

## تحديد فعالية بعض العزلات المحلية للنيماتودا الممرضة للحشرات ضد حافرة أوراق البندورة/الطماطم *Tuta absoluta* (Meyrick) في الحقل وتحت ظروف المختبر

علي درويش، عبد النبي بشير وخالد العسس

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص.ب. 30621، سورية، البريد الإلكتروني: basherofeckey11@gmail.com

### الملخص

درويش، علي، عبد النبي بشير وخالد العسس. 2020. تحديد فعالية بعض العزلات المحلية للنيماتودا الممرضة للحشرات ضد حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta* (Meyrick) في الحقل وتحت ظروف المختبر. مجلة وقاية النبات العربية، 38(4): 318-326.

نفذت الدراسة في حقل بندورة/طماطم في محافظة الحسكة بسورية خلال موسم 2018، لاختبار فعالية ثلاثة عزلات من النيماتودا الممرضة للحشرات حقلياً ومخبرياً. تم الحصول على عزلتين (VH11 و DKH) تتبعاً للنوع *Heterorhabditis bacteriophora*، وعزلة (RST) من النوع *Steinernema carpocapsae* متطفلة على يرقات وعذارى حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta* (Meyrick)، من مركز بحوث ودراسات مكافحة الحشرات في كلية الزراعة، جامعة دمشق. تم الحصول على يرقات وعذارى حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم من حقل بندورة في قرية كرحصار التابعة لمنطقة عامودا، محافظة الحسكة وتم تربيتها تحت الظروف المخبرية. تم اختبار الفعالية الحقلية لعزلات النيماتودا المحلية في الحقل على نباتات بندورة ضمن أقفاص مغطاة ومثبتة. أجريت المعاملة بجرعة 50 طور معدي من النيماتودا/سم<sup>2</sup>، اختلفت حساسية اليرقات باختلاف العزلة المختبرة، وكانت العزلة DKH للنوع *H. bacteriophora* الأكثر فعالية بنسبة نفوق وصلت إلى 80.75%، وكانت أقلها العزلة RST من النوع *S. carpocapsae* بنسبة نفوق وصلت إلى 68.88%. تم في الدراسة المخبرية اختبار فعالية العزلات الثلاث بمعدلات إعداء مختلفة (1، 2، 5، 10، 15، 20، 25 و 40 طور معدي/يرقة) على يرقات من العمر الرابع خارج الأنفاق، وتراوحت نسب النفوق الناتجة عن المعاملة بين 21.8 و 90% للعزلة RST التابعة للنوع *S. carpocapsae*، ومن 16.11 إلى 67.23% لدى العزلة DKH التابعة للنوع *H. bacteriophora*، من 13.6 إلى 86.25% لدى العزلة VH11 التابعة للنوع *H. bacteriophora*. بلغت الجرعة نصف القاتلة LD<sub>50</sub> للعزلات المدروسة 7.8، 18 و 16 طوراً فعلاً/يرقة للعزلات RST، DKH و VH11، على التوالي. استناداً إلى هذه البيانات كانت العزلة RTS هي أكثر العزلات كفاءةً، وتم استخدامها على يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم داخل الأنفاق والعذارى، وسببت معدلاً منخفضاً في نفوق اليرقات داخل الأنفاق (15%) والعذارى (5.5%). بينت هذه النتائج أن النيماتودا الممرضة للحشرات يمكن أن يكون لديها إمكانات جيدة للتحكم في يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم خارج الأوراق، مما يستدعي دراستها بشكل أعمق.

**كلمات مفتاحية:** *Steinernema*، *Heterorhabditis*، *Tuta absoluta*، تطفل، مكافحة حيوية، أعداء طبيعية.

### المقدمة

الثاني إلى الرابع تغزل مخابئ حيرية في الأوراق أو تشبك الأوراق مع بعضها (Desneux et al., 2010)، كما تحفر اليرقات في الثمار غير الناضجة والناضجة. تبدو الإصابة على الثمار على شكل أنفاق وحفر محاطة بمخلفات الحشرة الغامقة اللون، وتؤدي الإصابة إلى نمو الكائنات الممرضة والتي تؤدي إلى تعفن الثمار. تحفر اليرقة في السوق والبراعم القمية مسببةً تقرع السوق من محتواها وإتلاف البراعم القمية (Vargas, 1970). إن التحكم والسيطرة على هذه الحشرة من الصعوبة بكان لأن اليرقة تتغذى داخل أنفاق تحميها من تأثير المبيدات الحشرية، حيث يتم رش هذه الحشرة بالمبيدات الكيميائية بمعدل 8-25 رشة بالموسم الواحد في مناطق إنتاج البندورة في العالم لمكافحة هذه الآفة (Retta & Berhe, 2015) مما يؤدي ذلك إلى زيادة تكاليف الإنتاج وانخفاض المردود الاقتصادي بالإضافة إلى أضرار استخدام المبيدات على المستهلك والبيئة والتنوع الحيوي، وخطر ظهور سلالات

تعد حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) واحدة من أهم الآفات الحشرية على محصول البندورة في بقاع مختلفة من العالم ومنها سورية (Potting et al., 2013) تتغذى اليرقة على جميع الأجزاء الهوائية للنبات (الأوراق، السوق، الفروع، والثمار)، بحفرها أنفاقاً وممرات غير منتظمة الشكل بين بشرتي الورقة، وتتغذى على الميسيلوم تاركة تجاويف وأنفاق فارغة مغطاة بالبشرة الخارجية للأوراق، تتحول لاحقاً إلى بقع جافة، وتترك اليرقات مخلفاتها (برازها) في نهاية الأنفاق. تتغذى اليرقة في حال الإصابة الشديدة على كامل الورقة، ومن الملاحظ أن اليرقة من العمر

حشرية مقاومة للمبيدات (Roditakis et al., 2015). في هذا السياق، تؤدي مكافحة الحيوية للحشرة دوراً هاماً في السيطرة على هذه الآفة لأنها آمنة بيئياً، ويعتبر استخدام بعض أنواع النيماتودا المتخصصة كممرضات ضد الحشرات من أهم هذه الوسائل الأحيائية (Griffin et al., 2005). أشارت الأبحاث السابقة التي أجريت في العالم باستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات في السيطرة على فعالية حافرة أوراق البندورة. (Batalla-Carrera et al., 2010) إلى الكفاءة العالية للنيماتودا الممرضة للحشرات على اختراق النفق وقتل يرقات حافرة أوراق البندورة داخل الأنفاق، وتراوحت النسبة المئوية لنفوق اليرقات بين 76.3 و 92% بمعدل 60 طور معدي/سم<sup>2</sup>. في دراسة أخرى تراوحت نسبة نفوق يرقات حافرة أوراق البندورة داخل الأنفاق عند حرارة 10، 15، 20 و 25 °س في حدود 60-100% في الاختبارات المخبرية باستخدام النيماتودا *H. bacteriophora*، في حين كانت النسبة المئوية لنفوق شرانق حافرة أوراق البندورة/الطماطم منخفضة نسبياً تراوحت بين 16.6-20.83% (Desneux et al., 2010). في اختبار أجري في مصر (Youssef, 2015) وصلت فيه نسبة نفوق يرقات العمر الرابع لحافرة أوراق البندورة/الطماطم إلى 93.3% مخبرياً بعد 3 أيام من المعاملة بجرعة 1000 طور معدي/1 مل من النيماتودا المحلية لبعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات (Gözel & Kasap, 2015) في مكافحة حافرة أوراق البندورة/الطماطم.

هدف هذا البحث إلى دراسة مخبرية وحقلية لتحديد فعالية بعض العزلات المحلية للنيماتودا الممرضة للحشرات للنوعين *Heterorhabditis bacteriophora* و *Steinernema carpocapsae* في السيطرة على الأطوار المختلفة لحشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*T. absoluta*) في بعض حقول البندورة في محافظة الحسكة.

## مواد البحث وطرائقه

تم الحصول على العزلات المختلفة المشار إليها من مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية في كلية الزراعة من جامعة دمشق في سورية. تم تربية كل عذلة منفردة على العمر اليرقي الأخير لحشرة دودة الشمع (*Galleria mellonella* L.) (العائل الأكثر استخداماً في التربية المخبرية للنيماتودا الممرضة للحشرات) (Kaya & Stock, 1997)، وقد تم اختيار هذه الحشرة في تربية النيماتودا الممرضة للحشرات للحساسية العالية ليرقات هذه الحشرة للنيماتودا الممرضة للحشرة وسهولة التربية والوفرة الواسعة (Griffin et al., 2005). تم إكثار عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات الأنفة الذكر باتباع تقنية المصيدة المائية (مصيدة وايت).

تحضير تركيزات الطور المعدي لعزلات النيماتودا المحلية المختبرية اتبعت طريقة التخفيف (Dilution method) الموصوفة سابقاً (Hatim, 2010) للحصول على نسب الاستعمال المطلوبة من الطور اليرقي المعدي، حيث نُقل الماء الحاوي على أفراد الطور اليرقي المعدي من أطباق العذلة الواحدة إلى كأس مدرج وحدد فيه حجم المعلق المائي للطور اليرقي المعدي، ثم وُضع كل كأس على جهاز تحريك مغناطيسي ليتجانس المعلق النيماتودي وأخذ منه 0.5 مل وُضع على شريحة زجاجية خاصة لعذلات النيماتودا. تمَّ عدُّ يرقات الطور المعدي بوضع الشريحة على مكبرة تحت التكبير (10×). كُررت هذه العملية 10 مرات، وحُسب المتوسط الذي ضرب بحجم المعلق المركز في الكأس وبالتالي تمَّ تحديد عدد أفراد الطور اليرقي المعدي في المعلق للعذلة الواحدة، ثم تمَّ تخفيف المعلق بالماء المقطر للحصول على معدل الاستخدام (50 فرد معدي/مل من المعلق). كما استخدمت هذه الطريقة للحصول على الأعداد المطلوبة من الطور اليرقي المعدي في التجربة الحقلية، وتمَّ استخدامها ولمدة أسبوع إلى 12 يوماً من خروجها من يرقات دودة الشمع الكبرى.

## التربية المخبرية لحافرة أوراق البندورة/الطماطم

تم الحصول على يرقات وعذارى الآفة من حقل بندورة في قرية كرحصار التابعة لمنطقة عامودا، محافظة الحسكة، خلال الفترة الممتدة ما بين حزيران/يونيو وحتى تشرين الأول/أكتوبر لعام 2018. تم تربية هذه الأطوار على نباتات بندورة في أقفاص تربية خشبية (50×50×50 سم) تم تغطيتها بقماش من الموسلين في غرفة تربية عند حرارة 25±1 °س، ورطوبة نسبية 65±5%، وفترة إضاءة 16 ساعة ضوء: 8 ساعات ظلام. تم إكثار الحشرة مخبرياً لعدة أجيال للحصول على الذكور والإناث المستخدمة في التجارب الحقلية.

## الاختبار المخبري

أختبرت فعالية عزلات النيماتودا المحلية المذكورة أعلاه على يرقات الحشرة خارج النفق، واليرقات من العمر الرابع داخل الأنفاق، والعذارى. أجريت الدراسة باستخدام تركيزات مختلفة للسلاسل المختبرية (1، 2، 5، 5، 10، 15، 20، 25 و 40 طور معدي/يرقة) لكل معاملة. كان عدد المكررات لكل معاملة 20 يرقة (المجموع 60 يرقة)، بالإضافة إلى الشاهد (المعاملة بالماء، 20 يرقة). وضعت كل يرقة على ورقة ترشيح في طبق بتري نظيف ومعقم، ووضعت عند حرارة 25 °س. لإختبار فعالية العزلات المختبرية على يرقات الحافرة داخل الأوراق، تم تقطيع أوراق البندورة إلى أقراص بحيث يحتوي كل قرص على نفق للحافرة بداخله يرقة. تم وضع كل قرص في طبق بتري نظيف مغطى بالموسلين. تمت المعاملة بالتركيز نصف القاتل LD<sub>50</sub> للعذلة RST

المختبر. تم حساب نسبة النفوق ليرقات الحشرة خارج الأوراق باستخدام معادلة أبوت (Abbott, 1925). تم حساب الجرعة نصف القاتلة باستخدام العلاقة بين لوغاريتم التركيز والنسبة المئوية للنفوق باستخدام معادلة الارتباط.

## النتائج والمناقشة

### النتائج المخبرية

اختلفت النسبة المئوية لنفوق يرقات حافرة أوراق البندورة عند استخدام عزلات النيماتودا المدروسة باختلاف تركيز العزلة، ونوع العزلة، وكانت أعلى نسبة نفوق لجميع العزلات عند التركيز 40 طور معدي/يرقة، وأقلها عند التركيز 1 طور معدي/يرقة. بينت النتائج أن العزلة الأكثر فعالية على يرقات الحشرة في الدراسة المخبرية كانت العزلة RST التابعة للنوع *S. carpocapsae*، حيث تراوحت نسبة النفوق من 21.8 إلى 90%، والعزلة VH11 التابعة للنوع *H. bacteriophora* من 13.6 إلى 86.25%، ثم العزلة DKH التابعة للنوع *H. bacteriophora* من 16.11 إلى 67.23% (جدول 1).

سجل أعلى معدل نفوق (21.8%) على 1 طور فعال/يرقة للعزلة RST وكان الفارق معنوياً مع العزلتين DKH و VH11 عند مستوى احتمال 1%. بينما كان في 2 طور فعال/يرقة (27.53%) للعزلة RST، ولم يكن هناك اختلاف معنوي مع العزلة VH11 (27.31%). عند استخدام 5 طور فعال/يرقة كانت أعلى نسبة للنفوق 54.19% للعزلة VH11، ولم يكن هناك اختلاف معنوي مع نسبة النفوق للعزلة RST (43.41%). عند استخدام تركيز 10 طور فعال/يرقة كانت أعلى نسبة نفوق لليرقات 66.57% للعزلة RST، مع عدم وجود فرق معنوي مع العزلة VH11 (56.24%)، ولم يختلف الأمر بالنسبة للتركيزات الأخرى حيث كانت أعلى نسب مئوية للنفوق للعزلة RST بفارق غير معنوي مع العزلة VH11، ومعنوي مع العزلة DKH.

تتوافق هذه النتائج مع ما نشر سابقاً (Gözel & Kasap, 2015) من أن يرقات حافرة أوراق البندورة حساسة للإصابة بكل أنواع النيماتودا المعاملة بها، ويختلف مستوى الحساسية باختلاف نوع النيماتودا. في دراسة أخرى (Gözel et al., 2014) تحت الظروف المخبرية تراوحت النسبة المئوية للنفوق ليرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم بين 0-8.3% للنوع *H. bacteriophora*، و 8.3-83.3% للنوع *S. affinis*، و 8.3-91.6% للنوع *S. feltiae*.

للنوع *S. carpocapsae* التي تبين من الدراسة السابقة أنها أفضل العزلات المختبرة. كان عدد المكررات 4، بالإضافة للشاهد الذي عومل بالماء. وضعت أطباق البتري في غرفة مكيفة عند حرارة 25 س ورطوبة نسبية 5±65%. بالنسبة للعداري، تم وضع 24 عذراء منفردة على ورقة ترشيح في طبق بتري نظيف ومعقم، وتم تغطية كل عذراء برمل معقم، وتمت المعاملة بالتركيز نصف القاتل LD<sub>50</sub> للعزلة RST للنوع *S. carpocapsae* وحفظت في مكان مظلم. تمت المراقبة اليومية وتسجيل أعداد اليرقات والعداري الميتة لمدة 15 يوماً والتأكد أن سبب الموت هو النيماتودا المختبرة.

### الإختبار الحقلّي

تم الإختبار الحقلّي لعزلات النيماتودا المحلية في حقل بندورة مزروع بصنف دورا في قرية كرحصار التابعة لمنطقة عامودا، محافظة الحسكة، خلال الفترة الممتدة ما بين نهاية شهر نيسان/أبريل وحتى نهاية شهر تشرين الأول/أكتوبر لعام 2018. تم سقاية وتسميد شتلات البندورة/الطماطم في الحقل بشكل دوري، لحين وصول الشتلة إلى طول 20 سم، ثم وضعت في قفص تربية خشبي (50×50×50 سم) وغطيت بقمّاش من الموسلين لمنع دخول الأعداء الحيوية وغيرها من الحشرات. أحيطت الأقفاص بهيكل حديدي للحفاظ عليها، أدخل على كل نبات بندورة/طماطم بعمر 30 يوماً زوجين من الإناث والذكور (2 ذكر و 2 أنثى) لحشرة حافرة أوراق البندورة. تمت المعاملة بعزلات النيماتودا المدروسة في فترة الغسق (بعد الغروب) لتأمين الرطوبة الجوية المناسبة لنشاط عزلات النيماتودا. أستخدم في المعاملة بخاخ تقليدي بمعدل 50 طور معدي/سم<sup>2</sup>، ومعاملة الشاهد بنفس الحجم من الماء. تم تأمين الرطوبة اللازمة لنشاط سلالات النيماتودا المختبرة لعدة ساعات من خلال رش الأقفاص بالماء. كان عدد المكررات لكل معاملة اثنين، وتمت المعاملة بالسلالات المختبرة بعد 7، 14 و 21 يوماً من إطلاق الحشرات الكاملة للحافرة داخل صناديق التربية. أخذت القراءات بعد 3، 5، 7، 9، 11، 13 و 15 يوماً بعد المعاملة بسلالات النيماتودا المختبرة. تم في كل مرة قطع ثلاث نباتات من كل معاملة لتحديد نسب النفوق الناتجة عن الإصابة بسلالات النيماتودا الممرضة للحشرات المختبرة. وكانت يرقات الحشرة تشرح للتأكد من أن الإصابة كانت بالنيماتودا الممرضة للحشرات.

### التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام البرنامج SPSS 19.0 لمقارنة متوسطات نسبة النفوق للمعاملات المدروسة وفق اختبار دنكان للتفريق بين فعالية المعاملات عند مستوى احتمال 5% في الحقل و1% في

جدول 1. معدل نفوق يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta*) خارج الأوراق التي سببتها تراكيز مختلفة لثلاثة أنواع مختلفة من عزلات محلية للنيماطودا الممرضة للحشرات (عدد = 60).

**Table 1.** Mortality rates of *Tuta absoluta* (Meyrick) larvae outside the leaves caused by different concentrations of three local isolates of entomopathogenic nematodes (N=60)

نسبة النفوق (%) Mortality rate (%)			التركيز (طور معدي/يرقة) Inoculation rate (infective juveniles/larva)
Mean±SD (min-max)	(الحد الأدنى – الحد الأقصى)	متوسط±SD	
<i>H. bacteriophora</i> "VH11"	<i>H. bacteriophora</i> "DKH"	<i>S. carpocapsae</i> "RST"	
13.6±1.78 bD (11.13-14.84)	16.11±1.15 bD (14.28-17.26)	21.8±3.04 aC (17.21-27.53)	1
27.31±2.87 aD (21.56-30.18)	23.33±1.38 bCD (20.59-25.09)	27.53±1.98 aC (24.09-30.98)	2
54.19±7.99 aC (47.43-73.3)	28.81±4.75 bCD (20.58-37.68)	43.41±7.52 aBC (30.39-56.44)	5
56.24±7.30 aBC (43.68-68.99)	35.67±7.26 bBC (24.69-49.40)	66.57±5.79 aAB (60.78-78.15)	10
70.44±1.44 aABC (69.00-73.31)	38.41±1.37 bBC (26.59-51.30)	79.59±7.66 aA (60.49-91.17)	15
74.75±1.44 aABC (73.31-77.62)	53.51±8.57 bAB (49.3-69.97)	84.72±1.63 aA (82.60-86.72)	20
81.94±2.49 aAB (77.62-86.25)	59.0±1.37 bA (57.68-61.74)	86.42±0.53 aA (84.26-86.42)	25
86.25±2.49 aA (81.89-90.56)	67.23±2.48 bA (53.40-73.93)	90.00±0.55 aA (86.17-100.00)	40

القيم التي يتبعها أحرف صغيرة متشابهة في السطر الواحد لا يوجد بينها فروق معنوية بين العزلات المختلفة عند استخدام اختبار دنكان عند مستوى احتمال 1%. القيم التي يتبعها أحرف كبيرة متشابهة في العمود الواحد لا يوجد بينها فروق معنوية بين التراكيز المختلفة لنفس العزلة عند استخدام اختبار دنكان عند مستوى 1%. Means followed by the same small letters in the same row are not statistically different from each other based on Duncan's test (P=0.01). Means followed by the same capital letters in the same column not statistically different from between different concentration of the same isolate based on Duncan's test (P=0.01).

*H. bacteriophora*، 86.6% للنوع *S. carpocapsae* و100% للنوع *S. feltiae*

#### الجرعة نصف القاتلة لعزلات النيماطودا المحلية المدروسة

بينت الدراسة أن الجرعة نصف القاتلة LD<sub>50</sub> للعزلات المدروسة كانت 7.8 طور فعال/يرقة للعزلة RST، و18 طور فعال/يرقة للعزلة DKH و16 طور معدي/يرقة للعزلة VH11 (شكل 1).

تتوافق هذه النتائج مع ما نشره Lacey & Unruh (1998) اللذين درسا تأثير ثلاث أنواع من النيماطودا (*Steinernema riobrave*، *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora*) ضد يرقات دودة ثمار التفاح (*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)) ووجدوا بان النيماطودا *S. carpocapsae* كانت فعالة عند تركيز 10 طور معدي/يرقة وأدت إلى نسب نفوق في حدود 66-90%. تتشابه هذه النتائج مع ما ذكره Gözel & Kasap (2015) حيث توقفت النيماطودا *S. carpocapsae* مخبرياً على *H. bacteriophora*، كما تشابهت النتائج مع ما ذكره Chen et al. (2003)، من حيث أن زيادة التركيز أو الجرعة يزيد أيضاً من معدل الاختراق والنجاح في إحداث الإصابة للعائل، ولكن اختلفت الجرعة المثالية (25 طور معدي/يرقة<sup>2</sup>)، كما بين

تبين النتائج في جدول 1 عدم وجود فروق معنوية بالنسبة للعزلة RST التابعة للنوع *S. carpocapsae* عند استخدام التراكيز 40، 25، 20، 15 و10، وكذلك بين التركيزين 10 و5، والتركيزات 2 و1 عند مستوى احتمال 1%. بالنسبة للعزلة DKH التابعة للنوع *H. bacteriophora* كذلك يبين جدول 1 عدم وجود فروق معنوية بين التراكيز 40، 25، 20 وبين التركيزات 20، 15، 10 وبين التراكيز 15، 10، 5، 2 وبين التركيزين 2 و1 عند مستوى معنوية 1%. أما العزلة VH11 التابعة للنوع *H. bacteriophora* التي جاءت ثانية بفاعليتها في هذه الدراسة، فيبين الجدول 1 عدم وجود فروق معنوية بين التركيزات 40، 25، 20 و15، وبين التركيزات 25، 20، 15، 10 وبين التراكيز 20، 15، 10، 5، و2 وبين التركيزين 2 و1 عند مستوى معنوية 1%. تختلف النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة مع نتائج سابقة (Batalla-Carrera et al., 2010) لاختلاف العزلات عن عزلات هذه الدراسة، وبينوا أن معدل النفوق ليرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم على 25 طور معدي/يرقة<sup>2</sup> كانت 78.6% للنوع *H. bacteriophora*، 85.7% للنوع *S. carpocapsae* و100% للنوع *S. feltiae*، وعلى 50 طور معدي/يرقة<sup>2</sup>، 100% للنوع

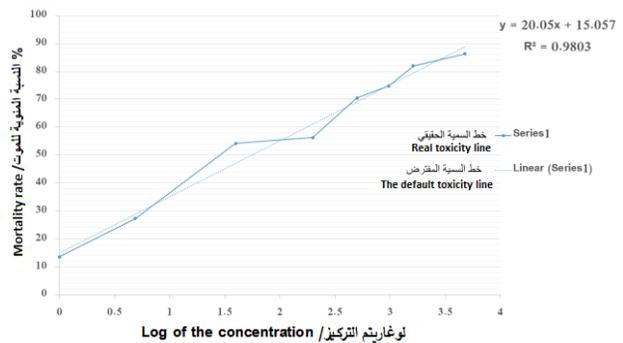
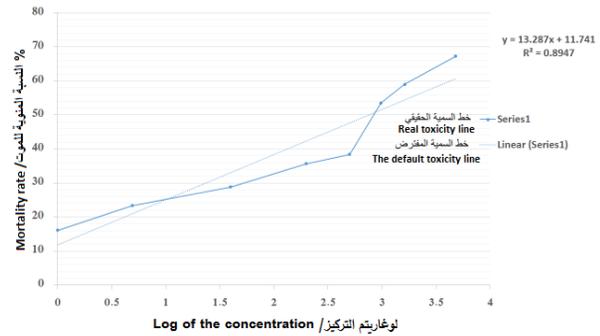
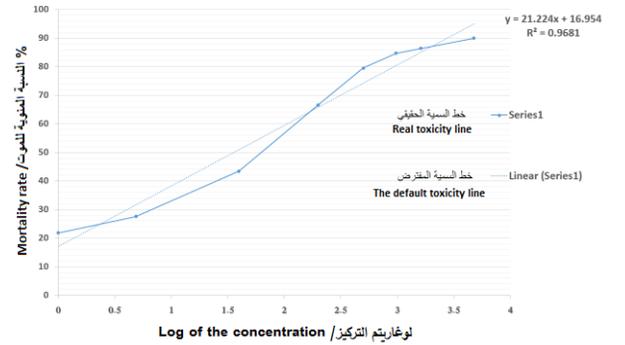
تم استخدام العزلة RST التابعة للنوع *S. carpocapsae* التي بينت الدراسة بأنها كانت الأفضل من بين العزلات المختلفة المختبرة، في التطفل على يرقات الآفة الموجودة داخل الأنفاق، ووصلت قيمة LD<sub>50</sub> لها إلى 15%. واختلفت هذه النتائج عن نتائج Türköz & Kaşkavalci (2016) اللذين أشارا إلى أن *S. feltiae* هي الأفضل من بين العزلات المخبرية، حيث بلغت قيمة LD<sub>50</sub> للتطفل على يرقات الحشرة داخل الأنفاق في المختبر 19%. كما تشابهت النتائج مع دراسة سابقة (Arthurs et al., 2004) من حيث أن معدل نفوق يرقات الحافرة الموجودة داخل الأنفاق والمعاملة بالنيماطودا منخفضة. وقد يكون السبب الرئيسي في انخفاض نسبة النفوق هو جفاف الطور المعدي للنيماطودا الممرضة للحشرات (IJs). وقد يساعد إضافة مضاد للجفاف على زيادة فعالية النيماطودا في مكافحة اليرقات داخل الأنفاق. تم استخدام العزلة نفسها في دراسة الفعالية على العذارى، وكانت نسبة النفوق منخفضة لم تتجاوز 5.5%، وهذا يتوافق مع ما نشر سابقاً (Türköz & Kaşkavalci, 2016؛ Garcia-del-Pino et al., 2013) بعدم وجود نفوق لعذارى الحشرة المعاملة بالنيماطودا الممرضة للحشرات.

### النتائج الحقلية

تراوحت فعالية عزلات النيماطودا الممرضة للحشرات المختبرة في الحقل بين 0 و 80.7%، وكانت أقل نسبة مئوية للنفوق بعد اليوم الثالث من المعاملة، وأعلى نسبة بعد اليوم 15 من المعاملة. بالنسبة لموعد معاملة يرقات حافرة أوراق البندورة بالنيماطودا الممرضة، كان أقل نسبة مئوية للنفوق في اليوم السابع من المعاملة، وأكثر نسبة في اليوم 21 من المعاملة. كانت العزلة RST من النوع *S. carpocapsae* الأقل فاعلية بين العزلات المختبرة، وأكثرها فعالية العزلة DKH للنوع *H. bacteriophora* بمعدل نفوق  $1.5 \pm 34.97\%$  و  $1.5 \pm 80.75\%$ ، على التوالي (جدول 2). سببت العزلة RST من النوع *S. carpocapsae* نسبة نفوق بلغت 68.88% وكانت العزلة الأقل فاعلية، أما العزلة VH11 من النوع *H. bacteriophora* فقد سببت نسب نفوق 72.07% وكانت هي العزلة الثانية في الترتيب من حيث الفعالية، بينما لم تتجاوز نسبة النفوق 10% في الشاهد، وكان الفارق معنوي بين الشاهد والمعاملات الأخرى.

توضح النتائج المبينة في جدول 2 اختلاف التفاوت في القدرة الإراضية بين العزلات المدروسة وحتى بين أنواع النوع الواحد، وهذا يتعلق بمقدرة النيماطودا على اختراق جسم الحشرة. كما تأثر معدل القتل بأعداد النيماطودا التي تخترق بنجاح الأنفاق وتصل لليرقة، وهذا يتوافق مع دراسة سابقة (Morley et al., 2010). كما ذكر Caroli et al.

Ngugi et al. (2018) أن انخفاض معدل النفوق قد يكون بسبب اكتظاظ النيماطودا الممرضة للحشرات في طبق البتري والتي سببت زيادة المنافسة بين النيماطودا على الدخول إلى داخل جسم العائل، مما أدى إلى نفوق أعداد من النيماطودا الممرضة للحشرات وبالتالي كانت عدوى العائل بالنيماطودا منخفضة.



شكل 1. العلاقة بين لوغاريتم التركيز ونسبة نفوق يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم المعاملة بالعزلة RST للنوع *S. carpocapsae* (A)، العزلة DKH للنوع *H. bacteriophora* (B)، والعزلة بالعزلة VH11 للنوع *H. bacteriophora* (C).

**Figure 2.** The relationship between log dose and mortality rate of larvae on tomato leaves treated with the isolate RST of the species *S. carpocapsae* (A), isolate DKH of *H. bacteriophora* (B), and isolate VH11 of *H. bacteriophora* (C).

استخدام العزلة DKH بعد 7، 14 و 21 يوماً من إطلاق الحافرة وبعد 5، 7، 9، 11، 13 و 15 يوماً للعزلة VH11 بعد 7 ايام من إطلاق الأفراد الكاملة للحشرة، وبعد 21 يوماً من إطلاق الأفراد الكاملة للحشرة للعزلة VH11 بعد المعاملة في اليوم 11 من المعاملة وبقية المعاملات. تشابهت نتائج هذه الدراسة مع ما نشر سابقاً (Gözel *et al.*, 2014) لاختبار بعض العزلات المحلية من النيماطودا الممرضة للحشرات حيث اختلفت فعالية العزلات المحلية المختبرة باختلاف العزلة، وكانت العزلة *S. feltiae* (عزلة 879) هي العزلة الأكثر فعالية على يرقات الحشرة ووصلت النسبة المئوية للنفوق إلى 90.7% خلال موسم 2012 و 94.3% خلال موسم 2013، وكانت أقل العزلات فعالية هي *S. affine* (عزلة 46) وتراوحت نسب النفوق بين 39.3% خلال موسم 2012 و 43.7% خلال موسم 2013. اختلفت هذه النتائج مع نتائج سابقة (Morley *et al.*, 2010) الذين أشاروا إلى أن نسبة النفوق ليرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم المعاملة بالنيماطودا *S. carpocapsae* وصلت إلى 100%، بينما كانت في هذه الدراسة 68.88%.

(1996) أن نسبة اختراق الطور المعدي ليرقة الحشرة يعتمد على نوع النيماطودا والعائل والوسط المحيط. بينت النتائج أيضاً أن فعالية وكفاءة جميع العزلات المدروسة كانت الأعلى عندما تمت المعاملة بعزلات النيماطودا المحلية المختلفة في اليوم 21 من إطلاق الأفراد الكاملة للحشرة، تلاها المعاملة في اليوم 14، وأخيراً المعاملة في اليوم السابع، كما تشابهت النتائج مع ما نشر سابقاً (Gözel & Kasap, 2015). أشار Batalla-Carrera *et al.* (2010) أنه في البيوت البلاستيكية وصلت نسبة نفوق يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم إلى 78.6-100%، كما وجدوا بأن الأنفاق التي تصنع من قبل يرقات الحشرة تؤمن حماية جيدة للنيماطودا وتجنبها التعرض للظروف غير الملائمة كالجفاف والأشعة فوق البنفسجية، كما أن للنيماطودا القدرة على قتل يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم ضمن الأنفاق، كما ذكروا بأن المعاملة بالنيماطودا خفضت من نسبة إصابة نباتات البندورة بنسبة 87-95%. أظهرت نتائج هذه الدراسة إنخفاض فعالية العزلات الثلاثة في اليوم الثالث بعد المعاملة، وعلى العكس من ذلك أثبتت النتائج فعالية عالية لعزلات النيماطودا بعد اليوم 15 من المعاملة. أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بعد 3، 5، 7، 9، 11، 13 و 15 يوم من المعاملة في نسب نفوق اليرقات عند

جدول 2. نسب النفوق المئوية ليرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta*) المعاملة بعزلات محلية مختلفة من النيماطودا الممرضة للحشرات في حقل بندورة/الطماطم في محافظة الحسكة بعد إطلاق الحشرة الكاملة لحافرة أوراق البندورة بـ 7، 14 و 21 يوم.

**Table 2.** Mortality rates of tomato leaf miner *Tuta absoluta* larvae treated with local isolates of entomopathogenic nematode in Al-Hasakah Governorate, 7, 14 and 21 days after the release of the tomato leaf miner adults.

<i>S. carpocapsae</i> "RST"			<i>H. bactriophora</i> "VH11"			<i>H. bacteriophora</i> "DKH"			الفترة بعد المعاملة بالنيماطودا المتطفلة (يوم)
21 يوم 21 days	14 يوم 14 days	7 أيام 7 days	21 يوم 21 days	14 يوم 14 days	7 أيام 7 days	21 يوم 21 days	14 يوم 14 days	7 أيام 7 days	Period after treatment with entomopathogenic nematode (day)
15.39±2.10 aD	14.23±1.20 aC	0.00±0.00 cD	29.36±1.40 aD	13.97±1.30 bD	0.00±0.00 cE	51.9±2.04 aD	37.8±1.30 aD	15.40±2.10 bD	3
18.95±2.00 aCD	17.53±2.30 aC	8.27±0.70 bCD	34.08±1.50 aCD	29.34±2.60 aCD	20.73±1.20 bD	58.45 ±1.06 aCD	48.31±1.8 aCD	18.90±2.40 bD	5
19.84±1.60 aCD	18.95±1.90 aBC	9.79±1.40 bCD	39.77±1.60 aCD	29.98±2.60 bCD	25.5±1.90 bCD	62.55 ±2.80 aBC	59.34± 2.03 aBC	19.84±1.80 bD	7
26.43±2.30 aBC	26.07±1.70 aBC	14.5±2.10 bBCD	46.53±2.40 aBC	36.48±2.50 bBC	31.14±2.50 bBCD	69.78 ±3.50 aB	69.13±2.30 aAB	26.43±2.00 bCD	9
32.30±3.20 aAB	28.45±1.70 aC	18.42±2.30 bBC	57.20±2.60 aAB	42.97±2.60 bBC	39.41±2.40 bBC	72.47 ±3.50 aAB	72.33±3.90 aAB	44.22±2.50 bBC	11
36.48±2.10 aA	34.70±2.10 aB	24.90±2.40 bAB	63.44±2.90 aA	47.78±4.30 bB	45.38±3.30 bAB	76.52±2.90 aAB	75.36±1.80 aA	53.11±2.60 bAB	13
68.88±1.50 aA	63.74±2.00 aA	33.50±2.50 bA	72.07±3.20 aA	65.57±2.50 bA	57.48±2.20 cA	80.7±1.50 aA	76.68±4.50 abA	64.33±2.40 bA	15

القيم التي يتبعها أحرف صغيرة متشابهة في السطر الواحد لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%. القيم التي يتبعها أحرف كبيرة متشابهة في العمود الواحد لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

Values followed by similar small letters in the same row are not significantly different at P=0.05.

Values followed by similar capital letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

درجات الحرارة الباردة، بينما يفضل الجنس *Heterorhabditis* درجات الحرارة الدافئة والمرتفعة (Grewal et al., 1994). هنالك عدة أسباب حول سبب ارتفاع معدلات النفوق في الأعمار الكبيرة لحافرة أوراق البندورة مقارنة مع الأعمار الأصغر، قد يكون من أحد هذه الأسباب حجم المضيف، حيث أشار Van Damme et al. (2016) أن الأنفاق التي صنعت من قبل العمر اليرقي الأول للآفة في قطع من أوراق البندورة التي قطرها 3 سم قد تكون أكثر صعوبة على النيماتودا لإختراقها مقارنة مع الأنفاق التي تصنعها الأعمار اليرقية الثالثة أو الرابعة. وهنا يمكن إضافة فرضيتين إضافيتين لارتفاع معدلات النفوق لدى اليرقات كبيرة الحجم: (أ) كلما كبر حجم اليرقة كلما زاد حجم الفتحات الطبيعية للعائل بالتالي يسهل دخول النيماتودا الممرضة للحشرات إلى داخل جسم اليرقة (Griffin et al., 2005)، (ب) قد يعود سبب زيادة حساسية اليرقات الكبيرة بالعمر عن اليرقات الصغيرة إلى الإشارات الجاذبة للأطوار المعدية مثل غاز ثاني أكسيد الكربون (CO<sub>2</sub>)، إلى جانب الإشارات الكيميائية (Turlings et al., 2012).

كما أشارت دراسات سابقة (Glazer et al., 1992) بأن التأثير الأكبر لسلاسل النيماتودا المتطفلة قد تكون ناتجة من تضافر عدة عوامل منها: معدل سرعة اختراق العائل الحشري، معدل تكاثر أكبر للنيماتودا بالإضافة إلى سرعة تكاثر البكتريا التعايشية وجميع هذه العوامل تتأثر بدرجة الحرارة. كما أن بقاء النيماتودا فعالة يعتمد بشكل واضح على نسبة الرطوبة الجوية (De Waal, 2011). وفي دراسة أخرى (Gözel et al., 2014) لاختبار فعالية النيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة يرقات حافرة أوراق البندورة *T. absoluta* في ظروف الحقل بلغت النسبة المئوية لقتل اليرقات 85.5% للنوع *H. bacteriophora*، 41.2% للنوع *S. affine*، و47.4% للنوع *S. carpocapsae* و95.6% للنوع *S. Feltiae*. تتوافق هذه النتائج مع أبحاث أخرى (Georgis & Gaugler, 1991) التي أشارت إلى أن الفعالية العالية في الاختبارات المخبرية قد يرافقه انخفاض الفعالية في الحقل. وقد يعود هذا الانخفاض إلى تأثير درجة الحرارة في فعالية النيماتودا (Molyneux, 1986)، حيث يفضل الجنس *Steinernema*

## Abstract

**Darwish, A., A. Bashir and K. El-Asas. 2020. 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, 38(4): 318-326.**

The efficacy of the infective juveniles (IJs) of two different local isolates (VH11, DKH) of the entomopathogenic nematode (EPN) *Heterorhabditis bacteriophora*, and a local isolate (RST) of *Steinernema carpocapsae* was investigated against the larvae and pupae of tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory and field conditions during the 2018 growing season. These isolates were obtained from the Biological Control Research and Studies Center, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria. Larvae of *T. absoluta* were collected from an infested tomato field in the village of Karhasar in Amouda subdistrict, Al-Hasaka governorate, Syria, and mass produced on tomato plants in a climate-controlled room. The tomato leaf miners were exposed to each nematode species at the rate of 50 IJs/cm<sup>2</sup> on tomato plants in cages. *T. absoluta* was susceptible to all EPNs tested but with different degrees of susceptibility of the larvae to EPNs infection, based on the isolate used. The most effective isolate on *T. absoluta* larvae was isolate DKH, leading to 80.75% mortality, whereas the least effective was isolate RST, leading to 68.88% mortality. Under laboratory conditions, the EPNs were applied at different inoculation rates (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 and 40 IJs per larva) to the 4<sup>th</sup> instar larvae of *T. absoluta*. The mortality rates produced by the isolates RST, DKH and VH11 were in the range 21.8-90, 16.11-67.23 and 13.6-86.25%, respectively. The LD<sub>50</sub> values for the three isolates RST, DKH and VH11 were 7.8, 18 and 16 IJs per larva, respectively. Based on the results obtained, the isolate RST was the most efficient nematode species, and can be applied against the larvae of *T. absoluta* inside the mines and against pupae. However, the isolate RST caused a low mortality rate of larvae inside the mines (15%) and the pupae (5.5%).

**Keywords:** *Tuta absoluta*, entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, biological control, natural enemies.

**Corresponding author:** Abdelnabi Bashir, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, Email: basherofeckey11@gmail.com

## References

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.  
<https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Arthurs, S., Heinz, K.M and J.R. Prasfika. 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. Bulletin of Entomological Research 94: 297-306.  
<https://doi.org/10.1079/BER2003309>

- المراجع**
- Batalla-Carrera, L., A. Morton and F. García-del-Pino. 2010. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leaf miner *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. BioControl, 55: 523-530. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9284-z>
- Caroli, L., I. Glazer and R. Gaugler. 1996. Entomopathogenic nematodes infectivity assay: Multivariable comparison of penetration into different hosts. Biocontrol Science and Technology, 6: 227-234. <https://doi.org/10.1080/09583159650039412>

- Chen, S., X.Y. Han and M. Moens.** 2003. Biological control of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) with entomopathogenic nematodes. *Applied Entomology and Zoology*, 38: 441-448. <https://doi.org/10.1303/aez.2003.441>
- De Waal, J.Y.** 2011. Biological and ecological factors contributing to the successful use of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) under South African conditions. PhD Thesis Department of Conservation Ecology and Entomology, Stellenbosch University, South Africa. 126 pp.
- Desneux, N., E. Wajnberg, K.A.G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C.A. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D.C. Ruescas, E. Tabone and J. Frandon.** 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83: 197-215. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0321-6>
- Garcia-del-Pino, F., X. Alabern and A. Morton.** 2013. Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. *BioControl*, 58: 723-731. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9525-z>
- Georgis, R. and R. Gaugler.** 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 84: 713-720. <https://doi.org/10.1093/jee/84.3.713>
- Glazer, I., M. Klein, A. Navon and Y. Nakache.** 1992. Comparison of efficacy of entomopathogenic nematodes combined with antidesiccants applied by canopy sprays against three cotton pests (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 85: 1636-1641. <https://doi.org/10.1093/jee/85.5.1636>
- Gözel, Ç. and I. Kasap.** 2015. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato field. *Turkish Journal of Entomology*, 39: 229-237. <https://doi.org/10.16970/te.84972>
- Gözel, Ç., U. Gözel and İ. Kasap.** 2014. Domates güvesi *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)'nin mücadelesinde entomopatogen nematodların kullanım olanakları, 319". *Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, XMAT Matbaa*. 417 pp. <https://doi.org/10.16970/te.84972>
- Grewal, P.S., E.E. Lewis, R. Gaugler and J.F. Campbell.** 1994. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108: 207-215. <https://doi.org/10.1017/S003118200006830X>
- Griffin, C.T., N.E. Boemare and E.E. Lewis.** 2005. Biology and behaviour. Pages 47-64. In: *Nematodes as Biocontrol Agents*. P.S. Grewal, R.-U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan (eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK. 528 pp. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8_13)
- Hatim, N.** 2010. Final report of the consultancy mission on the tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) in Syria Arab Republic. FAO. 13 pp.
- Kaya, H.K. and S.P. Stock.** 1997. Techniques in insect nematology. Pages 281-324. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. L.A. Lacey (ed.). Academic Press, London, UK. 409 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6>
- Lacey, L.A. and T.R. Unruh.** 1998. Entomopathogenic nematodes for control of codling moth effect of nematode species, dosage, temperature and humidity under laboratory and simulated field conditions. *Biological Control*, 13: 190-197.
- Molyneux, A.S.** 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp.: temperature, and aspects of behaviour and infectivity. *Experimental Parasitology*, 62: 169-180. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90021-4)
- Morley, P., R. Jacobson and P. Challinor.** 2010. Organic tomato Phase of contingency plans for the control of *Tuta absoluta* and *Nesidiocoris tenuis*. Final report of the project at Hortiilha Cilha Queimada Alcochete Portugal Wight Salads Group, Arreton Isle of Wight PO30 3AR RJC Ltd Bramham W Yorks LS23 6TH. 48 pp.
- Ngugi, C.N., J.N. Mbaka, P.M. Wachira and S. Okoth.** 2018. Laboratory screening for infectivity of selected indigenous entomopathogenic nematode isolates on *Tuta absoluta* in Kenya. *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*, 3: 10-25.
- Potting, R.P.J., D.J. van der Gaag, A. Loomans, M. van der Straten, H. Anderson, A. MacLeod, J.M.G. Castrillón and G.V. Cambra.** 2013. *Tuta absoluta*, tomato leaf miner moth or South American tomato moth. Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality, Plant Protection Service of the Netherlands. 28 pp.
- Retta, A.N. and D.H. Berhe.** 2015. Tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick): a devastating pest of tomatoes in the highlands of Northern Ethiopia, call for attention and action. *Research Journal of Agriculture and Environmental Management*, 4: 264-269.
- Roditakis, E., E. Vasakis, M. Grispou, R. Nauen and M. Gravouil.** 2015. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticide. *Journal of Pest Science*, 88: 9-16. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0643-5>
- Türköz, S. and G. Kaşkavalci.** 2016. Determination of the efficacy of some entomopathogenic nematodes against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory conditions. *Turkish Journal of Entomology*, 40: 175-183. <https://doi.org/10.16970/te.92606>
- Turlings, T.C.J., I. Hiltbold and S. Rasmann.** 2012. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant and Soil*, 358: 51-60. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1295-3>

**Van Damme, V.M.B., K.E.G. Beck, E. Berckmoes, R. Moerkens, L. Wittemans, R.De Vis, D. Nuyttens, H.F. Casteels, M. Maes, L. Tirry and P.De Clercq.** 2016. Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. *Pest Management Science*, 72: 1702-1709.

<https://doi.org/10.1002/ps.4195>

**Vargas, C.H.** 1970. Observations on the bionomics and natural enemies of the tomato moth *Gnorimoschema*

*absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae). *Idesia*, 1: 75-110.

**Youssef, A.M, I.M.A. Ebadah, A.S. Abd-Elrazek and T.E. Abd-Elwahab.** 2015. Population fluctuation of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) during winter and summer plantations in Egypt. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6: 647-652.

Received: February 21, 2019; Accepted: November 20, 2020

تاريخ الاستلام: 2019/2/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/11/20