اطلاعات جدید در باره نماتودهای بیمارگر حشرات ایران با استناد به مطالعه نواحی ژنی ITS و 28S

مهناز حسنی کاخکی، جوادکریمی *، ریحانه درسویی، ابراهیم شکوهی [۱]

*مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، جواد کریمی

پست الکترونیک: jkb@um.ac.ir

- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، استادیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، استادیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

چکیده

نماتودهای بیمارگر حشرات گروهی از عوامل کنترل بیولوژیک هستند که مطالعه و کاربرد آن‌ها، رویکردی جدید در قالب برنامه‌های مدیریت آفات می باشد. با توجه به اهمیت بررسی گونه‌های بومی این عوامل، مطالعه حاضر در راستای شناخت جمعیت‌های موجود در منطقه مشهد انجام گرفت. از بین ۲۰۰ نمونه‌ای که در سال ۱۳۸۹ از هشت زیستگاه متفاوت در منطقه مشهد جمع‌آوری شد، هفت جمعیت نماتود با روش تله گالریا جداسازی گردید. از این میان دو جمعیت موسوم به FUM1 و FUM2 به گروه گونه‌ای "*feltiae*" از جنس *Steinernema* تعلق داشت. توالی‌یابی ناحیه ژنی ITS و مقایسه این توالی با بانک اطلاعات (Nblast)، مؤید شباهت بیش از ۹۹ درصد این دو جمعیت به گونه *Steinernema feltiae* بود. در بررسی روابط شجره شناختی نیز دو جدایه مذکور در شاخه‌ای قرار گرفتند که جدایه‌های دیگر *S. feltiae* قرار داشتند. مطالعه توالی لوب‌های D2/D3 ناحیه 28S نیز تأیید کننده این مسأله بود. پنج جمعیت دیگر با استناد به بررسی های مورفولوژیکی و مولکولی ناحیه ITS به عنوان گونه *Pristionchus pacificus* Sommer, Carta, Kim & Sternberg, 1996 که گونه ای آزادی‌زی و باکتری خوار متعلق به راسته Rhabditida است معرفی می‌شود. این اولین گزارش از جنس و گونه اخیر از ایران می‌باشد.

کلمات کلیدی: نماتودهای بیمارگر حشرات، ITS، D2/D3، مشهد، *Pristionchus pacificus*

مقدمه

نماتودهای بیمارگر حشرات (entomopathogenic nematodes) متعلق به دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae می‌باشند. دو جنس معمول این دو خانواده شامل *Steinernema* و *Heterorhabditis* بوده که به ترتیب با دو جنس باکتری *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* دارای رابطه همزیستی اختصاصی هستند. تنها مرحله آزادزی این نماتودها لارو سن سوم موسوم به لارو عفونت‌زا است که پس از یافتن میزبان مناسب، از طریق منافذ طبیعی بدن (مخرج، روزنه‌های تنفسی و دهان) و یا جلد بدن به هموسل میزبان نفوذ می‌نماید. در هموسل میزبان، نماتود، باکتری‌های همزیست خود را رها می‌سازد که به دلیل عفونت خونی ایجاد شده توسط این باکتری‌ها، میزبان طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت از پای در می‌آید. لاروهای سن سوم نماتود از باکتری‌ها و همچنین بافت میزبان که بوسیله باکتری‌ها تجزیه شده تغذیه نموده و تبدیل به لارو سن چهار و سپس نماتود بالغ می‌شوند. پس از کامل شدن

دو تا سه نسل نماتود در لاشه میزبان، لاروهای عفونت‌زا نسل سوم از لاشه خارج شده و میزبانی جدید را جستجو می‌نمایند (Grewal et al. 2008).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به مطالعه نماتودهای بیمارگر حشرات به منظور استفاده از آن‌ها در کنترل بیولوژیک معطوف شده است (Burnell and Stock, 2000). برخی خصوصیات از قبیل دامنه میزبانی وسیع، مرگ سریع میزبان، عدم ایجاد مقاومت در آفت هدف، تخصص میزبانی، توانایی جستجوی فعال میزبان، تولید تجاری آسان در محیط زنده و غیر زنده، کاربرد آسان، تأثیر طولانی مدت، سازگاری با بسیاری از حشره‌کش‌های شیمیایی، ایمن بودن از لحاظ محیطی و عدم نیاز به تجهیزات خاص به منظور کاربرد باعث شده که نماتودهای بیمارگر حشرات به عنوان عواملی مطلوب در برنامه‌های کنترل بیولوژیک شناخته شوند (Canhilal and Carner ؛ Kurtz et al. 2009 2006). این نماتودها از عوامل مهم کنترل بیولوژیک آفات خاک‌زی (سوسک‌های ژاپنی، آبدزدک‌ها و سرخرطومی‌های ریشه) و شاخ و برگ‌زی از قبیل *Amyelois transitella*، کرم سیب، پروانه‌های زنبور مانند و کرم خراط که دارای زیستگاه مخفی (داخل گیاه) هستند دارند (Canhilal and Carner 2006).

این گروه از نماتودها از مناطقی با شرایط اکولوژیکی متفاوت مانند زمین‌های زراعی، جنگل‌ها، چمن‌زارها، بیابان‌ها و سواحل اقیانوس‌ها گزارش شده اند (Shahina et al. 2004). لازم به ذکر است گونه‌ها و نژادهای نماتودهای بیمارگر حشرات از لحاظ بیمارگری، رفتار جستجوی میزبان و زنده مانی در شرایط مختلف با یکدیگر متفاوتند. در کاربرد نماتودهای بیمارگر حشرات به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در منطقه‌ای خاص، بایستی اطلاعات لازم مانند وجود یا عدم وجود گونه‌های بومی این عوامل در آن ناحیه در اختیار باشد چرا که ورود گونه‌های خارجی ممکن است جمعیت‌های طبیعی را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش تنوع و فراوانی آنها گردند. به همین دلیل نیز در بسیاری از کشورهای دنیا نگرانی‌هایی در زمینه ورود گونه‌های خارجی و تأثیر نامطلوب آن‌ها بر محیط زیست وجود دارد. از طرفی به نظر می‌رسد به علت اینکه گونه‌های بومی نماتود نسبت به شرایط آب و هوایی منطقه خود سازگارتر هستند به طور مؤثرتری خواهند توانست آفات موجود در آن مناطق را کنترل نمایند (Miller and ؛ Emelianoff et al.2009 Barbercheck 2001). از این رو محققین تلاش می‌کنند تا با شناسایی و جداسازی گونه‌ها یا /جدایه‌های بومی نماتودهای بیمارگر حشرات در یک ناحیه، بهترین جدایه از گونه مؤثر را علیه آفات بومی آن منطقه به کار گیرند. از این رو، در سال‌های اخیر توجه نسبتاً زیادی به مقوله جداسازی نماتودهای بیمارگر حشرات معطوف شده است که در ایران نیز تلاش‌هایی به منظور جداسازی و شناسایی این عوامل از طبیعت صورت پذیرفته است و تا کنون گونه‌های *S. carpocapsae*، *S. feltiae*، *S. bicornutum*، *S. glaseri*، *S. kraussei* و *H. bacteriphora* از مناطق مختلف ایران گزارش شده‌اند (Agazadeh et al. 2010; Nikdel et al. 2010; Eivazian Kary et al.2009;Karimi et al.2009; Parvizi 2001).

هدف از این مطالعه جمع‌آوری جدایه‌های بومی نماتودهای بیمارگر حشرات از منطقه مشهد به منظور استفاده در مطالعات کنترل بیولوژیک برخی آفات می‌باشد. متعاقب جمع‌آوری نمونه‌ها، تشخیص مشخصات بیمارگر به شیوه مولکولی با رهیافت مبتنی بر دو جایگاه ژنی ITS و لوب های D2/D3 ناحیه 28S صورت خواهد پذیرفت.

مواد و روش ها

الف.جمع آوری و جداسازی نماتودهای بیمارگر

به منظور بررسی نماتودهای بیمارگر حشرات در شهرستان مشهد، تعداد ۲۰۰ نمونه خاک از هشت زیستگاه متفاوت از اطراف شهرستان مشهد طی ماه‌های تیر تا آذر سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری گردید. مناطق مورد بررسی شامل زمین‌های زراعی و باغی، چمن‌زارها و پارک‌ها بود. در هر منطقه بطور تصادفی نمونه‌برداری از فواصل چند متری از یکدیگر و در پروفیل صفر تا سی سانتی متری خاک صورت پذیرفت و نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل گردید. ، پس از مخلوط

نمودن خاک مربوط به هر نمونه، به میزان ۲۰۰ سی سی خاک از هر نمونه به ظروف پلاستیکی استوانه‌ای درب‌دار به حجم ۲۰۰ سی سی منتقل گشته و سپس تعداد ۵ تا ۷ لارو سن آخر *Galleria mellonella* L. به هر ظرف اضافه (Bedding and Akhurst, 1975) و ظروف در دمای محیط ۲۵ تا ۲۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به مدت دو هفته در فواصل دو تا سه روزه، مرگ و میر لاروهای گالریا بررسی و در صورت مشاهده لارو مرده با علایم مورد نظر به تله وایت (White, 1929) انتقال داده شدند. پس از طی زمان مورد نیاز لاروهای عفونت‌زای نماتود بصورت روزانه از تله جمع‌آوری شده و در دمای ۸ تا ۱۰ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری گردیدند. برای اثبات بیماری‌زایی، نماتودهای ۱۲ روزه برای آلوده‌سازی مجدد لاروهای گالریا مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

ب. شناسایی نماتودهای بیمارگر

گروه بندی اولیه این بیمارگرها با توجه به مشخصات موروفومتریک و مورفولوژیک و با توجه به میانگین طول بدن لاروهای عفونت‌زا صورت پذیرفت (Adams and Nguyen 2002).

تعیین مشخصات مولکولی

استخراج DNA

به منظوراستخراج DNA از کیت استخراج ژنومی بایونیر (http://www.bioneer.com) استفاده شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- تا زمان استفاده، نگاه‌داری شد.

واکنش PCR

نواحی ژنی مورد مطالعه شامل ناحیه ITS و 28S بود که از آغازگرهای TTG ATT ACG TCC CTG CCC (18S) TTT و TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG (26S) برای تکثیر ناحیه ITS (Vrain et al. 1992) و از یک جفت آغازگر CCT TAG TAA CGG CGA GTG AAA (D2F) و CAG CTA TCC TGA GGA AAC (536) (Stock et al. 2001) جهت تکثیر لوب‌های D2D3 rDNA ناحیه 28S استفاده گردید.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی نماتود

محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی مربوطه پس از دریافت با استفاده از نرم افزار BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) ویرایش گردید. برای آنالیز فیلوژنتیکی، از ۲۵ توالی ثبت شده مربوط به ۲۳ گونه از جنس *Steinernema* (موجود در بانک ژن NCBI) استفاده شد و به همراه توالی‌های بدست آمده در این تحقیق، با کمک نرم افزار BioEdit همردیف شدند. رسم درخت NJ[1] (Saitou and Nei 1987) با کمک نرم‌افزار MEGA4 (Tamura et al.2007) انجام پذیرفت. در درخت NJ فاصله تکاملی با استفاده از ضریب دو متغیره Kimura محاسبه گردید (Kimura 1980). آزمون بوت استرپ جهت ارزیابی و تخمین میزان ثبات شاخه‌های شجره با ۱۰۰۰۰ تکرار انجام شد (Felsenstein 1985).

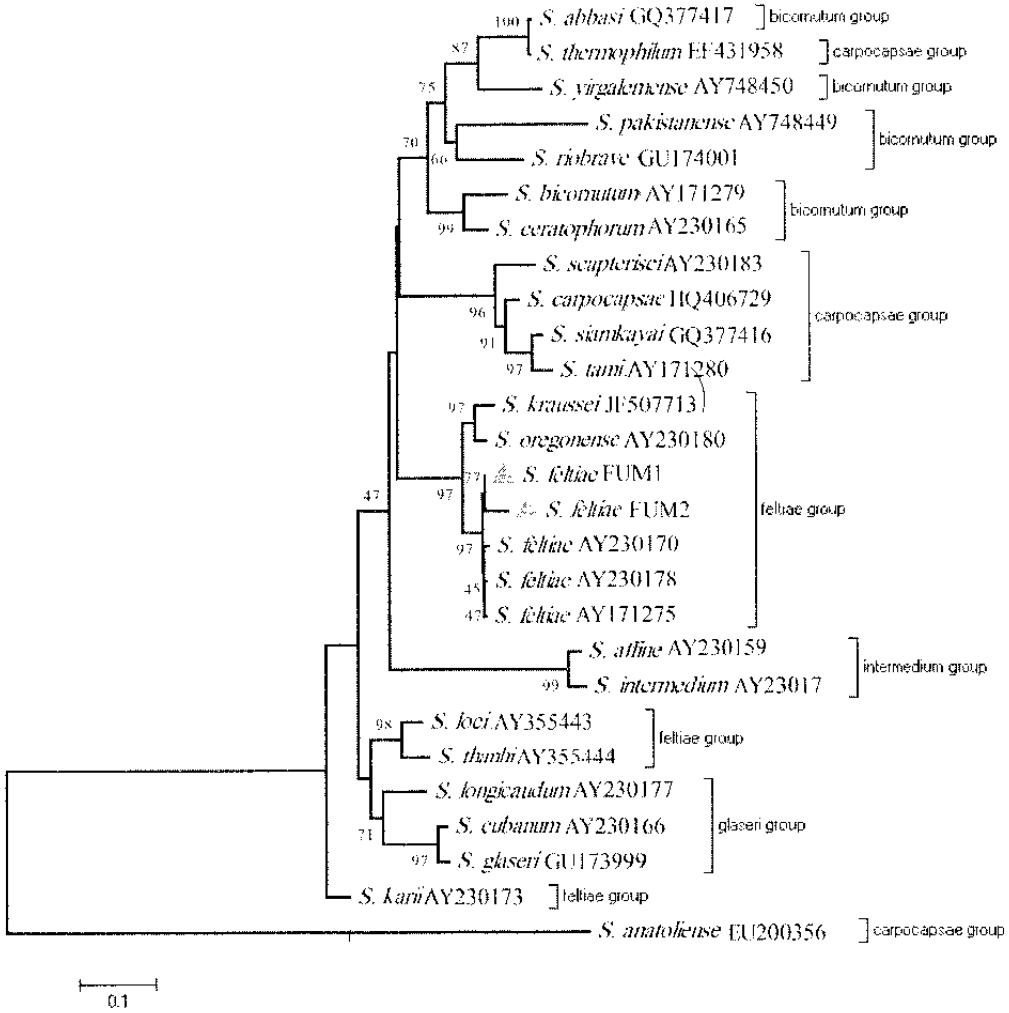
نتایج

از میان ۲۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از هشت زیستگاه متفاوت شهرستان مشهد، در هفت نمونه وجود نماتود های بیمارگر حشرات ردیابی شد. جدایه‌های احتمالی متعلق به جنس *Steinernema* با علایم خاص آلودگی حاصل از این

1. Neighbor Joining

جنس بخصوص تغییر رنگ میزبان متمایز گردیدند. بررسی مشخصات مورفومتریک و میانگین طول بدن لاروهای عفونت‌زای دو جمعیت ای FUM1 و FUM2 بر اساس بررسی های آدامز و نگوین (Adams and Nguyen 2002) نشان داد که گونه مورد بررسی با مشخصات جنس *Steinernema* و گروه "*feltiae*" مطابقت دارد. . در واکنش PCR ناحیه ITS مربوط به دو جدایه FUM1 و FUM2، قطعه‌ای به طول حدود یک کیلو باز تکثیر گردید که پس از توالی‌یابی و ویرایش، به ترتیب در بانک ژن با شماره دسترسی JF920964 و JN039363 ثبت گردیدند. اطلاعات مولکولی به دست آمده حاصل از تکثیر ناحیه ITS و لوب‌های D1 و D2 ناحیه 28S، همچنین نتایج بررسی های مورفولوژیک و مورفومتریک را تائید نمود. . آنالیز Nblast توالی‌های بدست آمده نشان داد که توالی این دو جدایه با سایر توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌های *Steinernema feltiae* هم ردیف شده و هیچ گونه فاصله‌ای (گپ) نیز مشاهده نگردید. مطالعه ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت نوکلوتیدی دو جدایه منسوب به گونه *S. feltiae* با سایر گونه‌های جنس *Steinernema* نشان داد که دو جمعیت FUM1 و FUM2 کمترین میزان تفاوت را با گونه *S. feltiae* دارند. میزان این تفاوت برای جمعیت FUM1 و FUM2 با نژاد ۸۸ گونه *S. feltiae* (شماره دسترسی AY171275) به ترتیب برابر ۰/۹۰ و ۰/۰۳۴ است. تعداد جایگزینی نوکلوتیدی جدایه‌های FUM1 و FUM2 با این جدایه به ترتیب برابر ۱۶ و ۲۸ نوکلئوتید می‌باشد. در بررسی انجام شده توالی ناحیه اخیر برای جدایه FUM1 توسط Raquel Campos-Herrera در دانشگاه ایالتی فلوریدا نیز انجام شد. در این مورد توالی حاصل برای جدایه FUM1، ۹۰۸جفت نوکلئوتید (با شماره دسترسی JF920966) طول داشت که بالاترین شباهت را به جدایه SN گونه *S. feltiae* (با شماره دسترسی GU569050) نشان داد.

آنالیز شجره‌شناسی دو جدایه بومی مذکور به همراه گونه‌ها و جدایه‌های دیگری از سایر گروه‌های *Steinernema* با استفاده از ناحیه ژنی ITS نشان داد که دو جدایه *S. feltiae* ایران در کنار سایر جدایه‌های این گونه در یک کلاد قرار می‌گیرند و میزان حمایت بوت استراپ شاخه‌های حاصل (۹۷) نیز در درخت NJ نشان می‌دهد که دو جمعیت مذکور به دیگر جدایه‌های این گونه نزدیک است (شکل شماره ۱). در بررسی روابط مذکور هنگامی که تعداد جدایه‌ها محدود به یک یا دو گروه *Steinernema* بود، گروه‌بندی با شاخص‌های مرفولوژیک انطباق بالایی داشت ولی هنگامی که از پنج گروه گونه ای جنس *Steinernema* جدایه‌ای انتخاب می‌شد و در آنالیز منظور می‌گردید گروه‌بندی مذکور نتایج دیگری نشان می داد.



شکل ۱. رابطه فیلوژنی بین جدایه‌های ایرانی *S. feltiae* و سایر گونه ها و ایزوله های *Steinernema* بر اساس توالی ناحیه ITS با استفاده از روش NJ با ۱۰۰۰۰ تکرار.

در کنار نمونه‌های نماتود بیمارگر، چند جمعیت از یک گونه نماتود آزادزی نیز جمع‌آوری گردید که به عنوان گونه‌ایی از خانواده Diplogasteridae (Sudhaus and Von Lieven 2003) و جنس *Pristionchus* تشخیص داده شد. تعیین هویت نهایی این نمونه‌ها توسط دکتر ابراهیم شکوهی از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان صورت پذیرفت و به عنوان گونه *Pristionchus pacificus* تعیین هویت گردید. توالی‌یابی ناحیه ITS در یک جمعیت از این گونه (FUM3) و مقایسه این توالی با سایر رکوردهای موجود در بانک ژن نیز به این شناسایی کمک نمود. طول ناحیه ITS تکثیر شده در این نماتود ۹۵۰ نوکلئوتید بود که توالی به دست آمده در بانک ژن (NCBI) با شماره دسترسی JN039364 ثبت گردید. هرچند به دلیل فقدان اطلاعات ناحیه ITS از سایر گونه های این جنس در بانک اطلاعاتی، بررسی دقیق تر و همچنین مطالعه روابط خویشاوندی آن با سایر گونه ها را مقدور نمی سازد. این اولین گزارش از جنس *Pristionchus* و نیز گونه *P. pacificus* از ایران می‌باشد.

بحث

تا کنون دو خانواده از نماتودهای بیمارگر حشرات در جهان شناسایی شده‌اند که شامل Steinernematidae و Heterorhabditidae می‌باشند (Gaugler 2002). خانواده Steinernematidae دارای ۲ جنس *Steinernema* (با بیش از ۳۰ گونه) و *Neosteinernema* (یک گونه) بوده و خانواده Heterorhabditidae تنها دارای جنس *Heterorhabditis* (دارای ۲۰ گونه) می‌باشد (Edgington *et al.*, 2010; Plichta *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2002; Saleh ,1995).

گونه *S. feltiae* از بسیاری از نقاط جهان گزارش شده و به همراه گونه *Steinernema affine* متداول‌ترین گونه-هایی هستند که محققین با آن‌ها در زمان نمونه‌برداری در اروپا مواجه می‌شوند (Hominick 2002). *S. feltiae* دارای پراکنش گسترده در مناطق معتدل می‌باشد، شاید این پراکنش به دلیل دامنه میزبانی وسیع این گونه و همچنین توان تحمل شرایط زیستی مختلف (جدایه‌های مقاوم به گرما و سازگار با اقلیم‌های سرد) باشد که به این گونه اجازه می‌دهد تا در شرایط مختلف محیطی به فعالیت خود ادامه دهد (Hominick 2002). تا کنون گونه *S. feltiae* در ایران از استان‌های تهران، مازندران، اردبیل (جنگل‌های ارسباران) و آذربایجان شرقی، گزارش شده است (Nikdel et al. 2010; Karimi et al. 2009; Eivazian Kary et al. 2009;TanhaMa'afi et al. 2006).

نواحی هسته‌ای 18S، 28S و ITS برای شناسایی نماتودهای بیمارگر حشرات استفاده می‌شوند، که ژن اول به منظور بررسی در سطح خانواده مفید است. نواحی ITS1 و ITS2 دارای بیشترین اهمیت در مطالعات این گروه در سطح گونه هستند (Stock and Hunt 2005). علاوه بر این ها، ناحیه 5.8S نیز در مورد گونه‌های *Steinernema* در تفکیک گونه‌های نزدیک و ارزیابی فیلوژنیک استفاده می شود. هرچند در مورد گونه‌هایی که قرابت چندانی ندارند بیشتر از ژن 28S استفاده می‌شود (Stock 2009؛ Stock et al. 2001). به نظر می‌رسد ناحیه ژنی ITS تنها برای حل روابط بین گونه‌های نزدیک *Steinernema* مفید باشد (Stock et al. 2004). در این مطالعه نیز در بررسی روابط بین گونه‌های این جنس با استفاده از این ناحیه ژنی، هنگامی که از هر پنج گروه –گونه ای جنس *Steinernema* در آنالیزها استفاده می‌شد، گروه‌بندی‌ها با شاخص‌های مرفولوژیک تضاد داشتند. این موضوع با یافته-های Stock و همکاران (۲۰۰۱) انطباق داشت. آن‌ها اظهار داشته‌اند که به علت نرخ تغییرات ITS در بین گروه‌های پنج گانه *Steinernema*، نمی‌توان از این ناحیه ژنی به عنوان مارکری جهت تمایز تمامی گونه‌های *Steinernema* استفاده نمود و در بررسی گونه هایی که قرابت کمتری با هم دارند بهتر است که از ناحیه ژنی D2/D3 مربوط به ناحیه 28S استفاده گردد.

گونه *P. pacificus* برای نخستین بار در سال ۱۹۹۶ میلادی به عنوان گونه‌ای جدید به دنیا معرفی گردید (Sommer 2006) و به نظر می‌رسد این گونه دارای پراکنش جهانی است (Zauner et al. 2007). این نماتود حدوداً یک میلی‌متر درازا داشته و دارای نر و ماده است. ماده‌ها معمولاً هرمافرودیت بوده و از نرها بزرگ‌ترند (Dieterich et al. 2006). تصور می‌شود گونه*P. pacificus* حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلیون سال پیش از گونه *Caenorhabditis elegans* منشعب شده باشد (Rudel et al. 2005).

گونه *P. pacificus* از باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی دیگر نماتودها تغذیه می‌نماید هر چند با حشرات نیز دارای ارتباط است (Sommer 2006). ارتباط نماتود با حشرات می‌تواند در سه گروه مسافری (فورتیک)، لاشه‌خواری یا پارازیتی قرار گیرد. بر اساس مطالعات، همراهی جنس *Pristionchus* با گونه‌های *Melolontha* sp. *Geotrupes* sp. و سوسک کلرادو سیب‌زمینی محرز شده است (Rae et al. 2008). همراهی این نماتود با این حشرات از نوع لاشه-خواری بوده بدین معنا که لاروهای عفونت‌زا نماتود پس از ورود به بدن حشره، به انتظار مرگ میزبان می‌نشیند و پس از مرگ میزبان، لاروهای نماتود از باکتری‌ها و قارچ‌هایی که روی لاشه حشره تکثر شده‌اند تغذیه می‌نماید (Weischer and Brown 2000). در بررسی انجام شده این گونه با کلنی گونه‌های مختلف نماتودهای بیمارگر از قبیل *Heterorhabditis* sp. و*Steinernema* spp. در ارتباط بوده و در بسیاری مواقع سبب نابودی پرورش

گونه‌های مذکور گردید. مورفولوژی و رشد و نمو *P. pacificus* منحصربفرد بوده و سبب شده در سال های اخیر به مدلی ایده‌آل برای مطالعات مقایسه‌ای تبدیل گردد (Rudel et al. 2006). به تازگی نقشه پیوستگی ژنتیکی و همچنین نقشه فیزیکی این گونه ایجاد و کل ژنوم آن توالی‌یابی گردیده است(Herrmann et al. 2007).

نکته قابل ذکر در ارتباط با این تحقیق، درصد بازیابی اندک (یک درصد) نماتودهای بیمارگر از مناطق مورد نظر است که با دیگر بررسی‌های انجام شده در مناطق مختلف ایران و جهان قابل مقایسه است. Nikdel و همکاران (۲۰۱۰) در یک مطالعه نرخ بازیابی نماتودهای بیمارگر را از جنگل‌های ارسبارن سه درصد عنوان نمودند. در دیگر کشورهای منطقه از جمله اردن (نه درصد)، ترکیه (دو درصد) و سوریه (۲.۳۷ درصد) نرخ بازیابی نماتودهای بیمارگر حشرات گزارش شده است (Abi Nader et al. 2010). این درصد بازیابی اندک شاید به دلیل الگوی پراکنش نماتودهای بیمارگر حشرات باشد چرا که این نماتودها بیشتر دارای پراکنش تجمعی هستند تا اینکه دارای پراکنش تصادفی باشند. از طرفی شیوع (درصد نمونه‌هایی که مثبت\هستند) و شدت (تعداد افراد در یک نمونه) نماتودهای بیمارگر حشرات می‌تواند دارای الگوی پراکنش زمانی متفاوتی باشد. این نکته را نیز بایستی در نظر داشت که در یک منطقه ممکن است برخی گونه‌ها غالب و برخی دیگرکمیاب باشند. بنابراین بدون در نظر گرفتن تکنیک‌های مورد استفاده، اظهار نظر در خصوص وجود یا فقدان یک گونه در یک ناحیه دشوار است چرا که ممکن است گونه مورد نظر بسیار کمیاب باشد و یافتن آن به تکرار نمونه‌برداری وابسته باشد (Hominick 2002).

با وجود اینکه نماتودهای بیمارگر حشرات دامنه میزبانی نسبتاً گسترده و پراکنش جهانی دارند (Shapiro-Ilan et al. 2002) اما تنها علیه تعداد معدودی از آفات و تنها در مناطق محدودی از جهان با موفقیت به بازار عرضه شده‌اند. شاید مهم‌ترین دلیل این موضوع عدم اطلاع از مکان جغرافیایی دقیق و قابل اعتماد و همچنین عدم وجود جدایه های مناسب باشد (Tóth 2006). از طرفی استفاده از جدایه‌های بومی یک راهبرد اساسی در برنامه‌های کنترل بیولوژیک حشرات می‌باشد بنابراین مطالعه جدایه های بومی این گروه از عوامل کنترل بیولوژیک، بویژه جمع آوری و شناخت ویژگی های بیولوژیک آنها از اولویت خاصی برخوردار است. با این کار نه تنها اثرات زیست محیطی، قوانین نظارتی و نگرانی‌های کنوانسیون تنوع زیستی به حداقل خواهد رسید بلکه به افزایش اطلاعات محققین در زمینه جغرافیای زیستی این موجودات نیز کمک خواهد نمود (Hominick 2002). لذا ضروری است تا در کشور به تلاش برای یافتن گونه‌ها و جدایه‌های بومی مناسب با شرایط اقلیمی متفاوت ادامه داد تا در نهایت امکان استفاده آن‌ها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات عملی شود.

منابع

1. Adams B.J., Nguyen K.B. 2002. Taxonomy and systematics. In: Entomopathogenic nematology. Ed. by Gaugler R, CABI Publishing, Oxon, New York, 1-34.
2. Agazadeh M, Mohammadi D, Eivazian Kary N, 2010. Molecular identification of Iranian isolates of the genus *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Entrobacteriaceae) based on 16S rRNA. Mun. Ent. Zool. 5, 772-779.
3. Bedding R A, Akhurst RJ, 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21, 109–116.
4. Burnell AM, Stock SP, 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts, lethal pathogens of insects. Nematology. 2, 31–42.
5. Canhilal R, Carner G R, 2006. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in South Carolina. J. Agric. Urban Entomol. 23, 159–166.
6. Dieterich C, RoeselerW, Srinivasan J, 2006. *Pristionchus pacificus* genomics: from genetics to genome sequence. WormBook, 1-14. http://www.wormbook.org.

7. Edgington S, Buddie AG, Moore D, France A, Merinoand L, Hunt DJ, 2010. *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert, Chile. J. Helminthol. 19, 1-14.
8. Eivazian Kary N, Niknam G, Griffin CT, Mohammadi S A, Moghaddam S A, 2009. A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) from north-west of Iran. Nematology 11, 107-116.
9. Emelianoff V, Brun NL, Pagès S, Stock SP, Tailliez P, Moulia K, Sicard M, 2009. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). J. Invertebr. Pathol. 98, 211-217.
10. Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.
11. Gaugler R, 2002. Entomopathogenic nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK:
12. Grewal PS, Ehler RÜ, Shapiro-Ilan DI, 2008. Nematode as Biocontrol Agents, CABI, Wallingford ,UK, 528pp.
13. Hall T A, 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/. NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98.
14. Herrmann M, Mayer WE, Hong RL, Kienle S, Minasaki R, Sommer RJ, 2007. The nematode *Pristionchus pacificus* (Nematoda: Diplogastridae) is associated with the oriental beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Japan. Zool. Sci. 24, 883–889.
15. Hominick WM, 2002. Biogeography. In: Entomopathogenic nematology. Ed. by Gaugler R, CABI Publishing, Oxon, New York, 115-144.
16. Karimi J, Kharazi-pakdel A, Yoshiga T, 2009. Insect pathogenic nematode, *Steinernema feltiae* from Iran. IOBC/wprs Bulletin, 45: 409-412.
17. Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16,111-120.
18. Kurtz B, Hiltpold I, Turlings TCJ, Kuhlmann U, Toepfer S, 2009. Comparative susceptibility of larval instars and pupae of the western corn rootworm to infection by three entomopathogenic nematodes. BioControl 54, 255-262.
19. Miller LC, Barbercheck ME, 2001. Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. Biol. Control. 22, 235–245.
20. Nikdel M, Niknam G, Shojaee M, Askary H, Mohammadi SA, 2008. A survey on the response of the last instar larvae of acorn weevil, Curculio glandium (Col.: Curculionidae), to entomopathogenic nematodes *Steinernema bicornutum* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the laboratory. J. E. S. I. 28, 45-60.
21. Nikdel M, Niknam G, Griffin CT, Kary Eivazian N, 2010. Diversity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from Arasbaran forests and rangelands in north-west Iran. Nematology, 5, 767-773.
22. Noujeim E, Hayek PE, Nemer N, Darwich T, Thaler O, Khater C, 2010. Habitat characterization of entomopathogenic nematodes in north Lebanon. Leb. Sci. J. 11, 27-37.
23. Parvizi R, 2001. Study infectivity of *H. bacteriophora* and *Steinernema* sp. against white grub, *Polyphylla olivieri*. J. E. S. I. 21, 63-72.

24. Plichta KL, Joyce SA, Clarke D, Waterfield N, Stock SP, 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiontica* (Enterobacteriaceae: g-Proteobacteria). J. Helminthol, 83, 309–320.
25. Poinar GO, 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomopylic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. Fundam. Appl. Nematol. 16,: 333–338.
26. Rae R, Riebesell M, Dinkelacker I, Wang O, Herrmann M, Weller AM, Dieterich C, Sommer RJ, 2008. Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. J. E. B. 211, 1927-1936.
27. Rudel D, Riebesell M, Sommer RJ, 2005. Gonadogenesis in *Pristionchus pacificus* and organ evolution: development, adult morphology and cell–cell interactionsin the hermaphrodite gonad. Dev. Biol. 277, 200–221
28. Saleh MME, 1995. Efficiency of the Egyptian entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis taysearae* in controlling the cabbage-worm, *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). Egypt. J. Biol. Pest. Control 5, 99-112.
29. Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4,406-425.
30. Shahina F, Manzar H, Tabassum KA, 2004. Symbiotic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* associated with entomopathogens. Pak. J. Nematol. 22,117-128.
31. Shapiro-Ilan D, Gouge D, Koppenhöfer A, 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: entomopathogenic nematology, ED. by Gaugler R, CABI Publishing, Oxon, New York, 333-356.
32. Sommer, R.J, Carta, L. K., Kim, S. Y. and Sternberg, P. W. 1996. Morphological, genetic and molecular description of *Pristonchus pacificus* sp.n. (Nematoda: Neodiplogasteridae). Fundam. Appl. Nematol., 19 (6), 511-521.
33. Sommer RJ, 2006. *Pristionchus pacificus*. In: Worm Book. ed. by The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.102.1, http://www.wormbook.org.
34. Stock SP, Campbell J F, Nadler SA, 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. J. Parasitol. 87, 877-889.
35. Stock SP, Griffin CT, Burnell AM, 2002. Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar,1976 from the 'Irish group' (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, *H. downesi* n. sp. *Syst. Parasitol.* 51, 95–106.
36. Stock SP, Griffin CT, Chaerani R, 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. Nematology 6, 401-412
37. Stock, S. P. and D. J. Hunt (2005). Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. In: nematodes as biocontrol agents. Eds by Grewal P S, Ehlers RU, Shapiro-Ilan D, CAB publishing, CAB International, Oxon, U. K. 1-68.
38. Stock, S.P. 2009. Molecular approaches and taxonomy of insect parasitic and pathogenic nematodes. In: insect pathogens: molecular approaches and techniques. Eds by Stock SP, Vandenberg, Boemare,Glazer,.) CABI Publishing, Wallingford, UK. 70-98.
39. Sudhaus, W and Von Lieven, F. 2003. A phylogenetic classification and catalogue of the Diplogasteridae (Secernentea, Nematoda). J. Nem. Morph. Syst. 6(1), 43-90.

40. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.
41. Tanha Ma'afi Z, Ebrahimi N, Abootorabi E, Spiridonov SE, 2006. Record of two Steinernematid species from Iran, 17 th Iranian Plant Protection Congress, University of Tehran, Karaj, Iran, 2-5 Sptember, 482 P.
42. Tóth T, 2006. Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. J. Fruit Ornam Plant Res. 14, 225-230.
43. Vrain TC, Wakarchuk DA, Levesque AC, Hamilton RI, 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphisms in the *Xiphinema americanum* group. Fund. Appl. Nematol. 15, 563–574.
44. Weischer B, Brown D, 2000. An Introduction to Nematodes: General Nematology, A Students Textbook. Sofia: Pensoft.
45. White G F, 1929. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66, 302–303.
46. Zauner H, Mayer W, Herrmann M, Weller A, Erwig M, Sommer RJ, 2007. Distinct patterns of genetic variation in *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*, two partially selfing nematodes with cosmopolitan distribution. Mol. Ecol. 16, 1267-1280.

New data about entomopathogenic nematodes of Iran inferring from genes sequences of ITS and 28S

Mahnaz Hassani Kakhki, Javad Karimi *, Reihane Darsouei, Ebrahim Shokoohi [1]

×Javad Karimi, Entomology Division, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E mail:jkb@um.ac.ir

-MS student of Agriculture Entomology, Ferdowsi University of Mashhad, Assistant professor, Department of pant protection, Ferdowsi University of Mashhad, MS student of Agriculture Entomology, Ferdowsi University of Mashhad, Assistant professor, Department of plant protection, Shahid Bahonar University of Kerman.

Abstract:

Entomopathogenic nematodes are a group of biological control agents that their study and application is a new trend in pest management programs. Due to the importance of the knowledge about native species of entomopathogenic nematodes, we addressed the identify of native populations of this group in Mashhad region. Among 200 samples that were collected from eight diverse habitats of this area in 2010, seven populations were isolated using *Galleria* trap. Initial characterization showed that two populations, namely FUM1 and FUM2 belonged to "*feltiae*" group of *Steinernema*. Sequencing of ITS rDNA gene and comparing this sequence with database (Nblast) confirmed the similarity of more than 99 % of these two populations with *Steinernema feltiae*. In phylogenetic analysis, both isolates placed in a same clade with other isolates of *S. feltiae*. Sequence analysis of another gene, D2/D3expansions of 28S also confirmed this identity. Remaining five populations characterized as species of *Pristionchus pacificus* Sommer, Carta, Kim, Sternberg, 1996 belonging order Rhabditida is free living bacteriovorus nematodes. This achieved using classic data, as well ITS1-5.8S-ITS2 gene analysis. This is the first record of the latest genus and species from Iran.

Key words: Entomopathogenic nematodes, ITS, D2/D3, Mashhad, *Pristionchus pacificus*.