Virulence of Syrian Entomopathogenic Nematode Isolates Against of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Dr. Mohamad Ahmad [*]
Dr. Nada Allouf **
Mai Ali***

(Received 13 / 7 / 2021. Accepted 22 / 3 /2022)

□ ABSTRACT □

The virulence of three native isolates of Entomopathogenic Nematodes (EPNs) *Heterorhabditis* 160, *Heterorhabditis* 136, *Steinernema* 22, was evaluated using the last instar of *Galleria mellonella* as host. Four bioassays were conducted to compare them. (i) Exposure time assay, the isolate H.136 recorded the highest mortality rate within 15 minutes. Less significant differences in mortality rates among isolates were observed by increasing the exposure time intervals. (ii) Dose-response assay, all the studied isolates showed 100% mortality rate at the dose of 40 infective juveniles (IJ) per insect larva. H.136 caused highest mortality rate (41.66%), at the dose of 5 IJ/L. Where the isolate S. 22 revealed the lowest mortality rate (20.33%). (iii) One-On-One assay, the mortality rates among all isolates presented close results, where the isolate H.136 was the highest. (iv) Sand column assay, the results showed that the ability of isolates to find, penetrate and kill the host, with significant difference between them. Propit analysis was conducted to calculate the lethal half-time (LT50) and lethal half-dose (LD50). The findings presented that the most virulence isolate H.136 leaded 22 minutes as LT50 and 5.42 infective juveniles per larva as LD50.

Keywords: Entomopathogenic Nematode – Bioassays- *Steinernema* - *Heterorhabditis Galleria mellonella.*

[*] **Professor, Department of plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. mohamad.ahmad@tishreen.edu.sy**
****Assistant Professor, Department of plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. nada.allouf@tishreen.sdu.sy**
***** PhD student, Department of plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. mai-a85@hotmail.com.**

اختبار شراسة بعض العزلات المحلية من النيماتودا الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematodes على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

د. محمد أحمد*

د. ندى ألوف**

مي علي***

(تاريخ الإيداع 13 / 7 / 2021. قبل للنشر في 22 / 3 / 2022)

□ ملخّص □

اختُبرت شراسة ثلاث عزلات محلية من النيماتودا الممرضة للحشرات. عزلتان من الجنس *Heterorhabditis* (H.136, H.160) وعزلة من الجنس *Steinernema* (S.22) باستعمال العمر اليرقي الأخير لفراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*. أجريت أربعة اختبارات حيوية للمقارنة بين العزلات الثلاث هي زمن التعرض، الاستجابة للجرعة، واحد– لواحد، عمود الرمل. في اختبار زمن التعرض حققت العزلة H.136 أعلى نسبة قتل خلال 15 دقيقة من بداية الاختبار، وانخفضت الفروق المعنوية بين العزلات الثلاث مع ازدياد الزمن لتختفي عند الزمن 45 دقيقة وتحقق جميع العزلات نسب قتل متقاربة. أظهرت النتائج في اختبار الاستجابة للجرعة أن العزلات الثلاث حققت نسبة قتل بلغت 100 %عند الجرعة 40 فرد معدي/ اليرقة، في حين تفوقت العزلة H.136 عند الجرعة الأقل المستخدمة في الاختبار وهي 5 فرد معدي/ يرقة بنسبة قتل بلغت 41.66%. سجلت العزلة S.22 عند نفس الجرعة أقل نسبة قتل بلغت 20.33%. في اختبار واحد – لواحد حققت العزلات الثلاث نسب قتل متقاربة مع تفوق غير معنوي للعزلة H.136. في اختبار عمود الرمل أظهرت النتائج قدرة العزلات المدروسة على إيجاد العائل واختراقه وقتله مع تفوق معنوي للعزلتين H.160، H.136. استعمل اختبار Probit analysis لحساب الزمن النصفي القاتل والجرعة النصفية القاتلة للعزلات المدروسة. أظهرت النتائج تفوق معنوي للعزلة H.136 على بقية العزلات فكان الزمن النصفي القاتل لأفراد المجتمع المختبر هو 22 دقيقة، والتركيز النصفي القاتل هو 5.42 فرداً معدياً/ اليرقة.

الكلمات المفتاحية: النيماتودا الممرضة للحشرات، الاختبارات الحيوية، الجنس *Heterorhabditis*، الجنس *Steinernema*، فراشة الشمع الكبرى.

* أستاذ في قسم وقاية النبات كلية الزراعة جامعة تشرين –اللاذقية– سورية . mohamad.ahmad@tishreen.edu.sy

** أستاذ مساعد في قسم وقاية النبات. كلية الزراعة –جامعة تشرين– اللاذقية– سورية nada.allouf@tishreen.sdu.sy

***طالبة دكتوراه في قسم وقاية النبات . كلية الزراعة– جامعة تشرين –اللاذقية– سورية . mai-a85@hotmail.com

مقدمة

تعدّ النيماتودا الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematodes (EPNs) من فصيلتي Heterorhabditidae، Steinernematidae رتبة Rhabditida، ممرضات إجبارية التطفل على بعض الآفات الحشرية التي تُلحق خسائر اقتصادية كبيرة في المحاصيل الزراعية (Burnell and Stock., 2000). تشكل EPNs مع البكتريا المتعايشة معها ثنائياً مميتاً للعائل الحشري حيث يرتبطان معاً بعلاقة تكافلية متخصصة جداً (Lewis and Clarke., 2012). الطور اليرقي الثالث أو يسمى بالطور المعدي Infective Juvenile أو طور الاستمرارية Dauer Juvenile، هو الطور الوحيد الموجود في التربة حرّ المعيشة، والمسؤول عن إحداث العدوى واختراق جسم العائل الحشري. إما من خلال فتحات الجسم الطبيعية (فتحة الإخراج الهضمية Anus، فتحة الفم Mouth، الثغور التنفسية Spiracles)، أو بطريقة مباشرة من خلال اختراق الكيوتيكل، كما هو الحال عند أنواع الجنس *Heterorhabditis* التي تملك سناً ظهرياً يساعدها في ذلك (Poinar and Grewal., 2012; Smart, 1995). تصل النيماتودا إلى التجويف الدموي للعائل وتحرر البكتريا المتعايشة معها، والتي تبدأ بدورها بالتضاعف بسرعة وإفراز مواد بروتينية سامة ومضادات حيوية تحوّل مكونات جسم العائل إلى الشكل المناسب والملائم لتغذي النيماتودا، وهذا بدوره يؤدي إلى التسمم وتعفن الدم Septicemia مما يؤدي إلى حدوث الموت خلال 24-48 ساعة من الاختراق (Forst and Clarke., 2002; Koppenhöfer, 2010)، بالإضافة لهذه القدرة على القتل السريع تمتلك EPNs أيضاً مدى عوائلي واسع، ويمكن إنتاجها مخبرياً بأعداد كبيرة داخل جسم العائل In-vivo أو على بيئة صنعية In-vitro، بالإضافة لإمكانية تصنيعها على شكل مستحضرات تجارية وتسويقها وتطبيقها حقلياً Lacey and Georgis., 2012). هذا وقد أعفتها وكالة البيئة في أمريكا وأوروبا وبلدان شرق آسيا من الترخيص لأنها آمنة على البيئة والإنسان، وهذا جعل منها عوامل مكافحة حيوية فعّالة وناجحة عالمياً وجاءت مستحضراتها التجارية في المرتبة الثانية مبيعاً في أوروبا في قائمة المستحضرات الحيوية التجارية بعد مستحضرات بكتريا *Bacillus thuringiensis* (Divya and Sankar., 2009). بناءً على ذلك، اتجه الباحثون في معظم دول العالم للحصول على عزلات محلية جديدة من EPNs وإجراء التجارب الحيوية عليها لتقييم شراستها Virulence وانتقاء العزلات الأشرس لإدخالها في برامج الإدارة المتكاملة للآفات خاصة مع إمكانية تكامل استعمالها مع عدة مبيدات حيوية وكيميائية (Lacey and Georgis., 2012). تُجرى هذه الاختبارات عادة باستعمال العمر اليرقي الأخير لفراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)، فهي عائل مفضل لمعظم أنواع EPNs بسبب غنى أجسامها بالمواد الغذائية (Divya and Sankar., 2009). تتضمن هذه التجارب وفقاً لـ (Glazer and Lewis., 2000, Ricci *et al.*, 1996) ، مجموعة من الاختبارات الحيوية Bioassays وهي: اختبار زمن التعرض (Exposure Time) وهو يشير إلى معدل ونسبة اختراق النيماتودا لجسم العائل بالنسبة للزمن وبناءً عليه يتم حساب LT50 (الزمن النصفي القاتل)، اختبار الاستجابة للجرعة (Dose- Response) وهو يشير إلى العلاقة بين تركيز النيماتودا ونسبة الموت للعائل ومنه يتم حساب LD50 (الجرعة النصفية القاتلة)، اختبار واحد- لواحد(One-On-One) ويشير إلى قدرة فرد معدي واحد من النيماتودا على قتل يرقة واحدة من الحشرة، اختبار عمود الرمل (Sand column) وهو يقيس قدرة النيماتودا على تحديد موقع العائل المستهدف واختراقه.

لازالت الأبحاث التي تهتم بدراسة النيماتودا الممرضة للحشرات وكفاءتها في مكافحة الآفات في سورية محدودة وغير منتشرة على نطاق واسع، بالرغم من نجاح استعمالها في مكافحة كابنودس اللوزيات *Capnodis* spp في حقول اللوزيات في محافظة اللاذقية (Hourieh *et al.*, 2008)، و في مكافحة بعض آفات التربة مثل الدودة البيضاء و *Agriotes lineatus* في محافظة دمشق (Jawish., 2016)، وفي مكافحة حافرة أوراق البندورة حقلياً في محافظة الحسكة (Darwish *et al.*, 2020). لذا هدف هذا البحث إلى اختبار كفاءة بعض عزلات EPNs المعزولة من ترب الساحل السوري، على يرقات فراشة الشمع الكبرى مخبرياً والمقارنة بين شراستها، ليتم لاحقاً اختبارها في مكافحة بعض الآفات الحشرية، وبالتالي الوصول إلى تطبيقها حقلياً واعتمادها كمبيدات حيوية.

طرائق البحث ومواده:

النيماتودا EPNs: تم الحصول على العزلات *Heterorhabditis*.136, *Heterrhabditis*.160, *Steinernema*.22 من أنظمة بيئية مختلفة (بساتين حمضيات، حقول زيتون، مسطحات خضراء) أثناء دراسة الانتشار الطبيعي للنيماتودا الممرضة للحشرات في الساحل السوري خلال الأعوام (2017-2018-2019). عُزلت النيماتودا من التربة باستعمال طريقة الطعم بفراشة الشمع الكبرى الموصوفة من قبل Bedding and Akhurst., (1975. وُصفت على مستوى الجنس اعتماداً على الأعراض المتمثلة بالتغيرات اللونية التي ظهرت على اليرقات الميتة، بالإضافة للفحص المجهري بعد تشريح جثث اليرقات وتحديد الصفات التشخيصية المميزة لكل جنس والمتمثلة بوجود ذكور وإناث النيماتودا كجيل أول لها داخل العائل أو وجود الخناث Hermaphroditic فقط. كذلك بوجود السن الظهري في مقدمة الرأس لدى الطور المعدي أو غيابه، وبموقع فتحة الإطراح Excretory pore، ووجود كيس السفاد لدى الذكور أو غيابه (Adams and Nguyen., 2002).

حشرة *Galleria mellonella*: تم الحصول على العمر اليرقي الأخير من فراشة الشمع الكبرى بوزن يتراوح بين (0.2 -0.3) غ من خلال تربيتها مخبرياً في الحاضنة بحرارة 25± 2 C° ضمن وسط غذائي صنعي مكّون من: 350 دقيق القمح، 200 غ دقيق الذرة، 130 غ حليب بودرة، 70 غ خميرة جافة، 100 مل عسل، 150 مل غليسرين (Metwally *et al.,* 2012).

تحضير تراكيز المعلق النيماتودي: تم الحصول على الطور المعدي IJs ضمن معلّق مائي بعد أن وضعت يرقات *G.mellonella* المصابة بالنيماتودا في مصيدة وايت White Trap (White., 1927). نُظّف المعلق ميكانيكياً بالتصفية بالمناخل (50 مش) ومن ثم غُسل عدة مرات بالماء. حُفظ المعلق بحرارة (9-10) C° في البراد ووضع في جو المختبر قبل الاستعمال بيوم واحد. فُحصت حيويته قبل التطبيق مباشرة باستعمال المكبرة (Kaya and Stock., 1997) . استعملت طريقة التخفيف المتسلسل وفقا لـ (Glazer and Lewis., 2000) ، برجّ المعلق النيماتودي جيداً، ومن ثم أُخذ منه حجم مقداره 50 ميكروليتر بالماصة الميكروليترية ووضع في شريحة عدّ النيماتودا وأضيف لها 15 مل ماء، ومن ثم عدّت أفراد النيماتودا باستعمال المكبرة كررت هذه العملية ثلاث مرات. ومن ثم طُبّق القانون التالي:

$$[(i/c) - 1] \times V = Va$$

Va= كمية الماء (مل) الواجب اضافتها (في حال كانت القيمة إيجابية) أو إنقاصها (في حال كانت القيمة سلبية) من المعلق الأساسي. V= حجم المعلق النيماتودي ، c= التركيز النهائي المطلوب في 50 ميكروليتر، i = التركيز الأولي

في 50 ميكروليتر. في حال كان التركيز أعلى من القيمة المحددة يترك المعلق 30 دقيقة على الأقل لتتجمع النيماتودا في قعر الكأس الزجاجي ومن ثم يُزال الحجم المحدد من الماء الفائض بالماصة.

نُفذت جميع الاختبارات، باستثناء اختبار عمود الرمل، باستخدام أطباق well plates –24 (قطر كل حجرة 1.5 سم) ووضع في كل حجرة من الحجرات ورق ترشيح معقم. في كل معاملة، وعند كل قراءة أُخذت ست يرقات حشرية من الطبق وبعدد مكررات بلغ أربع (N=24). عُومل الشاهد في جميع الاختبارات بالماء فقط وبذات الحجم المحدّد لكل اختبار من دون وجود النيماتودا.

تنفيذ الاختبارات الحيوية

نُفذت جميع التجارب في مختبر أبحاث وقاية النبات التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة جامعة تشرين خلال عام 2020، وفقاً للطرائق المتبعة من قبل (Glazer and Lewis.,2000; Ricci., *et al* 1996)

أولاً اختبار زمن التعرض: حُضّر معلق نيماتودي بتركيز 8000 فرد معدي/مل وفقاً للطريقة المذكورة سابقاً. بعد الرجّ جيداً نُقل 50 ميكروليتر منه لكل حجرة في الطبق أي بمعدل 400 فرد معدي للحجرة الواحدة، ثم نقلت يرقة واحدة من *G. mellonella* إلى كل حجرة، أغلق الطبق جيداً بغطائه ووضع في الحاضنة بحرارة 25 ± 2 Cº أخذت القراءات بعد (15، 30، 45، 60) دقيقة. في كل توقيت أُخرجت ست يرقات (4 مكررات)، غُسلت بالماء لإزالة النيماتودا العالقة على جسمها من الخارج ومن ثم وضعت في طبق بتري (9 سم) وضع فيه ورق ترشيح رطب. أُغلق الطبق بالبارافيلم ووضع في الحاضنة على نفس درجة الحرارة السابقة وبعد 48 ساعة فُحصت وسُجل عدد اليرقات الميتة.

ثانياً اختبار الاستجابة للجرعة: حضّر معلق نيماتودي بتركيز 100 فرد معدي/ مل واستعملت التراكيز التالية (5–15–25–45) فرد معدي/50 ميكروليتر ماء. نقل التركيز المطلوب إلى كل حجرة في الطبق ومن ثم نُقل إليها يرقة *G. mellonella* واحدة، أُغلق الطبق جيداً بغطائه ووضع في الحاضنة على درجة حرارة 25±2Cº . أخذت القراءات بعد 72 ساعة وسُجل عدد اليرقات الميتة.

ثالثاً اختبار واحد – لواحد: حضّر معلق نيماتودي بتركيز 100 فرد معدي/ مل، نقل فرد معدي واحد ضمن 25 ميكروليتر ماء معقم إلى كل حجرة وبنفس رأس الماصة المستعمل أخذت 25 ميكروليتر أخرى من ماء معقم من كأس زجاجي لنفس الحجرة في الطبق لضمان عدم بقاء الفرد النيماتودي داخل الماصة، فيصبح التركيز النهائي في كل حجرة فرد معدي واحد /50 ميكروليتر. نقلت يرقة من *G. mellonella* واحدة إليها، أُحكم إغلاق الطبق بغطائه ووضع في الحاضنة على حرارة 25 ± 2Cº . أُخذت القراءات بعد 72 ساعة وسُجل عدد اليرقات الميتة.

رابعاً اختبار عمود الرمل: حضّر معلق نيماتودي بتركيز 1000 فرد معدي/مل. استعمل Falcon Tubes بحجم 30 مل وضع في أسفل كل أنبوب يرقة *G. mellonella* واحدة، ومن ثم مُلئ بتورب معقم (تم تعقيمه بالأوتوغلاف على حرارة 120Cº). نُقل 100 ميكروليتر (100 فرد معدي) من المعلق النيماتودي ووضع على سطح التورب أعلى الانبوب. أغلقت جميع الأنابيب بإحكام وحُضّنت على حرارة 25 ± 2 Cº لمدة 24 ساعة. نُقلت اليرقات بشكل مفرد من كل أنبوب وغُسلت بالماء ووضُعت في طبق بتري (5 سم) وضُع فيه ورق ترشيح رطب، حضّنت الأطباق وسُجلت نسبة الموت بعد 72 ساعة.

أجري التحليل الاحصائي وحللت البيانات باستخدام برنامج SPSS حيث تمت مقارنة المتوسطات لمعرفة درجة التباين والفروق المعنوية عن طريق ANOVA باستخدام اختبار دانكن عند مستوى معنوية 1%. حسبت قيم LT50 , LD50 باستعمال اختبار Propit Analysis.

النتائج والمناقشة:

النتائج :

أظهرت النتائج تفوق العزلات المحلية الثلاث على الشاهد في جميع الاختبارات التي أجريت. في اختبار زمن التعرض كما هو مبيّن في الجدول (1) تفوقت العزلة H.136 معنوياً على باقي العزلات خلال الزمن الأول البالغ 15 دقيقة، محققة أعلى نسبة قتل بلغت (37.5%) بينما لم تسجل فروق معنوية بين العزلتين H.160 وS.22. أما في الزمن الثاني 30 دقيقة ازدادت نسبة القتل الذي حققته العزلة H.160 لتبلغ (45.83%) فلم تظهر أي فروق معنوية بينها وبين العزلة H.136 لتتفوقا بذلك على العزلة S.22 التي بلغت نسبة قتلها(37.5%). بعد 45 دقيقة من الاختبار، سجلت العزلة S.22 زيادة ملحوظة في نسبة القتل لتبلغ (66.66%)، بالتالي لم تسجل أي فروق معنوية بينها وبين العزلتين الأخريين. كذلك كان الأمر بالنسبة للزمن 60 دقيقة، الذي بلغت فيه نسبة القتل لكلتا العزلتين ,H.136 H.160 (100%). يبين الجدول (4) أن العزلة H.136 تفوقت بالزمن النصفي القاتل LT50 فكان الزمن اللازم لقتلها نصف أفراد المجتمع المختبر هو 22 دقيقة، بينما بلغت هذه القيمة (32.36) و(37.61) دقيقة للعزلتين H.160، S.22 على التوالي. أظهرت نتائج اختبار الاستجابة للجرعة الموضحة في الجدول (2) بأن العزلات الثلاث حققت أعلى نسبة قتل (100 %) عند الجرعة 40 فرد معدي/اليرقة. بينما في التراكيز المنخفضة بدءاً من الجرعة 5 فرد معدي/ اليرقة حققت العزلة H.136 أعلى نسبة قتل (41.66%) وتفوقت معنوياً على باقي العزلات. ازدادت نسبة القتل مع ازدياد التركيز، فعند الجرعة 15 فرد معدي/اليرقة، استمرت العزلة H.136 بتفوقها على بقية العزلات محققة نسبة قتل بلغت (75%). انخفضت الفروق المعنوية بين العزلات الثلاث لتختفي تماماً عند الجرعة 25 فرد معدي / اليرقة فلم تسجل فروق معنوية واضحة بينها. أظهرت نتائج اختبار Probit Analysis والموضحة في الجدول (4) تفوق العزلة H.136 على بقية العزلات فكان نصف عدد أفراد المجتمع المُختبر مقتول عند الجرعة (5.42 فرد معدي /اليرقة)، تلتها العزلة H.160 (10.35 فرد معدي/اليرقة)، ثم العزلة S.22 (15.67 فرد معدي/اليرقة). يوضح الجدول (3) أن العزلات الثلاث استطاعت تحقيق نسب قتل متقاربة في اختبار واحد– لواحد مع تفوق معنوي للعزلة H.136 بنسبة بلغت 33.33% بينما بلغت هذه النسبة 20.83% و12.5% للعزلتين H.160 و S.22 على التوالي. أظهرت نتائج اختبار عمود الرمل قدرة العزلات الثلاث على إيجاد العائل واختراقه وقتله مع تفوق معنوي للعزلتين H.160 و H.136فسجلتا أعلى نسب قتل بلغت (83.33%)، (62.5 %) على التوالي، بينما بلغت هذه النسبة (58.33%) للعزلة S.22 .

المناقشة:

تعدّ الاختبارات الحيوية من أهم المؤشرات التي يُستدل بها على شراسة عزلات EPNs وأساس الشراسة هو المعقد نيماتودا– بكتريا. وقد أظهرت نتائجنا شراسة العزلات الثلاث مع بعض الفروقات في بعض الاختبارات. أثبتت العزلة H.136 أنها الأكثر شراسة، فاستطاعت خلال 15 دقيقة إحداث أعلى نسبة قتل مقارنة بالعزلتين الأخريين كما استطاعت قتل نصف المجتمع المدروس خلال 22 دقيقة وبأقل عدد من الأفراد بلغ 5.42 فرد معدي/اليرقة. يمكن أن تفسر شراسة هذه العزلة باتجاهين الأول هو النيماتودا نفسها من حيث قدرتها على الاختراق السريع للعائل والتغلب على سلوكيات المقاومة لديه كتغليفها وعزلها ومنع وصولها للتجويف الدموي. يضاف إلى ذلك سرعتها في تحرير وإطلاق البكتريا المتعايشة معها. تختلف الفترة الزمنية باختلاف الأنواع والسلالات وبشكل عام تتراوح بين 30 دقيقة وحتى 5 ساعات من حدوث الإصابة. تعدّ الفترة الزمنية اللازمة لإطلاق البكتريا حاسمة فيما يخص الاستجابة المناعية للحشرة

وقيامها بتغليف النيماتودا (Dowds and Peters., 2002). من ناحيةٍ أخرى وبالرغم من قلة الدراسات التي تناولت شراسة النيماتودا لوحدها بمعزل عن البكتريا إلا أنه من المهم الإشارة هنا إلى الدور الذي تلعبه النيماتودا في إحباط الاستراتيجيات الدفاعية للحشرة العائل ضد البكتريا، فقد وجد أن طور الاستمرارية DJ (الطور المعدي IJ) لكل من النوعين *S.carpocapsae* ، *H.bacteriophora* يفرز أنزيم Protease الذي يحطم المضادات البكتيرية التي تفرزها الحشرة مما يحمي البكتريا المتعايشة مع النيماتودا من التخريب ويجعلها تقوم بدورها القاتل للعائل (Burnell and Stock., 2000). بدورها تلعب السلالة البكتيرية المتعايشة مع النيماتودا الدور الرئيس في إحداث القتل السريع للعائل. عندما تحرر النيماتودا البكتريا في التجويف الدموي للعائل تبدأ البكتريا بالتضاعف وإفراز سموم وإنزيمات ومضادات حيوية ذات تركيب كيميائي متنوع، فقد وجد أنها تفرز أكثر من ثلاثين مركباً كنواتج استقلاب ثانوية، مثل Indoles الذي تفرزه بكتريا *Xenorhabdus* و Hydroxy stilbenes (ST) الذي تفرزه *Photorhabdus*، وهذه المركبات بالإضافة لغيرها من المركبات النوعية تتميز بخواص سامة للحشرة ومضادة للفطور الرمية مثل (*Aspergillus, Botrytis, Fusariu*m) والبكتريا مثل (*Staphylococcus , Bacillus, Erwinia*)، مما يساهم في حماية جثة العائل من الترمم خلال فترة تغذية وتطور النيماتودا. تختلف السلالات البكتيرية فيما بينها من حيث كمية ونوعية هذه المركبات التي تنتجها مما يؤدي لاختلاف شراستها، فكلما أنتجت كميات أكبر وذات نوعية محددة تكون أشرس وبالتالي ستكون قدرتها على إحداث الموت أسرع بالمقارنة مع سلالات أخرى (Dowds and Peters., 2002; Burnell and Stock., 2000; Glazer and Lewis., 2000). لا يتوقف الأمر على هذا فحسب، ففي بعض السلالات الشرسة من البكتيريا يكفي وجود عدد منخفض من خلاياها داخل التجويف الدموي للعائل الحشري ليحدث الموت السريع. أشارت إحدى الدراسات أن إفراز النيماتودا لأقل من 10 خلايا بكتيرية داخل التجويف الدموي للعائل كان كافٍ لقتله، بالتالي يتحقق القتل بأقل عدد من الأفراد المعدية من النيماتودا (Burnell and Stock., 2000). وهذا يمكن أن يفسر النتائج التي تم التوصل إليها في اختبار واحد – لوحد للعزلة H136، حيث أنّ فرد واحد من النيماتودا كان كافٍ لقتل يرقة واحدة من العائل، لتصل نسبة القتل الكلية إلى (33.33%) من مجتمع الحشرة. بيّنت نتائج الاختبارات المختلفة أن العزلة S.22 كانت الأقل شراسة بين العزلات المختبرة. ففي اختبار زمن التعرض احتاجت زمناً أطول، لتختفي الفروق المعنوية بينها وبين بقية العزلات، فبعد(45) دقيقة من بدء الاختبار حققت نسبة قتل (66.66%)، وكان الزمن النصفي القاتل لها أطول، ووصل إلى(37.61 دقيقة). يمكن تفسير انخفاض شراسة هذه العزلة، بأن الأنواع التابعة للجنس *Steinernema* تختلف بيولوجياً في دورة حياتها داخل العائل الحشري عن الجنس *Heterorhabditis*، فلا بدّ من اختراق فردين معديين على الأقل من هذا الجنس لجسم العائل ليتطورا إلى ذكر وأنثى ليتم بينهما التزاوج وينتج جيل جديد. وهذا بدوره يُنتج عدد كبير من الأفراد، وهذه الآلية لتطور *Steinernema* في حال ترافقت مع انخفاض في شراسة البكتيريا المتعايشة معها فإنها تستغرق فترة زمنية أطول نسبياً لتُحدث القتل بالمقارنة مع أنواع أخرى، لذلك فهي تحتاج لجرعة أعلى من الأفراد المعدية لترتفع عندها نسبة القتل، وهذا أظهرته نتيجة اختباري واحد – لواحد، والاستجابة للجرعة، فهي احتاجت جرعة أعلى من الأفراد المعدية (25 IJ/ اليرقة) لتحقق نسبة قتل (79.16%) وتصبح متقاربة بذلك مع نسب القتل التي حققتها بقية العزلات مع جرعة أقل من الأفراد المعدية. بالتالي كان من الطبيعي أن تكون الجرعة النصفية القاتلة لهذه العزلة أعلى (15.67 فرداً معدياً/ اليرقة). بالنسبة لاختبار عمود الرمل الذي يرتبط بشكل أساسي بسلوك البحث عن العائل والذي يختلف باختلاف أنواع النيماتودا، وهو إما ان يكون بالتجوال Cruiser والذي تقوم فيه النيماتودا بالتحرك صعوداً ونزولاً في التربة بحثاً عن العائل، وتكون متكيفة

لإصابة العوائل المستقرة أو قليلة الحركة. بعكس بعض الأنواع التي تتبع استراتيجية الكمين Ambush الذي تبقى فيه النيماتودا منتظرة مرور العائل حيت تميل للبقاء بجانب سطح التربة، فتستطيع من خلال سلوك التمايل والقفز إصابة العوائل المتحركة. تتبع بعض أنواع EPNs استراتيجية وسطية بين هاتين الاستراتيجيتين (تجوال – كمين). بالتالي يمكن القول بعد أن أثبتت جميع العزلات قدرتها على إيجاد العائل واختراقه واحداث العدوى بكفاءة عالية، أن استراتيجية البحث لديها إما أن تكون بالتجوال أو الاستراتيجية الوسطية (Lewis., 2002).

جدول (1) النسبة المئوية ليرقات حشرة *G. mellonella* الميتة بفعل عزلات EPNs المحلية في اختبار زمن التعرض Exposure Time

EPNs Isolate	T1 (15min) Mean ± SD	T2 (30min) Mean ± SD	T3 (45min) Mean ± SD	T4 (60min) Mean ± SD
H.160	8.33±2.8 [b]	45.83±5.9 [a]	79.16± 4.1[a]	100 ± 0.0 [a]
H.136	37.5±4.9 [a]	60.5±5.0 [a]	91.66±2.8 [a]	100 ± 0.0 [a]
S.22	8.37±2.8 [b]	37.5±5.0 [b]	66.66± 4.8[a]	87.5 ±3.3[a]
control	4.16 ± 2.4 [c]	4.16 ± 2.0 [c]	8.33± 2.8[b]	8.33± 2.8 [b]
SE	6.81	9.0	7.66	4.5
LSD	22.8	30.37	25.65	15.04

* القيم المتبوعة بالأحرف ذاتها عمودياً لا تختلف معنوياً (P≤0.01)

جدول (2) النسبة المئوية ليرقات حشرة *G. mellonella* الميتة بفعل عزلات EPNs المحلية في اختبار Dose-Response

(P≤0.01)

EPNs Isolate	Dose (5 IJ/L) Mean ± SD	Dose (15 IJ/L) Mean ± SD	Dose (25 IJ/L) Mean ± SD	Dose (40 IJ/L) Mean ± SD
H.160	29.16 ± 4.6 [b]	58.33 ±8.2[b]	87.5 ± 10.2 [a]	100 ± 0.0 [a]
H.136	41.66 ± 5.0[a]	75.0 ±9.8[a]	100 ± 11.5 [a]	100 ± 0.0 [a]
S.22	20.83 ±4.1 [b]	41.66 ± 6.5[b]	79.16 ± 9.4 [a]	100 ± 0.0 [a]
control	4.1667± 2.0 [c]	8.33 ± 2.8 [c]	4.16 ±2.0 [b]	4.16 ± 2.0 [b]
SE	8.43	9.0	5.84	2.0
LSD	28.24	30.23	19.56	6.97

جدول (3) النسبة المئوية ليرقات حشرة *G. mellonella* الميتة بفعل عزلات EPNs المحلية في اختبار One–On–One واختبار عمود الرمل (P≤0.01)

EPNs Isolate	One-On-One Mean ± SD	Sand Column Mean ± SD
H.160	20.833 ± 4.0[b]	83.33 ± 4.0 [a]
H.136	33.333 ± 5.2[a]	72.5 ± 4.45[a]
S.22	12.5 ± 3.1[b]	58.33 ± 5.36 [b]
control	0.0± 0.0 [c]	0.0± 0.0 [c]
SE	7.43	8.18
LSD	24.59	27.40

جدول (4) قيم LD_{50} وLT_{50} لعزلات EPNs المحلية بحسب Probit Analysis

EPNs Isolate	LT_{50} (min)	LD_{50} (IJ /Larvae)
H.160	32.38	10.35
H.136	22.0	5.42
S.22	37.61	15.67

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

1. أثبتت جميع العزلات المحلية المختبرة قدرتها على إحداث العدوى وقتل *G. mellonella* بنسب متفاوتة.
2. تفوقت العزلتان من الجنس *Heterorhabditis* بالشراسة على العزلة التابعة للجنس *Steinernema*.
3. تفوقت العزلة H.136 في الشراسة على بقية العزلات المختبرة.

التوصيات:

1. إجراء الاختبارات الحيوية للعزلات المحلية من النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs على أنواع أخرى من الحشرات الضارة اقتصادياً.
2. إدخال هذه العزلات ضمن اختبارات حقلية.

References:

1. ADAMS, B.J. and NGUYEN, K.B. *Taxonomy and Systematics*. Entomopathogenic Nematology, CAB International, 2002. 1-28.
2. BEDDING, R. A. and AKHURST, R.J. *A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil.* Nematologica, Vol.21, 1975, 109-110.
3. BURNELL, A.M. and STOCK, P. *Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts- lethal pathogens of insects*. Nematology Belgium, Vol.2(1), 2000, 31-42.
4. DARWISH, A; BASHIR. A; AL-ASSAS, KH. *Effectiveness of some local isolates of Entomopathogenic nematodes for the control of Tuta absoluta (Meyrick) under laboratory and field conditions*. Arab Journal Of Plant Protection. Vol.38(4), 2020, 318-326.
5. DIVYA, K. and SANKAR, M. *Entomopathogenic nematodes in pest* management. Indian Journal of Science and Technology. Vol.2(7), 2009, 53-60.
6. DOWDS, B.C.A. and PETERS, A. *Virulence Mechanisms*. CABI, Entomopathogenic Nematodes, 2002, 79-93.
7. FORST, S. and CLARKE, D. *Bacteria–Nematode Symbiosis.* CABI, Entomopathogenic Nematodes, 2002, 57-74.
8. GLAZER, I. and LEWIS, E.E. *Bioassays for Entomopathogenic Nematodes*. CABI, USA, 2000, 229-247.
9. HOURIEH, A; ALLOUF, N; MUSALLAM, Z. *Efficacy of Entomopathogenic nematode isolates extracted from stone-fruit orchards in Lattakia region against neonate larvae of Capnodis carbonaria and Capnodis tenebrionis (Coleoptera: Buprestidae) in laboratory.*Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies.Vol. 30(4), 2008**,** 73-83.
10. JAWISH, A. *Biological and Morphological Characterization of Entomopathogenic Nematode Isolates and their Symbiosis Bacteria and Evaluation their Efficiency in the Control of Soil Insects*. PhD. Thesis. University of Damascus, Syria, 2016, 228.
11. KAYA, H.K. and STOCK, P. *Techniques in insect nematology, in manual of Techniques in Insect Pathology*. Elsevier, 1997, 281-324
12. KOPPENHöFER, H.S. *Bacterial Symbionts of Steinernema and Heterorhabditis*. Brill, 2010, 735-808.

13. LACEY, L.A. and GEORGIS, R. *Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial*. Journal of Nematology, Vol.44(2), 2012, 218-225.
14. LEWIS, E.E. and CLARKE, D.J. *Nematode Parasites and Entomopathogens*. Insect Pathology. Second Edition, Elsevier, USA, 2012, 395-424.
15. LEWIS, E.E. *Behavioural Ecology*. CABI, Entomopathogenic Nematodes, 2002, 205-220.
16. METWALLY, H. M; HAFEZ, G.A.; HUSSEIN, M.A; HUSSEIN, M.A; SALEM, H.A; SALEH, M.M. *Low Cost Artificial Diet for Rearing the Greater Wax Moth, Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a Host for Entomopathogenic Nematodes*. Egyptian Journal of Biological Pest Control. Vol.22(1), 2012, 15-17.
17. POINAR, G.O. and GREWAL, P.S. *History of Entomopathogenic Nematology*. Journal of Nematology. Vol.44(2), 2012,153-161.
18. RICCI, M; GLAZER, I; CAMPBELL, F; GAUGLER, R. *Comparison of Bioassays to Measure Virulence of Different Entomopathogenic Nematodes*. Biocontrol Science and Technology. Vol.6, 1996, 235-245.
19. SMART, G.C. *Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects*. Journal of Nematology. Vol.27(4), 1995,520-534.
20. WHITE, G. A. *method for obtaining infective nematode larvae from cultures*. Science (Washington). 1927, 66.