj با گروه گونه‌ی "*bacteriophora*" جنس "*Heterorhabditis*" می‌باشد.

توالی ناحیه‌ی ITS جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با جدایه‌های *S. feltiae* FUM1 با شماره دسترسی JF920964، Arak7 با شماره دسترسی JF920962، Arak3 با شماره دسترسی JF358016 و Armenia با شماره دسترسی AY171256 ۱۰۰-۹۹ درصد شباهت را نشان دادند. همچنین توالی ITS جدایه‌ی HBoj مربوط به گروه گونه‌ی "*bacteriophora*"، ۹۹ درصد شباهت را با توالی جدایه‌ی *H. bacteriophora* BGKB-1/2007 با شماره دسترسی JX993984 نشان داد.

بررسی ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت نوکلئوتیدی چهار جدایه‌ی منسوب به گروه گونه‌ی "*feltiae*" با سایر گونه‌های جنس *Steinernema* نشان داد که چهار جدایه‌ی Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 کمترین فاصله را با سایر جدایه‌های گونه‌ی *S. feltiae* دارد. همچنین برای جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 فاصله‌ی نوکلئوتیدی درون‌گونه‌ای مشاهده نشد. تبارنمای بازسازی شده مربوط به ناحیه‌ی ITS نشان داد که جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با سایر جدایه‌های گونه‌ی *S. feltiae* با میزان بوتسترپ بالا در یک شاخه قرار گرفتند (شکل ۲). همچنین جدایه‌ی HBoj مربوط به ناحیه‌ی ITS با میزان اعتماد بالایی با سایر جدایه‌های *H. bacteriophora* در یک شاخه قرار

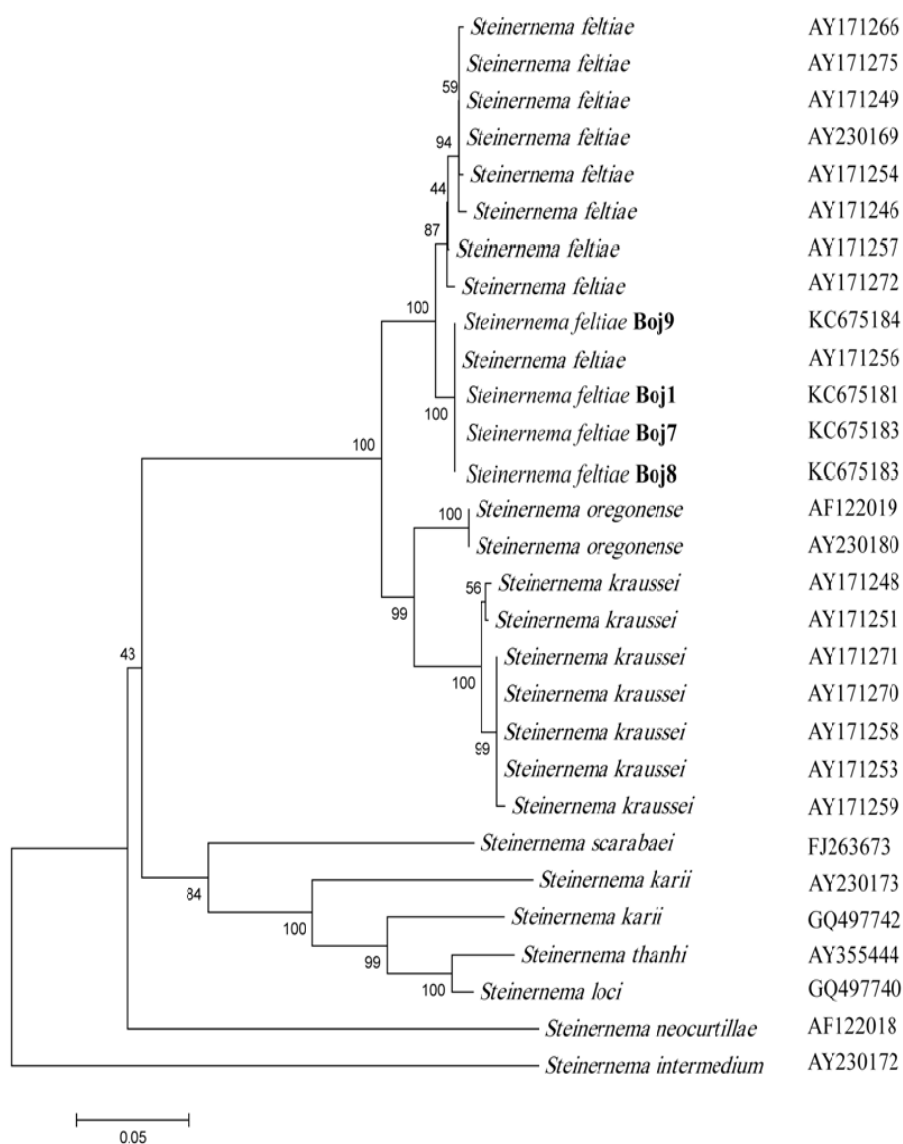
1. Anterior end
2. Anal
3. Lateral field
4. Corpus
5. Cardia

گرفتند (شکل ۳). توالی‌های حاصل از این بررسی در بانک ژن NCBI ثبت گردید (جدول ۵).

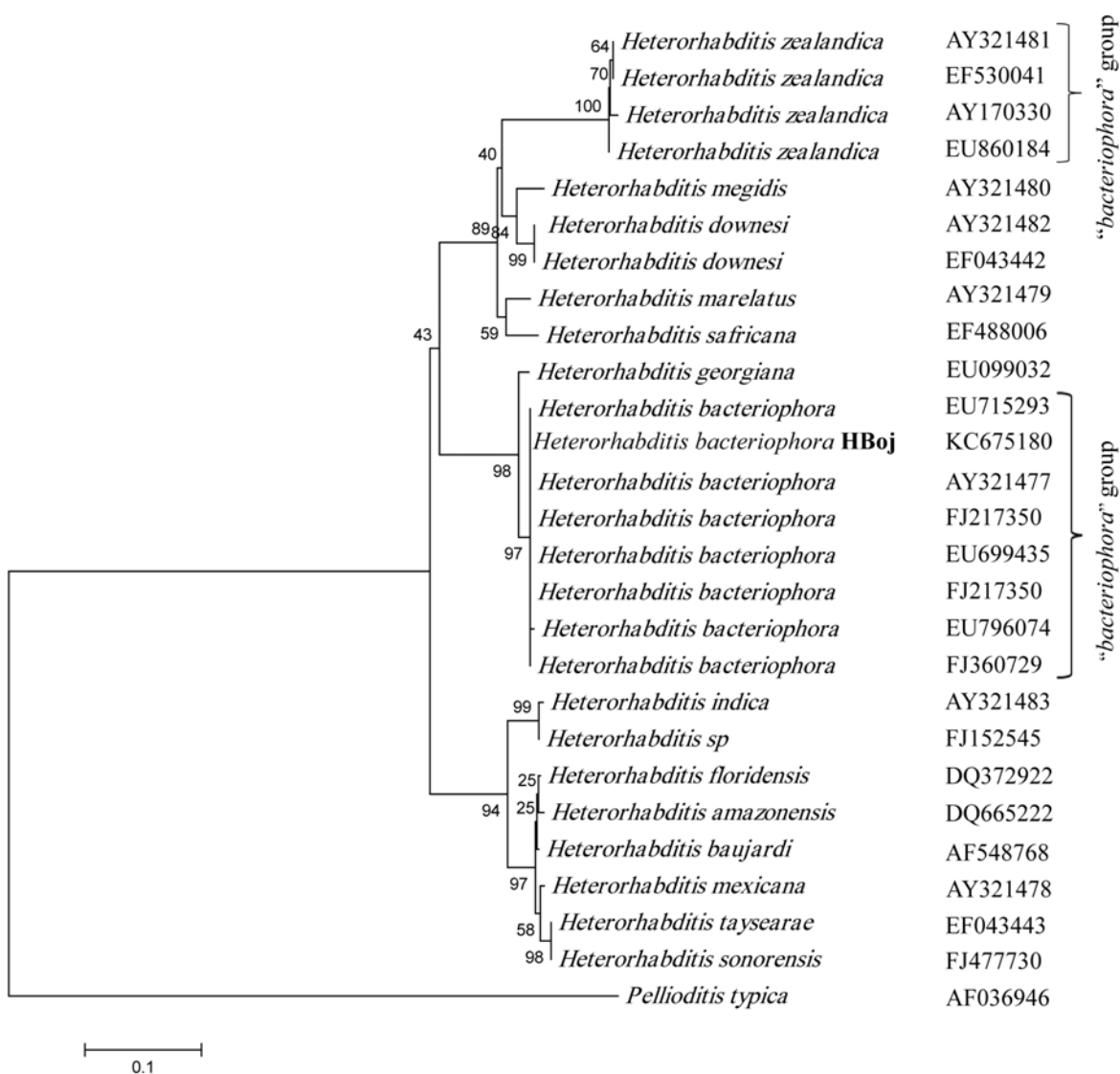
لقاح بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای (آزمون دگرآمیزی) آزمون لقاح درون و بین‌گونه‌ای در تمام موارد با نتایج مربوط به تحلیل‌های نسب‌زایی و کلاسیک هماهنگ نبود. از این‌رو لقاح درون و بین‌گونه‌ای جدایه‌های Boj1، Boj7، Boj8 و Boj9 با گونه‌ی مرجع *S. feltiae* (استفاده شده از فرآورده‌ی تجاری Entonem) موید آن بود که جدایه‌ی اول (Boj1) به گونه‌ی *S. feltiae* و سه جدایه‌ی دیگر (Boj7، Boj8 و Boj9)، به جنس "*Steinernema*" تعلق دارند.

جدول ۵. شماره‌ی دسترسی ثبت‌شده مربوط به نواحی ژنی

شماره‌ی دسترسی	گونه‌ی نماتود
KC675181	<i>S. feltiae</i> Boj 1
KC675182	<i>S. feltiae</i> Boj 7
KC675183	<i>S. feltiae</i> Boj 8
KC675184	<i>S. feltiae</i> Boj 9
KC675180	<i>H. bacteriophora</i> HBoj



شکل ۲. تبارنمای بازسازی شده بر مبنای ژن ITS در جنس *Steinernema* به روش NJ. گونه *Steinernema intermedium* گروه خارجی بوده و اعداد کنار گره معرف میزان بوت استراپ می‌باشد.



شکل ۳. تبارنمای بازسازی شده بر مبنای ژن ITS در جنس *Heterorhabditis* به روش NJ. گونه *Pellioditis typica* به عنوان گروه خارجی انتخاب گردید و اعداد کنار گره مبین مقادیر بوت استراپ می باشد.

جنس *Heterorhabditis* و (۱۰ نمونه) ۱/۲ درصد دارای جنس *Steinernema* بود. حسنی کاخکی و همکاران ۱۳۹۱ نیز زیستگاه‌های مختلف منطقه‌ی مشهد را بررسی و از بین ۲۶۰ نمونه خاک تنها پنج نمونه (۱ درصد) دارای نامتود بیمارگر بود (Eivazian Kary et al. 2009, Hassani kakhki et al. 2012).

تشخیص صحیح گونه‌ها و یا جدایه‌های نامتوذهای بیمارگر حشرات به دلیل سازگاری جدایه‌ی نامتود با حشره یا شرایط زیست محیطی مورد نظر می‌تواند برای موفقیت در برنامه‌های کنترل بیولوژیک مهم باشد

بحث

در بررسی حاضر از پنجاه نمونه خاک جمع‌آوری شده پنج نمونه دارای نامتوذهای بیمارگر حشرات بود. فراوانی نامتوذهای بیمارگر از زیستگاه‌های مختلف زراعی و غیر زراعی استان‌های تهران، مازندران و گلستان از بین ۷۸ نمونه خاک جمع‌آوری شده (به ترتیب تعداد ۳۸، ۳۰ و ۱۰ نمونه) ۰/۴ درصد بود (Tanha Maafi et al. 2006). عیوضیان کاری و همکاران از ۸۳۳ نمونه خاک مورد بررسی، (۲۷ نمونه) ۳/۲ درصد را برای وجود نامتوذهای بیمارگر گزارش نمودند که (۱۷ نمونه) ۲ درصد دارای

مولکولی به‌عنوان مکمل روش‌های کلاسیک استفاده گردید.

در دو دهه‌ی اخیر بسیاری از نماتودهای بیمارگر با کمک مارکرهای مولکولی شناسایی و توصیف شده‌اند (Liu and Berry 1996, Stock and Hunt 2005). این روش‌ها نه‌تنها اهمیت ویژه‌ای برای تفکیک گونه‌های نماتود دارند بلکه جهت برآورد روابط تبارشناسی در سطوح مختلف رده‌بندی نیز ارزشمند می‌باشند (Dorris et al. 1999, Blaxter 2003, Kumari and Lišková 2009, Stock 2009) از نواحی هسته‌ای که در جهت شناسایی نماتودهای بیمارگر استفاده می‌شود می‌توان به ژن‌های ۱۸S (زیرواحد کوچک)، ۲۸S (زیرواحد بزرگ) و ITS اشاره نمود (Blaxter et al. 1998, Liu et al. 1999, Szalanaski et al. 2000, Stock et al. 2001, Adams and Nguyen, 2002). زیرواحد کوچک ریبوزومی، ژن rDNA (۱۸S) اهمیت ویژه‌ای در تعیین هویت نمونه‌های ناشناخته نماتودها دارد (Blaxter et al. 1998). این زیر واحد به‌دلیل ماهیت حفاظت شده با سرعت کمی تکامل می‌یابد، از این‌رو در بررسی طبقه‌بندی در سطح خانواده استفاده می‌شود (Stock and Hunt 2005). ناحیه‌ی ITS در DNA ریبوزومی مارکری مهم در تفکیک گونه‌های جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* می‌باشد (Adams et al. 1998, Szalanaski et al. 2000, Nguyen et al. 2001). D2/ D3 (بخشی از توالی ناحیه‌ی ۲۸S) نیز در تعیین هویت نماتودهایی که قرابت چندانی با هم ندارند استفاده می‌شود (Stock et al. 2001, Stock 2009).

در این بررسی جهت شناسایی مولکولی پنج جمعیت Boj1, Boj7, Boj8, Boj9 و HBoj و بررسی روابط بین گونه‌های جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* از ناحیه‌ی ریبوزومی ITS استفاده گردید. به‌نظر می‌رسد ناحیه‌ی ITS در بین گروه‌های پنج‌گانه‌ی *Steinernema* متغیر بوده و ممکن است این اختلاف در بین افراد یک گونه نیز مشاهده گردد. از این‌رو این ناحیه‌ی ژنی نمی‌تواند برای تمایز کلیه‌ی گونه‌های *Steinernema* مارکری مناسب باشد (Stock 2009).

در بررسی جاری از ناحیه‌ی ITS برای تمایز جدایه‌های جمع‌آوری شده نماتودهای بیمارگر استفاده گردید. لازم به ذکر است که ناحیه مذکور در برخی

(Stock 2009). علاوه‌بر این، تجاری کردن این عوامل و حقوق انحصاری برای استفاده از ثبت اختراع و دیگر مسائل قانونی در رابطه با استفاده و کاربرد نماتودهای بیمارگر نیازمند شناسایی دقیق این عوامل بیمارگر می‌باشد (Stock 2009).

در روش‌های کلاسیک برای تعیین هویت گونه‌ها ساختارهایی مانند حفره‌ی دهان، لب، مری، روده، سیستم تولید مثل، اندام‌های حسی و دم توسط میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری می‌شود که این، فرایندی مشکل و گاه شک برانگیز می‌باشد (Dorris et al. 1999, Abebe et al. 2011). به‌نظر می‌رسد با افزایش تعداد گونه‌های شناسایی شده، روش‌های کلاسیک از قبیل ریخت‌شناسی مقایسه‌ای در شناسایی یا رده‌بندی نماتودهای بیمارگر به‌دلیل کاهش تنوع در خصوصیات ظاهری استفاده‌ی بهینه ندارد (Campos-Herrera et al. 2012). به‌علاوه، صفات مذکور تنها برای شناسایی مناسب هستند و فاقد هر گونه ارزش تبارشناسی می‌باشند.

برای شناسایی نماتودهای بیمارگر در کنار روش کلاسیک، آزمایش لقاح درون و بین‌گونه‌ای مبتنی بر زیست‌شناسی گونه می‌تواند در تشخیص گونه‌های جنس *Steinernema* موفق باشد. با این وجود نتایج حاصل نیز ممکن است با نتایج مربوط به تحلیل‌های نسب‌زایی و کلاسیک همخوانی نداشته باشد. زیرا دو جدایه متعلق به یک گونه ممکن است به‌دلیل وجود فاصله‌ی جغرافیایی یا سایر عوامل، لقاح نداشته باشند اما این نمی‌تواند موید این باشد که دو جدایه‌ی مذکور متعلق به یک گونه نمی‌باشد. مسئله‌ی دیگر موضوع احتمال نفوذ یک لارو آلوده کننده از هر جدایه به بدن میزبان مورد نظر می‌باشد. از این‌رو ممکن است تک فردی که از یک جدایه به‌همراه فردی دیگر از جدایه‌ی دیگر جهت ارزیابی دگرآمیزی استفاده می‌شود، بنا به دلایل مختلف شناسی برای ورود به میزبان پیدا نکند. در این شرایط نیز به‌دلیل عدم نفوذ و همچنین عدم تولیدمثل این دو جدایه، احتمالاً محقق در تعیین صحیح گونه با مشکل مواجه می‌شود (Nguyen et al. 2006). بنابراین برای حل مشکلاتی از قبیل شناسایی اعضای یک گونه و تمایز گونه‌هایی که ریخت‌شناسی مشابه دارند، از روش‌های

اردبیل، آذربایجان شرقی و مشهد (Tanha Maafi et al. 2006, Eivazian Kary et al. 2009, Karimi et al. 2009, Nikdel et al. 2010, Saffari 2011, Hassani 2012, kakhki et al. 2012) و *H. bacteriophora* از آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، تهران، اراک و مشهد (Parvizi et al. 1998, Eivazian Kary et al. 2009, Karimi and Kharazi-pakdel 2007, Ashtari et al. 2011, Hassani 2012) گزارش شده است.

در بین گونه‌های متعلق به جنس *Heterorhabditis*، *H. bacteriophora* دارای گستردگی وسیعی در آمریکا، بخش‌های جنوبی و مرکزی اروپا، استرالیا و شرق آسیا می‌باشد (Burnell and Stock 2000).

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت حمایت از اجرای تحقیق به عنوان بخشی از پایان نامه نگارنده اول تشکر و قدردانی می‌شود.

موارد توانایی تفکیک گونه‌های نامتود بیمارگر را ندارد، در این موارد ژن ۲۸S که توالی آن در گونه‌های مختلف در مقایسه با ناحیه‌ی ITS از پایداری بیشتری برخوردار است استفاده می‌شود (Stock and Hunt 2005). این ناحیه نیز در تعیین هویت نامتوهای بیمارگر جنس *Steinernema* استفاده شده است. استاک و همکاران برای نخستین بار از این ناحیه در جهت بررسی مولکولی نامتوهای بیمارگر استفاده نمودند (Stock et al. 2001).

در مطالعه‌ی جاری چهار جدایه از گونه‌ی *S. feltiae* و یک جدایه از گونه‌ی *H. bacteriophora* از خاک‌های مربوط به مناطق مورد بررسی جداسازی گردید. به نظر می‌رسد گونه‌ی *S. feltiae* در مقایسه با سایر گونه‌های جنس *Steinernema* گسترش جهانی دارند. در مقابل، سایر گونه‌های جنس *Steinernema* پراکنش جغرافیایی محدودتری دارند (Griffin et al. 2005). تا به امروز گونه‌ی *S. feltiae* از استان‌های تهران، مازندران، همدان،

REFERENCES

- Ashtari M, Karimi J, Rezapanah MR, Hassani-kakhki M (2011) Biocontrol of leopard moth, *Zeuzera pyrina* L. (Lep.: Cossidae) using entomopathogenic nematodes in Iran. IOBC/wprs Bulletin 66: 333-33.
- Abebe E, Mekete T, Thomas WK (2011) A critique of current methods in nematode taxonomy. African Journal of Biotechnology 10(3): 312-323.
- Adams BJ, Burnell AM, Powers TO (1998) A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. Journal of Nematology 30(1): 22-39.
- Adams BJ, Fodor A, Klein MG, Smith HL, Stackebrandt E, Stock SP (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. Biological Control 37(1): 32-49.
- Adams BJ, Nguyen KB (2002) Taxonomy and systematic, In: Gaugler R (ed.), Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, Oxon, New York. pp. 1-34.
- Bedding RA, Akhurst RJ (1975) A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21(1): 109-116.
- Blaxter M (2003) Counting angels with DNA. Nature 421(6919): 122-124.
- Blaxter ML, de Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas K (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature 392(6671): 71-75.
- Burnell MA, Stock SP (2000) *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. Nematology 2(1): 31-42.
- Campos-Herrera R, El-Boral FE, Duncan LW (2012) Real-time PCR as an effective technique to assess the impact of phoresy by *Paenibacillus* sp. bacteria on *Steinernema diaprepesi* nematodes in nature. Molecular Ecology 12(5): 885-893.
- Campos-Herrera R, Gutiérrez C (2009) A laboratory study on the activity of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) Rioja strain against horticultural insect pests. Journal of Pest Science 82(3): 305-309.
- Canhilar R, Carner GR (2006) Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in South Carolina. Journal of Agricultural and Urban Entomology 23(3): 159-166.
- De Grisse, A. (1969). Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des

- nematodes phytoparasitaires. Mededelingen van de Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen Gent 34: 351-369.
- Dorris M, De Ley P, Blaxter ML** (1999) Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today* 15(5): 188-193.
- Eivazian Kary N, Niknam Gh, Griffin CT, Mohammadi SA, Moghaddam M** (2009) A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the North-West of Iran. *Nematology* 11(1): 107-116.
- Felsenstein J** (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791.
- Georgis R, Kaya HK, Gaugler R** (1991) Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 20(3): 815-22.
- Glazer I, Lewis EE** (2000) Bioassays of entomopathogenic nematodes, In: Navon A, Ascher KRS (ed.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. New York: CABI Publishing. pp. 229-247.
- Berryman AA** (1999) Principles of population dynamics and their application. Stanley Thornes, UK.
- Grewal PS, Ehlers RÜ, Shapiro-Ilan D** (2005) Nematodes as biocontrol agents. CABI, New York, NY.
- Griffin CT, Boemare NE, Lewis EE** (2005). Biology and behavior, In: Grewal PS, Ehler RÜ, Shapiro-Ilan D (ed.), *Nematode as biocontrol agents*. CABI, Wallingford, UK. pp. 47-64.
- Hassani-Kakhki M, Karimi J, Hosseini M** (2012) Efficacy of entomopathogenic nematodes against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology* 23(2): 146-159.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, In: *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41. pp. 95-98
- Hominick WM** (2002) Biogeography, In: Gaugler R (ed.), *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Oxon, New York.
- Karimi J, Kharazi-pakdel A** (2007) Incidence of natural infection of the white grub *Polyphylla olivieri* (Coleoptera: Scarabaeidae) with entomopathogenic nematodes in Iran. *Bulletin OIL Bsrop* 30(1): 35-39.
- Karimi J, Kharazi-pakdel A, Yoshiga T** (2009) Insect pathogenic nematode, *Steinernema feltiae* from Iran. *IOBC/wprs Bulletin*, 45: 409-412.
- Kaya HK, Stock SP** (1997) Techniques in insect nematology, In: Lacey LA (ed), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London. pp. 281-324
- Kimura M** (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Kumari S, Lišková M** (2009) Molecular confirmation of *Xiphinema italiae* Meyl, 1953 (Nematoda: Longidoridae) from the Slovak Republic. *Helminthologia* 46(2): 131-134.
- Lacey LA, Unruh TR** (2005) Biological control of codling moth (*Cydia Pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia* 12(1): 33-60.
- Liu J, Berry RE** (1996) Phylogenetic analysis of the genus *Steinernema* by morphological characters and randomly amplified polymorphic DNA fragments. *Fundamental and Applied Nematology* 19(5): 463-469.
- Nikdel M, Niknam G, Griffin CT, Eivazian Kary N** (2010) Diversity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from Arasbaran forests and rangelands in north-west Iran. *Nematology* 12(5): 767-773.
- Nguyen KB, Maruniak J, Adams B J** (2001) Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology* 33(2/3): 73- 82.
- Nguyen KB, Malan AP, Ugur G** (2006) *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* 8(2): 157-175.
- Parvizi R, Barouti Sh, Adldost H** (1998) Entomopathogenic nematodes on cutworms in West Azerbaijan. In: the 13th Iranian Plant Protection Congress, 23-27 Aug., Campus of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj. In Persian.
- Parvizi R, Barooti SH, Adldost H** (1994) Report on occurrence of entomopathogenic nematodes from Iran. *Applied Entomology and Phytopathology* 62(1): 1-2. In Persian.
- Poinar GO** (1990) Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In: Gaugler R, Kaya HK (ed.), *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 23-62
- Saffari T** (2012) Efficacy of Entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* against developmental stages of Onion Thrips in laboratory. MSc Thesis, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. [In persian].

- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Shapiro-Ilan D, Gouge DH, Piggott SJ, Patterson Fife J** (2006) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control* 38(1): 124-133.
- Stock SP** (2009) Molecular approaches and taxonomy of insect parasitic and pathogenic nematodes, 0 In: Stock SP, Vandenberg J, Boemare N, Glazer I (ed.), *Molecular Approaches and Techniques*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 74-10
- Stock SP, Campbell JF, Nadler SA** (2001) Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87(4): 877-889.
- Stock SP, Hunt DJ** (2005) Nematode Morphology and Systematics, In: Grewal PS, Ehlers RÜ, Shapiro-Ilan D (ed.), *Nematodes as Biological Control Agents*. CAB International. pp. 3-43.
- Szalanaski AP, Taylor DB, Mullin PG** (2000) Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditidae: Steinernematidae). *Journal of Nematology* 32(2): 229- 223.
- Tanha Ma'afi Z, Ebrahimi N, Abootorabi E, Spiridonov S E** (2006) Record of two Steinernematid species from Iran. In: the 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Campus of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj. 482. In Persian.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Vrain TC, Wakarchuk DA, Levesque AC, Hamilton RI** (1992) Intra specific rDNA restriction fragment length polymorphisms in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental Applied Nematology* 15(6): 563-574.
- White GF** (1929) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66(1709): 302-303.