

بررسی مشخصات ریخت شناختی و مولکولی جدایه نماتد بیمارگر حشرات *Steinernema carpocapsae* از شمال غرب ایران

ژילה علیزاده، ناصر عیوضیان کاری *

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸

چکیده

طی نمونه برداری از خاک‌های شمال غرب ایران با هدف یافتن نماتدهای بیمارگر حشرات، در بین جدایه‌های مختلف جمع‌آوری شده جدایه TS25 بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، آزمون دگرآمیزی و ترادف ناحیه ITS-rDNA به عنوان گونه *Steinernema carpocapsae* Weiser شناسایی گردید. مقایسه ویژگی‌های ریختی و ریخت‌شناختی جدایه مورد نظر با جدایه All و نیز تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی نشان دهنده وجود برخی تفاوت‌ها بین جدایه مورد بررسی با گونه تیپ بود. در جدایه مورد مطالعه تمام ویژگی‌های مربوط به لارو آلوده‌کننده به جز نسبت b و d از نظر میانگین و دامنه با داده‌های گونه فوق مطابق بود. در نرها، NR از نظر میانگین و دامنه، از جدایه DD 136 تفاوت داشت. بین دیگر صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی مبتنی بر داده‌های مولکولی و ترسیم درخت نیایی، جدایه مورد بررسی را در یک گروه مونوفایلتیک با جدایه All گونه *S. carpocapsae* قرار داد.

واژه‌های کلیدی: نسب‌شناختی، ریخت‌سنجی، ریخت‌شناختی، نماتدهای بیمارگر حشرات، ITS-rDNA.

* گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
نویسنده مسئول: eivazian@azaruniv.ac.ir

مقدمه

نماتدهای بیمارگر حشرات متعلق به خانواده‌های Steinernematidae و باکتری‌های همزیست آنها، *Xenorhabdus* انگل‌های اجباری و کشنده حشرات هستند. آنها یک گروه همه‌جازی و عوامل ارزشمند زیستی با کاربری گسترده علیه حشرات زیان‌آور می‌باشند (Kaya and Gaugler 1993). در این نماتدها لارو آلوده‌کننده سن سوم که مرحله عفونت^۲ می‌باشد، باکتری همزیست *Xenorhabdus* را در قسمت جلویی روده‌ی خود حمل و با ورود به هموسل میزبان، باکتری‌های همزیست را به داخل هموسل حشره رها می‌سازد. این باکتری‌ها به سرعت در هموسل تکثیر یافته و حشره در اثر عفونت باکتریایی^۳ و معمولاً ظرف ۲۴-۴۸ ساعت کشته می‌شود. تولیدمثل نماتد تا زمان تهی شدن لاشه از مواد غذایی ادامه می‌یابد که معمولاً امکان تشکیل دو یا سه نسل در این فاصله فراهم می‌گردد. با اتمام مواد غذایی لاشه، لارو مرحله دوم که در اواخر مرحله رشدی خود می‌باشد تغذیه خود را متوقف و توده باکتریایی را وارد فضای باکتریایی^۴ خود کرده و بعد از پوست‌اندازی با حفظ پوسته لاروی مرحله قبلی وارد مرحله آلوده‌کنندگی یا لارو مقاوم می‌گردد که معمولاً لاشه را به دنبال یافتن میزبان جدید ترک می‌کند. لارو آلوده‌کننده تغذیه نکرده و می‌تواند چند ماه را بدون تغذیه در خاک سپری نماید (Kaya and Gaugler 1993).

شناسایی و معرفی گونه‌ها و جدایه‌های نماتدهای بیمارگر حشرات در سراسر دنیا شتاب بسیار زیادی پیدا کرده است و با اضافه شدن مفهوم زیستی گونه و نشانگرهای مولکولی، دقت شناسایی به طور چشمگیری افزایش یافته است. در حال حاضر تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی مبتنی بر داده‌های مولکولی از ابزارهای ضروری در توصیف گونه‌های جدید و همچنین شناسایی گونه‌ها می‌باشد.

گونه *Steinernema carpocapsae* Weiser اولین بار با نام *Neoaplectana carpocapsae* از یک میزبان بالپولکدار به نام *Laspeyresia pomonella* از چکسلواکی توسط Weiser (1955) توصیف و سپس از

نواحی مختلف جهان گزارش شد (Poinar 1967). این گونه نه تنها به آسانی از خاک قابل جداسازی است بلکه می‌توان آن را از لارو بالپولکداران آلوده نیز به دست آورد. گونه *S. carpocapsae* از لهستان، مکزیک، فرانسه، روسیه، سوئد، کانادا، ایالات متحده، آرژانتین، استرالیا، ایتالیا و آلمان گزارش شده است (Ehlers and Hokkanen 1996, Poinar 1967).

با توجه به کارایی بالای نماتدهای بیمارگر حشرات در کنترل زیستی حشرات آفت و اهمیت شناسایی دقیق گونه‌ها و جدایه‌های موجود به عنوان اولین گام در کاربرد این عوامل ارزشمند زیستی، مطالعه حاضر، صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، آزمون دگرآمیزی جدایه TS25 و جایگاه نسب‌شناختی نماتد بیمارگر حشرات *Steinernema carpocapsae* از شمال غرب ایران را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بررسی خاک باغات شهرستان سردرود (استان آذربایجان شرقی) با هدف یافتن نماتدهای بیمارگر حشرات تنها یک جدایه از این عوامل ارزشمند زیستی با استفاده از روش تله‌گذاری با لارو سن آخر پروانه موم‌خوار بزرگ^۵ (Bedding and Akhurst 1975) به دست آمد. جهت آماده‌سازی نمونه‌های قابل مطالعه نماتدهای کشته شده با حرارت به تثبیت‌کننده TAF^۶ منتقل (Kaya and Stock 1997) و سپس با استفاده از روش تبخیر^۷ به گلیسرین خالص رسانده شد (Poinar 1975). از هر جدایه از افراد نر و ماده بالغ نسل اول و دوم و لاروهای آلوده‌کننده اسلایدهای میکروسکوپی دائمی با روش حلقه پارافین تهیه گردید. از تمامی مراحل لارو سن سوم، نر و ماده تصاویر دیجیتالی با استفاده از دوربین DP50 متصل به میکروسکوپ المپوس BX41 تهیه شد. تمامی بررسی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی با استفاده از میکروسکوپ المپوس مدل BX41 مجهز به لوله ترسیم صورت گرفت.

^۵*Galleria mellonella* Fabricius^۶triethanolamin-formalin^۷Evaporation method^۲ Infective juvenile^۳Septicemia^۴Bacterial pouch

تهیه تصاویر SEM

برای آماده سازی نمونه ها جهت تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO-41 از روش تغییر یافته (Nguyen and Smart 1995) استفاده گردید. به این منظور، نرها و ماده های نسل اول و دوم و نیز لاروهای آلوده کننده ای که یک هفته از عمر آنها می گذشت، انتخاب شدند. نماتدها بعد از چند بار شست و شو در محلول رینگر، جهت تثبیت به محلول گلو تار آل دئید^۸ ۳ درصد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سپس نماتدها چهار بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در محلول سدیم کاکودیلات^۹ ۰/۱M با اسیدیته ۷/۲ شست و شو شدند و بعد به محلول اسمیوم تتروکساید^{۱۰} ۲ درصد منتقل و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. مجدداً، نماتدها چهار بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در محلول سدیم کاکودیلات مورد شست و شو قرار گرفته و با استفاده از شیب های مختلف غلظت اتانول که شامل غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ درصد و در نهایت الکل خالص می شد، آگیری و نماتدها در هر غلظت الکل به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. سدیم کاکودیلات ۰/۱ M با اسیدیته ۷/۲ به عنوان بافر در تهیه تمامی محلول های ذکر شده مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آگیری، نمونه ها به روی پایه های مخصوص^{۱۱} تصویربرداری SEM منتقل گردیدند. ناحیه سر و دم در نماتدهای نر و ماده، وضعیت فرج در ماده ها و الگوی شیارهای طولی سطوح جانبی لاروهای آلوده کننده در تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفتند.

صفات مورد بررسی صفات ریخت شناختی و ریخت سنجی مورد مطالعه در این بررسی

شامل: طول بدن (L)، عریض ترین قسمت بدن (W)، عرض بدن در ناحیه مخرج^{۱۲} (Abw)، طول دم (T)، طول مری (Es)، فاصله ابتدای جلویی بدن تا منفذ دفعی-

ترشچی^{۱۳} (Ep)، فاصله ابتدای جلویی بدن تا محل حلقه عصبی^{۱۴} (Nr)، نسبت فاصله ابتدای بدن تا منفذ دفعی-ترشچی بر طول دم (%E)، نسبت طول بدن بر طول دم (c)، نسبت طول بدن بر عریض ترین قسمت بدن (a)، طول بدن بر طول مری (b)، نسبت فاصله ابتدای بدن تا منفذ دفعی-ترشچی بر طول مری (%D)، نسبت فاصله ابتدای بدن تا منفذ دفعی-ترشچی بر طول دم ضرب در صد (e)، طول اندام نرینه^{۱۵} (SpL)، عرض اندام نرینه (Spw)، طول گوبرناکولوم^{۱۶} (Gl)، عرض گوبرناکولوم (Gw)، نسبت طول گوبرناکولوم به طول اندام نرینه ضرب در صد (GS)، نسبت طول اندام نرینه بر عرض آن (SpLW) و نسبت طول اندام نرینه بر عرض بدن در ناحیه مخرج^{۱۷} (SW) بودند. هر صفت حداقل در ۲۰ فرد نماتد اندازه گیری شد.

آزمون دگر آمیزی

برای اطمینان بیشتر از صحت شناسایی گونه، از آزمون دگر آمیزی با جدایه All گونه *S. carpocapsae* که از آزمایشگاه بیو کنترل در دانشگاه ملی ایرلند تهیه شده بود با استفاده از روش قطره همولف (Poinar 1967) استفاده گردید.

بررسی های مولکولی

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از روش (Eivazian Kary et al. 2009) صورت گرفت. قطعه تکثیر شده با استفاده از کیت خالص سازی (Qiagen, Leusden, The Netherlands) خالص سازی و سپس برای ترادف یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. بعد از ترادف یابی، فایل های کروماتوگرام حاصله با استفاده از برنامه ChromasPro 1.41 ویرایش و تجمیع گردید. ترادف ویرایش شده به همراه ترادف ناحیه ITS-rDNA تعدادی از گونه های *Steinernema* با استفاده از نرم افزار ClustalX 2.0 و براساس پارامترهای از پیش تعیین شده برنامه، زیرهم چینی گردید. ترادف های مورد استفاده عبارت بود از: *S. abbasii* (AY248749)، *S. arenarium* (DQ314288)، *S. aciari* (AY787660).

¹³ Secretory-excretory pore position

¹⁴ Nerve ring position

¹⁵ Spicule length

¹⁶ Gubernaculum length

¹⁷ SI/Abw

⁸ Glutaraldehyde

⁹ Sodium cacodylate

¹⁰ Osmium tetroxide

¹¹ Stub

¹² Anal body width

شده و به حباب انتهایی با دریچه کوچک متصل می‌گردد. حلقه عصبی در نیمه‌ی دوم لوله ثانویه مری و جلوتر از حباب انتهایی، منفذ دفعی-ترشعی (شکل ۱A) جلوتر از حلقه عصبی، شیارهای سطوح جانبی نامشخص، دارای دو لوله‌ی جنسی در طرفین بدن و در انتها دارای برگشتگی، فرج به صورت یک شکاف عرضی و برآمده^{۲۳}. دم تا حدی مخروطی یا گنبدی شکل با یا بدون زائده‌ی کوچک انتهایی دم، فاسمیدها نامشخص. نسل‌های دوم و بعدی شبیه ماده‌های نسل اول ولی تا حدی کوچکتر.

نرها: ناحیه جلویی بدن شبیه ماده‌ها (شکل ۱E و F)، دارای یک بیضه با برگشتگی، یک جفت اندام نرینه با خمیدگی متوسط (شکل ۱G و H). قسمت سر اندام نرینه طولی‌تر از عرض آن و دارای برآمدگی در ناحیه شکمی خود، دارای شفت، تیغه اندام نرینه دارای خمیدگی متوسط که به طرف انتها تیز می‌گردد و یا با انتهای صاف (شکل ۱G)، دارای ولوم مشخص.

لارو آلوده‌کننده: بدن استوانه‌ای و کشیده که به تدریج به طرف سر و دم باریک می‌گردد (شکل ۱C و D)، دهان و مخرج بسته، مری و روده تحلیل‌رفته، سطوح جانبی دارای شش برجستگی مشخص در ناحیه میانی بدن (شکل ۱C) و یا هفت شیار طولی. با استفاده از کلید Nguyen and Smart (1995) جدایه مورد مطالعه با اطمینان بالا به عنوان *S. carpocapsae* شناسایی گردید. با استفاده از کلید Hominick et al. (1997) نیز جدایه مورد بررسی با مشخصات *S. carpocapsae* همخوانی داشت. بر اساس کلید چندگانه (Adams and Nguyen 2002) و کلید طراحی شده توسط Nguyen (ifas.ufl.edu/~kbn/steinkey.htm) نیز نتیجه مشابهی به دست آمد و صحت تشخیص این جدایه به عنوان *S. carpocapsae* تایید شد.

در جدایه مورد مطالعه تمام ویژگی‌های مربوط به لارو آلوده‌کننده به جز نسبت b و d از نظر میانگین و دامنه با داده‌های گونه فوق در هر سه کلید مورد استفاده مطابق بود. در نرها، NR از نظر میانگین و دامنه، با جدایه تیپ DD 136 تفاوت داشت. داده‌های ریخت‌سنجی مربوط

S. diaprepesi (EF431959)، *cholashanense* (AF122021)، *S. glaseri* (AY230171)، *S. karii* (EU914856)، *S. krausseii* (AY230173)، *S. kushidai* (AB243440)، *S. affine* (AF331899)، *S. ceratophorum* (AF331889)، *S. cubanum* (AF331909)، *S. longicaudum* (AF331895)، *S. monticolum* (AY170338)، *S. oregonense* (AF331891)، *S. rarum* (DQ221117)، *S. feltiae* (AF331906)، *scapterisci* (AF331898)، *S. bicornutum* (AF331900)، *S. carpocapsae* (AF331904)، *S. texnum* (EF152568) و *Caenorhabditis elegans* (X03680) به عنوان گروه خارجی در تجزیه و تحلیل‌ها منظور گردید.

تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی

تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی براساس روش بیشترین پارسیمونی^{۱۸} (MP) با وزن یکسان با استفاده از برنامه PAUP*4.0 (Swofford 1995) و بر اساس جستجوی ابداعی^{۱۹} و با تنظیمات زیر انجام گردید: ۱۰۰ تکرار برای افزودن تصادفی تاکسون^{۲۰} (RTA)، جانشینی شاخه‌ها از نوع اتصال دوبخشی و با نگهداری چندین درخت^{۲۱}. تمامی داده‌ها به صورت غیر خطی، کاراکترها با وزن یکسان و فاصله‌ها^{۲۲} به عنوان داده‌های گم‌شده فرض گردیدند. برای اطمینان از توپولوژی درخت آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید.

نتایج و بحث

در بین نمونه‌های خاک تنها یک نمونه از نظر وجود این گونه مثبت بود که نشان دهنده پراکنش بسیار پایین این گونه در منطقه مورد بررسی می‌باشد.

ریخت‌شناسی

ماده‌ها: طول بدن متغیر، کوتیکول صاف، سر تخت و تا حدی گرد، دارای شش پاپیل لبی و چهار پاپیل سر (شکل ۱A، B). مری ماهیچه‌ای، قسمت جلویی لوله اولیه در پشت محفظه دهان تا حدی متورم، متصل به حباب میانی نسبتاً طولی که در ادامه به لوله ثانویه مری منتهی

¹⁸Maximum Parsimony

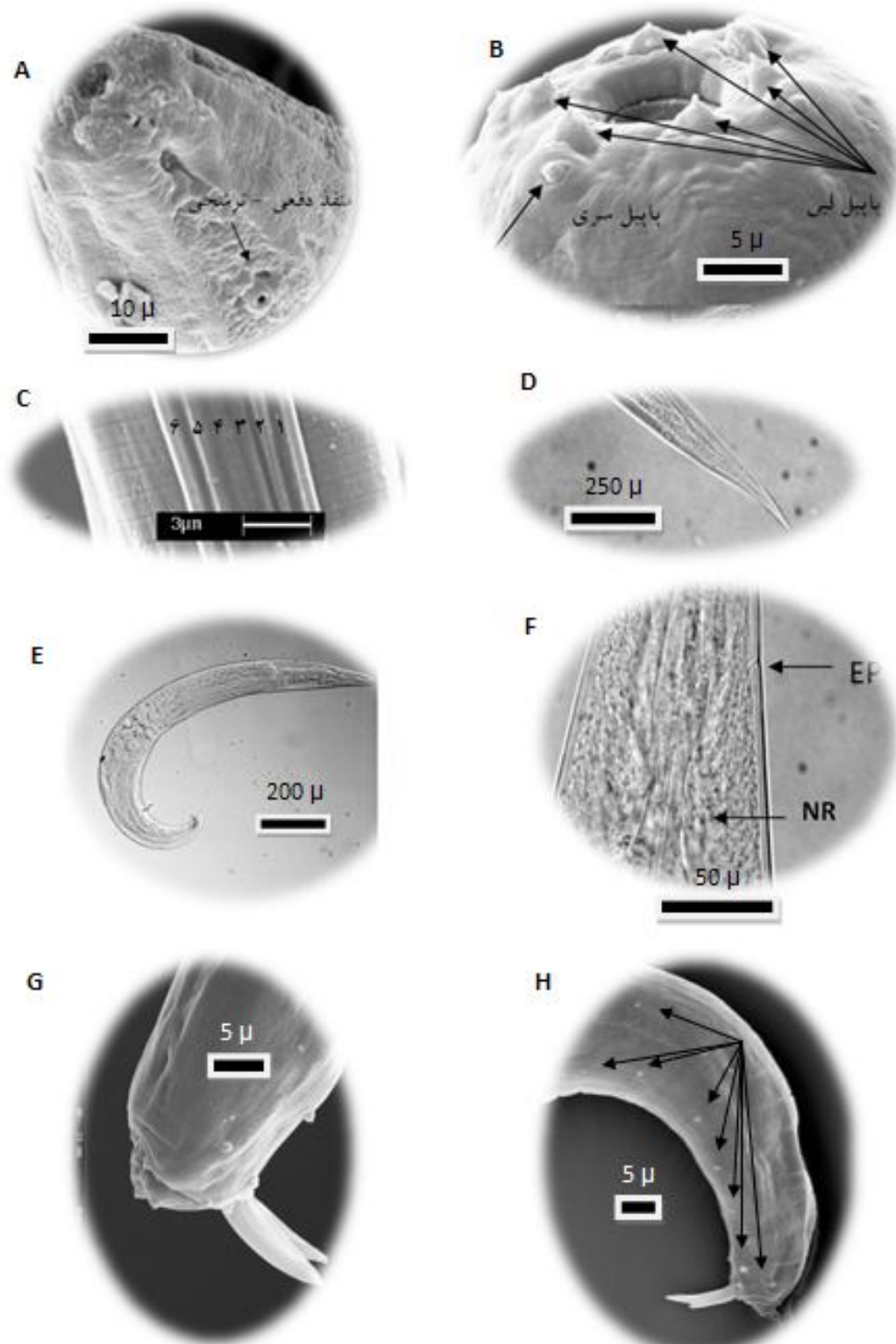
¹⁹Heuristic search

²⁰Random Taxon Addition

²¹Multiple Trees Retained

²²Gaps

²³Protuberance



شکل ۱. *S. carpocapsae*: (A) منفذ دفعی-ترشچی ماده. (B) پاپیل‌های لبی و سری در ماده. (C) شیارهای طولی لارو آلوده‌کننده. (D) دم لارو آلوده‌کننده. (E) نر. (F) مری و منفذ دفعی-ترشچی نر. (G) اندام نرینه. (H) پاپیل‌های جنسی.

ترسیم شده با گونه *S. carpocapsae* (AF331900) تشکیل یک گروه مونوفایلیتیک داده است. ارزش بوت استرپ ۱۰۰ درصد گره فوق نشان دهنده اطمینان بسیار بالا از گروه‌بندی صورت گرفته در آن بخش از درخت است. فاصله ژنتیکی جدایه مورد بررسی با گونه‌های نزدیک در جدول ۳ آورده شده است.

در جمع‌بندی کلی و با توجه به نتایج حاصل از مقایسه‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی با آن چه که در کلیدهای تنظیم شده برای شناسایی گونه‌های جنس *Steinernema* ذکر شده است و نیز نتیجه آزمون دگرآمیزی و همچنین داده‌های به دست آمده از بررسی ناحیه ITS-rDNA می‌توان نتیجه گرفت که با اطمینان خیلی بالا این گونه *S. carpocapsae* بوده و جدایه ایرانی TS25 در کنار سایر جدایه‌های گزارش شده این گونه در سراسر جهان می‌باشد.

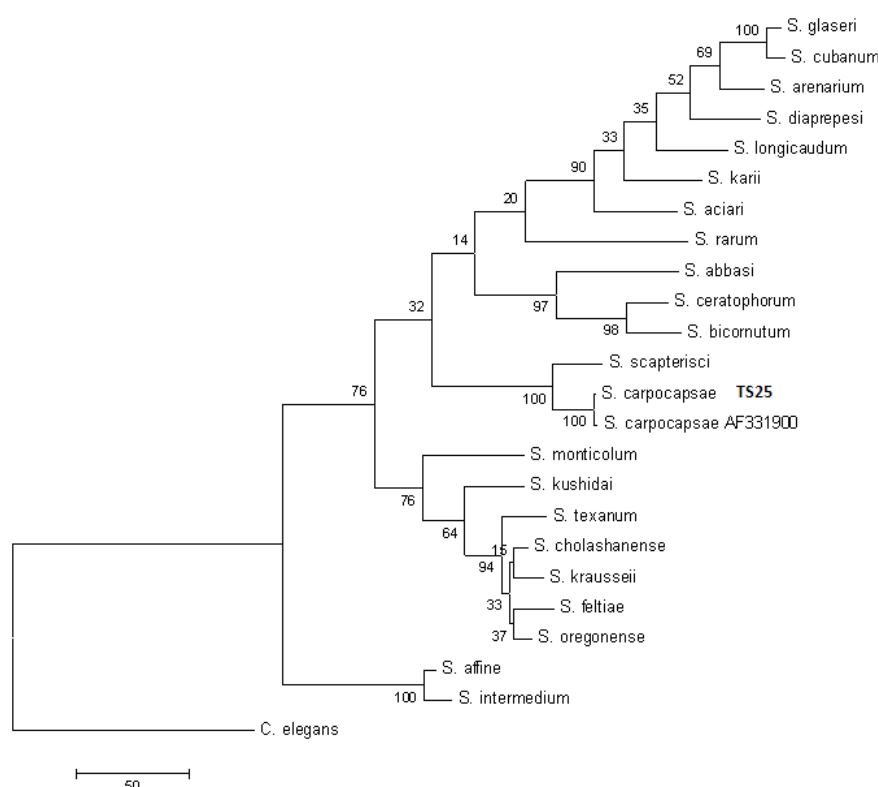
به لاروهای آلوده‌کننده و نرهای جدایه TS25 و جدایه تیپ DD 136 به ترتیب در جداول ۱ و ۲ ذکر شده است.

آزمون دگرآمیزی

نتیجه این آزمون ایجاد نتاج بارور در دگرآمیزی بین جدایه TS25 و جدایه All گونه *S. carpocapsae* در بیش از ۸۰ درصد تکرارها بود. بنابراین با اطمینان زیاد می‌توان بر شناسایی دقیق گونه صحه گذاشت. با این حال باید توجه داشت که اخیراً گونه‌ای از *Steinernema* تحت نام *S. hermaphroditum* که همافروdit می‌باشد از اندونزی گزارش شده است (Griffin et al. 2001).

تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی

تجزیه و تحلیل نسب‌شناختی بر اساس داده‌های ترادف ناحیه ITS-rDNA منجر به تشکیل درخت شکل ۲ گردید. چنانچه مشخص است جدایه مورد نظر در درخت



شکل ۲. درخت بیشترین پارسیمونی که جایگاه نسب‌شناختی جدایه مورد بررسی را در رابطه با دیگر گونه‌های *Steinernema* نشان می‌دهد. اعداد نمایش داده شده در گره نشان دهنده ارزش بوت استرپ برای گروه مونوفایلیتیک مربوطه می‌باشد.

جدول ۱. مقایسه ریخت‌سنجی لاروهای آلوده‌کننده جدایه ایرانی TS25 گونه‌ی *Steinernema carpocapsae* و جدایه تیپ DD 136.

	n	L	W	Abw	T	Es	Ep	Nr	a	b	c	%D	e
IRA18 n=۲۰	۲۰	۶۱۴±۲۳*	۲۷±۲	۱۴±۰/۵	۵۷±۳	۱۱۷±۵	۳۷±۲	۸۵±۱۵	۲۲±۱	۵/۴±۰/۳	۱۰/۵±۰/۶	۳۳±۲	۷۳±۵
		۵۷۸-۶۴۵**	۲۶-۳۰	۱۳-۱۶	۵۳-۶۲	۱۰۴-۱۲۵	۳۵-۴۰	۷۶-۱۲۸	۱۸-۲۵	۴/۶-۵/۷	۱۰-۱۱/۷	۲۹-۳۵	۶۵-۷۳
Isolate DD 136 n=۵۵	۵۴	۵۶۰	۲۶	+	۵۴	۱۲۳	۳۷	۸۴	۲۱	۴/۵	۱۰	۲۶	۶۰
Poinar (1967)		۴۳۸-۶۵۰	۲۰-۳۰		۴۶-۶۱	۱۰۳-۱۹۰	۳۰-۶۰	۷۸-۹۰	۱۸-۲۶	۴-۴/۷	۹/۵-۱۰/۹	۲۲-۲۶	۵۵-۶۳

* میانگین ± انحراف استاندارد؛ ** دامنه تغییرات؛ + عدم دسترسی به داده

جدول ۲. مقایسه ریخت‌سنجی افراد نر جدایه ایرانی TS25 گونه‌ی *Steinernema carpocapsae* و جدایه تیپ DD 136.

	L	W	Abw	T	Es	Ep	Nr	SpL	SpW	Gl	SpLW	GS	%D
IRA18 n=۲۰	۱۲۰۵±۱۸۵*	۷۴±۱۵	۳۰±۲	۲۴±۳	۱۲۷±۶	۵۷±۶	۸۴±۵	۶۵±۳	۱۱/۲±۰/۵	۴۲±۲/۶	۵±۰/۴	۷۱±۴	۴۲±۲
	۹۶۲-۲۰۰۰**	۶۱-۹۱	۲۹-۴۲	۱۸-۳۰	۱۱۹-۱۵۵	۵۰-۷۸	۷۵-۹۵	۵۵-۷۰	۹/۲-۱۲/۲	۳۵-۵۰	۳/۶-۵/۴	۶۲-۷۵	۴۰-۴۵
Isolate DD 136 n=25	۱۳۹۰	۹۹	۴۱/۶	۲۹	۱۵۰	۵۹	۱۰۸	۶۱/۵	۱۱/۲	۴۸	+	+	+
Poinar (1967)	۱۱۲۰-۱۷۱۰	۷۵-۱۲۵	۳۳/۵-۵۵/۶	۲۲/۴-۳۷	۱۳۵-۱۶۰	۴۸-۷۲	۹۲-۱۱۹	۵۵/۵-۷۲/۵	۹/۳-۱۲/۸	۴۱-۵۵			

* میانگین ± انحراف استاندارد؛ ** دامنه تغییرات؛ + عدم دسترسی به داده

جدول ۳. فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های نزدیک هم.

	۱	۲	۳
<i>S. carpocapsae</i> TS25	.		
<i>S. carpocapsae</i> (AF331900)	۰/۰۱	.	
<i>S. scapterisci</i> (AF331898)	۰/۰۸	۰/۰۹	.

منابع

- Adams, B. J., Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. (pp. 1–33). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Bedding, R. A., Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.
- Ehlers, R. U., Hokkanen, H. 1996. Insect biocontrol with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 291-295.
- Eivazian Kary, N., Niknam, G., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M. 2009. A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the north-west of Iran. *Nematology*, 11: 107-116.
- Griffin C. T. O., Callaghan, K. M., Dix, I. 2001. A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes? *Parasitology*, 122: 181-186.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., Del Pino, F. G., Heng, J. A., Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mráček, Z., Nguyen, K. B., Reid, A. P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271–298.
- Kaya, H. K., Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Kaya, H. K., Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey L A (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. (pp. 281-324) San Diego, CA, USA, Biological Techniques Series.
- Nguyen, K. B., Smart, Jr. G.C. 1995. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 41: 183-190.
- Poinar, Jr. G. O. 1967. Description and taxonomic position of the DD-136 nematode (Steinernematidae; Rhabditoidea) and its relationship to *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Proceedings of Helminthological Society of Washington*, 34: 199–209.
- Poinar, Jr. G. O. 1975. Description and Biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.
- Swofford, D. L. 1955. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sunderland, MA, USA, Sinauer, 128 pp.
- Weiser, J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata, Steinernematinae) nový cizopasník housenek obalečce jablečného, *Carpocapsa pomonella* L. *Vestník Česk. Zool. Společnosti*, 19: 44–52.

Morphology and Molecular characterization of Iranian isolate of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Rhabditida, Steinernematidae) from north-west of Iran

Zhila Alizadeh and Naser Eivazian Kary*

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University Tabriz, Iran.

Date received: 3.9.2014

Date accepted: 5.8.2014

Abstract

During a survey in north-west of Iran, an entomopathogenic nematode isolate named TS25 was isolated by *Galleria* baiting from soil samples collected near Sardroud, East Azarbaijan, North-west of Iran during 2012. Based on morphological and molecular characters as well as cross breeding test, it was identified as *Steinernema carpocapsae* (Weiser 1955). Morphology and morphometric characterization and comparison with All and DD 136 isolates revealed differences in ratios b and d between their infective juvenile and NR in males. There were no significant differences among other characters. Maximum parsimony constructed Phylogenetic tree based on the sequences of Internal Transcribed spacer of ribosomal DNA clearly showed that the studied isolate constitute well supported monophyletic group with well-known *S. carpocapsae* isolate All. In constructed Phylogenetic tree, *S. scapterisci* showed nearest genealogic relationship with *S. carpocapsae*. Bootstrap value showed that defined monophyletic group has high confidence. Here we describe TS25 isolate in details.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, ITS- rDNA, Iran, Morphometric, Morphology, Phylogenetic analysis, *Steinernema carpocapsae*.