دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاه‌پزشکی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد

بررسی فونیستیک و رهیافتی مولکولی در مطالعه‌ی گوشخیزک‌های مشهد و حومه و تأثیر نماتود بیمارگر حشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar روی گونه‌ی فراوان

مونا کردستانی

اسفند ۱۳۹۰

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد

بررسی فونیستیک و رهیافتی مولکولی در مطالعه‌ی گوشخیزک‌های مشهد و حومه و تأثیر نماتود بیمارگر حشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar روی گونه‌ی فراوان

مونا کردستانی

استاد راهنما

دکتر مهدی مدرّس اوّل

استادمشاور

دکتر جواد کریمی

اسفند ۱۳۹۰

تعهد نامه

بررسی فونیستیک و رهیافتی مولکولی در مطالعه‌ی گوشخیزک‌های مشهد و حومه و تأثیر نماتود بیمارگرحشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar روی گونه‌ی فراوان

اینجانب مونا کردستانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته‌ی حشره شناسی کشاورزی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی آقای دکتر مهدی مدرس اول متعهد می‌شوم:

- نتایج ارایه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد دیگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل به نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**

استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

گوشخیزک‌ها شامل گروهی از حشرات با زیستگاه متفاوت ازنظر پوسیده‌خواری و هم‌چنین شکارگر آفات ریزجثه نظیر شته‌ها، پروانه‌ی کرم سیب و کنه‌های نباتی هستند. به‌دلیل دانش اندک در مورد فون گوشخیزک‌ها در استان خراسان رضوی، مطالعه‌ی فونیستیک این راسته به‌خوبی صورت نگرفته است. به‌این منظور طی سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ نمونه‌برداری از نواحی مختلف شهرستان مشهد و حومه انجام شد. در ادامه با استفاده از ویژگی‌های ریخت-شناسی و کلیدهای معتبر، شناسایی نمونه‌ها صورت پذیرفت. حاصل این بررسی، شامل شناسایی سه گونه‌ی *Forficula auricularia* (Linnaeus,1758)، *Anechura bipunctata*(Fabricius,1781) و *Labidura riparia* (Pallas, 1773) بود که به‌طور مشاهده‌ای، گونه‌ی *F. auricularia*گونه‌ی فراوان تشخیص داده شد. به‌منظور بررسی روابط این گروه با سایر گروه‌های مرتبط، بازسازی تبارنما براساس ژن COI و روش Neighbor Joining انجام شد. در تبارنما، دو گونه‌ی *F. auricularia* و *A. bipunctata* در خانواده‌ی Forficulidae و گونه‌ی *L. riparia* در خانواده‌ی Labiduridae قرار گرفتند. این حشرات گاه به‌دلیل زندگی اجتماعی در تراکم زیاد، باعث خسارت به گیاهان می‌شوند. درادامه، تأثیر نماتود بیمارگر حشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 روی گوشخیزک معمولی *Forficula auricularia* با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بیشترین مرگ‌ومیر ایجاد شده مربوط به غلظت ۳۰۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر گوشخیزک ۷۲ ساعت پس از شروع آزمایش بود. مطالعه‌ی حاضر اولین بررسی کلاسیک-مولکولی گوشخیزک‌ها و بررسی بیماری‌زایی نماتودهای بیمارگر حشرات در ایران می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ژن COI، فون، گوشخیزک‌ها، نماتود *Heterorhabditis bacteriophora*، مشهد.

فهرست مطالب

عنوان **شماره‌ی صفحه**

بخش اول: مقدمه

۱-۱- معرفی راسته‌ی گوشخیزک‌ها ۱

۱-۲- ضرورت کاربرد داده‌های مولکولی در حشره‌شناسی ۳

۱-۲-۱- دلایل استفاده از ناحیه‌ی COI در این مطالعه..... ۵

۱-۳- مطالعه‌ی برهم‌کنش گوشخیزک‌ها و نماتودهای بیمارگر حشرات ۶

۱- ۴- اهداف طرح ۸

بخش دوم: بررسی منابع

۲-۱- مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه‌ی فونیستیک روی راسته‌ی گوشخیزک‌ها ۱۱

۲-۲- مروری بر مطالعات مولکولی صورت گرفته روی راسته‌ی گوشخیزک‌ها ۱۵

۲-۳- مروری بر مطالعات بررسی تأثیر عوامل بیماری‌زا بر گوشخیزک‌ها..... ۱۷

بخش سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مناطق نمونه‌برداری..... ۲۱

۳-۲- روش‌های نمونه‌برداری..... ۲۲

۳-۲-۱- نحوه‌ی آماده‌سازی تله‌ی طعمه‌ای ۲۳

۳-۲-۲- نحوه‌ی آماده‌سازی تله‌ی گودالی ۲۳

۳-۳- زمان نمونه‌برداری ۲۵

۳-۴- نگاه‌داری حشرات ۲۵
۳-۵- مطالعات ریخت‌شناسی ۲۵
۳-۵-۱- روند جداسازی قسمت‌های مختلف بدن به استثنای انبرک‌ها و تهیه‌ی اسلاید ۲۶
۳-۵-۲ جداسازی انبرک‌ها و ژنیتالیای نر ۲۶
۳-۶- شناسایی نمونه‌ها ۲۷
۳-۶-۱ روش‌های شناسایی .....
۲۷
۳-۷- مطالعات مولکولی ۲۷
۳-۷-۱- استخراج DNA ۲۷
۳-۷-۲- واکنش PCR و تکثیر ناحیه‌ی سیتوکروم اکسیداز یک COI ۲۷
۳-۷-۳- بهینه سازی واکنش PCR ۲۸
۳-۷-۴- مرحله‌ی الکتروفورز ۲۸
۳-۷-۵- توالی‌یابی ناحیه‌ی COI ۲۹
۳-۷-۶- تجزیه و تحلیل توالی COI ۲۹
۳-۶-۷- آنالیزهای تبارشناسی ۳۰
۳-۸- بررسی تأثیر نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* روی گوشخیزک معمولی ۳۱
۳-۸-۱- پرورش گوشخیزک ۳۱
۳-۸-۲- تکثیر نماتود *H. bacteriophora* ۳۱
۳-۸-۳- بررسی حساسیت گوشخیزک به نماتود *H. bacteriophora* ۳۲

۳-۸-۴- روش برآورد میزان تولیدمثل نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* ۳۳

۳-۸-۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳۴

بخش چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- شناسایی گونه‌های راسته‌ی *Dermaptera* و فراوانی آن‌ها ۳۷

۴-۲- کلید شناسایی گونه‌های راسته‌ی گوشخیزک‌ها (Dermaptera) در شهرستان مشهد و حومه..... ۴۰

۴-۳- معرفی گونه‌های جمع‌آوری شده ۴۱

زیرراسته‌ی ..... Forficulina ۴۱

۴-۳-۱- خانواده‌ی ..... Forficulidae ۴۲

زیرخانواده‌ی..... Forficulinae ۴۳

جنس ..... *Forficula* sp ۴۳

گونه‌ی گوشخیزک معمولی ..... *Forficula auricularia* L. ۴۳

زیرخانواده‌ی ..... Anechurinae ۴۹

گونه‌ی..... *Anechura bipunctata* F ۵۰

۴-۳-۲- خانواده‌ی ..... Labiduridae ۵۴

زیرخانواده‌ی ..... Labidurinae ۵۴

جنس ..... *Labidura* sp. ۵۴

گونه‌ی گوشخیزک نواری ..... *Labidura riparia* Pall. ۵۵

۴-۴- نتایج حاصل از داده‌های مولکولی ۶۰

۴-۵- بررسی توالی COI گوشخیزک‌ها در بانک ژن و سیستم Bold ۶۱
۴-۵-۱- ثبت توالی‌ها در بانک ژن ۶۱
۴-۶- نتایج بررسی حساسیت گوشخیزک معمولی به نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* ۶۵
۴-۶-۱- نتایج تلفات گوشخیزک های آلوده به نماتود بعد از ۴۸ ساعت ۶۸
۴-۶-۲- نتایج تلفات گوشخیزک‌های آلوده به نماتود بعد از ۷۲ ساعت ۶۸
۴-۶-۵- نتایج پتانسیل تولیدمثلی نماتود ۶۹
بحث ۷۱
بخش پنجم
نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۷۷
پیوست ۷۹
منابع ۸۹

فهرست شکل ها

شکل۱-۱- خسارت گوشخیزک به گیاهان ۹

شکل۳-۱- مناطق نمونه‌برداری شهرستان مشهد و حومه در سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ ..... ۲۲

شکل ۳-۲- تله‌های گودالی، نوری و طعمه‌ای ۲۴

شکل ۳-۳- ظروف نگاه‌داری گوشخیزک و پرورش نماتد با استفاده از لارو گالریا ۳۴

شکل ۴-۱- فراوانی گونه‌های جمع‌آوری شده در شهرستان مشهد و حومه در سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ ..... ۳۹

شکل ۴-۲- فراوانی گونه‌ها در ماه‌های جمع‌آوری شده در شهرستان مشهد و حومه در سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ ..... ۳۹

شکل ۴-۳- شاخک، حشره‌ی کامل نر و ماده، قطعات دهان گوشخیزک (L.) *Forficula auricularia* ۴۵

شکل ۴-۴- پنجه، بال جلو و عقب در گوشخیزک (L.) *F. auricularia* ۴۷

شکل ۴-۵- سرسی حشره‌ی نر و ماده و ژنیتالیای نرگوشخیزک (L.) *F. auricularia* ۴۸

شکل ۴-۶- شاخک، حشره‌ی کامل نر و ماده و قطعات دهان در گوشخیزک (F.) *Anechura bipunctata* ۵۱

شکل ۴-۷- پنجه، بال جلو و عقب در گوشخیزک (F.) *A. bipunctata* ۵۲

شکل۴-۸- ژنیتالیای نر، سرسی حشره‌ی ماده و نر درگوشخیزک (F.) *A. bipunctata* ۵۳

شکل ۴-۹- حشره‌ی کامل ماده و نر، شاخک و قطعات دهان در گوشخیزک (Pall.) *Labidura riparia*. ۵۶

شکل ۴-۱۰- پنجه، بال جلو و عقب در گوشخیزک (Pall.) *Labidura riparia*. ۵۷

شکل ۴-۱۱- ژنیتالیای نر، سرسی حشره‌ی ماده و نر در گوشخیزک (Pall.) *L. riparia* ۵۸

شکل ۴-۱۲- تکثیر و توالی‌یابی ناحیه‌ی COI ۶۱

شکل۴-۱۳- درخت تبارشناسی ۶۴

شکل ۴-۱۴- آلوده شدن گوشخیزک معمولی با نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* و خروج نماتود از بدن گوشخیزک معمولی ۶۵

شکل ۴-۱۵- میانگین مرگ و میر گوشخیزک معمولی در اثر غلظت‌های مختلف لارو عفونت‌زای نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* ۶۷

شکل ۴-۱۶- میانگین مرگ و میر گوشخیزک معمولی در اثر غلظت های مختلف لارو عفونت‌زای نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت ۶۷

شکل ۴-۱۷- رگرسیون میانگین مرگ و میر گوشخیزک معمولی در اثر غلظت‌های مختلف لارو عفونت‌زای نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* بعد از ۴۸ ساعت ۶۸

شکل ۴-۱۸- رگرسیون میانگین مرگ و میر گوشخیزک معمولی در اثر غلظت های مختلف لارو عفونت‌زای نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* بعد از ۷۲ ساعت ۶۹

فهرست جدول‌ها

جدول ۳-۱- لیست چهار راسته‌ی مورد استفاده در آنالیز توالی COI ۳۰

جدول ۴-۱- گونه‌های شناسایی شده در شهرستان مشهد و حومه در سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ ..... ۳۷

جدول ۴-۲- مناطق نمونه‌برداری، گیاهان میزبان و فراوانی گونه‌های جمع‌آوری شده در شهرستان مشهد و حومه در سال ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ ..... ۳۸

جدول ۴-۳- نسبت جنسی سه گونه‌ی موجود در فون گوشخیزک‌های مشهد و حومه ۵۹

جدول ۴-۴- میانگین اندازه‌ی قسمت‌های مختلف بدن ده عدد حشره از هر گونه مربوط به راسته‌ی گوشخیزک‌ها در شهرستان مشهد و حومه بر حسب میلی‌متر ۶۰

جدول ۴-۵- شماره‌های دسترسی سه گونه‌ی شناسایی شده در شهرستان مشهد و حومه ۶۲

جدول ۴-۶- تعداد و نسبت نوکلئوتید در ناحیه‌ی COI ۶۲

جدول ۴-۷- تجزیه‌ی واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف لارو عفونت‌زای نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* روی گوشخیزک معمولی ۶۶

فهرست علایم اختصاری

علایم	معادل انگلیسی	معادل فارسی
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	پلی‌مرفیسم طول قطعات تکثیر شده
COI	Cytochrom oxidase I	_
DBP	Double Brood Population	جمعیت دونسلی
IJs	Infective juveniles stage	مرحله‌ی لاروی عفونت‌زا
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat	ریزماهواره‌ها
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1	اسپیسر رونویسی داخلی
ICIPE	International Centre for Insect Physiology and Ecology	مرکز بین‌المللی فیزیولوژی و اکولوژی حشرات
K2P	Kimura 2-Parameter	مدل دومتغیره‌ی کیمورا
NJ	Neighbor Joining	اتصال همسایه‌ها
PCA	Philippine Coconut Authority	انجمن نارگیل فیلیپین
PCR	Polymeras Chain Reaction	واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
RAPD	Randomly Amplified	تکثیر تصادفی
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	قطعات برش داده شده با طول متفاوت

علایم	معادل انگلیسی	معادل فارسی
SAS	Serial-Attached SCSI (Small Computer System Interface)	_
SBP	Single Brood Population	جمعیت تک نسلی
Taq polymerase	Thermus aquaticus polymerase	_
TBE	TrisBuric acid EDTA	_
UV	Ultra Violet Radiation	ماوراءبنفش

بخش اول
مقدمه

۱-۱- معرفی راسته‌ی گوشخیزک‌ها

به‌دلیل وجود رگ‌بال‌های شعاعی و شباهت بال عقب این حشرات به لاله‌ی گوش انسان نام گوشخیزک از نام انگلیسی Earwig مشتق شده است (حجّت، ۱۳۸۲). گوشخیزک‌ها احتمالاً به‌علت فعالیت در شب ممکن است به‌طور تصادفی به‌گوش انسان در حال خواب وارد شوند. ولی برخلاف اعتقادات خرافی، این حشرات از مخاط داخلی گوش تغذیه نمی‌کنند و به‌سمت مغز نمی‌روند (مدرّس اوّل، ۱۳۸۷). ریشه‌ی کلمه‌ی Dermaptera یونانی و به‌معنی بال‌پوستی‌ها می‌باشد (آلفورد، ۱۹۸۴). به‌عبارت دیگر کلمه‌ی Dermaptera، از Derma (Dermatos) به‌معنای پوست و Ptera به‌معنای بال‌ها تشکیل شده است و بال‌های جلوی به‌عنوان محافظ بال‌های عقب به‌کار می‌روند (لودس، ۱۳۸۴). گوشخیزک‌ها در زمان استراحت تمایل زیاد به تماس تمام بدن با سطوح مختلف دارند. به‌همین دلیل معمولاً در گوشه‌های اتاق و یا در باغ‌ها در حالی‌که برگ‌ها را به‌دور بدن خود لوله می‌کنند مشاهده می‌شوند. حشرات این راسته به‌طور کلی شب فعال هستند، سریع حرکت می‌کنند و روزها در شکاف‌ها، زیر پوسته‌های گیاهان (شکل ۱-۱؛ چ) و باقی‌مانده‌ی مواد غذایی (شکل ۱-۱؛ ث، ج) پنهان می‌شوند (رس و همکاران، ۱۹۸۲؛ هاس، ۱۹۹۶). حشرات کامل دارای بدن کشیده و باریک هستند و اگرچه بیشترین شباهت را به سوسک‌های سرگردان خانواده‌ی Staphylinidae دارند، ولی برخ ، گوشخیزک‌ها در انتهای بدن خود انبرک دارند. از

سوی دیگر، به‌دلیل شباهت اندازه و رنگ بدن به سوسری‌ها، گاه به اشتباه به‌جای این حشرات تشخیص داده می‌شوند ولی دراثر بدن سخت و انبرک‌های بدون مفصل از سایر حشرات مشابه متمایز می‌شوند (کوکارک، ۱۹۹۸؛ پلیتری، ۱۹۹۹). از این راسته بیش از دوهزار گونه در جهان وجود دارد (کوکارک، ۲۰۱۱). این گروه از حشرات، بیشترین فراوانی را در مناطق گرمسیر دارند و با افزایش عرض جغرافیایی جمعیت آن‌ها کاهش می‌یابد (بریندل، ۱۹۷۰). برخی از گونه‌ها در مناطق آفریقایی و کشور فیلیپین روی بدن جوندگان زندگی و از مواد روی بدن آن‌ها تغذیه می‌کنند (دونالد، ۱۹۹۷). از ایران تاکنون چهار خانواده و ۲۳ گونه از این راسته گزارش شده است (کوکارک، ۲۰۱۱).

حشرات کامل ممکن است بالدار (با یک یا دو جفت بال) یا بدون بال باشند. در صورت بالدار بودن، بال‌های جلو کوتاه، چرم‌مانند و فاقد رگ می‌باشند که معمولاً بالپوش[1] نامیده می‌شوند. بال‌های عقب برخلاف بال‌های جلو، غشایی، شفاف و دارای رگ‌های شعاعی می‌باشند (میر و همکاران، ۱۹۹۲). قطعات دهان از نوع ساینده، زبانه[2] دوقسمتی و پنجه‌ی پاها سه‌بندی هستند. در قسمت پشتی سومین و چهارمین حلقه‌ی شکم برخی از گونه‌های گوشخیزک، تعدادی غده قرار دارند که هنگام دفاع، مایعی بدبو را به‌فاصله‌ی ۷۵ تا ۱۰۰ میلی‌متر پرتاب می‌کنند (اسماعیلی و همکاران، ۱۳۷۱). به‌طورکلی زیست‌شناسی این راسته در دنیا خیلی کم مطالعه شده‌است. این حشرات، چهار سن پورگی دارند و زمستان را به‌صورت حشره‌ی کامل نر و ماده در مکان‌های زمستانی به‌سر می‌برند (کامیمورا، ۲۰۰۳). رنگ بدن پوره‌ها سفید مایل به قهوه‌ای است و برخلاف حشرات کامل، فاقد بال هستند (بوور،

1- Tegmen
2- Ligula

۱۹۱۱). انبرک‌های[1] پوره‌ها نیزه‌ای شکل هستند و بیشتر در حالت تدافعی (شکل ۱-۱؛ ح) از آن‌ها استفاده می‌کنند (بورور، ۱۳۷۱). دگردیسی در این حشرات تدریجی[2] می‌باشد (بریندل، ۱۹۷۱).

حشرات این راسته که به‌دلیل برآمدگی انبرک مانند انتهای بدن ظاهری ناخوشایند دارند و در منازل باعث ناراحتی می‌باشند، نه‌تنها به انسان آسیب نمی‌رسانند بلکه به‌عنوان عوامل کنترل بیولژیک نیز محسوب می‌شوند (طالبی، ۱۳۸۰). ازجمله شکارگرهای رایج در باغ‌ها، گوشخیزک‌ها می‌باشند. به‌طور مثال، گوشخیزک معمولی شکارگر آفاتی نظیر شته‌ها، کنه‌های نباتی، لارو پروانه‌ی کرم سیب، زنجره، سپردار، مگس یونجه و مینوزهای برگ در درختان سیب، گیلاس، گلابی و می‌باشد. سن سوم پورگی و حشرات کامل گوشخیزک قهوه‌ای *Proreus simulans*، گوشخیزک سیاه *Euborellia annulipes*، گوشخیزک نواری *Labidura riparia* و گوشخیزک *Diaperasticus erythrocephala* شکارگر تخم و سنین اول و دوم لاروهای پروانه‌ی کرم ساقه‌خوار ذرت و سورگوم قبل از ورود به ساقه می‌باشند و درکنترل این آفات رهاسازی شدند (هایله و هافسوانگ، ۲۰۰۱؛ بورنیپ و همکاران، ۲۰۰۲؛ آلباجس و همکاران، ۲۰۰۳؛ دوآنگ‌بوفا و همکاران، ۲۰۰۶؛ جامجانیا و همکاران، ۲۰۰۷؛ استوتز و انتلینگ، ۲۰۱۱).

۱-۲- ضرورت کاربرد داده‌های مولکولی در حشره‌شناسی

در روش‌های سنتی، حشره‌شناسان با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی گونه‌های حشرات ازجمله گونه‌های جدید را شناسایی می‌کردند. در این روش فقط اشخاص ماهر قادر به تشخیص درست گونه می‌شدند که یافتن اشخاص متخصص نیز زمان‌بر بود (ویل و روبینوف، ۲۰۰۴). ازطرف‌دیگر تنها درصورتی حشره‌شناس موفق به شناسایی گونه می‌شد که حشره‌ی مورد مطالعه کامل بود و اگر حشره در مرحله‌ی لارو یا پوره قرار داشت و یا در

1- Cerci
2- Paurometabola

مواردی که حضور حشره‌ی نر یا ماده به‌منظور تکمیل روند شناسایی عامل تعیین‌کننده بود، این روش با مشکل مواجه می‌گردید. درحالی‌که در روش‌های مولکولی برخلاف روش‌های سنتی می‌توان از تمام مراحل حشره برای شناسایی استفاده کرد (جینبو و همکاران، ۲۰۱۱). بیشتر مطالعات صورت گرفته روی این راسته از حشرات برپایه‌ی مطالعات ریخت‌شناسی ازجمله مطالعه‌ی سرک‌ها و ژنیتالیای[1] نر بوده است. در این میان شناسایی برخی از گونه‌ها که سرک‌های تغییرشکل یافته دارند دشوار است. چرا که ممکن است حشرات متعلق به یک گونه دارای انبرک‌های کاملاً متفاوت باشند (هاس و هانس، ۲۰۰۲). لذا استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند در این زمینه مؤثر واقع شود.

تبارشناسی این راسته نسبت به دیگر راسته‌های حشرات بسیار بحث برانگیز بوده‌است. راسته‌ی گوشخیزک‌ها ارتباط نزدیکی با راسته‌های توربافک‌ها (Embioptera)، موریانه‌مانندها (Zoraptera) و چوبک‌مانندها (Phasmida) دارد. آنالیزهای جدید داده‌های مولکولی و نتایج حاصل از اطلاعات ریخت‌شناسی، این راسته را گروه خواهری راسته‌ی Zoraptera و سپس Embioptera و Phasmida معرفی کرده است (ویرژیلیو و همکاران، ۲۰۱۰). یکی از مهم‌ترین موارد استفاده از روش‌های مولکولی، شناسایی گونه‌ها و تعیین روابط تبارشناسی بین آن‌ها می‌باشد و از روش‌های مختلفی مانند مارکرهای RAPD، آلوزیم‌ها، AFLP، ISSR و RFLP استفاده می‌شود (کرانستن و گولان، ۲۰۰۸). نواحی ژنی مورد استفاده در این راسته، زیرواحد بزرگ ریبوزومی (28S)، زیرواحد کوچک ریبوزومی (18S) و ژن کدکننده‌ی پروتین هیستون سه (H3) می‌باشد (گویلت و همکاران، ۲۰۰۰). ژن سیتوکروم اکسیداز یک (COI)، داخل DNA میتوکندری قرار دارد و حاوی اطلاعات مفید برای روش‌های مولکولی در سطوح پایین‌تر رده‌بندی می‌باشد. ژن ITS1 دارای نواحی قابل ترجمه و ناحیه‌ی متغیری از ژن‌های 5.8 و 18S است که نوکلئوتیدهای کافی را برای زیرگونه‌ها به‌طور جداگانه فراهم می‌کند (مندر و همکاران، ۲۰۰۳).

1- Genitalia

۱-۲-۱- دلایل استفاده از ناحیه‌ی COI در این مطالعه

دشواری هم‌ردیفی ژن‌های ITS موجب کاربرد محدود در مطالعات تبارشناسی شده‌است باوجود این اطلاعات توالی ITS به‌طور گسترده برای شناسایی گونه‌ها مخصوصاً گونه‌های پنهان و یا گونه‌های نزدیک به یکدیگر استفاده می‌گردد (جینبو و همکاران، ۲۰۱۱). DNA میتوکندری به‌عنوان اساس کارهای مولکولی و شجره‌شناسی استفاده می‌شود و به‌دلیل حفاظت مناسب داخل یک گونه، انتقال ویژگی‌های وراثتی مادری با اندکی تغییر و تکثیر راحت‌تر نسبت به ژن‌های هسته‌ای برای انجام مطالعات تبارشناسی و سیستماتیک، اهمیت زیادی دارد (لئون و همکاران، ۲۰۰۵). برخی از خصوصیات مهم و مثبت این ناحیه عبارت است از: قدرت تمایز بیشتر گروه‌های جانوری، امکان توالی‌یابی مستقیم توسط دستگاه توالی‌یاب، فواصل درون‌گونه‌ای کم و بین‌گونه‌ای زیاد (برخلاف ناحیه‌ی ITS) و پذیرش کم صفات ارثی جدید (جارویس و همکاران، ۲۰۰۵؛ جینبو و همکاران، ۲۰۱۱). ناحیه‌ی COI به‌دلیل وجود مکان‌های آغازگری قوی، به‌عنوان استانداردی برای DNA بارکدینگ انتخاب گردید. کاربرد این ناحیه در رویکرد دهه‌ی اخیر موسوم به DNA بارکد، اهمیت این ژن را به‌خوبی نشان می‌دهد (شاکل و هولند، ۲۰۰۴). رویکرد جدید DNA بارکد تلاش دارد با استفاده از داده‌های مولکولی زمینه‌ی شناسایی گونه‌های جانوری و حشرات را فراهم نماید (جرناس و دامگارد، ۲۰۰۶). لذا در این مطالعه، استفاده از این ناحیه‌ی ژنی در کنار مشخصات کلاسیک به‌منظور مطالعه‌ی تنوع زیستی گوشخیزک‌های مشهد مدنظر قرارگرفت.

در این بررسی تلاش گردید تا ابتدا گونه‌های موجود در منطقه‌ی مشهد شناسایی گردد، در ادامه با استفاده از اطلاعات مربوط به ناحیه‌ی ژنی COI، تنوع ژنی این ناحیه در نمونه‌های مورد بررسی و روابط آن‌ها با استفاده از این ژن ارزیابی شود.

۱-۳- مطالعه‌ی برهم‌کنش گوشخیزک‌ها و نماتودهای بیمارگر حشرات

گوشخیزک‌ها بسته به اهمیت اقتصادی محصول و میزان خسارتی که به گیاه وارد می‌کنند، به‌عنوان آفت یا حشره‌ی مفید تلقی می‌شوند. برای مثال گوشخیزک معمولی در درخت‌های سیب به‌عنوان عامل کنترل کننده‌ی شته‌ی خونی سیب شناخته می‌شود ولی در محصولی مانند گیلاس، آفت تلقی می‌شود و درنتیجه باعث کاهش محصول می‌گردد (والکر و فل، ۲۰۰۱). در شب، این حشرات حفره‌های کوچک روی گیاهان ایجاد می‌کنند و در مقایسه با گروه‌های دیگر حشرات، به‌گیاهان رشد یافته آسیب کم‌تری وارد می‌نمایند (زاک و همکاران، ۲۰۱۰). به‌عبارت دیگر این گیاهان، تغذیه‌ی گوشخیزک را تحمل می‌کنند ولی بذر و گل‌دهی گیاهان کوچک، به‌دلیل جویده شدن پرچم گل یا گل‌برگ توسط انبوه جمعیت گوشخیزک‌ها (شکل ۱-۱؛ د، ذ) کاهش می‌یابد (گوبین و همکاران، ۲۰۰۹). گیاهانی نظیر گل‌آهار، ختمی، توت‌فرنگی، آفتابگردان، کرفس، هلو، لوبیاسبز (شکل ۱-۱؛ پ، خ)، انگور، سیب‌زمینی (شکل ۱-۱؛ الف، ت)، گل‌سرخ، حبوبات، چغندر، ذرت (شکل ۱-۱؛ ب)، گلابی جنگلی، گوجه‌ی جنگلی، کاج، انار، میخک، کلم، کاهو، شبدرسفید، گل‌کوکب، جلبک، گلسنگ و ...، میزبان این گروه از حشرات هستند (بی‌بینکو، ۱۹۲۹).

در طی بیست سال گذشته، کشاورزان برای محافظت محصولاتشان، آفت‌کش‌های شیمیایی را به‌دلیل تأثیر سریع، کاربرد آسان و قیمت ارزان در مقابل آفات به‌کار می‌بردند. استفاده از آفت‌کش‌ها در مقیاس وسیع و غیرضروری منجر به بروز مقاومت در آفت، شیوع آفات ثانویه (ازجمله طغیان گوشخیزک معمولی در سال ۱۹۲۵ میلادی در شهر پرتلند)، طغیان مجدد آفت، بقایای سموم در مواد غذایی، نابودی دشمنان طبیعی هم‌چنین حشرات مفید و گرده‌افشان، تهدید سلامتی بشر و آلودگی محیط زیست گردید (ساتایاویروت، ۲۰۰۵). این درحالی است که تعداد جانداران مضر موجود در طبیعت نسبت به گونه‌های بی‌ضرر آن بسیار کم و محدود می‌باشد. اکثر حشرات، کنه‌ها، نماتودها و ... بی‌ضرر هستند و تعداد زیادی از آن‌ها واقعاً مفید بوده و با شکار یا انگلی‌کردن سایر

گونه‌های مضر مانع از ازدیاد جمعیت آن‌ها در طبیعت می‌شوند (لودس، ۲۰۰۵). ازجمله گروه بالقوه‌ای‌که مورد توجه روزافزون قرار گرفته‌اند نماتودهای بیمارگر حشرات می‌باشند. این گروه به‌عنوان عوامل کنترل طبیعی طیف وسیعی از آفات نظیر کرم سفید ریشه، لاروهای پروانه، لارو سوسک ژاپنی، سوسک کلرادو، لارو ریشه‌ی توت-فرنگی، سرخرطومی‌ها، کرم‌های مفتولی، کرم ریشه‌ی ذرت، آفات مرکبات، سبزی‌ها، گیاهان زینتی و ... استفاده می‌شوند (دیکس و همکاران، ۱۹۹۲؛ میلز و همکاران ، ۱۹۹۹؛ لازنیک و همکاران، ۲۰۰۸).

نماتودهای بیمارگر حشرات دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی ازجمله وجود یک مرحله‌ی عفونت‌زای پایدار، توانایی آلوده‌سازی میزبان، ایمن برای پستانداران و دیگر ارگانیسم‌های غیرهدف، توانایی تولید انبوه به‌طریق مصنوعی، پتانسیل بازیافت در محیط، قابلیت اختلاط با آفت‌کش‌های زیستی و برخی آفت‌کش‌های شیمیایی، تابع انتخاب ژنتیکی برای کسب صفات مطلوب و هزینه‌ی کم‌تر نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی می‌باشند (اسمارت، ۱۹۹۵؛ شاپیرو- آیلان و همکاران، ۲۰۰۲؛ هزیر و همکاران، ۲۰۰۳). این گروه از نماتودها متعلق به دو خانواده‌ی Heterorhabditidae (جنس *Heterorhabditis* sp.) و Steinernematidae (جنس *Steinernema* sp.) هستند. از بین گونه‌های نماتودهای بیمارگر حشرات گونه‌ی *Heterorhabditis bacteriophora*، گونه‌ای حائز اهمیت است که اولین‌بار در سال ۱۹۷۵ میلادی به‌عنوان گونه‌ای جدید از راسته‌ی Rhabditida معرفی گردید (لازنیک و همکاران، ۲۰۰۹؛ به‌نقل از پوینار، ۱۹۷۶). در کشورهایی مانند استرالیا و مجارستان نتایج مطلوبی در رابطه با تأثیر کاربرد *H. bacteriophora* روی آفات مختلف به دست آمده است (اهلر و همکاران، ۲۰۰۸). لارو سن سوم این جنس موسوم به لارو عفونت‌زا[1]، برخلاف *Steinernema carpocapsae* در قسمت پشت خود دارای دندانه یا قلاب می‌باشد که می‌تواند علاوه‌بر روزنه‌های طبیعی بدن مانند دهان، مخرج و روزنه‌های تنفسی از طریق کوتیکول

۱- در بین محققان در مورد مرحله‌ی لاروی نماتود که ممکن است دوم یا سوم باشد اختلاف نظر وجود دارد ولی اکثراً لارو سن سوم را به‌عنوان لارو عفونت‌زا درنظر می‌گیرند.