

## مطالعه جدایه بومی نماتود بیمارگر حشرات *Heterorabditis bacteriophora* و باکتری همزیست آن *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*

جواد کریمی<sup>۱\*</sup>، عباس مکرم حصار<sup>۲</sup> و مهناز حسنی کاخکی<sup>۳</sup>  
۱، ۲، ۳. استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی  
دانشگاه فردوسی مشهد  
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۵ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲)

### چکیده

نماتودهای انگل حشرات از عوامل بسیار مهم در کنترل آفات می‌باشند. از میان گروه‌های مرتبط با این نماتودها، دو خانواده *Steinernematidae* و *Heterorhabditidae* نسبت به سایر گروه‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. با توجه به کاربرد تجاری این عوامل در کنترل آفات، تحقیقات گسترده‌ای برای شناسایی گونه‌های مختلف این نماتودها در نقاط مختلف دنیا صورت می‌پذیرد. در طی یک بررسی در رابطه با وجود نماتودهای بیمارگر حشرات در منطقه مشهد، یک جمعیت از جنس *Heterorhabditis* از خاک جداسازی گردید. گونه مورد نظر با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریکی مورد بررسی قرار گرفت و بعنوان گونه *H. bacteriophora* شناسایی شد. ناحیه ژنی ITS rDNA این نماتود تکثیر و توالی‌یابی گردید. در گروه‌بندی به روش‌های MP و NJ، این ایزوله در کنار سایر جمعیت‌های مربوط به گونه *H. bacteriophora* قرار گرفت. باکتری جداسازی شده از این نماتود نیز براساس خصوصیات فنتیکی و همچنین اطلاعات مولکولی ناحیه ژنی 16S rDNA شناسایی گردید. نتایج نشان داد که این باکتری، زیرگونه *Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii* می‌باشد. این اولین گزارش جامع از وجود این نماتود و باکتری همزیست آن در ایران است.

### واژه‌های کلیدی: نماتود بیمارگر حشرات، باکتری همزیست، ITS، 16S، شناسایی

#### مقدمه

می‌گردند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به مطالعه نماتودهای بیمارگر حشرات به منظور کاربرد در برنامه‌های کنترل بیولوژیک معطوف شده است (Burnell & Stock, 2000). وارد نمودن نماتودهای بیمارگر حشرات به عنوان عوامل بیوکنترل به منطقه‌ای خاص نیازمند اطلاعات قبلی از وجود آنها در آن محل و شناسایی گونه‌های بومی است (Miller & Barbercheck, 2001). همچنین به نظر می‌رسد کاربرد گونه‌هایی که به شرایط محیطی منطقه و آفت مورد نظر بهتر سازگار شده‌اند باعث کنترل بهتر آفت می‌شوند (Bedding,

نماتودهای خانواده *Heterorhabditidae* Poinar, 1976 انگل اجباری حشرات می‌باشند. تنها مرحله آزادزی این نماتودها لارو سن سوم است که دارای همزیست باکتریایی از جنس *Photorhabdus* متعلق به خانواده *Enterobacteriaceae* می‌باشد (Boemare, 2002). پس از ورود نماتود به بدن میزبان، لاروهای عفونت‌زا سلول‌های باکتری را در هموسل حشره آزاد می‌نمایند. نماتود و باکتری همزیست آن، موجب مرگ سریع حشره در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی

سانتی متری خاک بصورت تصادفی از مزارع چغندر قند (نزدیک به ریشه گیاه چغندر قند) اطراف مشهد جمع‌آوری گردید. به منظور بررسی حضور نماتودهای بیمارگر حشرات در نمونه‌های خاک، از لاروهای سن آخر *Galleria mellonella* L. (Lep.: Pyralidae) برای طعمه‌گذاری استفاده گردید (Bedding & Akhurst, 1975). لاروهای آلوده به تله وایت (White, 1927) منتقل گشت و پس از گذشت مدت زمان لازم، لاروهای عفونت‌زایی که وارد آب شده بودند جمع‌آوری و در دمای هشت درجه در یخچال نگهداری گردید (Kaya & Stock, 1997).

#### شناسایی ریخت‌شناسی بیمارگر

در شناسایی کلاسیک نماتود از افراد هرمافرودیت نسل اول و افراد ماده، نر و لاروهای عفونت‌زا نسل دوم با توجه به معیارهای ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی شرح داده شده توسط Stock & Kaya (1996) استفاده گردید. اندازه‌گیری‌های لازم (جدول ۱) با استفاده از میکروسکوپ نوری الیمپوس BH2 (مجهز به لوله ترسیم) انجام شد.

#### مطالعه ناحیه ITS بیمارگر

#### استخراج DNA و تکثیر ناحیه ITS

برای استخراج DNA ژنومی از روش Subbotin *et al.* (2003) استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR، آغازگرهای TW81 و AB28 مورد استفاده قرار گرفت. اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ μl بافر PCR، ۱ μl کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>)، ۰/۵ μl dNTPs، ۱ μl DNA الگو، ۱ μl آغازگر رفت، ۱ μl آغازگر برگشت، ۰/۳ μl آنزیم Taq و ۱۷/۷ μl آب مقطر استریل بودند. واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra صورت پذیرفت (Subbotin *et al.*, 2003).

#### توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی نماتود

محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت MWG در آلمان ارسال شد. قبل از ارسال، خالص‌سازی باند مربوطه با استفاده از کیت خالص‌سازی Bioneer انجام شد. توالی مربوطه پس از دریافت با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) ویرایش گردید. برای آنالیز فیلوژنتیکی، از ۲۵ توالی ثبت شده مربوط به ۱۵ گونه مختلف نماتود (موجود در بانک ژن NCBI) استفاده شد

(1990). از این رو یافتن گونه‌های بومی سازگار با شرایط محیطی دارای اهمیت است.

هم اکنون خانواده Heterorhabditidae دارای تنها یک جنس با نام *Heterorhabditis* می‌باشد (Stock *et al.*, 2002). تاکنون ۲۰ گونه از جنس *Heterorhabditis* در جهان شناسایی شده‌اند که این تعداد روز به روز در حال افزایش است (Edgington *et al.*, 2010; Plichta *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2002; Saleh, 1995). شناسایی گونه‌های *Heterorhabditis* با اتکای صرف به به خصوصیات ریخت‌شناسی مشکل است و استفاده از اطلاعات مولکولی مانند توالی نواحی ITS1 و ITS2، نیز در این زمینه ضروری است (Nguyen *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2003).

ظاهراً در فرآیند سازگاری نژادی نماتودها به شرایط محیطی خاص، نقش نژاد باکتریایی همزیست آن دارای اهمیت می‌باشد (Emelianoff *et al.*, 2008). برخی مطالعات نشان داده است که موفقیت پارازیتسم نماتودهای بیمارگر حشرات به شریک باکتریایی خاص آنها بستگی دارد (Sicard *et al.*, 2003). تاکنون سه گونه باکتری از جنس *Photorhabdus* شناسایی شده‌اند که هر یک دارای چندین زیرگونه متفاوت می‌باشند (Tailliez *et al.*, 2009).

تاکنون گونه‌های *S. feltiae*، *S. carpocapsae*، *S. kraussei*، *S. glaseri*، *S. bicornutum* و *H. bacteriphora* از 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، شناسایی جدایی‌یافته‌های بیمارگر حشرات و همچنین باکتری همزیست آن بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی مولکولی بوده است. توصیف نژادهای بومی نماتودهای بیمارگر و همزیست‌های باکتریایی آنها، اطلاعات بیشتری در زمینه انتخاب عوامل بالقوه مناسب در برنامه‌های بیوکنترل فراهم می‌آورد.

#### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری بیمارگر و آماده‌سازی

در سال ۱۳۸۷ تعداد ۵۰ نمونه از عمق صفر تا سی

محاسبه گردید (Kimura, 1980). آزمون بوت استرپ جهت ارزیابی و تخمین میزان ثبات شاخه‌های شجره با ۱۰۰۰۰۰ تکرار انجام شد (Felsenstein, 1985).

**استخراج باکتری همزیست نماتود**

استخراج باکتری به روش مستقیم انجام گرفت (Akhurst, 1980). از استریل کننده مرثیولیت برای ضد عفونی سطحی بدن نماتود استفاده شد و سوسپانسیون حاصل از مراحل استخراج باکتری، روی محیط کشت MacConkey پخش گردید و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد (Akhurst, 1980).

و به همراه توالی بدست آمده در این تحقیق، با کمک نرم‌افزار Clustal X 2.0.10 (Thompson *et al.*, 1994) هم‌ردیف شدند. گونه *Oscieius tipulae* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (Edgington *et al.*, 2010). رسم درخت‌های MP<sup>1</sup> (Eck & Dayhoff, 1966) و NJ<sup>2</sup> (Saitou & Nei, 1987) با کمک نرم‌افزار MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) انجام پذیرفت. در درخت NJ، فاصله تکاملی با استفاده از ضریب دو متغیره Kimura

1. Maximum Parsimony
2. Neighbor-joining

جدول ۱- اندازه‌های میکرومتری و آلومتری گونه *H. bacteriophora* (برحسب میکرومتر)

نر	لاروهای عفونت زا	ماده (Hermaphroditic)	صفت
۱۴	۱۵	۱۴	تعداد افراد مورد استفاده
۵۳۲±۱۴	۵۶۰±۱۹	۷۲۵±۱۸	طول بدن
(۴۹۷-۵۴۱)	(۵۴۰-۵۶۸)	(۷۰۲-۸۱۰)	
۲۷/۲±۱/۲	۲۶±۰/۶	۳۷/۵±۱/۱	عریض ترین بخش بدن
(۲۴-۲۹)	(۲۲-۲۷)	(۳۴-۳۹/۵)	
۲۲/۱±۰/۷	۲۳/۳±۰/۴	۲۳/۳±۰/۶	A
(۲۱/۴-۲۳/۷)	(۲۳/۹-۲۴/۱)	(۱۹/۸-۲۴/۲)	
۵/۷±۰/۱	۵/۲±۰/۳	۵/۲±۰/۲	B
(۵/۲۳-۵/۹)	(۴/۹۷-۶/۴)	(۴/۷-۵/۴)	
۱۰/۲۱±۰/۲	۵/۶۱±۰/۵	۱۰/۶۷±۰/۶	C
(۹/۶-۱۰/۴)	(۴/۹-۶/۲)	(۹/۸-۱۱/۲)	
۲/۹۶±۰/۱	۶/۲۹±۰/۳	۴/۱±۰/۱	c'
(۲/۸۵-۳/۲)	(۵/۸-۶/۵۹)	(۳/۷-۴/۲)	
-	-	۷۷/۵±۰/۵	V
-	-	(۷۶-۷۹)	
-	-	۸۵±۰/۸	V'
-	-	(۸۴-۸۸)	
۹۲/۵±۱/۵	۱۰۶/۳±۱/۳	۱۱۷/۵±۲/۵	منفذ دفعی - ترش‌حی
(۸۶-۹۴/۶)	(۹۲-۱۰۹)	(۱۱۱-۱۲۱)	
۵۴/۳±۲/۳	۹۶/۵±۱/۵	۶۸±۱/۸	طول دم
(۵۱/۲-۶۲)	(۹۱-۹۸)	(۶۵-۷۳)	
۹۵/۲±۱/۲	۹۱/۴±۱/۱	۹۳±۲/۱	موقعیت منفذ دفعی - ترش‌حی به طول مری
(۹۱/۴-۹۷/۳)	(۸۹-۹۲)	(۸۴-۹۷)	
۱۵۲/۳±۲/۳	۱۱۰/۲±۱/۲	-	موقعیت منفذ دفعی - ترش‌حی به طول دم
(۱۴۸/۷-۱۵۶)	(۱۰۴-۱۱۳)	-	
۳۵/۲±۰/۸	-	-	طول اسپیکول
(۲۹-۳۶)	-	-	
۱۵/۸±۰/۶	-	-	طول گوبرناکولوم
(۱۴-۱۷)	-	-	
۵۹±۱/۲	-	-	طول برگشتگی بیضه‌ها

که برای تکثیر ناحیه 16S باکتری‌های همزیست نامتودها توسط Fischer-le Sauxe *et al.* (1999) معرفی گردیدند. علاوه بر نمونه کنترل منفی، DNA باکتری *Xenorhabdus bovienii* به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده شد. شرایط انجام واکنش PCR مشابه مطالعه Fischer-le Sauxe *et al.* (1999) بود.

#### تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیکی باکتری

محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت MWG در آلمان ارسال شد. توالی مربوطه پس از دریافت با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) ویرایش گردید. در ارزیابی رابطه فیلوژنیک بین جدایه ایرانی *Photorhabdus* با دیگر جدایه‌ها و گونه‌های این جنس بر اساس توالی 16S، از ۲۵ توالی ثبت شده مربوط به سه گونه مختلف *Photorhabdus* spp. (موجود در بانک ژن NCBI) استفاده شد که عبارت بود از (AY278641 و *P. luminescens* ssp. *luminescens* (NR\_037074 *P. asymbiotica* ssp. (AY280573 و AY280574) *P. asymbiotica* ssp. (NR\_036851) *australis* *P. asymbiotica* (Z76753) *asymbiotica* (AY278650) *P. luminescens* ssp. *laumondii* (EU250473، AY278647، AY278649، AY278648، EU600195، EU600196 و HQ696947) *P. luminescens* ssp. *thracensis* (EU122952، EU930334 و EU930333) *P. luminescens* ssp. *kayaii* (AY278645) و *P. luminescens* ssp. *akhurstii* (AY278643) *P. temperate* (AY278652 و AY278657) *Xenorhabdus nematophila* YL001 (EU124381) و *Proteus vulgaris* (NR\_025336) توالی مربوط به باکتری‌های *Proteus vulgaris* و *Xenorhabdus nematophila* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شدند (Akhurst *et al.*, 2004). توالی‌های مورد نظر، با کمک نرم‌افزار Clustal X 2.0.10 (Thompson *et al.*, 1994) هم‌ردیف شدند. تغییرات مورد نیاز و رسم شجره به روش MP (Eck & Dayhoff, 1966) و NJ (Saitou & 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

#### تعیین مشخصات فنوتیک باکتری همزیست

پس از رشد اولیه باکتری‌های جدا شده روی محیط MacConkey، باکتری تک کلنی گردید. شرایط بررسی دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود. شکل سلول‌ها و تحرک آنها و جذب Dye (قرمز خنثی) به کمک کشت ۲۴ ساعته مطالعه گردید (Akhurst & Boemare, 1988). مرفولوژی سلول‌های باکتری با استفاده از میکروسکوپ Zeiss Axiostar (بزرگنمایی ۱۰۰۰) بررسی گردید. تشخیص فاز باکتری با کمک محیط کشت انجام پذیرفت. بررسی واکنش DNase، بیولومینسنس و نیز توان تولید رنگدانه بر اساس روش (Akhurst & Boemare, 1988) و (Boemare *et al.*, 1997) صورت پذیرفت. داده‌های حاصله با اطلاعات موجود مقایسه گردید. تعیین آستانه حرارتی رشد باکتری (ماکزیمم دما) با کشت باکتری در محیط LB<sup>۱</sup> و حمام آب گرم با دقت  $\pm 0.2$  درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به مدت زمان ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از این مدت زمان زنده‌مانی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

#### مطالعه ناحیه ۱۶S rDNA

#### استخراج DNA ژنومی باکتری و تکثیر ناحیه 16S rDNA

تک کلنی باکتری پس از تایید مشخصات مرفولوژیک و بیوشیمیایی در محیط LB (۱۰ ml) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۴۰rpm) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. استخراج DNA با توجه به روش Fischer-le Sauxe *et al.* (1999) انجام گرفت. محلول DNA ژنومی با افزودن ۲۰۰ μl آب مقطر یا بافر TE آماده شده و جهت استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Fischer-le Sauxe *et al.*, 1999). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۱۰۰ μl و به کمک ترکیبات ساخت شرکت Bioneer انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰ μl بافر PCR ۱۰×، ۸ μl مخلوط dNTPs، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* پلی‌مرز، ۱ μl از هر آغازگر و ۲ μl DNA الگو بود. آغازگرهای مورد استفاده عبارت بود از 16S-F و 16S-R

اسپیکول به صورت جفت و هلالی شکل بوده که گره‌های (مانوبریوم) آن نسبتاً کوچک است، گوبرناکولوم نسبتاً بلند و تقریباً به اندازه نصف طول اسپیکول می‌باشد. دم مخروطی شکل و نوک تیز است (شکل ۱- I, F, C).

**لاروهای عفونت‌زای نسل دوم:** بدن بلند، باریک و کشیده که اغلب در پوسته لاروی سن دوم قرار دارد. لوله اولیه مری به صورت متورم که گاهی تشخیص آن از حباب میانی مشکل می‌باشد، ایسموس، لوله‌ای شکل و کشیده، حباب میانی مری متورم و حباب انتهایی مری متورم و گلابی شکل است. حلقه عصبی در نیمه ابتدایی لوله ثانویه مری و با فاصله کمی نسبت به حباب میانی مری قرار دارد. دریچه بین مری و روده کاملاً مشخص می‌باشند (شکل ۱- G, E, B).

#### شناسایی مولکولی نماتود

ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 تکثیر شده در این نماتود، دارای قطعه‌ای به طول ۷۰۷ نوکلئوتید بود که توالی به دست آمده در بانک ژن (NCBI) با شماره دسترسی GU362544 ثبت گردید. برای آنالیز فیلوژنتیکی از روش‌های MP (شجره حاصل نشان داده نشده است) و NJ استفاده شد که توپولوژی درخت‌های حاصله مشابه بود. کلادوگرام حاصل از ارزیابی به شیوه NJ در شکل ۲ نشان داده شده است. بر این مبنا گونه‌های سه گروه "bacteriphora"، "indica" و "megidis" کاملاً تفکیک شدند و ایزوله مورد بررسی در کنار سایر جمعیت‌های گونه *H. bacteriphora* با مقدار بوت استرپ بالا (۹۴) قرار گرفت. درخت به دست آمده از این مطالعه بطور آشکاری مشابه نتایج *et al.* Edgington (2010) بود.

#### شناسایی فننتیکی باکتری

باکتری همزیست جدا شده مشخصات واضح و تیپیک *P. luminescens* را روی محیط کشت MacConkey نشان داد. نمونه مورد نظر در این محیط کشت، قرمز خنثی را جذب نمود. سلول‌های فاز ۱ این باکتری، حالت چسبنده و لزج داشت که این مشخصه در تیپ سلول‌های ثانویه دیده نمی‌شود. بررسی خواص بیوشیمیایی این جدایه باکتری نشان داد که ماکزیمم دمای رشد آن ۳۶°C (و بعضاً ۳۷°C ± ۰/۲) بود. واکنش DNase در جدایه Mashhad 1 مانند *P. luminescens* ssp. *laumondii* (استرین تیپ ۱۰۵۵۶۵<sup>T</sup> CIP) مثبت بود.

میزان ثبات شاخه‌های شجره با ۱۰۰۰۰۰ تکرار انجام شد (Felsenstein, 1985).

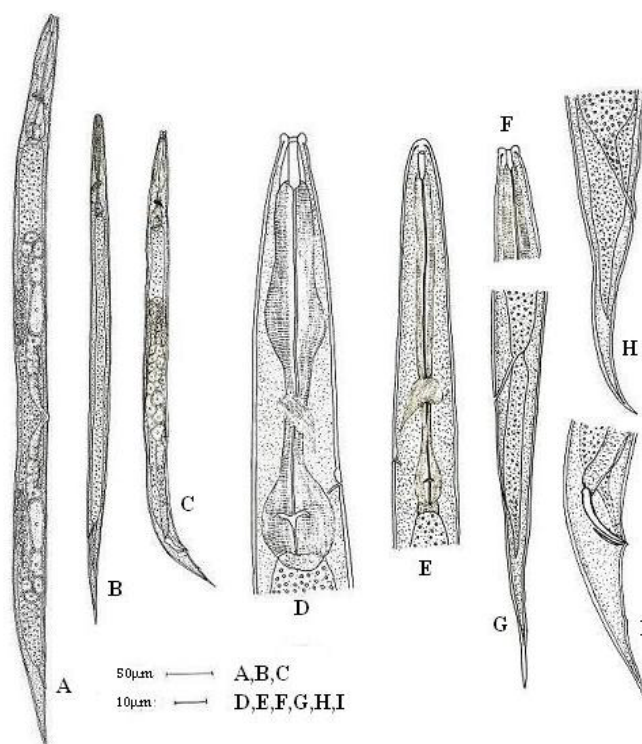
## نتایج

### شرح گونه *Heterorhabditis bacteriophora*

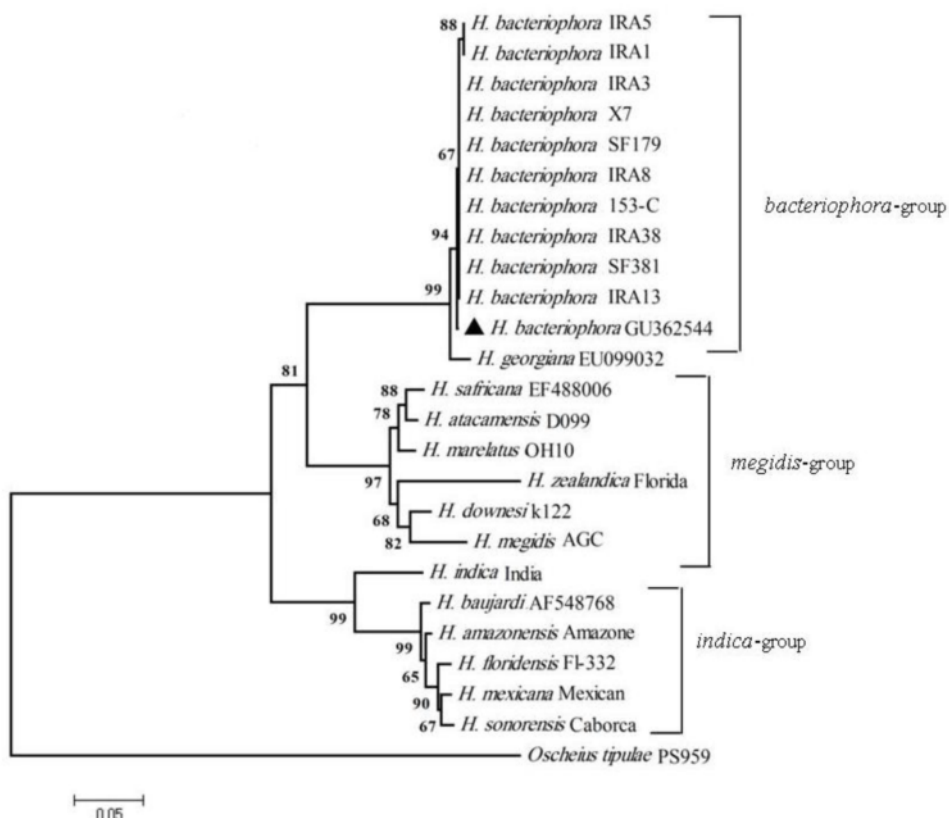
**ماده هرمافرودیت مربوط به نسل اول:** بدن کشیده و مستقیم، کوتیکول بدن صاف و فاقد شیار، سرصاف، فاقد شیار و همتراز بدن می‌باشد که در قسمت بالا تا حدی تخت (Truncate) و متمایل به گرد است. محافظه دهان لوله‌ای شکل و فراخ، لوله اولیه و ایسموس (لوله ثانویه مری)، لوله‌ای شکل و نسبتاً کشیده که عرض لوله اولیه بیشتر از لوله ثانویه می‌باشد. حباب میانی مری متورم و ماهیچه‌ای و حباب انتهایی مری متورم و گلابی شکل است. حلقه عصبی در وسط ایسموس مری قرار دارد. دریچه بین مری و روده مشخص و نیمه کروی است. دستگاه تولیدمثل دارای دو لوله جنسی است که در طرفین بدن کشیده شده‌است و در انتها دارای برگشتگی به سمت شکمی می‌باشند. شکاف فرج به صورت یک شیار عرضی در وسط بدن بوده که لب‌های آن دارای کمی برآمدگی می‌باشد. واژن به شکل کوتاه و ماهیچه‌ای است. دم مخروطی با انتهای نوک تیز که طول آن تقریباً دو برابر عرض بدن در ناحیه مخرج است. فاسمید در نمونه‌های مورد بررسی قابل مشاهده نبود (شکل ۱- A, H, D).

**افراد ماده نسل دوم:** شبیه به ماده هرمافرودیت ولی کمی کوچک‌تر می‌باشد.

**افراد نر نسل دوم:** بدن بلند و کشیده که پس از تثبیت شدن کمی به طرف شکم خمیدگی داشته و به حالت هلالی مشخص است. پوست بدن نسبتاً صاف و فاقد شیار، سر صاف، بدون شیار و همتراز بدن بوده که قسمت بالایی آن تا حدی تخت می‌باشد. مری کاملاً ماهیچه‌ای است و لوله اولیه و ثانویه مری بصورت لوله‌ای شکل و نسبتاً کشیده قابل مشاهده است. حباب میانی مری متورم و قابل تشخیص و حباب انتهایی مری متورم و گلابی شکل می‌باشد. حلقه عصبی در نیمه دوم لوله ثانویه مری و در مجاورت حباب انتهایی مری قرار دارد. دریچه بین مری و روده، مشخص و به شکل نیمه کروی است. دستگاه تولیدمثل دارای یک لوله جنسی می‌باشد که در انتها دارای برگشتگی به سمت شکمی است.



شکل ۱- *Heterorhabditis bacteriophora*: A: نematود ماده- B: لارو عفونت‌زا- C: نematود نر- D: بخش جلویی بدن نematود ماده- E: بخش جلویی بدن لارو عفونت‌زا- F: سر درنematود نر- G: دم لارو عفونت‌زا- H: دم ماده- I: دم نر



شکل ۲- رابطه فیلوژنی بین ایزوله ایرانی *H. bacteriophora* و دیگر گونه‌ها/ ایزوله‌های *Heterorhabditis* بر اساس توالی ناحیه ITS با استفاده از روش NJ با ۱۰۰۰۰۰ تکرار. گونه *Oscheius tipulae* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده و اعداد کنار گره‌ها معرف بوت استرپ می‌باشد.

جهان شناسایی شده‌اند که شامل Steinernematidae و Heterorhabditidae می‌باشند (Poinar, 1993). خانواده Steinernematidae دارای دو جنس *Steinernema* (با بیش از ۳۰ گونه) و *Neosteinerema* (تنها دارای یک گونه) بوده و خانواده Heterorhabditidae تنها دارای جنس *Heterorhabditis* می‌باشد (Edgington *et al.*, 2010; Plichta *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2002; Saleh, 1995).

با افزایش گونه‌های توصیف شده نماتودهای جنس *Heterorhabditis*، کاربرد روش‌های سنتی مانند مقایسه ریخت‌شناسی، استفاده محدودی دارد (Stock, 2002). در عین حال، توسعه روش‌های مولکولی، راه‌کارهای مناسبی را برای شناسایی جمعیت‌ها و گونه‌های نماتودهای بیماری‌گر فراهم آورده است. در این بین توالی‌یابی DNA، متداول‌ترین روشی است که مورد استفاده محققین قرار می‌گیرد (Stock, 2002; Stock *et al.*, 1996). از جمله نشانگرهای مولکولی به کار رفته در این گونه بررسی‌ها، ناحیه ژنی ITS1 و ITS2 است

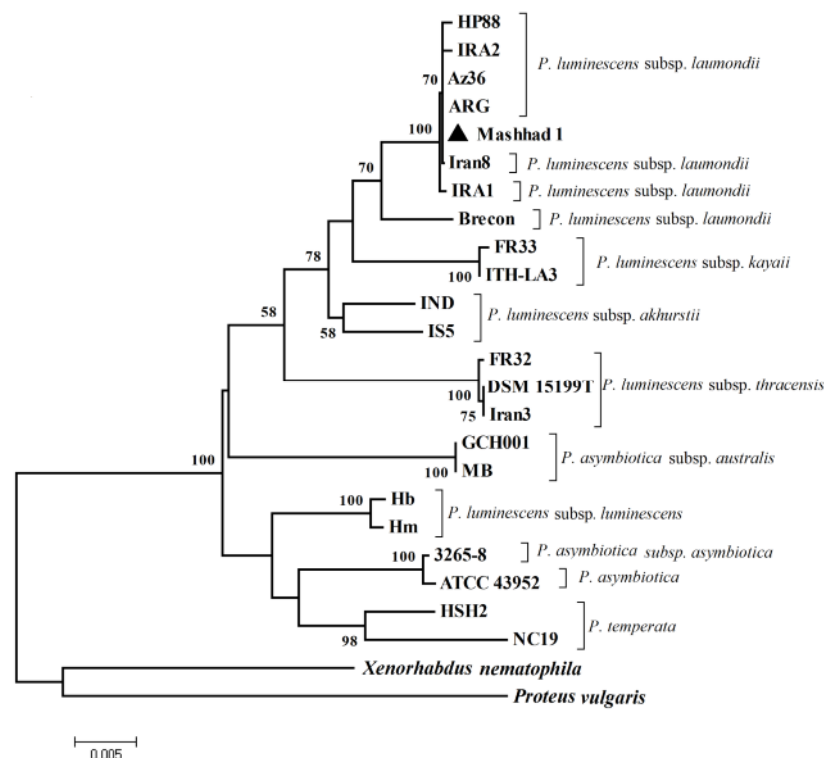
### شناسایی مولکولی باکتری

در تکثیر ناحیه 16S این باکتری، قطعه‌ای به طول ۱۴۹۹ نوکلئوتید بدست آمد. توالی مربوطه در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی HQ696947 ثبت گردید. در درخت NJ، استرین Mashhad 1 در کنار سایر استرین‌های مربوط به زیرگونه *P. luminescens* ssp. *laumondii* با عدد بوت استرپ بالا قرار گرفت (شکل ۳). استرین Mashhad 1 به همراه دیگر جمعیت‌های ایرانی و غیر ایرانی این گونه تشکیل یک شاخه را داد و به نظر می‌رسد استرین برکون (Brecon) با شماره دسترسی AY278647 گروه خواهری این شاخه باشد.

اطلاعات به دست آمده از درخت NJ نشان داد که ایزوله Mashhad 1 به همراه دیگر استرین‌های *P. luminescens* ssp. *luminescens* در شاخه‌ای جداگانه نسبت به گروه Brecon قرار می‌گیرد.

### بحث

تا کنون دو خانواده از نماتودهای بیماری‌گر حشرات در



شکل ۳- رابطه فیلوژنی بین ایزوله ایرانی *P. Luminescens* و دیگر گونه‌ها/ ایزوله‌های *Photorhabdus* بر اساس توالی ناحیه 16S با استفاده از روش NJ با ۱۰۰۰۰۰ تکرار. گونه *Proteus vulgaris* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده و اعداد کنار گره‌ها معرف بوت استرپ می‌باشند.

که دارای تنوع ژنتیکی مناسبی برای شناسایی گونه‌های *Heterorhabditis* بوده و اطلاعاتی سودمند در زمینه تفسیر فیلوژنی گونه‌های این جنس در اختیار محققین قرار می‌دهد (Adams et al., 1998). از این رو توصیه می‌گردد در شناسایی افراد این جنس، مشخصه‌های متفاوت ریخت‌شناسی به همراه اطلاعات مولکولی مورد استفاده قرار گیرد (Stock et al., 2002). در هر گونه نماتود بیمارگر، ناحیه ITS، خصوصیات ثابتی در بین تمامی افراد دارد اما طول و توالی ITS در بین گونه‌های مختلف نماتودهای بیمارگر حشرات متغییر است و از این رو مارکری مناسب برای تفکیک و تمایز گونه‌ها محسوب می‌شود. با این وجود یکی از محدودیت‌های کاربرد این مارکر در مطالعات فیلوژنی، گونه‌هایی است که از لحاظ تکاملی، فاصله زیادی با یکدیگر دارند. در این حالت مشکل هم‌ردیفی توالی ناحیه ITS بین گونه‌های مختلف باعث می‌شود نتایج بررسی مقایسه‌ای توالی مذکور در بین گونه‌ها، بعضاً به سادگی قابل تفسیر نباشد. این موضوع از مشکلات مهم استفاده از این ژن می‌باشد (Spiridonov et al., 2004). در این گونه مواقع، استفاده از ژن 28S که توالی آن در گونه‌های مختلف در قیاس با ITS از ثبات بیشتری برخوردار است پیشنهاد می‌شود (Stock & Hunt, 2006).

در خصوص جدایه باکتری همزیست این نماتود واکنش DNase مثبت بود در حالی که این واکنش در *P. luminescens ssp. luminescens* (استرین تیپ ATCC ۲۹۹۹۹<sup>T</sup>، همزیست گروه برکون *H. bacteriophora*) و همچنین *P. luminescens ssp. Akhurstii* (استرین تیپ CIP ۱۰۵۵۶۴<sup>T</sup>، همزیست *H. indica*) منفی است. بر اساس آزمایشات انجام شده در این بررسی، خصوصیات بیوشیمیایی جدایه Mashhad 1 در اکثر موارد مطابق با جدایه *P. luminescens ssp. laumondii* تیپ CIP ۱۰۵۵۶۵<sup>T</sup> بود. و به نظر می‌رسد از لحاظ همزیستی زیرگونه *P. luminescens ssp. laumondii* همراه نماتودهای زیرگونه HP 88 متعلق به *H. bacteriophora* بوده و استرین تیپ آن TT01 می‌باشد (Boemare & Akhurst, 2006). صفات مهم مرفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری همزیست منطبق با داده‌های مربوط به *P. luminescens*

که دارای تنوع ژنتیکی مناسبی برای شناسایی گونه‌های *Heterorhabditis* بوده و اطلاعاتی سودمند در زمینه تفسیر فیلوژنی گونه‌های این جنس در اختیار محققین قرار می‌دهد (Adams et al., 1998). از این رو توصیه می‌گردد در شناسایی افراد این جنس، مشخصه‌های متفاوت ریخت‌شناسی به همراه اطلاعات مولکولی مورد استفاده قرار گیرد (Stock et al., 2002). در هر گونه نماتود بیمارگر، ناحیه ITS، خصوصیات ثابتی در بین تمامی افراد دارد اما طول و توالی ITS در بین گونه‌های مختلف نماتودهای بیمارگر حشرات متغییر است و از این رو مارکری مناسب برای تفکیک و تمایز گونه‌ها محسوب می‌شود. با این وجود یکی از محدودیت‌های کاربرد این مارکر در مطالعات فیلوژنی، گونه‌هایی است که از لحاظ تکاملی، فاصله زیادی با یکدیگر دارند. در این حالت مشکل هم‌ردیفی توالی ناحیه ITS بین گونه‌های مختلف باعث می‌شود نتایج بررسی مقایسه‌ای توالی مذکور در بین گونه‌ها، بعضاً به سادگی قابل تفسیر نباشد. این موضوع از مشکلات مهم استفاده از این ژن می‌باشد (Spiridonov et al., 2004). در این گونه مواقع، استفاده از ژن 28S که توالی آن در گونه‌های مختلف در قیاس با ITS از ثبات بیشتری برخوردار است پیشنهاد می‌شود (Stock & Hunt, 2006).

روش‌های کلاسیک تعیین هویت باکتری‌های همزیست، مبتنی بر کشت باکتری روی محیط‌های مختلف می‌باشد. در این شیوه خصوصیتی چون رشد هوازی یا بی‌هوازی، تولید اسپور، توان حرکت، واکنش کاتالاز، بنزیدین<sup>۱</sup> و اکسیداز، تخمیر گلوکز و نیاز یا عدم نیاز به گلوکز در محیط کشت ارزیابی می‌گردد. این شیوه‌ها با افزایش تعداد جدایه‌های جدید، ارتقاء یافته‌اند. امروزه در مطالعه این گروه همزیست، راهکار چندشیوه‌ای<sup>۲</sup> مرسوم می‌باشد. تعیین مشخصات ژنوتیپی (خصوصیات DNA و RNA) کار متخصصین این گروه را آسان‌تر نموده است. در راهکار چند شیوه‌ای می‌توان از اطلاعاتی از قبیل رابطه‌ی DNA-DNA، مشخصات توالی ناحیه 16S (و بعضاً *gvr B* و *rop D*)، خصوصیات بیوشیمیایی و فنوتیپی و همچنین ریبوتایپ با اندونوکلائزهایی چون *EcoRI* استفاده نمود.

توالی 16S، علاوه بر تفکیک گونه‌ها/ زیرگونه‌های باکتری، قادر است جمعیت‌های مختلف را نیز متمایز نماید. تحقیقات نشان داده است توالی 16S rDNA ابزاری سودمند در زمینه شناسایی باکتری‌ها در سطح جنس می‌باشد (Fukushima et al., 2002). بر اساس توالی این ناحیه، تمام نژادهای *Xenorhabdus* از نژادهای *Photorhabdus* بطور آشکاری مجزا می‌شوند. البته لازم به ذکر است که مطالعه توالی بخشی از ژن 16S rDNA برای بررسی رابطه فیلوژنی در سطح جنس کافی است اما با این وجود توصیه بر این است که به نتایج فیلوژنی که تنها بر اساس یک ژن به دست آمده

1. Benzidine  
2. Polyphasic



بخصوص انتخاب گونه‌ها و یا نژادهای برتر برای کاربرد محسوب می‌شود (Stock, 2002). از طرفی بیشتر بررسی‌ها در زمینه نماتودهای بیماری‌گر حشرات، عمدتاً در مورد شناسایی خود نماتود بوده و همزیست‌های باکتریایی چندان مدنظر نبوده است (Emelianoff et al., 2008). با توجه به نقش باکتری‌های همزیست نماتودها در بروز عفونت خونی و مرگ حشره، مطالعه این گروه از پروکاریوت‌ها می‌تواند در شناخت ایزوله‌های مؤثرتر نماتودهای عامل بیوکنترل راهگشا باشد. هر چند این امر مستلزم تغییر قوانین مربوط به ورود این فرآورده‌های زیستی به کشور است. در این مقاله، با تلفیق کاربرد روش مولکولی، ریخت‌شناسی و فنتیکی، روشی چند مرحله‌ای در شناسایی کمپلکس نماتود-باکتری توضیح داده شده است تا به عنوان منبعی برای مطالعات آینده در مورد این گروه از بیماری‌گرهای حشرات توسط محققین مورد استفاده قرار گیرد.

با احتیاط نگریست (Liu et al., 1997). در حالیکه ناحیه 16S به عنوان یک گزینه مناسب برای شناسایی باکتری‌ها در سطح جنس مطرح است، اما به نظر می‌رسد گاه‌ا این ناحیه ژنی به جای حل مشکل باعث پیچیدگی روابط بین گونه‌های باکتریایی شده (Peat et al., 2010) و به دلیل تکامل آهسته ممکن است قادر به تفکیک نژادهای نزدیک از یکدیگر نباشد (Adams et al., 2006) از این رو توصیه می‌گردد تا از چند ناحیه ژنی دیگر چون *gyrB* و *glnA* نیز در اینگونه مطالعات استفاده گردد و رویکرد چند مرحله‌ای<sup>۱</sup> با استناد به چند ناحیه ژنی ناظر بر همین مطلب است (Peat et al., 2010).

شناسایی صحیح گونه‌های نماتود قدمی مهم در مسایل مرتبط با کاربرد این عوامل در بیوکنترل

#### 1. Polyphasic

## REFERENCES

- Adams, B. J., Burnell, A. M. & Powers, T. O. (1998). A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30, 22-39.
- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P. & Klein, M. (2006). Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*, 37, 32-49.
- Agazadeh, M., Mohammadi, D. & Eivazian Kary, N. (2010). Molecular identification of Iranian isolates of the genus *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) based on 16S rRNA. *Munis Entomology & Zoology*, 5, 772-779.
- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, 303-309.
- Akhurst, R. J. & Boemare, N. E. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology*, 134, 1835-1845.
- Akhurst, R. J., Boemare, N. E., Janssen, P. H., Peel, M. M., Alfredson, D. A. & Beard, C. E. (2004). Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1301-1310.
- An, R. & Grewal, P. S. (2010). *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Current Microbiology*. DOI 10.1007/s00284-010-9741-z.
- Bedding, R. A. & Akhurst, R. J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21, 109-110.
- Bedding, R. A. (1990) Logistics and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology in developing countries. In: R. Gaugler and H. K. Kaya, (Eds), *Entomopathogenic Nematodes for Biological Control*. (pp. 233-248) CRC Press.
- Boemare, N. E., Givandan, A., Brehelin, M. & Laumond, M. (1997). Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. *Symbiosis*, 22, 21-24.
- Boemare, N. E. (2002). Interactions between the partners of the entomopathogenic bacterium nematode complexes, *Steinernema-Xenorhabdus* and *Heterorhabditis-Photorhabdus*. *Nematology*, 4, 601-603.
- Boemare, N. E. & Akhurst, R. J. (2006). The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: M. Dworkin et al. (Ed.), *The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria*. (pp. 451-494) Springer.
- Brunel, B., Givandan, A., Lanois, A., Akhurst, R. J. & Boemare, N. (1997). Fast and accurate

- identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 574-580.
14. Burnell, A. M. & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2, 31-42.
  15. Eck, R. V. & Dayhoff, M. O. (1966). *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
  16. Edgington, S., Buddie, A. G., Moore, D., France, A., Merinoand, L. & Hunt, D. J. (2010). *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert, Chile. *Journal of Helminthology*, 19, 1-14.
  17. Eivazian Kary, N., Niknam, G., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A. & Moghaddam, S. A. (2009). A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) from Northwest of Iran. *Nematology*, 11, 107-116.
  18. Emelianoff, V., Le Brun, N., Pages, S., Stock, P., Taillie, P., Moulia, C. & Sicard, M. (2008). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 211-217.
  19. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
  20. Fischer-le Sauxe, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P. & Boemare, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *Laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperate* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1645-1656.
  21. Fukushima, M., Kakinuma, K. & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2779-2785.
  22. Hall, T. A. (1999). *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/. NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
  23. Hsieh, F-C., Tzeng, C-Y., Tseng, J-T., Tsai, Y-S., Meng, M. & Kao, S-S. (2009). Isolation and characterization of the native entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis*, and its symbiotic bacteria from Taiwan. *Current Microbiology*, 58, 564-570.
  24. Kaya, H. K. & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (ed.) *Techniques in insect pathology*. (pp. 281-324). Academic Press, London.
  25. Karimi, J., Kharazi-pakdel, A., Yoshiga, T. & Koochi-habibi, M. (2009). Report of entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri*, from Iran. *Russian Journal of Nematology*, 17, 83-85.
  26. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
  27. Liu, J., Berry, R. E., Poinar, G. & Moldenke, A. (1997). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16s rRNA gene sequences. *International Union of Microbiological Societies*, 47, 948-951.
  28. Liu, J., Berry, R. E. & Blouin, M. S. (2001). Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 87-91.
  29. Miller, L. C. & Barbercheck, M. E. (2001). Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. *Biological Control*, 22, 235-245.
  30. Nguyen, K. B., Gozel, U., Koppenhofer, H. S. & Adams, B. J. (2006). *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. *Zootaxa*, 1177, 1-19.
  31. 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, 767-773.
  32. Parvizi, R. (2001). Study infectivity of *H. bacteriophora* and *Steinernema* sp. against white grub, *Polyphylla olivieri*. *Journal of Entomological Society of Iran*, 21, 63-72. (In Farsi)
  33. Peat, S. M., French-Constantb, R. H., Waterfield, N. R., Marokházi, J., Fodor, A. & Adams, B. J. (2010). A robust phylogenetic framework for the bacterial genus *Photorhabdus* and its use in studying the evolution and maintenance of bioluminescence: A case for 16S, *gyrB*, and *glnA*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 728-740.
  34. Phan, K. L., Subbotin, S. A., Nguyen, N. C. & Moens, M. (2003). *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5, 367-382.
  35. Plichta, K. L., Joyce, S. A., Clarke, D., Waterfield, N. & Stock, S. P. (2009). *Heterorhabditis gerrardi* n.

- sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiontica* (Enterobacteriaceae: g-Proteobacteria). *Journal of Helminthology*, 83, 309-320.
36. Poinar, G. O. (1993). Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundamental Applied nematology*, 16, 333-338.
  37. Rainey, F. A., Ehlers, R. U. & Stackebrandt, E. (1995). Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 379-381.
  38. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
  39. Saleh, M. M. E. (1995). Efficiency of the Egyptian entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis taysarae* in controlling the cabbage-worm, *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 5, 99-112.
  40. Sicard, M., Le-Brun, N., Pagès, S., Godelle, B., Boemare, N. & Moulia, C. (2003). Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitology Research*, 91, 520-524.
  41. Stock, S. P. & Kaya, H. K. (1996). A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species and the role of morphometrics in the taxonomy of the species of the genus. *Journal of Parasitology*, 82, 806-813.
  42. Stock, S. P., Strong, D. & Gardner, S. L. (1996). Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. *Fundamental and Applied Nematology*, 19, 585-592.
  43. Stock, S. P. (2002). New trends in entomopathogenic nematodes systematics: impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. In: Monduzzi (Ed.), *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Parasitology*, 4-9 Aug., Vancouver, Canada, p.1.
  44. Stock, S. P., Griffin, C. T. & Burnell, A. M. (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. *Systematic Parasitology*, 51, 95-106.
  45. Subbotin, S. A., Sturhan, D., Rumpfenhorst, H. J. & Moens, M. (2003). Molecular and morphological characterisation of the *Heterodera avenae* complex species (Tylenchida: Heteroderidae). *Nematology* 5, 515-538.
  46. Szállás, E., Koch, C., Fodor, A., Burghardt, J., Buss, O., Szentirmai, A., Neilson, K. H. & Stackebrandt, E. (1997). Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 402-407.
  47. Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. & Boemare, N. (2009). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1921-1937.
  48. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
  49. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
  50. White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66, 302-303.