

مطالعه ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و مولکولی برخی از جدایه‌های جغرافیایی

نماتود بیمارگر حشرات (Rhabditida: *Steinernema feltiae*)

(Steinernematidae) از شمال غرب ایران

ناصر عیوضیان‌کاری*، داود محمدی و ژילה علیزاده

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eivazian@azaruniv.ac.ir

چکیده

با هدف مطالعه صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و مولکولی جدایه‌های نماتود بیمارگر حشرات *Steinernema feltiae* هشت جدایه از شمال غرب ایران مورد شناسایی و بررسی قرار گرفت. در بین جدایه‌ها تنوع ریخت‌شناختی مشاهده نگردید ولی تنوع ریخت‌سنجی قابل توجهی ردیابی و جدایه‌های جغرافیایی بر اساس صفات لاروهای آلوده‌کننده در سه گروه متفاوت قرار گرفتند، گروه اول متشکل از جدایه‌های IRA25 و IRA30، گروه دوم شامل IRA21، IRA28، IRA34، IRA22 و IRA23 با بیشترین فاصله گروه سوم را تشکیل داد. گروه‌بندی بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی افراد نر، جدایه‌ها را در چهار گروه قرار داد. جدایه‌های IRA22، IRA23، IRA21 و IRA28 یک گروه، IRA34، IRA25 و IRA30 هر کدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. مشابه گروه‌بندی حاصل از لاروهای آلوده‌کننده، جدایه‌های IRA17 به صورت جداگانه و با بیش‌ترین فاصله نسبت به بقیه گروه‌ها قرار گرفت. در بررسی الگوی PCR-RFLP ناحیه ITS-rDNA با شانزده آنزیم برشی اختلافی بین جدایه‌ها مشاهده نگردید ولی بین جدایه‌های ایرانی و جدایه Pumping اختلاف قابل ملاحظه‌ای به عنوان تنوع درون گونه‌ای مشاهده گردید. نتایج نشان داد هر چند که الگوی PCR-RFLP ناحیه ITS-rDNA آنزیم‌های MspI، HinfI و MboI جهت تفکیک جدایه‌های مورد بررسی حداقل از جدایه Pumping نشانگر کارآمدی می‌باشد اما در تفکیک جدایه‌های بومی فاقد کارایی بوده و لازم است روش‌های کارآمدتر، از جمله تجزیه و تحلیل نسب شناختی مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ITS-rDNA یا دیگر نواحی ژنومی مناسب، مورد ارزیابی و استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های برشی، ریخت‌سنجی، نماتود بیمارگر حشرات، ITS-rDNA، PCR-RFLP

Morphology, morphometric and molecular study of geographical isolates of an entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from north-west of Iran

Naser Eivazian Kary*, Davoud Mohammadi & Zhila Alizadeh

Azərbaycan Şahid Madani University

* Corresponding author, E-mail: eivazian@azaruniv.ac.ir

Abstract

The study was intended to investigate the morphological, morphometric and molecular characterization of eight geographical isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* from northwest of Iran. The results showed no detectable morphological variations, but significant morphometric variations were recorded among the isolates. Clustering based on morphometry of infective juveniles, classified the isolates in the following three separate groups: group I consists of IRA30 and IRA25; group II includes IRA21, IRA23, IRA34, IRA28 and IRA21 and group III contains of IRA17. Clustering the isolates based on the male's morphometric characters, yielded nearly similar results and four groups were constructed as follows: group I is made up of IRA22,

IRA23 and IRA21; group II holds IRA25, IRA34 and IRA28; group III contains IRA30 and IRA17 constitutes group IV. No intraspecific variation was observed among PCR-RFLP patterns of the native isolates resulted from 16 restriction enzymes but significant variations were recorded within the isolate Pumping by *HinfI*, *MspI* and *MboI*. Although these markers serve as effective tools in separating the native isolates from the exotic ones, they are unable to detect variations among native isolates. Therefore, only ITS-rDNA sequence based phylogenetic analysis can effectively clarify the intraspecific variations of *S. feltiae*.

Keywords: Entomopathogenic nematode, ITS-rDNA, Morphometric, PCR-RFLP, Restriction enzymes

Received: 13 June 2016, Accepted: 1 February 2017

مقدمه

نماتودهای بیمارگر حشرات (Entomopathogenic nematodes (EPNs)) متعلق به خانواده Steinernematidae و باکتری همزیست آنها، *Xenorhabdus* spp. انگل‌های اجباری و کشنده حشرات هستند. آنها یک گروه همه‌جازی و عوامل ارزشمند زیستی با کاربری گسترده علیه حشرات زیان‌آور می‌باشند. قابلیت آنها به عنوان عوامل کنترل زیستی آفات مختلف بسیار بالا بوده زیرا گونه‌ها و جدایه‌های مختلف کارایی‌های متفاوتی را در مورد آفات خاص و در شرایط خاص نشان می‌دهند (Eivazian Kary *et al.*, 2012; Eivazian Kary *et al.*, 2011; Kaya & Gaugler, 1993).

نماتودهای بیمارگر خانواده Steinernematidae شامل دو جنس *Steinernema* Travassos, 1927 و *Neosteinerema* Nguyen & Smart, 1994 هستند. این جنس دارای پنج گروه گونه‌ای مشتمل بر گروه‌های گونه‌ای *Glaseri*, *Feltiae*, *Intermedium*, *Carpocapsae* و *Bicornutum* با مجموع ۷۹ گونه توصیف شده (Nguyen, 2015) و جنس دوم این خانواده تنها یک گونه بنام *N. longicurvicauda* دارد که در سال ۱۹۹۴ توسط Nguyen & Smart توصیف شده است.

لارو آلوده کننده سن سوم که مرحله عفونت‌زای (Infective Juveniles) نماتودهای *Steinernema* می‌باشد، باکتری همزیست *Xenorhabdus* را در قسمت جلویی روده‌ی خود حمل می‌کند. با ورود لارو آلوده کننده به هموسل میزبان، باکتری‌های همزیست رها می‌شوند. این باکتری‌ها به سرعت در هموسل حشره تکثیر یافته و حشره در اثر عفونت باکتریایی (Septicemia) و معمولاً ظرف ۲۴-۴۸ ساعت کشته می‌شود. 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 خود کرده و بعد از پوست‌اندازی با حفظ پوسته لاروی مرحله قبلی وارد مرحله پیش آلوده کننده (pre-infective) و سپس آلوده‌کنندگی می‌گردد. لارو آلوده کننده تغذیه نکرده و می‌تواند چند ماه را بدون تغذیه در خاک سپری نماید.

در فهرست گونه‌های متعدد نماتودهای بیمارگر حشرات که به صورت گسترده تولید و به عنوان عوامل کنترل زیستی مورد استفاده وسیع می‌باشند، گونه *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده و یکی از پرکاربردترین گونه‌ها در برنامه‌های کنترل زیستی به شمار می‌آید. این گونه دارای پراکنش جهانی بوده و در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد (Hominick, 2002). شناسایی دقیق نماتودهای بیمارگر حشرات با استفاده از روش‌های سنتی و رایج، به دلیل کمبود صفات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی قابل اعتماد بسیار مشکل می‌باشد و لذا استفاده از راه کارهای مکمل از جمله آزمون دگرآمیزی و ابزارهای مولکولی از جمله برش فراورده‌های تکثیر یافته در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده (Restriction Fragment Length Polymorphism)

(RFLP) و مقایسه آن با ترادف‌های تعریف شده در بانک‌های ژنی به عنوان روش‌های مکمل و سریع در شناسایی گونه‌های این نماتودها مطرح می‌باشند. RFLPs به طور گسترده‌ای برای تشخیص و شناسایی گونه‌های *Steinernema* به کار گرفته شده‌است (Phan *et al.*, 2001; Hominick *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 1998).

تاکنون گونه‌های متعددی از نماتودهای بیمارگر حشرات از شمال‌غرب ایران گزارش و از نظر ریختی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است (Nikdel, *et al.*, 2011; Nikdel *et al.*, 2010; Eivazian Kary, 2010; Eivazian Kary, *et al.*, 2009).

با توجه به کارایی بالای نماتودهای 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، این تحقیق با هدف یافتن صفات اختصاصی جدایه‌های ایرانی به مطالعه صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و الگوی PCR-RFLP ناحیه ITS-rDNA برخی از جدایه‌های جغرافیایی نماتودهای بیمارگر حشرات گونه *S. feltiae* در شمال غرب ایران و گروه‌بندی آن‌ها پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل و از زمین‌های واجد پوشش گیاهان رایج در منطقه (باغ‌های سیب، مزارع یونجه و گندم و مراتع) انجام گرفت و نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از روش تله‌گذاری با لارو سن آخر پروانه موم‌خوار بزرگ (Bedding & Akhurst, 1975) از نظر وجود نماتودهای بیمارگر حشرات بررسی شدند. لاروهای پروانه موم‌خوار روزانه بررسی و لاشه‌ها در دمای اتاق در تله جهت جمع‌آوری لاروهای آلوده کننده (در صورت آلودگی لاشه حشره به نماتودهای بیمارگر حشرات) نگهداری شدند (White, 1929).

تهیه اسلاید میکروسکوپی

برای هر جدایه، از افراد نر و ماده بالغ نسل اول و دوم و لاروهای آلوده کننده اسلایدهای میکروسکوپی جهت مطالعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی تهیه شد. نماتودها بعد از کشته‌شدن در محلول رینگر 65°C به محلول تثبیت کننده TAF (۷ میلی‌لیتر فرمالدئید ۴۰٪، ۲ میلی‌لیتر تری اتانول آمین و ۹۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل) (Woodring & Kaya, 1988) منتقل و به مدت پنج شبانه روز در دمای اتاق نگهداری شدند. برای انتقال و رساندن نمونه‌ها به گلیسرین خالص از روش تبخیر تدریجی استفاده گردید (Kaya & Gaugler, 1993). در مورد لاروهای آلوده کننده از آن‌هایی استفاده شد که یک هفته بعد از ظهور اولین لارو آلوده کننده در تله وایت لاشه را ترک کرده بودند (Nguyen & Smart, 1994). تمامی بررسی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی با استفاده از میکروسکوپ المپیوسمدل BX41 مجهز به لوله ترسیم صورت و هر صفت حداقل در ۲۰ نماتود اندازه‌گیری شد. برای اطمینان بیشتر از صحت شناسایی گونه، از آزمون دگرآمیزی با جدایه 4CFMO که از آزمایشگاه بیوکنترل در دانشگاه ملی ایرلند تهیه شده بود استفاده گردید.

آماده سازی و تصویربرداری از نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO-41 از روش Nguyen & Smart (1995) و با اعمال برخی تغییرات استفاده شد. نماتودها بعد از چند بار شست و شو در محلول رینگر، جهت تثبیت به محلول گلو تارآلدید (Glutaraldehyde) ۳٪ منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۸ نگه‌داری شدند. بعد از دوره زمانی ذکر شده، نماتودها چهار مرتبه‌ی ۱۵ دقیقه‌ای در محلول سدیم کاکودیلات (Sodium cacodylate) ۰/۱M با pH ۷/۲ شست و شو و سپس به محلول اسمیوم تتروکساید (Osmium tetroxide) ۲٪ منتقل و به مدت ۱۲ ساعت در دمای °C ۲۴ نگه‌داری شدند. مجدداً نماتودها چهار مرتبه‌ی ۱۵ دقیقه‌ای در محلول سدیم کاکودیلات شست و شو و با استفاده از شیب‌های مختلف اتانول مشتمل بر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و در نهایت الکل خالص، به مدت ۲۰ دقیقه آبگیری شدند. سدیم کاکودیلات ۰/۱ M با pH ۷/۲ به‌عنوان بافر در تهیه تمامی محلول‌های ذکر شده مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آبگیری، نمونه‌ها روی پایه‌های مخصوص تصویربرداری SEM منتقل گردیدند.

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از روش Eivazian Kary *et al.* (2009) انجام و شانزده آنزیم برشی جهت شناسایی و بررسی چند شکلی احتمالی موجود در ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های موجود مورد استفاده قرار گرفتند. تیمار برش در دمای °C ۳۷ و با استفاده از ۱۵ میکرولیتر از فراورده تکثیر یافته در ۱۲ ساعت صورت گرفت. قطعات برشی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ درصد تفکیک شدند (Maniatis *et al.*, 1989). جهت شناسایی، ترادف ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های بومی ایران که توسط Eivazian Kary *et al.* (2009) و Nikdel *et al.* (2010) گزارش شده‌اند از بانک ژنی استحصال و الگوی RFLP آن با استفاده از نرم‌افزار <http://www.restrictionmapper.org> تهیه و با الگوی جدایه‌های مورد مطالعه مقایسه شدند. بعد از تعیین شباهت الگوهای RFLP جدایه‌های مورد بررسی با *S. feltiae* جهت اطمینان بیشتر، جدایه Pumping (AY170336) از بانک ژن انتخاب و با الگوی جدایه‌های مورد بررسی مقایسه گردیدند.

تجزیه‌های آماری

برای تعیین تفاوت‌های بین جمعیت‌ها ابتدا تجزیه واریانس چند متغیره (MANOVA) به منظور تثبیت خطای نوع اول، در مورد صفات اندازه‌گیری شده انجام گردید. بعد از اطمینان یافتن از وجود تفاوت بین جمعیت‌ها، تجزیه‌های واریانس تک متغیره (ANOVA) نیز برای هر کدام از صفات برای تعیین متغیرهای تاثیرگذار بر اختلافات موجود در جمعیت‌ها صورت گرفت. قبل از انجام تجزیه‌های واریانس، آزمون نرمال بودن متغیرها توسط روش کومولوگراف اسمیرنوف و آزمون یکنواختی واریانس‌ها در ارتباط با ANOVA توسط روش لون و آزمون یکنواختی ماتریس‌های کوواریانس به وسیله روش Box در ارتباط با MANOVA انجام شد. به منظور گروه‌بندی جمعیت‌ها ابتدا فاصله آن‌ها توسط معیار فاصله اقلیدسی محاسبه و سپس تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA صورت گرفت. بهترین محل برش در دندروگرام توسط تجزیه تابع تشخیص تعیین شد. جهت بررسی تفاوت بین جمعیت‌ها و گونه‌ها بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی از نرم افزار SPSS 15.0 استفاده گردید.

نتایج و بحث

در این بررسی ۸ جدایه جغرافیایی از گونه *S. feltiae* از خاک‌های زراعی و غیر زراعی شمال‌غرب کشور جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

ویژگی‌های ریخت‌شناختی

ماده‌ها: کوتیکول صاف. سر گرد یا بریده با شش لب، هر یک دارای یک پاییل در انتها (شکل ۱ A)، چهار پاییل سری، آمفیدها نامشخص، کیلورابدیون‌ها به خوبی اسکلت‌تیزه، پرورابدیون به صورت یک ساختار مشخص در بخش عقبی کیلورابدیون‌ها. مری در مقایسه با طول بدن کوتاه، شبیه دیگر گونه‌های *Steinernema*. حباب انتهایی گلابی شکل، دارای دریچه سه جزئی. سوراخ دفعی-ترشچی هم سطح حباب میانی یا کمی جلوتر از آن، غدد ترشچی در قسمت جلویی روده و سمت پشتی. یک جفت لوله جنسی با برگشتگی انتهایی. لبه‌های فرج با اپیپتیگمای بیرون زده و کوچک (شکل ۱ B). راست روده و مخرج مشخص. لبه عقبی مخرج معمولاً متورم، دم در ماده‌های نسل اول نوک تیز و دارای موکرون (شکل ۱ C) و در ماده‌های نسل دوم گرد و دارای موکرون (شکل ۱ D).

جدول ۱- محل و پوشش گیاهی غالب جایگاه‌های جداسازی جدایه‌های جغرافیایی *Steinernema feltiae* در شمال‌غرب ایران

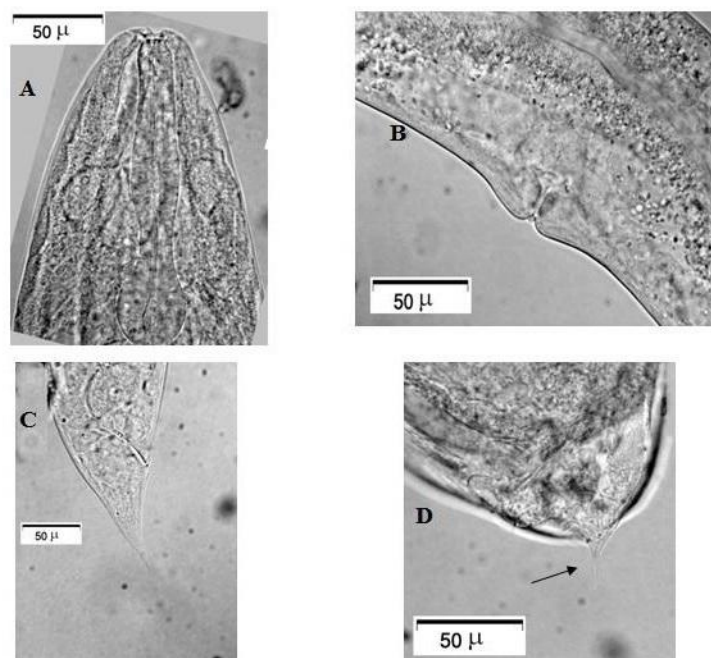
Table 1. Location and vegetation of sites with entomopathogenic nematodes of the geographical isolates of *Steinernema feltiae* from north-west of Iran

Isolate	Province	Locality	Vegetation
IRA17	East Azarbaijan	Varzegan	Grassland
IRA21	East Azarbaijan	Ahar	Grassland
IRA22	East Azarbaijan	Ahar	Grassland
IRA23	East Azarbaijan	Sarab	Wheat field
IRA25	East Azarbaijan	Ahar	Alfalfa field
IRA28	East Azarbaijan	Shabestar	Orchard
IRA30	East Azarbaijan	Heris	Orchard
IRA34	Ardabil	Meshgin Shahr	Orchard

نرها: کوتیکول صاف، ناحیه جلویی بدن شبیه ماده‌ها (شکل ۲ A). کاردیا بزرگ. بیضه دارای برگشتگی (شکل ۲ B). اندام نرینه تا حدی خمیده، سر اندام نرینه طویل، نسبت طول سر اندام نرینه به عرض آن بزرگتر از ۱/۵ و معمولاً دو برابر عرض آن، شفت کوتاه، تیغه با خمیدگی متوسط، بدون ولوم، انتهای اندام نرینه صاف. از دید شکمی گوبرناکولوم در قسمت جلویی تیز و دارای یک گردن باریک (شکل ۲ C). دارای ۱۱ جفت پاییل و یک پاییل پیش مخرجی جنسی بزرگ که به صورت پنج جفت شکمی در جلوی روزنه دفعی-ترشچی، دو جفت کنار مخرجی، یک جفت جانبی، دو جفت شکمی تقریباً انتهایی و یک جفت تقریباً پشتیروی دم قرار می‌گیرند. دم نوک تیز با موکرون طویل.

لارو آلوده کننده: بدن استوانه‌ای، از قاعده مری به طرف انتهای جلویی و از ناحیه مخرج به سمت انتهای دم باریک می‌گردد. شیارهای عرضی پوست نامشخص (شکل ۳ A). سطوح جانبی دارای هشت برجستگی و نه شیار طولی که از نزدیکی سر شروع و تا دم ادامه می‌یابند. برجستگی‌های کنار حاشیه ای (بیرونی) در مقایسه با

بقیه تا حدودی تحلیل رفته (شکل ۳ B). دایریدها در سطح همیزونااید. مری طویل و باریک که در حدود ۲۵ تا ۳۳ درصد عرض بدن را اشغال می کند، به طور مشخص باریک تر در محل حلقه عصبی، منتهی به حباب انتهایی دارای دریچه. حلقه عصبی مشخص. همیزونید هم سطح حباب انتهایی. دارای کاردیا. کیسه حامل باکتری همزیست توسط دیواره روده در زیر کاردیا مسدود شده است. فاسمیدها کوچک و در نیمه عقبی بخش غیر شفاف دم. دم بدون فرورفتگی نسبت به بدن. راست روده طویل و باریک، منخرج مشخص. دم مخروطی با انتهای نوک تیز.



شکل ۱- ماده *S. feltiae*: A) انتهای جلویی بدن، B) فرج در ماده نسل دوم، C) دم در نسل اول و D) دم در نسل دوم

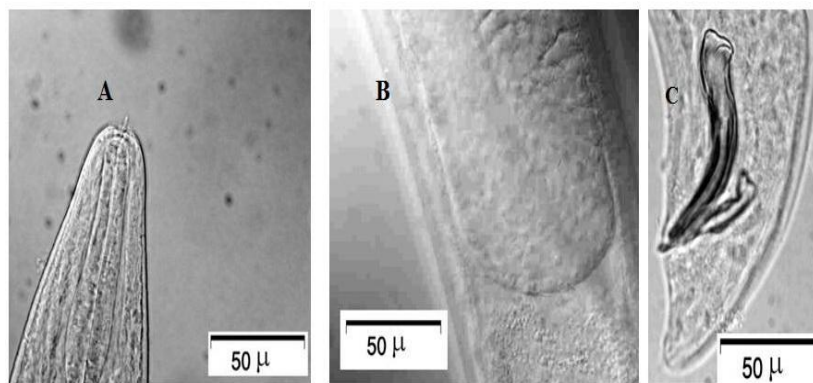
Fig. 1. Female of *S. feltiae*: A) Anterior end of body, B) Vulva of 2nd generation, C) Tail of 1st generation and D) Tail of 2nd generation.

با استفاده از کلید Nguyen & Smart (1996) جدایه های مورد مطالعه با اطمینان بالا به عنوان *S. feltiae* شناسایی شدند و تنها تفاوت، طول لاروهای الوده کننده در جدایه IRA17 بود که با گونه *S. kraussei* نزدیکی بیشتری داشت. Stock *et al.* (1997) از صفات ریخت شناسختی جهت رده بندی نماتودهای *Steinernema* استفاده و کلید شناسایی برای آنها ایجاد نمودند. با پیروی از کلید فوق کلیه جدایه های مورد نظر به عنوان گونه *S. feltiae* شناخته شدند. با استفاده از کلید Hominick *et al.* (1997) نیز این جدایه ها تحت نام *S. feltiae* شناسایی گردیدند. استفاده از کلید چندگانه Adams & Nguyen (2002) نیز نتایج مشابهی در بر داشت.

تنوع ریخت سنجی

داده های مربوط به بررسی های ریخت سنجی لاروهای آلوده کننده و نرهای جدایه های مورد بررسی گونه *S. feltiae* در جدول ۲ و ۳ و نتایج مربوط به تجزیه های واریانس چند متغیره و تک متغیره در جداول ۴، ۵ و ۶ درج شده اند. در تجزیه واریانس چند متغیره هر چهار نوع آزمون در ارتباط با خصوصیات لاروهای آلوده

کننده و نیز افراد نر معنی‌دار بودند که نشانگر وجود تفاوت بین جمعیت‌های مورد مطالعه (با تثبیت خطای نوع اول در سطح احتمال یک درصد) است. تجزیه‌های واریانس تک متغیره برای ویژگی‌های لاروهای آلوده کننده و نرها نیز نشان داد که از نظر کلیه این متغیرها تفاوتی معنی‌دار بین جمعیت‌ها وجود دارد. بنابراین می‌توان عنوان کرد که تمامی صفات مورد اندازه‌گیری در ایجاد تمایز بین جمعیت‌های مورد مطالعه موثر بوده‌اند.

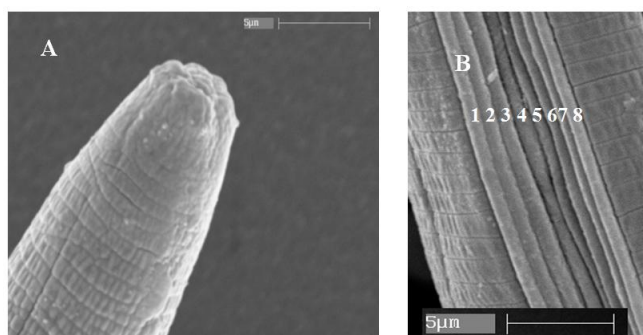


شکل ۲- نر *S. feltiae*: A) انتهای جلویی بدن، B) برگشتگی بیضه (Tr)، C) بخش انتهایی بدن نر، اندام نرینه و گوبرناکولوم

Fig. 2. Male of *S. feltiae*: A) Anterior end of body, B) Testis reflexion and C) Posterior end of body, spicule and gubernaculum.

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌سنجی لاروهای آلوده کننده با استفاده از الگوریتم UPGMA و فاصله اقلیدسی

گروه‌بندی جدایه‌های جغرافیایی مورد مطالعه *S. feltiae* بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی لاروهای آلوده‌کننده وجود سه گروه متفاوت را نشان داد (شکل ۴ و ۵). در این گروه‌بندی، گروه اول متشکل از جدایه‌های IRA25 و IRA30، گروه دوم شامل IRA21، IRA28، IRA34 و IRA22، و IRA23 در نهایت گروه سوم فقط شامل IRA17 می‌باشد. جدایه IRA17 بیش‌ترین فاصله را با دیگر گروه‌ها داشت. الگوی خاصی در ارتباط با تطابق پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی بین جدایه‌ها مشاهده نگردید. به‌عنوان نمونه، جدایه‌های IRA21 و IRA25 از اهر (منطقه جغرافیایی مشابه) در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند. گروه‌بندی حاصل با زیستگاه جدایه‌ها نیز مطابقتی نداشت.



شکل ۳- لارو آلوده کننده *S. feltiae*: A) انتهای جلویی و B) ناحیه جانبی که شیارهای طولی سطوح جانبی مشخص می‌باشد.

Fig. 3. Infective juvenile of *S. feltiae*: A) Anterior end of body, B) Lateral field showing longitudinal ridges.

Table 2. Morphometric of geographical isolates of *S. feltiae* and type isolate infective juveniles.

انواع	n	L	W	ABW	T	Es	EP	NR	a	b	c	d	e
IRA17	20	963±41*	32±2	19±2	84±5	132±8	60±4	90±12	31±2	7.3±0.2	11±0.5	45±4	68±5
		893-1019**	28-34	16-21	79-3492	120-147	47-65	71-111	27-34	6.7-7.8	10-12	43-51	52-73
IRA21	20	869±27	29±1	18±1	80±3	121±6	62±4	81±10	30±2	7.2±0.2	11±0.5	51±4	78±6
		787-906	28-31	16-19	76-84	117-137	60-73	74-100	27-32	6.3-7.7	10-12	46-62	71-95
IRA22	20	867±45	30±2	18±1.5	86±3	135±6	62±3	99±7	28±2	6.4±0.3	10±0.5	45±3	72±3
		787-937	25-36	16-21	78-92	123-148	57-69	80-110	25-32	5.6-6.9	9-12	41-51	66-80
IRA23	20	858±42	32±2	18±1	81±4	139±7	60±5	100±8	27±2	6±0.3	11±0.5	43±3	73±5
		781-925	28-36	17-20	75-92	125-148	52-69	84-111	23-32	5.7-6.6	10-11	37-47	64-81
IRA25	20	873±46	35±2	19±1	80±6	128±9	62±5	84±7	25±2	7±0.3	11±1	48±5	78±9
		769-956	31-38	17-21	67-89	107-139	56-79	75-95	22-29	6.3-7.6	9-13	43-60	69-102
IRA28	20	890±38	29±1	18±1	84±5	125±4	60±2	79±6	31±2	7±0.3	11±0.6	43±2	72±2
		800-950	27-31	15-21	77-95	120-132	57-66	70-87	28-34	6.3-7.6	9-12	45-52	60-77
IRA30	20	876±57	32±2	20±1.7	80±7	126±7	59±4	81±8	26±2	7±0.4	11±1	47±4	75±8
		781-981	31-39	18-23	57-89	109-136	52-66	66-95	22-30	6.3-7.5	10-14	42-55	65-94
IRA34	20	872±60	29±3	17±1.3	80±4	133±7	59±3	92±7	30±2	6.6±0.4	11±0.5	45±3	73±5
		762-969	25-34	15-19	72-87	121-142	52-69	77-101	27-33	5.6-7.3	10-12	40-53	67-83
Type# isolate	20	880	25	15.6	83	135	62	100	*	*	*	*	*
		750-950	22-27	15-17	71-92	115-150	53-67	89-108	*	*	*	*	*

* Mean ± Standard deviation; ** Range; + Data not available

* میانگین ± انحراف استاندارد؛ ** دامنه تغییرات؛ + عدم امکان مسترسی به داده؛ # به نقل از Nguyen and Adams, 2002

جدول ۲- داده‌های ریخت‌سنجی لاروهای آلوده کننده جدا‌یمنی مورد مطالعه *S. feltiae* و جدا‌یمنی

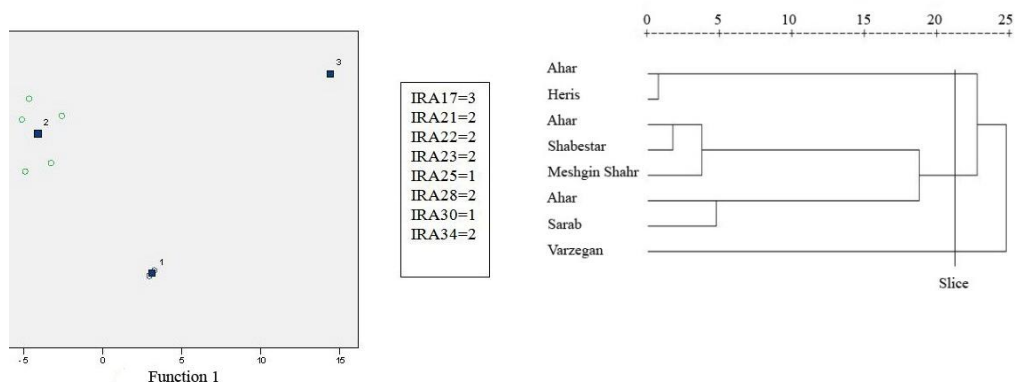
Table 3. Morphometric of geographical isolates of *S. felinae* and type isolate male.

ایزوله	n	L	W	ABW	T	Es	EP	NR	SPL	SPW	GL	D	E	SW	GS
IRA17	20	867 ± 138*	56 ± 8	32 ± 3	44 ± 4	142 ± 12	51 ± 6	88 ± 10	59 ± 6	9 ± 1	38 ± 8	42 ± 4	138 ± 20	1.8 ± 0.2	62 ± 10
		669-1118**	42-70	29-37	34-49	125-161	49-68	73-107	48-70	7-10	27-52	34-46	105-165	1.4-2.1	46-73
IRA21	20	1046 ± 59	73 ± 13	33 ± 3	28 ± 4	131 ± 8	70 ± 7	82 ± 11	57 ± 7	9 ± 1	36 ± 5	54 ± 6	265 ± 35	1.7 ± 0.2	63 ± 10
		931-1150	56-103	27-39	20-34	119-145	52-80	57-99	47-65	7-11	28-3457	43-64	221-335	1.4-2.3	45-80
IRA22	20	1037 ± 169	70 ± 12	33 ± 3	29 ± 4	142 ± 8	79 ± 7	91 ± 9	64 ± 5	11 ± 1	31 ± 4	57 ± 8	268 ± 44	2 ± 0.2	49 ± 7
		793-1425	50-87	26-41	22-37	128-155	69-93	76-106	56-72	8-12	22-37	47-73	201-366	1.5-2.3	37-67
IRA23	20	1175 ± 152	57 ± 9	30 ± 3	27 ± 5	133 ± 10	79 ± 13	92 ± 8	62 ± 6	10 ± 1	33 ± 5	59 ± 8	289 ± 54	2 ± 0.2	54 ± 8
		1019-1744	42-73	24-35	19-44	105-150	62-101	71-109	48-71	8-12	24-42	46-71	225-408	1.6-2.5	43-73
IRA25	20	1360 ± 130	133 ± 15	41 ± 3	31 ± 3	154 ± 8	82 ± 7	92 ± 9	70 ± 5	12 ± 1	40 ± 5	54 ± 6	271 ± 31	1.7 ± 0.2	57 ± 6
		1162-1625	114-171	37-44	25-40	144-172	66-92	73-106	59-82	9-12	30-47	44-68	221-337	1-1.9	42-68
IRA28	20	1335 ± 69	152 ± 12	40 ± 4	36 ± 4	145 ± 6	76 ± 4	97 ± 8	67 ± 3	13 ± 2	48 ± 5	53 ± 4	211 ± 22	1.7 ± 0.1	64 ± 9
		1268-1406	132-156	33-41	33-41	127-148	72-78	89-105	64-70	11-16	43-52	49-56	189-233	1.6-1.8	53-79
IRA30	20	1470 ± 258	82 ± 14	34 ± 2	39 ± 3	128 ± 9	85 ± 4	82 ± 11	67 ± 4	9 ± 0.7	47 ± 3	67 ± 4	221 ± 19	1.9 ± 0.1	69 ± 9
		1106-1662	61-106	31-38	34-45	109-139	79-93	67-100	58-74	8-10	39-52	61-74	176-248	1.6-2.1	60-81
IRA34	20	1384 ± 270	102 ± 26	42 ± 7	35 ± 3	145 ± 11	82 ± 15	95 ± 15	69 ± 8	11 ± 1	44 ± 3	56 ± 8	233 ± 52	1.7 ± 0.2	65 ± 5
		931-1725	54-124	30-50	32-41	127-158	62-99	75-117	53-73	9-12	39-47	47-65	173-303	1.4-1.8	59-73
Type isolate	10	934	75	-	27	130	130	-	62	-	40	-	-	-	-
		850-1000	60-90	-	22-32	110-150	65-85	-	60-65	-	35-45	-	-	-	-

* Mean ± Standard deviation; ** Range; + Data not available

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

جدول ۳- مقایسه ریخت‌سنجی افراد نر جدا شده‌های مورد مطالعه *S. felinae* و جدا شده نسبتی.



شکل ۵- تجزیه تابع تشخیص دو بعدی در ارتباط با تجزیه کلاستر شکل ۴

Fig. 5. Two dimensional canonical discriminant analysis related to cluster analysis of fig. 4.

شکل ۴- گروه‌بندی جدایه‌های جغرافیایی مورد مطالعه

S. feltiae بر اساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی لاروهای آلوده کننده و با استفاده از الگوریتم UPGMA و فاصله اقلیدسی

Fig. 4. UPGMA clustering of geographical isolates of *S. feltiae* based on infective juvenile morphometric data.

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌سنجی افراد نر با استفاده از الگوریتم UPGMA و فاصله اقلیدسی

گروه‌بندی جدایه‌های جغرافیایی *S. feltiae* بر اساس داده‌های ریخت‌سنجی افراد نر، وجود چهار گروه متفاوت را نشان داد (شکل ۶ و ۷). مشابه گروه‌بندی حاصل از لاروهای آلوده کننده، جدایه‌ی IRA17 به صورت جداگانه و با بیش‌ترین فاصله نسبت به بقیه گروه‌ها قرار گرفت. گروه‌بندی دیگر جدایه‌ها نیز کم و بیش با گروه‌بندی بر اساس لاروهای آلوده کننده مشابه و تقریباً قرابت جدایه‌ها حفظ شده بود. در این مورد نیز الگوی خاصی در ارتباط با تطابق پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی بین جدایه‌ها مشاهده نشد.

جدول ۴- تجزیه‌های واریانس چند متغیره در مورد متغیرهای ریخت‌سنجی لاروهای آلوده کننده و افراد نر جدایه‌های مورد مطالعه *S. feltiae*

Table 4. Multivariate analysis of infective juvenile and male morphometric data of *S. feltiae* isolates.

Source		F value	df	Statistic
Infective Juveniles	Pillai`s Trace	5.693*	808	3.288
	Wilk`s Lambda	50.522*	643.4	0.00
	Hotelling`s Trace	78274.3*	738	81456.23
	Roy`s Largest Root	685549.2*	101	81451.4
Males	Pillai`s Trace	6.665*	592	4.315
	Wilk`s Lambda	37.684*	472	0.00
	Hotelling`s Trace	8604.41*	522	13714.31
	Roy`s Largest Root	77988.37*	74	13700.66

*Significant difference at $P < 0.01$

* معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۵- تجزیه واریانس متغیرهای ریخت‌سنجی لاروهای آلود کننده جلدپیمای مورد مطالعه *S. felitae*
Table 5. Variance analysis of infective juvenile morphometric data of geographical isolates of *S. felitae*

Source	Degrees of Freedom	Mean Squares												
		e	D	c	b	A	NR	EP	Es	T	AbW	W	L	
Population	8	7.6*	3.07*	0.16*	0.06*	1.15*	11.01*	5.18*	24.04*	9.6*	0.47*	1.38*	1103.8*	
Error	105	59.52	17.74	0.46	0.12	4.27	72.12	32.52	47.32	25.7	1.55	4.08	2184.7	

*Significant difference at $P < 0.01$

* معنی دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۶- تجزیه واریانس متغیرهای ریخت‌سنجی افراد نر جلدپیمای مورد مطالعه *S. felitae*
Table 6. Variance analysis of infective juvenile morphometric data of geographical isolates of *S. felitae*.

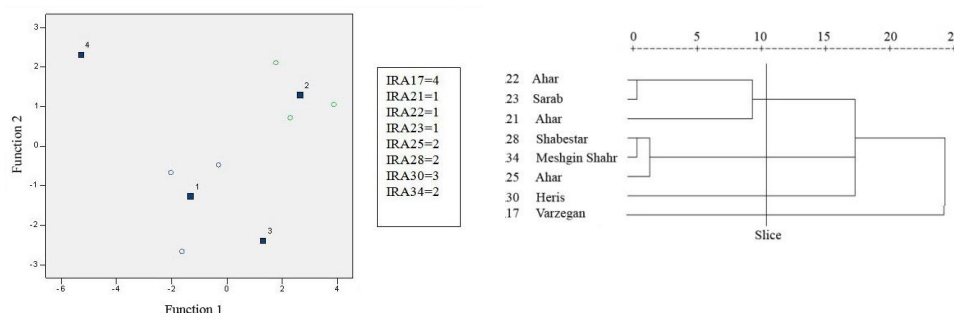
Source	Degrees of Freedom	Mean Squares												
		GS	SW	e	D	GL	SPL	T	AbW	NR	EP	Es	W	L
Population	8	3.99*	0.003*	65.64*	3.53*	1.69*	4.55*	1.26*	1.38*	8.79*	6.78*	21.3*	10.01*	1542.7*
Error	79	59	0.036	1346	34.9	32.9	33.06	18.15	12.5	108.6	76.61	93.9	321	20937

*Significant difference at $P < 0.01$

* معنی دار در سطح احتمال یک درصد

آزمون دگرآمیزی

با انجام این مطالعه که نتیجه آن ایجاد نتاج بارور در بیش از ۸۵ درصد تکرارها بود، بی‌تردید می‌توان بر صحت شناسایی جدایه‌ها اطمینان خاطر داشت. از سویی این آزمون نشان داد که شناسایی گونه‌ها براساس صفات ریخت‌شناختی و مولکولی صحیح بوده و تنوع مشاهده شده در الگوی PCR-RFLP از صفات جمعیتی بوده و بایستی آن‌ها را به عنوان تنوع درون گونه‌ای مدنظر قرار داد.



شکل ۷- تجزیه تابع تشخیص دو بعدی در ارتباط با تجزیه کلاستر شکل ۶

Fig. 7. Two dimensional canonical discriminant analysis related to cluster analysis of figure 6.

شکل ۶- گروه بندی جدایه‌های جغرافیایی مورد مطالعه

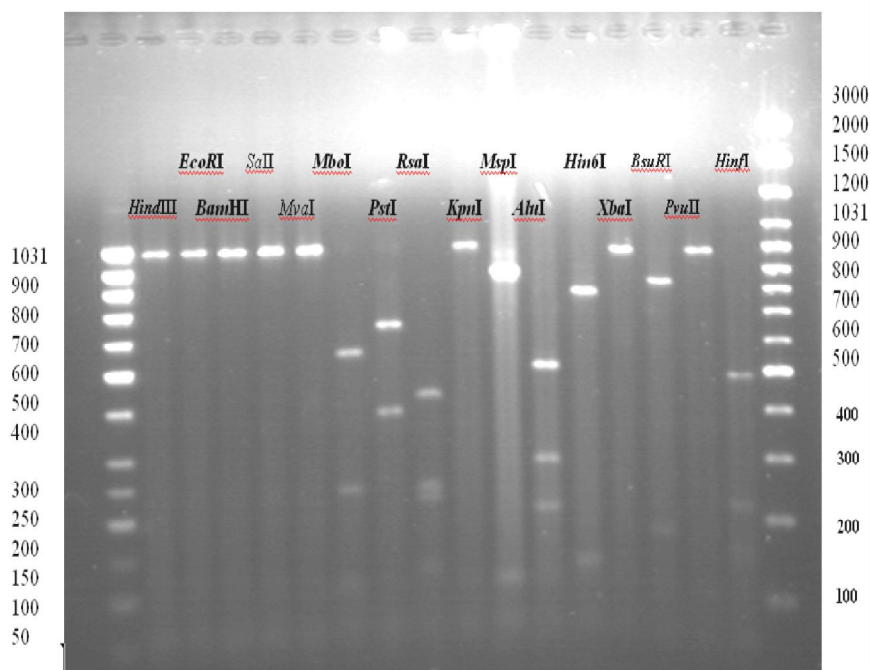
S. feltiae بر اساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی افراد نر و با استفاده از الگوریتم UPGMA و فاصله اقلیدسی

Fig. 6. UPGMA clustering of geographical isolates of *S. feltiae* based on male morphometric data.

الگوی برشی ناحیه ITS-rDNA جدایه‌ها

ناحیه ITS-rDNA تمام جدایه‌های مورد مطالعه *S. feltiae* برای آنزیم‌های بررسی شده الگوی مشابهی را نشان دادند. از بین آنزیم‌های مورد بررسی، *HindIII*، *EcoRI*، *BamHI*، *SaII*، *MvaI*، *KpnI*، *XbaI*، *PvuII*، جایگاه برشی بودند. الگوی برشی ناحیه ITS-rDNA جدایه‌ها بر اساس آنزیم *HinfI* شامل سه قطعه ۴۹۰، ۲۲۰ و ۱۷۰ جفت بازی بود. با توجه به طول ۱۰۰۰ جفت بازی قطعه تکثیری می‌توان اظهار داشت که ناحیه مورد بررسی برای این آنزیم دارای بیش از دو جایگاه برشی بوده ولی قطعات حاصله به علت کوچکی قابل تشخیص در ژل آگارز نبوده‌اند. بنابراین، با توالی‌یابی این ناحیه می‌توان تعداد دقیق جایگاه‌های برش را تعیین کرد. آنزیم *BsuRI* با یک جایگاه برشی در ناحیه مورد مطالعه، دو قطعه ۸۳۰ و ۱۸۰ جفت بازی ایجاد کرد. ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های فوق برای آنزیم *Hin6I* دارای یک جایگاه برشی با دو قطعه ۸۲۰ و ۱۵۰ جفت بازی بود. در مورد این آنزیم نیز احتمال وجود حداقل یک جایگاه برشی دیگر که یک قطعه کوچک غیر قابل ردیابی در ژل آگارز ایجاد نموده محتمل می‌باشد. آنزیم *AluI* دارای دو جایگاه برشی و سه قطعه ۲۹۰، ۵۱۰ و ۲۱۰ جفت بازی بود. در برش با آنزیم *MspI* مشخص شد که ناحیه مورد نظر دارای یک جایگاه برشی بوده و دو قطعه به طول ۸۵۰ و ۱۳۰ جفت بازی حاصل

برش با این آنزیم بود. برای آنزیم *RsaI* ناحیه ITS-rDNA جدایه‌های مورد مطالعه *S. feltiae* دارای سه جایگاه برشی بودند و در نتیجه چهار قطعه به طول ۴۲۰، ۲۳۰، ۲۱۰ و ۱۴۰ جفت بازی حاصل گردید. آنزیم *PstI* از یک جایگاه برشی برخوردار بوده و دو قطعه به طول تقریبی ۶۱۰ و ۳۸۰ جفت باز را ایجاد کرد. آنزیم *MboI* نیز دارای دو جایگاه برشی بر روی ناحیه ITS-rDNA بوده و سه قطعه به طول ۵۸۰، ۲۵۰ و ۱۳۰ را ایجاد نمود (شکل ۸). ترادف ناحیه ITS جدایه Pumping (AY170336) به منظور بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌های احتمالی بین جدایه‌های مورد مطالعه *S. feltiae* با جدایه دیگری از این گونه از بانک ژن انتخاب و الگوی برشی ناحیه ITS-rDNA آن با استفاده از نرم افزار Restriction Mapper برای آنزیم‌های مورد آزمون تهیه شد (جدول ۷). نتایج نشان دهنده وجود برخی تفاوت‌ها بین جدایه‌های مورد بررسی با جدایه Pumping بود و بنابراین الگوی PCR-RFLP ناحیه ITS-rDNA آنزیم‌های *MspI*، *HinfI* و *MboI* می‌تواند جهت تفکیک جدایه‌های مذکور، حداقل از جدایه Pumping مورد استفاده قرار گیرد. Reid et al. (1997) گزارش کردند که آنزیم‌های *HinfI* و *RsaI* جدایه‌های *S. feltiae* را به دو تیپ مشخص تقسیم می‌کنند: تیپ A1 (جدایه UK 76 و یک جدایه از نگاین) و A2 (جدایه UK 107). در بررسی صورت گرفته توسط Yoshida (2003) نیز مشخص گردید بین جدایه‌های ژاپنی مورد بررسی و برخی از جدایه‌های اروپایی تنوع درون گونه‌ای در الگوی PCR-RFLP ناحیه ITS-rDNA آنزیم‌های *Sau3AI*، *RsaI*، *HinfI*، *DdeI*، *TaqI* و *Tru9I* وجود دارد.



شکل ۸- الگوی برشی فراورده تکثیری ناحیه ITS-rDNA جدایه IRA34 نامتود *S. feltiae* با ۱۶ آنزیم برشی (ردیف‌های بالایی). ستون‌های راست و چپ به ترتیب نشانگرهای مولکولی ۱۰۰ و ۵۰ جفت بازی می‌باشند.

Fig. 8. Digestions of ITS-rDNA of isolate IRA34 using 16 restriction enzymes (upper rows). Left and right columns indicate 50 and 100 bp. ladder, respectively.

جدول ۷- مقایسه تعداد جایگاه‌های برشی و طول قطعات به نسبت آمده از برش ترادف ITS-rDNA در جدایه‌های IRA34 و Pumping گونه *S. feltiae*

Table 7. ITS-rDNA RFLP profiles of geographical and Pumping isolates of *S. feltiae*.

Isolate	Accession Number	HinfI	PvuII	BsuRI	XbaI	Hin6I	AluI	MspI	KpnI	RsaI	PstI	MboI
Pumping	AY170336	612	-	829	-	879	513	861	-	431	621	518
		194		151		101	257	97		237	359	239
		166					177	22		193		87
		9					33			117		77
									2		59	
IRA34		490	-	830	-	820	510	880	-	420	610	580
		220		180		150	290	130		230	380	250
		170					210			210		130
		*									120	

* Undetectable fragments may be present

* احتمال وجود قطعه یا قطعات کوچک غیر قابل ردیابی روی ژل آگارز

با توجه با شباهت کامل الگوی PCR-RFLP جدایه‌های مورد بررسی و اختلاف آن با جدایه Pumping، نتایج حاصله از بررسی صورت گرفته نشان دهنده کارایی این نشانگر در تفکیک جدایه‌های جغرافیایی *S. feltiae* شمال غرب کشور، حداقل از جدایه مورد مقایسه (Pumping) می‌باشد. در سال‌های اخیر تاثیر استفاده از نماتودهای بیمارگر غیربومی در قالب برنامه‌های کنترل زیستی آفات بر روی جانداران غیرهدف از جمله فرار از محل مورد استفاده و تاثیر منفی بر روی فون و فلور بومی غیرهدف، مورد بررسی و توجه قرار گرفته است (Henneman & Memmott, 2001). هر چند این مطالعات هنوز در آغاز مسیر قرار دارند اما اولین گام در ارزیابی هر عامل کنترل کننده زیستی غیربومی در قالب برنامه‌های مدیریتی آفات، توانایی تفکیک و شناسایی جمعیت‌های آن از عوامل بومی می‌باشد. در صورت رهاسازی تجاری نماتودهای بیمارگر حشرات می‌توان از آنزیم‌های برشی که بین جدایه‌های بومی و غیربومی چندشکلی نشان می‌دهند جهت تفکیک و مطالعه جدایه‌های بومی و غیربومی برای مقاصد خاص بهره جست.

References

- Adams, B. J., & Nguyen, K. B. (2002) Taxonomy and systematics. pp. 1-33 In Gaugler R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Bedding, R. A., & Akhurst, R. J. (1975) A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21, 109-110.
- Eivazian Kary, N. (2010) Morphometric and Molecular characterization of new isolate of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from the North of Iran. *Munis Entomology and Zoology* 5, 1075-1084.
- Eivazian Kary, N., Golizadeh, A., Rafiee Dastjerdi, H., Mohammadi, D., Afghahi, S., Omrani, M., Morshedloo, M. R. and Shirzad, A. (2012) A laboratory study of susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Huber) to three species of entomopathogenic nematodes. *Munis Entomology and Zoology*, 7(1), 372-379.
- Eivazian Kary, N., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Nikdel, M., & Niknam, G. (2010) Morphology and Molecular study of an entomopathogenic nematode, *Steinernema*

- bicornutum* Tallosi, Peters & Ehlers, 1995 (Nematoda, Rhabditida, Steinernematidae) from Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 29(2), 25-34.
- 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(1), 107-116. doi: 10.1163/156854108X398453
- Eivazian Kary, N., Rafiee Dastjerdi, H., Mohammadi, D., & Afghahi, S.** (2011) Laboratory study of susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) to some geographical isolates of Entomopathogenic nematodes. *Munis Entomology and Zoology* 5(3), 1066-1074.
- Henneman, M. L., & Memmott, J.** (2001) Infiltration of a Hawaiian community by introduced biological control agents. *Science* 293, 1314-1316.
- Hominick, W. M.** (2002) Biogeography. In Gaugler R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* pp. 115-143. Wallingford: CABI Publishing.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mracek, 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(4), 271-298.
- Kaya, H. K., & Gaugler, R.** (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38, 181-206.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J.** (Eds.). (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Publication.
- Nguyen, K. B.** (2015) Species of *Steinernema*. Available from: <http://entnem.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm> (accessed 4 April 2015).
- Nguyen, K. B., & Smart, G. C.** (1994) *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a Parasite of the Termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of nematology* 26(2), 162-174.
- Nguyen, K. B., & Smart, G. C.** (1995) Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 41, 183-190.
- Nguyen, K. B., & Smart, G. C.** (1996) Identification of entomopathogenic nematodes in the steinernematidae and heterorhabditidae (nemata: rhabditida). *Journal of Nematology* 28, 286-300.
- Nikdel, M., Niknam, G., & Eivazian Kary, N.** (2011) First report of an entomopathogenic nematode, *Steinernema kraussei* (Rhabditida, Steinernematidae) from Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 30(2), 39-51.
- Nikdel, M., Niknam, G., Griffin, C. T., & 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.
- Phan, K. L., Nguyen, N. C., & Moens, M.** (2001) *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. *Nematology* 3, 503-514.
- Reid, A. P., Hominick, W. M., & Briscoe, B. R.** (1997) Molecular taxonomy and phylogeny of entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) by RFLP analysis of the ITS region of the ribosomal DNA repeat unit. *Systematic Parasitology* 37, 187-193.
- Stock, S. P., Choo, H. Y., & Kaya, H. K.** (1997) An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticulum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematologica* 43, 15-29.

-
- Stock, S. P., Somsook, V., & Reid, A. P.** (1998) *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Systematic Parasitology* 41, 105-113.
- White, G. F.** (1929) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302-303.
- Woodring, J. L., & Kaya, H. K.** (1988) *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques*. : Southern Cooperative Series Bulletin, Arkansas, Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas.
- Yoshida, M.** (2003) Intraspecific variation in RFLP patterns and morphological studies on *Steinernema feltiae* and *S. kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Hokkaido. *Japanese Nematology* 5(5), 735-746.
-