تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حيوية النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar مخبرياً

محمد هشام الزينب[1] ورالف أودو إيلرز[2]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة حلب، حلب، سورية، البريد الإلكتروني: Dr_alzainab@yahoo.com؛

(2) قسم التقاني الحيوية والمكافحة الحيوية، معهد أمراض النبات، جامعة كيل، ألمانيا.

الملخص

الزينب، محمد هشام ورالف أودو إيلرز. 2015. تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حيوية النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabdites bacteriophora* Poinar مخبرياً. مجلة وقاية النبات العربية، 33(2): 107–115.

تم في هذه الدراسة اختبار تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حياتية يرقات الطور المعدي لأربع سلالات H1، H3، H4 وH5 من النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar معزولة من ترب سورية، كما تم اختبار كفاءتها على قتل الحشرات بعد تعرضها للإجهادات البيئية المتمثلة بدرجات الحرارة المنخفضة تحت الظروف المخبرية. تم تعريض يرقات النيماتودا لحرارة 0 °س لمدة ساعتين قبل عملية العدوى بمعدل 5 يرقات لكل حشرة من يرقات الطور الأخير لدودة شمع العسل *Galleria mellonella* L. أظهرت النتائج بأن تعريض السلالات السورية الطبيعية المختبرة لدرجات الحرارة المتدرجة ما بين 3.8–7 °س لمدة ساعتين قد خفض نسبة اليرقات الحية لجميع السلالات المختبرة، تراوحت عندها نسبة اليرقات الحية ما بين 87.3–96.1% (وسطياً 93.1%) للسلالات المختبرة، وظهرت نسبة الموت في حدها الأعلى 12% عند السلالة H4 وبفارق معنوي مع باقي السلالات. بالمقابل لم تظهر أية فروق معنوية في نسبة الموت ليرقات النيماتودا بانخفاض درجات الحرارة المختبرة. كما تبين بأن تعريض يرقات النيماتودا لحرارة 0 °س لمدة ساعتين قد خفض نسبة الحشرات الميتة في جميع السلالات المختبرة وسطياً (54.2%) مقارنة بالشاهد (93.7%) وبفروق معنوية. وأظهرت النتائج أيضاً فروقاً معنوية بين السلالات (المعرضة للبرودة) في كفاءتها على قتل حشرات التجربة، حيث كانت السلالة H3 الأكثر كفاءة في قتل الحشرات مقارنة بالسلالات H1، H5 وH4، وبلغ متوسط نسبة الحشرات الميتة 71.8، 66.2، 42.3 و36.6% للسلالات السابقة، على التوالي.

كلمات مفتاحية: النيماتودا الممرضة للحشرات، تحمل البرودة، سورية، *Heterorhabditis bacteriophora*، *Galleria mellonella*.

المقدمة

تعد النيماتودا الممرضة للحشرات والتابعة للعائلة Heterorhabditidae والرتبة Rhabditidomorpha من أهم الأعداء الحيوية لبعض الحشرات الاقتصادية المنتشرة على الخضار وأشجار الفاكهة ونباتات الزينة وبخاصة حشرات التربة والحدائق (7، 18). ويعد استخدامها من طرائق المكافحة الحيوية ذات الكفاءة العالية، فهي آمنة الاستخدام لمكافحة الحشرات وغير ضارة بالبيئة (9)، الأمر الذي أدى إلى تزايد الاهتمام بها في السنوات الأخيرة (15). فقد استخدمت بنجاح لمكافحة خنفساء الحدائق *Phyllopertha horticola* L. (10) وسوسة النخيل الحمراء *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier وحفار ساق التفاح *Zeuzyra pyrina* L. ودودة ثمار التفاح *Cydia pomonella* L. وغيرها من الآفات الحشرية (5، 25). سُجلت النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 في معظم دول العالم، وهي إحدى أهم الأنواع المدروسة من بين النيماتودا الممرضة للحشرات (32). ويمكن إنتاجها بكميات وافرة واقتصادية في البيئات السائلة، الأمر الذي أتاح منذ فترة ليست ببعيدة من إنتاجها بشكل تجاري في البيئات السائلة (8). يعد الطور اليرقي الثالث الطور المعدي Infective juvenile (IJ) ويسمى أيضاً بطور الاستمرارية Dauer juvenile (Dj) (14) وهو مقاوم للحرارة والجفاف، ويثابر في التربة لفترة زمنية طويلة (16). إن هذه النيماتودا متعايشة مع البكتريا *Photorhabdus luminescens* (20)، وهي سالبة الغرام Gram-negative وتنتمي للعائلة Enterobacteriaceae (12). يحمل الطور المعدي 200–2000 خلية بكتيرية متعايشة في الجزء الأمامي من أمعاء اليرقة (13). تخترق يرقات النيماتودا جسم الحشرة عبر الفتحات الطبيعية أو مباشرة عبر طبقة الكيوتيكل (29)، وتكون الظروف في دم العائل مثالية لتكاثر النيماتودا (33) بفعل منبه غذائي خاص Food signal (30)، تتحرر الخلايا البكتيرية إلى دم العائل، وتفرز توكسينات ومستقلبات أخرى، تعطل بدورها العمليات الاستقلابية للحشرة مما يؤدي إلى قتلها خلال يومين من الإصابة (6). تتكاثر هذه البكتريا أثناء تطفلها ضمن العائل

وبذلك يتم تأمين كمية كافية من البكتريا–الغذاء الرئيس للنيماتودا– مما يسهم في تطور النيماتودا وتكاثرها. تتغذى النيماتودا على الخلايا البكتيرية، ثم تتحول إلى ديدان بالغة تتوالد بكرياً، ولأجيال عدَّة ضمن جثة العائل، وتعطي نسلاً جديداً تحتفظ يرقاته المعدية بالخلايا البكتيرية في القسم الأمامي من أمعائها. تغادر يرقات النيماتودا الناتجة من مجتمع الدفعة الواحدة من الأجيال المتعاقبة (Patch) جثة الحشرة وتبحث عن عائل جديد (21).

تتأثر حياة النيماتودا الممرضة للحشرات وكفاءتها في التطفل وقتل الحشرات بالظروف البيئية المحيطة، إذ بينت دراسات مختلفة تأثر حياة النيماتودا بدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة (11، 16) والجفاف (34). إن تأهيل السلالات الطبيعية وتحسينها أمراً مهماً كي تتحمل الظروف البيئية غير المناسبة مع احتفاظها بمقدرتها على قتل الحشرات كشرط أساسي من أجل استخدامها على المستوى التجاري (19، 27). ويتم ذلك بدراسة الخصائص الطبيعية لسلالات النيماتودا كمرحلة أولى ثم عملية الانتخاب الطبيعي، بهدف الحصول على تلك الخصائص التي تنقل وراثياً للأجيال المتعاقبة مثل تحمّل درجات الحرارة والجفاف (26، 34). أشارت دراسات سابقة إلى زيادة مقدرة النيماتودا على تحمل درجات الحرارة من خلال الاصطفاء الطبيعي، وتبين بأن عامل التوريث heritability لتلك السلالات لصفة تحمل درجات الحرارة المرتفعة بلغ 68%، إلا أن عامل التوريث لتحمل البرودة كان أقل، ولم يتجاوز نسبة 38% عند بعض سلالات طبيعية للنيماتودا *H. bacteriophora*، وتبين بأن تحمل طور العدوى من هذه النيماتودا لدرجات الحرارة يتأثر من ناحية أولى بالمورثات، وبالعوامل البيئية من ناحية أخرى. إذ تعد الحرارة المرتفعة أولاً والمنخفضة ثانياً من العوامل البيئية المهمة والمحددة لبقاء النيماتودا الممرضة للحشرات على قيد الحياة (11)، وأيضاً تؤثر في كفاءتها في قتل الحشرات (27).

تعد الدراسات في مجال النيماتودا الممرضة للحشرات ضمن ظروف القطر العربي السوري من الدراسات حديثة العهد نسبياً، فقد تم عزل وتعريف سلالات من هذه النيماتودا من ترب سورية لبساتين الفاكهة من مناطق مختلفة من القطر. كما تم في دراسات سابقة اختبار كفاءة السلالات الأربع ذاتها (موضوع هذه الدراسة) التي تنتمي للنوع *H. bacteriophora* في نسبة قتل يرقات خنفساء الطحين الصفراء *Tenebrio molitor* L. تحت الظروف المخبرية، وتم تحديد الكثافة القاتلة النصفية (LC_{50}) وكذلك القاتلة لـ 90% (LC_{90}) لهذه السلالات بهدف اختيار الأفضل منها لقتل الحشرات (1). كما تم دراسة تأثير درجات الحرارة المرتفعة في حياتية هذه السلالات ومدى إمكانية بقائها على قيد الحياة عند درجات مختلفة من الحرارة المرتفعة، وتم تحديد درجات الحرارة القاتلة النصفية (LC_{50}) والقاتلة لـ 90% (LC_{90}) ليرقات سلالات النيماتودا المختبرة ذاتها (2). كما درس تأثير مستويات مختلفة لرطوبة التربة في كفاءة سلالات النيماتودا المختبرة ذاتها في نسبة قتل الحشرات وبينت تلك الدراسة بأن رطوبة التربة 10% هي الأكثر كفاءة على قتل الحشرات لكافة السلالات المختبرة (3).

تهدف هذه الدراسة لمعرفة تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حياتية أربع سلالات من النيماتودا الممرضة للحشرات *H. bacteriophora* معزولة من ترب سورية، واختبار كفاءتها على قتل الحشرات بعد تعرضها للإجهادات البيئية المتمثلة بدرجات الحرارة المنخفضة في نسبة قتل يرقات دودة شمع العسل *Galleria millonella* تحت الظروف المخبرية، كما تم اختبار تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حياتية سبع سلالات هجينة، تم الحصول عليها من مختبر المكافحة الحيوية في معهد أمراض النبات بجامعة كيل، ألمانيا، للمقارنة.

مواد البحث وطرائقه

نفذت الدراسة في مختبر المكافحة الحيوية في معهد أمراض النبات بجامعة كيل، ألمانيا خلال عام 2009. استخدمت للدراسة أربع سلالات طبيعية سورية H1، H3، H4 وH5 من النيماتودا الممرضة للحشرات *H. bacteriophora* عزلت من ترب مختلفة من حقول اللوزيات في محافظة حمص خلال شهري نيسان/أبريل وأيار/مايو لعام 2009 (تم الحصول على الطور المعدي للعزلات السابقة الذكر من مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية بكلية الزراعة في جامعة دمشق). كما تم اختبار تأثير درجات الحرارة المنخفضة في حياتية سبع سلالات هجينة معروفة المصدر (26)، تم الحصول عليها من مختبر المكافحة الحيوية في معهد أمراض النبات بجامعة كيل، ألمانيا، بهدف المقارنة.

تحضير يرقات الطور المعدي من سلالات النيماتودا المختبرة

تمت تنمية يرقات الطور المعدي لكافة سلالات النيماتودا المختبرة – السابقة الذكر– وإكثارها مخبرياً، باستخدام الطور اليرقي الأخير لدودة شمع العسل، العائل المثالي للنيماتودا. استخدمت لذلك أطباق بتري بقطر 12 سم، وضع في قاعدة كل منها ورقة ترشيح. تم إضافة 1 مل من معلق النيماتودا يحتوي على 1000±50 يرقة من الطور المعدي لسلالات النيماتودا المختبرة لكل طبق. ومن ثم وضعت عشرة يرقات حية من الطور اليرقي الأخير لدودة شمع العسل في كل طبق. أغلقت الأطباق بالبارافيلم، وحفظت في غرفة مظلمة (حاضنة) عند 25±1°س لمدة ثلاثة أيام. أخذت يرقات دودة شمع العسل الميتة، وضعت على

ورقة ترشيح رطبة ضمن المصيدة المائية التي تحتوي على محلول Ringer's والمكون من: 0.9 غ كلوريد الصوديوم، 0.42 غ كلوريد البوتاسيوم، 0.37 غ كلوريد الكالسيوم و 0.2 غ بيكربونات الصوديوم لكل ليتر من الماء المقطر. وضعت المصائد المائية في الحاضنة ذاتها لمدة خمسة عشر يوماً حيث غادرت يرقات الطور المعدي خلال تلك الفترة جثة الحشرة إلى محلول Ringer's. واعتبرت جميع اليرقات المعدية للأجيال المتعاقبة التي تم الحصول عليها من الحشرات النافقة ذاتها مجتمعاً واحداً (مجتمع الدفعة الأولى من الأجيال). تم تصفية المعلق اليرقي للنيماتودا باستخدام منخل فتحاته 20 ميكروناً، ونقلت يرقات النيماتودا كمياً إلى محلول Ringer's وحفظت عند 15°س، إذ تم اختبارها خلال اسبوع من الجمع (الحصاد). أعيدت عملية تنمية يرقات الطور المعدي لسلالات النيماتودا المختبرة وتم إكثارها لثلاثة مرات للحصول على دفعات للأجيال المتعاقبة أي: الدفعة الأولى، الدفعة الثانية والدفعة الثالثة (21، 23).

اختبار تأثير الحرارة المنخفضة في نسبة نفوق يرقات النيماتودا

استخدم لهذه الدراسة جهاز خاص مولد للحرارة المتدرجة، مزود بصفيحة ألمنيوم ذات قطبين أحدهما ينتهي بحمام مائي ذو درجة حرارة منخفضة (صفر درجة مئوية)، والآخر ينتهي بحمام مائي حرارته 8 °س. زود الجهاز بخمسة أطباق بلاستيكية يرتبط بكل منها سلك كهربائي يصلها بالحاسب لتحديد درجات الحرارة في كل طبق خلال فترة التجربة. وضع في كل طبق 5 مل ماء، ثم وضعت الأطباق على لوح الألمنيوم في الجهاز، وبعد 30 دقيقة من معايرة الجهاز على درجة الحرارة المطلوبة (وضع الجليد في الحوض الأول لتأمين الحرارة المنخفضة المطلوبة)، تم إضافة 1 مل من معلق النيماتودا يحتوي 500±50 يرقة نيماتودا في كل طبق، وتركت لمدة ساعتين. تم في نهاية الفترة الزمنية تصفية المعلق اليرقي للنيماتودا باستخدام منخل فتحاته 20 ميكرون، ونقلت يرقات النيماتودا كمياً إلى محلول Ringer's وحفظت في غرفة مظلمة (حاضنة) عند 25±1°س ولمدة 24 ساعة. ثم عدَّت اليرقات الحية واليرقات النافقة لكل طبق وحسبت نسبها المئوية. تم تحديد متوسط درجة الحرارة لكل طبق من الأطباق الخمسة المستخدمة في الجهاز خلال فترة تعرض اليرقات للحرارة، وتم حساب متوسط درجات الحرارة لكل طبق (2).

اختبار تأثير تعرض سلالات النيماتودا المختبرة للبرودة في كفاءتها على قتل الحشرات

تم تهيئة اللقاح المعدي من يرقات النيماتودا للبرودة وذلك بوضعها ضمن أطباق بتري بمعدل 1000±50 يرقة من الطور المعدي لسلالات النيماتودا المختبرة لكل طبق بقطر 5 سم مع كمية كافية من الماء. وضعت الأطباق في حاضنة للحصول على حرارة 0 °س وتركت الأطباق لمدة ساعتين عند تلك الدرجة، نقلت بعد ذلك يرقات النيماتودا كمياً إلى محلول Ringer's جديد، وحفظت الأطباق في الحاضنة عند 25±1°س لمدة 24 ساعة قبل إجراء التجربة. وبقيت يرقات النيماتودا غير المعرضة للبرودة عند . 25±1°س لحين الاختبار.

لاختبار تأثير فاعلية سلالات النيماتودا المختبرة بعد تعريضها للبرودة تمت العدوى بمعدل 5 يرقات حية من النيماتودا لكل يرقة من الحشرة من الطور الأخير لدودة شمع العسل (28). تم اصطياد خمسة يرقات حية من النيماتودا في كل مرة باستخدام ماصة خاصة. وضعت تلك اليرقات في أطباق بتري ذات 24 حفرة كل منها ذات قطر 16 مم مخصصة لهذا الغرض (Asahi Techno Glass, Tokyo, Japan)، تحتوي كل حفرة على 1غرام تربة رملية معقمة. أضيف محلول Ringer's لكل حفرة بما يحقق نسبة رطوبة 10% (وزن/وزن). ثم وضع في كل حفرة يرقة دودة شمع العسل في طورها الأخير، أغلقت الأطباق بالبارافيلم وحفظت في غرفة مظلمة (حاضنة)، وحضنت عند 25±1°س لمدة ثلاثة أيام. كما نفذت التجربة بالطريقة ذاتها لذات سلالات النيماتودا دون تعريض يرقاتها للبرودة واعتبرت شاهداً. تم عد يرقات الحشرة الحية وكذلك النافقة وحسبت النسبة المئوية ليرقات الحشرات النافقة. ولتصحيح نسبة نفوق الحشرات نفذت تجربة بالطريقة ذاتها بإضافة محلول Ringer's فقط دون نيماتودا في معاملات شاهد إضافي (يحدد نسبة النفوق الطبيعي للحشرات دون النيماتودا خلال فترة التجربة) بهدف تصحيح نسبة نفوق الحشرات بسبب النيماتودا سواء المعرضة للبرودة أو غير المعرضة البرودة (4).

حساب عامل التوريث (h^2) heritability للسلالات المختبرة

تم حساب قيمة عامل التوريث heritability (h^2) لكل من تجربة تأثير التعرض للبرودة في حياة سلالات النيماتودا المختبرة، وأيضاً في تجربة تأثير التعرض للبرودة في كفاءة تلك السلالات على قتل الحشرات وفق المعادلة التالية (22):

$$\text{عامل التوريث } h^2 = \frac{\text{العوامل الوراثية المسببة للإختلاف } \sigma_g^2}{\text{العوامل الوراثية المسببة للإختلاف } \sigma_g^2 + \text{العوامل البيئية المسببة للإختلاف } \sigma_e^2}$$

لذلك فالاختلافات الملاحظة ضمن كل سلالة والتي تعود للعوامل البيئية (σ_e^2) تكون قيمتها تساوي متوسط المربعات للقيمة المتبقية Residual mean of square، بالمقابل فإن الاختلافات في متوسطات المعاملات بين السلالات التي تعود للعوامل الوراثية (σ_g^2) وحسبت وفق المعادلة التالية:

$$\sigma_g^2 = \frac{\text{متوسط المربعات للأصناف - متوسط المربعات للقيمة المتبقية}}{\text{عدد المكررات}}$$

وتم الحصول على القيم للمعادلات السابقة من جدول تحليل التباين من نتائج التحليل الإحصائي المستخدم في تحليل النتائج.

تصحيح النسبة المئوية لنفوق يرقات النيماتودا والحشرات:

تم تصحيح نسبة نفوق يرقات النيماتودا والحشرات في المعاملات السابقة الذكر مقارنة بالشاهد في كل مرة تبعاً للمعادلة التالية (4):

$$\text{نسبة الفوق المصححة في المعاملة} = \frac{\text{نسبة الفوق في المعاملة - نسبة الفوق في الشاهد}}{\text{100- نسبة الفوق في الشاهد}} \times 100$$

كررت التجربة ثلاث مرات لثلاثة دفعات متعاقبة من أجيال النيماتودا الناتجة عن كل سلالة وفق تصميم كامل العشوائية CRD، حللت النتائج بالاعتماد على تحليل التباين وفقاً لبرنامج ANOVA وتم حساب المتوسطات وقيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمال 5% بين المعاملات، وذلك باستخدام برنامج GenStat 15.

تم حساب الانخفاض في كفاءة السلالات على القتل بتأثير التعرض للبرودة مقارنة بغير المعرضة للبرودة وفق المعادلة التالية:

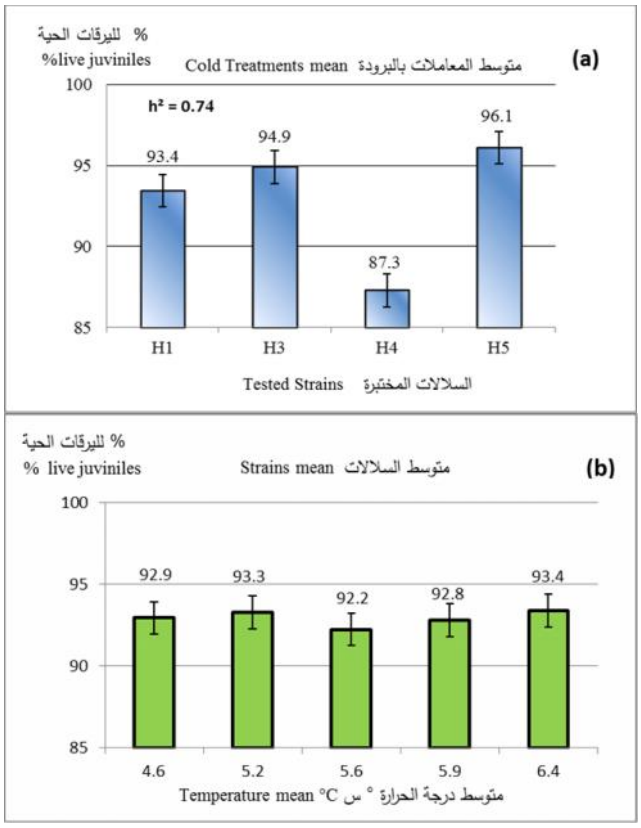
$$\text{\% لانخفاض الكفاءة على قتل الحشرات} = 100 - \left(\frac{\text{نسبة الفوق في المعاملة بالبرودة}}{\text{نسبة الفوق في المعاملة غير المعرضة للبرودة}} \right) \times 100$$

النتائج

اختبار تأثير الحرارة المنخفضة في نسبة نفوق يرقات النيماتودا للسلالات السورية

تراوحت درجات الحرارة ضمن أطباق بتري المحتوية على سلالات النيماتودا المختبرة المعرضة للبرودة خلال فترة التجربة في حدود 3.8–7 °س (وسطياً 5.5 °س). في حين بقيت أطباق الشاهد عند حرارة 25±1°س لمدة 24 ساعة ضمن الحاضنة لحين الاختبار. أظهرت النتائج بأن تعريض السلالات السورية الطبيعية المختبرة لدرجات الحرارة المتدرجة لمدة ساعتين قد خفض نسبة اليرقات الحية لجميع السلالات المختبرة. إذ بلغت نسبة اليرقات الحية (المصححة) 94.4، 94.9، 87.3 و96.1% (وسطياً 93.1%) للسلالات H1، H3، H4 و H5 على التوالي (شكل a1). وقد ظهرت فروق معنوية (F=44.08؛ *df* =3, 40؛ $P \leq 0.001$) بين السلالة H4 وباقي السلالات والتي لم تظهر أية فروق معنوية فيما بينها. إذ بلغت نسبة الفوق في حدها الأعلى عند السلالة H4 (12%) مما يشير إلى أن معظم السلالات المختبرة تتحمل درجات الحرارة المنخفضة، دون أن يؤثر ذلك في نفوقها.

أما بالنسبة لتأثير درجات الحرارة المتدرجة ما بين 3.8 و7 °س في السلالات المختبرة فلم تظهر أية فروق معنوية (F=0.91؛ *df* =4, 40؛ $P \leq 0.466$) في نسبة نفوق يرقات النيماتودا بتغير درجات الحرارة المختبرة (شكل b1).



شكل 1. النسبة المئوية لليرقات الحية للسلالات الطبيعية السورية للنيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* تحت تأثير درجات مختلفة من الحرارة المنخفضة (3.8-7 س) لمدة ساعتين. (**a**): متوسط النسبة المئوية لليرقات الحية للسلالات السورية عند متوسط درجات الحرارة (n =15، 3 مكررات* 5 درجات للحرارة)، (**b**): متوسط النسبة المئوية لليرقات الحية لكافة السلالات ضمن كل معاملة لدرجات الحرارة المتدرجة (n =12، 3 مكررات* 4سلالات). القيمة الدنيا والعظمى لليرقات الحية موضحة بالشكل.

Table 1. Percentage of live juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* Syrian strains tested under different temperatures (3.8–7 °C) for 2 h. (**a**): percentage mean of live juveniles of strains at temperature mean (n= 15, 3 rep*5 temperature treatment). (**b**): percentage mean of live juveniles of all strains within one replicate (n=12, 3 rep*4 strains). Bars indicate minimum and maximum values of live juveniles.

عند حساب عامل التوريث للسلالات السورية المختبرة تبين بأنه مرتفع نسبياً (h^2= 0.74) وهذا ربما يعود إلى التجانس الوراثي للسلالات المختبرة، في حين لم يظهر أي تأثير للعوامل البيئية المتعلقة هنا بانخفاض درجات الحرارة خلال ثلاثة دفعات متعاقبة من الأجيال لليرقات المعدية.

اختبار تأثير الحرارة المنخفضة في نسبة نفوق يرقات النيماتودا للسلالات الهجينة

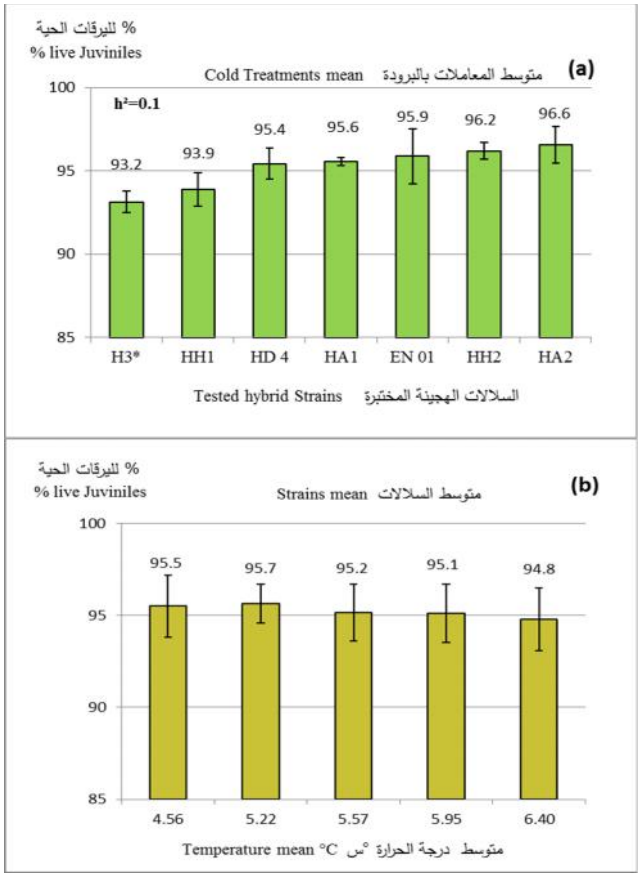
تم اختبار 7 سلالات هجينة لكفاءتها على البقاء حية تحت تأثير درجات الحرارة المنخفضة المتدرجة ذاتها بين 3.8 و7 °س لمدة ساعتين. أظهرت النتائج (شكل a2) انخفاضاً في نسبة اليرقات الحية لجميع السلالات المختبرة، إذ تراوحت نسبة اليرقات الحية في حدود 93.2– 96.6 % (وسطياً 95.25%). وقد ظهرت فروق معنوية بين السلالات المختبرة (F=2.79؛ df =6, 70؛ p=0.017) حيث تأثرت السلالة H3* أولاً، ثم HH1 بالبرودة أكثر من باقي السلالات، وبفارق معنوي مع السلالتين HH2 و HA2، وكانت الأخيرة أقل تأثراً من باقي السلالات (اليرقات الحية 96.6%) وبفروق غير معنوية.

أما بالنسبة لتأثير درجات الحرارة المتدرجة ما بين 3.8 و7 °س في السلالات الهجينة المختبرة فلم تظهر أية فروق معنوية (F=0.28؛ df =4, 70؛ p=0.889) في نسبة نفوق يرقات النيماتودا بتغير درجات الحرارة المختبرة (شكل b2).

وعند حساب عامل التوريث للأصناف الهجينة تبين بأن عامل التوريث لتحمل البرودة كان منخفضاً (h^2 = 0.17)، وهذا عائد على ما يبدو لعدم التجانس الوراثي للسلالات المختبرة لتحمل البرودة، أو ربما لأن السلالات الهجينة المختبرة المذكورة منتخبة لتحمل درجات الحرارة المرتفعة.

اختبار تأثير التعرض للبرودة في كفاءة سلالات النيماتودا السورية في قتل الحشرات

أظهرت النتائج (شكل 3) بأن السلالات السورية المختبرة في معاملة الشاهد أبدت كفاءة عالية في قتل الحشرات، ولم تظهر أية فروق معنوية فيما بينها، إذ بلغت نسبة الحشرات الميتة 91.5، 94.4، 95.8و 93.0% وسطياً (93.7%) للسلالات H1، H3، H4 و H5، على التوالي، وذلك عند العدوى بـ 5 يرقات نيماتودا/حشرة حسب الطرائق الموصوفة من قبل Peters (28). وهذا يؤكد بأن استخدام اللقاح المعدي بهذه النسبة أبدى كفاءة عالية في قتل الحشرات تحت ظروف التجربة، وهذه الكثافة ملائمة وكافية للحصول على نسبة قتل جيدة للحشرات.



شكل 2. النسبة المئوية لليرقات الحية للسلالات الهجينة المختبرة للنيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* تحت تأثير درجات مختلفة من الحرارة المنخفضة (3.8-7 °س) لمدة ساعتين. (**a**): متوسط النسبة المئوية لليرقات الحية للسلالات الهجينة المختبرة عند متوسط درجات الحرارة (n =15، 3 مكررات* 5 معاملات للحرارة)، (**b**): متوسط النسبة المئوية لليرقات الحية لكافة السلالات ضمن كل معاملة لدرجات الحرارة المتدرجة (n= 21، 3 مكررات*7سلالات). القيمة الدنيا والعظمى لليرقات الحية موضحة بالشكل.

Table 2. Percentage of live juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* hybrid Syrian strains under different temperatures (3.8–7 °C) for 2 h (**a**): percentage of live juveniles of strains at mean of temperature (n= 15, 3 rep*5 temperature treatment). (**b**): percentage of live juveniles of all strains within one replicate (n=21, 3 rep* 7 strains). Bars indicate minimum and maximum values of live juveniles.

من ناحية ثانية أظهرت النتائج بأن تعريض يرقات النيماتودا لحرارة 0 °س لمدة ساعتين قد خفض قدرة النيماتودا على قتل الحشرات في جميع السلالات المختبرة إذ بلغت نسبة الحشرات النافقة 36.6، 42.3، 66.2 و71.8% للسلالات H4، H5، H1 و H3، على التوالي (متوسط المعاملة بالبرودة 54.2%). وهذا الانخفاض كان عالي المعنوية مقارنة بالشاهد، إذ بلغت نسبة نفوق الحشرات عندها 91.6، 94.4، 95. 8 و93.0% (وسطياً 93.7%) دون وجود فروق معنوية (الشاهد) فيما بينها (F=255.6؛ df =1, 16؛ $P \leq 0.001$). كما تبين

بأن هناك اختلافات واضحة بين السلالات المختبرة المعرضة للبرودة في كفاءتها على قتل حشرات التجربة، إذ بلغت نسبة الحشرات النافقة 71.8، 66.2، 42.3 و36.6% للسلالات H3، H1، H5 و H4، على التوالي، وقد ظهرت فروق معنوية بين السلالات المختبرة (F=11.41؛ df =3, 16؛ $P \leq 0.001$) تفوقت فيها السلالة H3 والسلالة H1 على السلالتين H5 و H4 وبفارق معنوي وذلك في المعاملات المعرضة للبرودة، في حين لم تظهر أية فروق معنوية بين السلالتين H3 و H1 من ناحية وبين السلالتين H5 و H4 من ناحية ثانية.

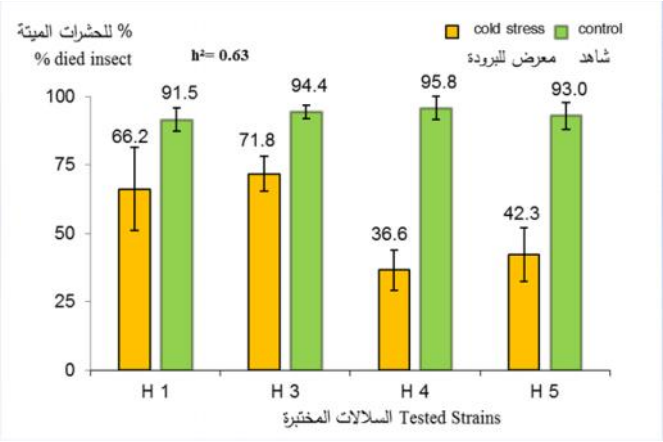
أظهرت السلالات المختبرة انخفاضاً في فعاليتها على قتل الحشرات عند تعريضها للبرودة وبنسب مختلفة مقارنة بالشاهد غير المعرض للبرودة في كل مرة، وعند حساب نسبة انخفاض الكفاءة على قتل الحشرات وفق المعادلة المذكورة في طرائق العمل تبين بأن نسبة الانخفاض في الفعالية نتيجة التعرض للبرودة كان في حده الأدنى عند السلالة H3 تلتها السلالة H1 ثم السلالة H5 وأخيراً السلالة H4، والتي بلغت عندها نسبة انخفاض الكفاءة على قتل الحشرات نتيجة تعرض النيماتودا للبرودة 23.9، 27.7، 54.5 و 61.8 %، على التوالي.

بلغ عامل التوريث لقتل الحشرات بعد تعريضها للحرارة المنخفضة للأصناف المختبرة (h^2 = 0.63) وهذا يتوافق إلى حد بعيد مع عامل التوريث (h^2= 0.74) الذي تم حسابه لبقاء النيماتودا على قيد الحياة بعد تعريضها للبرودة، وهذا يفسر التجانس الوراثي للسلالات المختبرة لتحمل البرودة.

هذا وقد بينت النتائج التي تم الحصول عليها للسلالات الهجينة من قبل Mukuka وآخرون (27) بأن تعريض يرقات سلالات النيماتودا الهجينة لحرارة 0 °س لمدة ساعتين قد خفض قدرة النيماتودا على إصابة الحشرات في جميع السلالات المختبرة تراوحت ما بين 18.4 و85% (وسطياً 54%) مقارنة بالشاهد غير المعرض للبرودة 55–97% (وسطياً 76%)، وهذا الانخفاض كان معنوياً عند السلالات الهجينة EN01، HH1 و*H3 (F=3.7؛ df=6, 20؛ $p \leq 0.02$) ، وأن الفعالية كانت في حدها الأدنى عند السلالة التجارية EN01 (18.4% للمعرض للبرودة، 55% للشاهد).

المناقشة

تظهر النتائج السابقة (شكل 1 و2) عدم وجود تأثير هام للحرارة المنخفضة المتدرجة 3.8–7 °س في بقاء النيماتودا على قيد الحياة، إذ لم تتجاوز نسبة النفوق وسطياً 5 % عند تلك الدرجة من الحرارة سواء للسلالات الطبيعية السورية أو للسلالات الهجينة، بغض النظر عن عامل التوريث لكلا المجموعتين اللتين أبدتا قيم متباينة لتأثير العوامل الوراثية في تحمل البرودة، على الرغم من وجود اختلافات معنوية بين بعض السلالات ضمن كل مجموعة من سلالات النيماتودا المختبرة، وهذا يؤكد بأن لكل سلالة صفات خاصة بها في تحمل البرودة والبقاء على قيد الحياة، مما يعكس أهمية الانتخاب الطبيعي بين السلالات ومن ثم التهجين للحصول على سلالات ذات مواصفات جيدة.



شكل 3. متوسط نسبة موت يرقات الطور الأخير لدودة شمع العسل *Galleria mellonella* بعد العدوى بـ 5 يرقات نيماتودا/حشرة لسلالات طبيعية سورية للنيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* بعد 72 ساعة عند حرارة 25 °س. (**العمود الأصفر**) تم تعريض يرقات النيماتودا لدرجة 0°س لمدة ساعتين قبل عملية العدوى في **التجربة**، (**العمود الأخضر**) يرقات الشاهد حفظت عند 25 °س **دون التعريض** للبرودة. القيم في الأعمدة تمثل متوسط نسبة موت الحشرات لثلاث مكررات كل منها 24 **حشرة**.

Figurre 3. Abbott-corrected mortality mean of last instar *Galleria mellonella* after exposure to 5 DJs/insect of different *Heterorhabditis bacteriophora* inbred Syrian strains for 72 h at 25°C. Prior to inoculation in the assays, DJs were exposed to 0 °C (yellow bars) for 2 h. Control DJs were kept at 25°C (green bars). Each column represents a mortality mean of three replicates with 24 insects each.

بلغ متوسط نسبة الحشرات النافقة بفعل السلالات السورية المعاملة بالبرودة 36.6–71.8% (وسطياً 54.2%)، مقارنة بالسلالات الهجينة التي تم اختبارها بالطريقة ذاتها من قبل Mukuka وآخرون والتي بلغ متوسط نسبة الحشرات النافقة عندها 18.4–85% (وسطياً 54%) (27). وفي كلتا المجموعتين كان الانخفاض عالي المعنوية مقارنة بالشاهد. وهذا مؤشر لأهمية دور العوامل البيئية في خفض كفاءة النيماتودا الممرضة للحشرات على قتل الحشرات عند التعرض للاجهادات البيئية. أشار Grewal وآخرون إلى أن مقدرة الطور المعدي للنيماتودا *H. bacteriophora* على إصابة الحشرات يكون عند حرارة 10–35 °س (19)، وهذا لا ينطبق على معظم سلالات هذه النيماتودا (17)، والتي تكون ذات كفاءة جيدة عند حرارة أقل من 10 °س، وهذا أيضاً يرتبط بالعائل الحشري (31). وبالتالي فإن كفاءة وفعالية سلالات

هـذا النـوع مـن النيمـاتودا ضـمن درجـات الحـرارة المنخفضـة يتـيح استخدامها في المواسم الزراعية الباردة (24). إلا أن النيماتودا تكون غير قادرة على قتل الحشرات بغياب البكتريا (12)، وللحرارة تأثير هام ومباشر في فاعلية البكتريا المرافقة للنيماتودا والتي تبقى فاعلة ضمن درجات الحرارة المنخفضة (11)، ويمكن أن تحفظ البكتريا عند حرارة 6°س، وقد تتحمل انخفاض في الحرارة لدرجة أقل من تلك الدرجة وتبقى فاعلة (19). وهذا ما تم ملاحظته في دراستنا حيث حدث موت للحشرات بنسبة تجاوزت وسطياً 50% بعد تعرض النيماتودا والبكتريا المرافقة لها لدرجة حرارة الصفر مئوية لمدة ساعتين. وهذا يشجع على استخدام السلالات ذات الكفاءة العالية والمتحملة للبرودة في بداية الربيع أونهاية الخريف لمكافحة الحشرات التي تنشط في درجات الحرارة المنخفضة (24). والجدير بالذكر أن ارتفاع الحرارة إلى أكثر من 35 °س خلال عمليات النقل لفترة قصيرة قد يؤثر في كفاءة النيماتودا على إصابة الحشرات، أو في عملية التكاثر أو حتى البقاء على قيد الحياة (19)، وهذا مايفسر انخفاض فعالية النيماتودا بتأثير الحرارة المرتفعة (17.2%) مقارنة بالحرارة المنخفضة (22.2%) للسلالات الهجينة المختبرة سابقة الذكر (27).

كان عامل التوريث لقتل الحشرات بعد تعريضها للحرارة المنخفضة للأصناف المختبرة (h^2= 0.63) عالياً وهذا يتوافق إلى حد بعيد مع قيمة عامل التوريث (h^2= 0.74) التي تم حسابها لبقاء النيماتودا على قيد الحياة بعد تعريضها للبرودة، وهذا يفسر التجانس الوراثي للسلالات المختبرة لتحمل البرودة. إذ أن التوالد الناتج عن الاخصاب الذاتي في النيماتودا الخنثى يعطي أجيالاً متجانسة، ولهذا يلاحظ بأن السلالات المختلفة تتأثر بالظروف البيئية، وبالتالي فالاختلافات الملاحظة بين مجتمع الدفعة الواحدة من الأجيال لليرقات المعدية ضمن كل سلالة يعود إلى تأثيرات بيئية، في حين الاختلافات بين المعاملات المختلفة يعود إلى عوامل وراثية (22).

تظهر النتائج بأن السلالة H3 السورية كانت الأفضل في قتل الحشرات بعد تعرضها للبرودة من بين السلالات المختبرة فهي لم تتأثر كباقي السلالات عند التعرض للبرودة ونسبة تأثرها كانت أقل من السلالة H4 ولكن دون ظهور فروق معنوية بين السلالتين المذكورتين (شكل 3)، رغم ارتفاع نسبة نفوق يرقات السلالة الأخيرة H4 عند تعرضها للبرودة وبفارق معنوي مع السلالة H3 (شكل a1). وهذا يتطابق مع النتائج المتحصل عليها للسلالات الهجينة، إذ أظهرت نتائج سابقة لذات السلالات انخفاض كفاءة السلالتين HH1، *H3 على قتل الحشرات (27). وتأثرهما بالبرودة للبقاء على قيد الحياة أكثر من باقي السلالات المختبرة (شكل a2).

تتأثر سلالات النيماتودا *Heterorhabdites bacteriophora* بالظروف البيئية السيئة، فقد أشارت دراسات سابقة حول انخفاض الفعالية بتأثير الاجهادات البيئية بأن نسبة الانخفاض في الفعالية كان في حده الأعلى 40.2% بتأثير الجفاف، يليه التعرض للبرودة 22.2%، وأخيراً التعرض للحرارة المرتفعة 17.2%، رغم أن السلالات المختبرة تلك مهيئة لتحمل الحرارة المرتفعة والجفاف (27). وفي دراستنا تبين بأن نسبة الإنخفاض في الكفاءة على قتل الحشرات للسلالات السورية المختبرة نتيجة التعرض للبرودة تراوح ما بين 23.9–61.8% (وسطياً 42%) مقارنة بغير المعرضة للبرودة. كما أن استخدام السلالات الأكثر تحملاً للحرارة المرتفعة لا يعكس بالضرورة زيادة كفاءتها على القتل في تلك الظروف (2). وقد يؤدي استخدام السلالات الأكثر تحملاً للحرارة إلى فقد في كفاءتها على قتل الحشرات عند تعرضها لدرجات الحرارة المنخفضة كما هو الحال عند السلالات الهجينة المختبرة (27). على أية حال فالتجارب المفيدة في زيادة الكفاءة على قتل الحشرات ضمن الظروف الحرارية المختلفة أو الجفاف يتم عن طريق الانتخاب الطبيعي والتحسين الوراثي للسلالات (11)، للتمكن من انتاجها واستخدامها على المستوى التجاري. هذا وقد أظهرت نتائج دراسات سابقة بأن السلالة السورية H3 هي الأكثر كفاءة في قتل الحشرات عند كثافة عدوى ابتدائية منخفضة (LC_{50} = 3.8 يرقة نيماتودا/حشرة) مقارنة بباقي السلالات ذاتها التي تم اختبارها (1)، إلا أنها (أي السلالة H3) كانت الأقل تحملاً للحرارة المرتفعة عند نسبة نفوق 90% من يرقاتها (2) كما أن السلالة H3 كانت الأفضل وبفارق معنوي في فعاليتها على قتل الحشرات بترب ذات رطوبة مختلفة تراوحت ما بين 5–15% مقارنة بباقي السلالات المختبرة (3).

يستخلص من هذه الدراسة بأن دراسة الخصائص البيولوجية ذو أهمية خاصة لعزلات وسلالات النيماتودا لمنطقة ما والمتعلقة بخصائصها لتحمل الحرارة المرتفعة أو المنخفضة أوالجفاف مع الاحتفاظ بمقدرتها على قتل الحشرات ضرورية من أجل عمليات التهجين للحصول على سلالات ذات خصائص جيدة، وهذا ما بينته دراساتنا من إمكانية إجراء تهجين بين السلالة H3 مع السلالتين H4 أو H5، أو غيرها من السلالات التي تحمل خصائص بيولوجية جيدة، قبل إكثارها مخبرياً واستخدامها في الحقل.

شكر وتقدير

يتقدم الباحث بجزيل الشكر إلى البروفيسور Ralf-Udo Ehlers من قسم التقاني الحيوية والمكافحة الحيوية، معهد أمراض النبات، جامعة كيل، ألمانيا، لتقديم الأجهزة المخبرية ومستلزمات البحث، والأستاذ الدكتور خالد العسس من كلية الزراعة بجامعة دمشق للمساهمة في

ارسال العينات لمعهد وقاية النبات بجامعة كيل، ألمانيا في حزيران/يونيو 2009، والسيد خالد الشمعة من المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) لمساعدته في التحليل الإحصائي للنتائج.

Abstract

Al-Zainab, M.H. and R.U. Ehlers. 2015. Effect of low temperatures on the activity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabdites bacteriophora* Poinar *in Vitro*. Arab Journal of Plant Protection, 33(2): 107-115.

An experiment was carried out in order to investigate the *in-vitro* effect of low temperatures on the dauer juveniles (DJs) life of 4 strains H1, H3, H4 and H5 of the entomopathogenic nematode *Heterorhabdites bacteriophora* Poinar, 1976 isolated from Syrian soil. The effect of stress exposure on the infectivity of cold tolerant Syrian strains was assessed against last instars larvae of *Galleria mellonella*. Nematode dauer juveniles (DJs) were exposed to temperature treatment at 0°C for 2 h prior to inoculation with 5 DJs per insect. Results indicated that the exposure to cold temperature between 3.8 and 7 ºC for 2 h reduced the percentage of live juveniles of all strains ranging from 87.3 to 96.1% (mean 93.1%) compared to the control (99.33%), the highest mortality after low temperature treatment was for H4 (12%) and differed significantly from other strains. On the other hand, results showed no significant variation in mortality rate of nematodes larvae occurred at the low temperatures tested. Exposure of nematodes larvae to cold stress (0 ºC) caused significant reduction in the efficiency of all strains (mean insect mortality 54.2%) compared to the control (93.7%). In addition, results showed significant differences between tested strains, where H3 was the most effective strain compared to H1, H5 and H4, with mean mortality rate of 71.8, 66.2%, 42.3, and 36.6%, respectively.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Galleria mellonella*, cold stress, Syria..

Corresponding author: ***M.H. Al-Zainab, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Aleppo, Syria, email: Dr_alzainab@yahoo.com***

المراجع

1. **الزينب، محمد هشام.** 2011. تأثير مستويات مختلفة من النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabdites bacteriophora* في نسبة قتل يرقات خنفساء الطحين الصفراء *Tenebrio molitor*. مجلة بحوث جامعة حلب، سلسلة العلوم الزراعية، العدد 88: (قيد الطباعة).
2. **الزينب، محمد هشام.** 2013. تأثير درجات الحرارة المرتفعة في حيوية النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora* مخبرياً. مجلة وقاية النبات العربية، 31: 269-274.
3. **الزينب، محمد هشام.** 2013. تأثير رطوبة التربة في حيوية النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora*. مجلة بحوث جامعة حلب، سلسلة العلوم الزراعية، العدد 106: (قيد الطباعة).
4. **Abbott, W.S.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.
5. **Akhurst, R.J.** 1986. *Xenorhabdus nematophilus* ssp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Systematic and Applied Microbiology, 8: 142-147.
6. **Bowen, D., T.A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia and R.H. French-Constant.** 1988. Insecticidal toxins from bacterium *Photorhabdus luminescens.* Science, 280: 2129-2132.
7. **Ehlers, R.U.** 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: parasitic and commercial aspects in regard to regulatory policies. Biocontrol Science and Technology, 6: 303-316.
8. **Ehlers**, **R.U**. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied Microbiology Biotechnology, 5: 623-633.

References

9. **Ehlers**, **R.U**. 2003. Biocontrol nematodes. Pages: 177-220. In: Environmental Impacts of Microbial Insecticides. H.M.T. Hokkanenn and A.E. Hajek (eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
10. **Ehlers, R.U. and P. Arne.** 1998. Bekämpfung von engerlingen auf Sportrasen. 1998. Rasen, Turf, Gazin, 3:60-67.
11. **Ehlers**, **R.U., J. Oestergarrd, S. Hollmer, M. Wingen and O. Strauch.** 2005. Genetic selection for heat tolerance and low temperature activity of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis bacteriophora-Photorhabdus luminescens.* Biological Control, 50: 699- 716.
12. **Ehlers**, **R.U., U. Wyss and E. Stackebrandt**. 1988. 16 S RNA cataloguing and the phylogenetic position of the genus *Xenorhabdus*. Systematic Applied Microbiology, 10: 121-125.
13. **Endo, B.Y. and W.R. Nickle**. 1994. Ultrastructure of the buccal cavity region and oesophagus of the insect parasitic nematode, *Heterorhabdites bacterophora*. Nematologica, 40: 379-398.
14. **Fuchs, R**. 1915. Die Naturgeschichte der Nematoden und einiger anderer Parasiten. The Zoological Journal, Abt. Syst. Ökol. Gögr. Tiere, 38.
15. **Gaugler, R., P. Grewal, H.K. Kaya and D. Smith-Fiola.** 2000. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes, Biological Control, 17: 100-109.
16. **Glazer, I.** 2002**.** Survival biology. Pages 169-187. In: Entomopathogenic Nematology. R. Gaugler (eds). CAB International, Walling-ford, UK.
17. **Gouge, D.H., L.L. Lee and T.J. Henneberry**. 1999. Effect of temperature and lepidopteran host species on entomopathogenic nematodes (Nematoda:

26. **Mukuka, J., O. Strauch, C. Hoppe and R.U. Ehlers**. 2010a. Improvement of heat and desiccation tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through cross-breeding of tolerant strains and successive genetic selection. BioControl, 55: 511-521.
27. **Mukuka, J., O. Strauch, M.H. Al Zainab and R.U. Ehlers.** 2010b. Effect of temperature and desiccation stress on infectivity of stress tolerant hybrid strains of *Heterorhabditis bacteriophora*. Russian Journal of Nematology, 18: 111-116.
28. **Peters, A.** 2005. Insect based bioassay. Pages: 57-72. In: Cost Action 819, Quality Control of Entomopathogenic Nematodes. J.M. Grunder (eds). Wädenswil, Switzer-land. Agroscope.
29. **Peters A. and R.U. Ehlers.** 1997. Encapsulation of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. Journal Invertebrata Pathology, 69: 218-222.
30. **Riddle, D.L., T. Blumenthal, B.J. Meyer and J.R. Priess.** 1997. Introduction to *C. elegans*. Pages 1-22. In: *C. elegans* II. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer and J.R. Press (eds). Cold Spring harbor laboratory Press, Harbor, NY.
31. **Stenseth, C.** 1997. Effects of temperature on development of *Otiorhynchus sulcatus* (Colioptera: Curculiionidae). Annals of Applied Biology, 91: 179-185.
32. **Stock, S.P. and D.J. Hunt**. 2005. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. Pages 3-43. In: Nematodes as Biological Agents. P.S. Grewal, R.U. Ehlers and D.I. Shaprio, (eds.). CAB International, Wallingford, UK.
33. **Strauch, O. and R.U. Ehlers.** 1998. Food signal production of *Phptorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabdites* spp. in liquid culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 50: 369-374.
34. **Strauch, O., J. Oestergarrd, S. Hollmer and R.U. Ehlers**. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. Biological Control, 31: 218-226.

Steinernematidae, Heterorhabditidae) infection. Environment Entomology, 28: 876-883.
18. **Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shaprio**. 2005. Nematodes as Biological Agents. CAB International, Wallingford, UK, 356 pp.
19. **Grewal, P.S., S. Selvan and R. Gaugler.** 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breath for infection, establishment and reproduction. Journal of Thermal Biology, 19: 245-253.
20. **Han, R. and R.U. Ehlers**. 2000. Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. Journal of Invertebrata Pathology, 75: 55-58.
21. **Johnigk, S.A. and R.U. Ehlers**. 2008. Frequently used standard methods in entomopathogenic nematode-bacterium research. Department of Biotechnology and Biological Control, Institute for Phytopathology, Christian-Albrechts-University Kiel, Germany, 12 pp.
22. **Johnigk, S.A., S. Hollmer, U. Wyss and R.U. Ehlers.** 2002. Heritability of the liquid culture mass production potential of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabdites bacteriophora*. Biocontrol Science Technology, 12: 267-276.
23. **Kaya, H.K. and S.P. Stock.** 1997. Techniques in insect nematology. Pages 282-324. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. L.A. Lacey (eds.). Academic Press, San Diego.
24. **Long, S.L., P.N. Richardson and J.S. Fenlon.** 2000. Influence of temperature on the infectivity of entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabdites* spp. to larvae and pupae of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus.* Nematology, 2: 309-317.
25. **Mracek, Z. and G. Jenser.** 1988. First report on entomogenous nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae from Hungary. Acta Phytopathologica Entomologica Hungaricae, 23: 153-156.

Received: July 22, 2013; Accepted: February 2, 2015

تاريخ الاستلام: 2013/7/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2015/2/26