گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره۱، بهار ۱٤۰۱

doi 10.22055/ppr.2022.17374

بررسی ویژگی‌های کمی و کیفی فرمولاسیون مبتنی بر آلژینات جدایه‌ی بومی نماتد بیمارگر حشرات *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae)

لاله ابراهیمی[1*]

۱- *نویسنده مسوول: استادیار بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران (Ebrahimi.laleh@gmail.com).

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۵

چکیده

جدایه‌ی بومی *Steinernema carpocapsae* با رس‌شمار MF187616 در پایگاه NCBI (مرکز بین‌المللی اطلاعات بیوتکنولوژی) که از منطقه‌ی مغان جداسازی شده است، به‌دلیل برخورداری از پتانسیل بالای بیماری‌زایی و تحمل محیطی در بررسی‌های آزمایشگاهی، برای فرمولاسیون مبتنی بر آلژینات مورد استفاده قرار گرفت. ویژگی‌های فرمولاسیون، درصد زنده‌مانی نماتدها در داخل فرمولاسیون، میزان آب خارج شده از کپسول‌ها و بیماری‌زایی نماتدهای فرموله شده روی لاروهای *Galleria mellonella* به عنوان میزبان آزمایشگاهی در فواصل زمانی چهار تا ۹۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، بهترین غلظت آلژینات سدیم و کلرید کلسیم به‌ترتیب دو درصد و نیم درصد بود که برای ادامه کار انتخاب شدند. قطر کپسول‌های تشکیل شده در دامنه‌ی ۳/۵ تا ٤/٥ میلی‌متر قرار داشت. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به‌میزان آب خروجی از کپسول و زنده‌مانی لاروهای آلوده‌کننده‌ی نماتد در داخل کپسول بیانگر تفاوتی معنی‌دار بین نقاط زمانی مختلف بود ($P \leq 0.01$). در نقاط زمانی چهار تا ۹۰ روز پس از فرمولاسیون، نماتدهای فرموله شده درصد بقای بیشتری نسبت به نماتدهای فرموله نشده (در سوسپانسیون آبی) نشان دادند ($P \leq 0.01$). نتایج تجزیه واریانس زیست‌سنجی فرمولاسیون آلژینات جدایه بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین نقاط مختلف زمانی در درصد مرگ‌ومیر *G. mellonella* بود ($P \leq 0.01$). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده‌ی پتانسیل بالای جدایه‌ی بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 برای فرمولاسیون آلژینات سدیم بود. فرموله کردن موفقیت‌آمیز یک نماتد عامل کنترل بیولوژیک به منظور افزایش مدت زمان نگهداری بدون یخچال نیز از نتایج این پژوهش است که می‌تواند مبنای بررسی‌های بعدی با هدف تجاری‌سازی این جدایه باشد.

***کلیدواژه‌ها:* فرمولاسیون آزاد شونده تدریجی، آلژینات سدیم، فرمولاسیون نگهداری، کنترل بیولوژیک**

دبیر تخصصی: دکتر صدیقه عظیمی

Citation: Ebrahimi, L. (2022). Quantitative and qualitative characteristics of alginate-based formulation of a native isolate of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(1), 83-95. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17374.

مقدمه

نماتدهای بیمارگر حشرات متعلق به خانواده‌های Heterorhabditidae و Steinernematidae، انگل‌های اجباری حشرات و برخی بندپایان دیگر هستند که با کمک باکتری هم‌زیست‌شان باعث مرگ میزبان‌های خود می‌شوند (Grewal 2002; Koppenhöfer et al., 2020). این نماتدها عوامل ارزشمند کنترل زیستی آفات هستند که علیه آفات حشره‌ای بی‌شماری در بسیاری از محیط‌ها موثر و کارآمد بوده‌اند. نماتدهایی که به صورت انبوه تولید شده‌اند، در بازارهای جهانی جایگاه مطلوبی را به‌عنوان عوامل کنترل زیستی آفات کسب نموده‌اند (Grewal 2002; Shapiro- Ilan et al., 2002; Koppenhöfer et al., 2020). برخلاف قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر حشرات که به صورت اسپورهای قارچی یا باکتریایی یا پروتئین‌های حشره‌کش فرموله و توزیع می‌گردند، مرحله زیستی که در نماتدهای بیمارگر حشرات فرموله می‌شود، لاروهای سن سوم نماتد با متابولیسم فعال است. در این مرحله‌ی زیستی، نماتدها تغذیه‌ای انجام نمی‌دهد اما انرژی مورد نیاز برای حرکت و فعالیت خود را از چربی و کربوهیدرات‌های ذخیره شده تأمین می‌نماید. این لاروها برای زنده ماندن به رطوبت بالا و اکسیژن نیاز دارند. نماتدهای بیمارگر حشرات نباید منجمد شوند و اغلب گونه‌ها تحمل دمای بالای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد را ندارند. از طرف دیگر، فعالیت این لاروها باعث تولید حرارت می‌گردد که در فضای محدود باعث بروز مشکل می‌شود (Peters, 2016; Koppenhöfer et al., 2020). به‌همین منظور و برای جلوگیری از آلوده شدن توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها و یا پروتوزوآها، این نماتدها اغلب در یخچال نگهداری می‌شوند (Ramakuwela et al., 2015). گرچه تمام اصول فرموله کردن نماتدها مشابه با فرموله کردن آفت‌کش‌های تجاری مختلف از جمله آفت‌کش‌های میکروبی می‌باشد، اما نماتدها چالش‌های منحصر به فردی ایجاد می‌نمایند. نیاز به اکسیژن و رطوبت بالا، حساسیت به حدود بالای دمایی و رفتار لاروهای آلوده‌کننده، انتخاب روش فرموله‌کردن و مواد مورد استفاده را محدود می نماید. اهداف اصلی توسعه‌ی فرمولاسیون‌های نماتدها شامل حفظ کیفیت، افزایش پایداری انبارداری، بهبود سهولت انتقال و استفاده، کاهش هزینه های انتقال و افزایش بقای نماتد طی مصرف نماتد و بعد از آن است (Georgis & Kaya 1998; Peters 2016)

فرمولاسیون‌های مختلفی به منظور کاهش تحرک نماتدها چه از طریق به دام انداختن فیزیکی و چه از طریق بازدارنده‌های متابولیکی، توسعه یافته‌اند. کپسول‌های آزاد شونده تدریجی یکی از فرمولاسیون‌های کاربردی نماتدهای بیمارگر حشرات هستند (Kim et al., 2015). آلژینات در سال‌های اخیر به عنوان امیدبخش‌ترین پلیمر زیستی در فرموله کردن سلول‌های زنده و میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است (Navon et al., 1998; Hoffman, 2012). آلژینات‌ها در اصل پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای *Laminaria* spp. هستند که در تماس با یون کلسیم پلیمریزه می‌شوند. فرایند پلیمریزاسیون آلژینات در مجاورت یون کلسیم منجر به تشکیل یک پوسته یا غلاف کروی‌شکل می‌گردد که یک هسته مایع را احاطه کرده است (Hiltpold et al., 2012; Vemmer & Patel 2013; Peters 2016). کپسول‌های آلژینات به‌دلیل سازگاری با محیط زیست و تجزیه‌پذیری زیستی، پتانسیل بالایی را برای استفاده به عنوان حامل مواد موثر کشاورزی و داروسازی دارا هستند (Kim et al., 2015). امکان رهاسازی تدریجی نماتدها ازکپسول‌های آلژینات در داخل خاک وجود دارد و این یک ویژگی کلیدی در فرمولاسبون نماتدهای بیمارگر حشرات است (Kim et al., 2015; Peters 2016; Kim et al., 2021). انکپسوله کردن نماتدها در بسترهای ژل آلژینات کلسیم برای

اولین بار توسط Kaya and Nelsen (1985) به منظور استفاده از آنها به عنوان طعمه یا برای کاربرد در خاک گزارش گردید. اخیرا نیز جنبه‌های مختلف این فرمولاسیون، مانند غلظت مواد مورد استفاده در فرمولاسیون، تعداد نماتد قابل حمل در هر کپسول، تعداد نماتدی که طی دوره نگهداری از فرمولاسیون فرار می‌کنند، ویژگی‌های ظاهری کپسول‌ها و استحکام آن‌ها و همچنین میزان زنده‌مانی و پایداری هر گونه یا جدایه نماتد در هر فرمولاسیون مورد توجه و ارزیابی قرار گرفته است (Chen & Glazer 2005; Hussein & Aty-Abdel 2012; Kim et al., 2015; Ruiz-Vega et al., 2019; Kagimu & Malan 2019; Kim et al., 2021). با توجه به نتایج تحقیقات علمی، جدایه‌های بومی هر منطقه به علت سازگاری اکولوژیکی بالا، تاثیر بیشتری نسبت به جدایه‌های غیربومی و خارجی دارند (Millar & Barbercheck 2001). بررسی خاک ایران از نظر پتانسیل حضور نماتدهای بیمارگر حشرات اولین قدم برای آغاز مطالعه و کاربردی کردن این نماتدها است. با توجه به این که پیش از این، نماتدهای بیمارگر حشرات به صورت فرآورده‌های بیولوژیک فرموله شده از خارج وارد کشور شده و در اختیار مصرف‌کننده قرار می‌گرفت، فرموله کردن این نماتدها به‌عنوان گامی در جهت تجاری‌سازی سویه‌های کارامد بومی، گامی ارزشمند در جهت قطع یا کاهش واردات این محصول و صرفه‌جویی اقتصادی خواهد بود. جدایه‌ی بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 در ارزیابی‌های اولیه، قدرت بیماری‌زایی و تحمل محیطی قابل قبولی را در بین جدایه‌های مورد بررسی نشان داده است (Ebrahimi et al., 2019). از طرف دیگر، فرمولاسیون آلژینات به دلیل قابل دسترس بودن مواد اولیه، آب‌دوست بودن و سازگاری با محیط زیست، در فرمولاسیون نماتدهای بیمارگر حشرات مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، پژوهشی با هدف بررسی امکان فرموله‌کردن جدایه بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 در فرمولاسیون آلژینات به منظور افزایش نیمه عمر فرمولاسیون انجام شد که بخشی از نتایج در اینجا ارائه می‌گردد.

مواد و روش‌ها

پرورش شب پره مومخوار بزرگ *Galleria mellonella* L.

کلنی حشره شب‌پره مومخوار بزرگ برای جداسازی نماتدهای بیمارگر حشرات از نمونه‌های خاک و تکثیر آن‌ها در آزمایشگاه مورد نیاز بود. جهت پرورش شب‌پره مومخوار بزرگ از غذای مصنوعی با ترکیب ۱۲۰۰ گرم آرد، ۳۰۰ گرم مخمر، ۱۲۰ گرم موم خالص ریز شده، ۶۰۰ گرم عسل و ۵۰۰ میلی‌لیتر گلیسیرین استفاده شد (Ebrahimi et al., 2011). پرورش حشره در ظروف پلاستیکی مستطیلی به ابعاد ۳/۶×۱۴/۳×۱۹/۳ سانتی‌متر که درپوش آن با تور سیمی پوشانده شده بود، انجام گرفت. شرایط پرورش شامل دمای ۲۶±۳°C، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵۰±۵ درصد بود. تکثیر و جمع‌آوری نماتدها به روش White (1927) انجام شد.

جدایه نماتد

در این مطالعه از گونه‌ی *S. carpocapsae* IRMoghan1 استفاده شد. این جدایه پیش از این، از منطقه مغان جداسازی و شناسایی شده بود. توالی ژن ITS rDNA در پایگاه داده NCBI (مرکز بین‌المللی اطلاعات بیوتکنولوژی) با شماره دستیابی MF187616 ثبت شده بود (Ebrahimi et al., 2019b).

انتخاب غلظت مناسب آلژینات سدیم و کلرید کلسیم برای تشکیل کپسول

به منظور انتخاب بهترین و در عین حال مقرون به صرفه‌ترین ترکیب تشکیل کپسول، غلظت‌های نیم، یک، دو و سه درصد آلژینات با غلظت‌های نیم، یک و دو درصد محلول کلرید کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفت و براساس کیفیت کپسول

حاصل (از نظر میزان آب‌دهی و کیفیت سفت و نرم بودن)، ترکیب نهایی کپسول انتخاب گردید (Kim et al., 2021).

برای تشکیل کپسول‌های آلژینات سدیم حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات ابتدا سوسپانسیون نماتد به غلظت ۸۰۰۰ لارو آلوده‌کننده نماتد در هر میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. برای تهیه غلظت ویا شمارش نماتدهای بیمارگر حشرات، سوسپانسیون نماتد کاملا به هم زده شد و قبل از ته نشین شدن نماتدها، سه تا پنج نمونه از سوسپانسیون با حجم مشخصی برداشته شد. تعداد نماتدهای موجود در هر نمونه به صورت جداگانه زیر بینوکولر شمارش شدند و تعداد نماتد در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون محاسبه گردید (Ebrahimi, 2021). محلول ۲۰ میلی‌لیتری شامل آلژینات سدیم (نیم، یک، دو و سه درصد)،گلیسرین ۱۸ درصد و فرمالین ۰/۰۷۵ درصد تهیه شد. در ادامه، محلول ۵۰ میلی‌لیتری حاوی کلرید کلسیم (نیم، یک و دو درصد)، گلیسرین ۱۸ درصد و فرمالین ۰/۰۷۵ درصد تهیه گردید. سپس، سوسپانسیون حاوی نماتد (به حجم یک میلی‌لیتر) و محلول آلژینات سدیم (به حجم ۱۹ میلی‌لیتر) به خوبی همزده شد و با کمک سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری با قطر دهانه دو میلی‌متری سترون شده به داخل محلول کلرید کلسیم در حال تکان داده شدن افزوده شد. تکان دادن مخلوط واکنش به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت تا فرایند تشکیل کپسول تکمیل گردد. پس از ۲۰ دقیقه، کپسول‌ها از مخلوط واکنش جدا شده و به صورت جداگانه داخل میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری قرار داده شده و به منظور جلوگیری از خروج رطوبت و خشک شدن کپسول‌ها، درب آنها با پارافیلم پوشانده شد. میکروتیوب‌های حاوی کپسول‌ها در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Ruiz-Vega et al., 2018).

ارزیابی ویژگی‌ها و پایداری فرمولاسیون

ویژگی‌های فرمولاسیون از جمله قطر کپسول‌ها، میزان آب خروجی و تعداد نماتد خارج شده از کپسول طی فواصل زمانی مختلف پس از فرمولاسیون ثبت گردید. به منظور ارزیابی پایداری فرمولاسیون نیز درصد زنده‌مانی نماتدها در داخل فرمولاسیون، در فواصل زمانی مختلف شامل صفر، چهار، هفت، ۱۴، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از فرموله کردن بررسی و ثبت شد. با توجه به این که در هر کپسول به طور متوسط ۴۰۰ تا ۴۵۰ نماتد وجود داشت، از سوسپانسیون نماتد به غلظت حدود ۴۰۰ لارو آلوده کننده در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد و درصد مرگ‌ومیر نماتدها در فواصل زمانی مختلف ثبت گردید. شاهد نیز مانند فرمولاسیون در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای شمارش نماتدهایی که از فرمولاسیون خارج شده بودند، در بازه‌های زمانی ذکر شده، کپسول‌ها با کمک یک سوزن سرنگ انسولین از داخل میکروتیوب خارج شد و آب باقی مانده در داخل میکروتیوب با کمک میکروپیپت خارج و حجم آن اندازه‌گیری شد. سپس نماتدهای موجود در این آب شمارش گردید. جهت اطمینان، ۱۰۰ میکرو لیتر آب به میکروتیوب اضافه شد و سپس این آب به داخل پتری کوچکی منتقل شد و نماتدهای احتمالی موجود در آن شمارش شدند. سطح کپسول نیز در۱۰۰ میکرو لیتر آب به داخل پتری کوچکی شسته شد و نماتدهای احتمالی شمارش شدند. برای شمارش نماتدهای مرده و زنده داخل کپسول ابتدا کپسول داخل ۲۰۰ میکرولیتر آب قرار داده شد و زیر بینوکولر با کمک دو سوزن سرنگ انسولین به آرامی شکافته شد و پنج دقیقه اجازه داده شد که نماتدها به داخل آب مهاجرت کنند. سپس نماتدهای داخل آب شمارش شدند. باقی مانده کپسول به ظرف دیگر حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب منتقل شد و نماتدهای موجود در آن به دقت شمارش شدند. در هر نقطه زمانی پنج کپسول مورد ارزیابی قرار گرفت و این بررسی دو بار تکرار شد. یعنی هر داده، میانگین داده حاصل از ۱۰ عدد کپسول است (Ruiz-Vega et al., 2018; Kagimu & Malan, 2019).

زیست‌سنجی و ارزیابی بیماری‌زایی روی میزبان آزمایشگاهی

به‌منظور ارزیابی بیماری‌زایی نماتدهای فرموله شده، کپسول‌های حاوی نماتد در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از تهیه فرمولاسیون و نگهداری در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون با کمک سوزن سرنگ انسولین زیر بینوکولر پاره شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا نماتدها از داخل کپسول خارج و وارد آب شوند. برای زیست‌سنجی از پلیت ۲۴ چاهکی که کف چاهک‌ها مفروش به کاغذ صافی بودند، استفاده شد. سپس ۴۰۰ لارو آلوده‌کننده که از کپسول‌های پاره شده خارج شده بودند به همراه نیم میلی‌لیتر آب مقطر به هر چاهک افزوده شد و یک لارو سن آخر *G. mellonella* در هر چاهک قرار گرفت و درپوش پلیت گذاشته شد و با کمک چسب محکم چسبانده شد تا از حرکت و جابه جا شدن لاروهای حشره ممانعت به عمل آید. برای هر بازه زمانی ۱۲ لارو *G. mellonella*و در سه تکرار (در مجموع ۳۶ لارو)، مورد استفاده قرار گرفت. از آب مقطر به عنوان شاهد عاری از نماتد استفاده شد. براساس همین روش، از سوسپانسیون نماتد به غلظت ۴۰۰ لارو آلوده کننده در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد. مرگ و میر حشره ۷۲ ساعت پس از آلوده‌سازی، ثبت گردید. لاروهای *G. mellonella* مرده تشریح شدند و وجود نماتد در لاشه آن‌ها بررسی گردید (Chen & Glazer 2005; Ruiz-Vega et al., 2018; Kagimu & Malan 2019).

تجزیه‌ی آماری

تجزیه‌ی واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن، با کمک نرم افزار SAS انجام گرفت (SAS Institute 2012). برای مقایسه زنده‌مانی و پایداری نماتدهای فرموله شده در زمان‌های مختلف پس از فرمولاسیون با زنده‌مانی نماتدهای فرموله نشده از آزمون t-student استفاده شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج

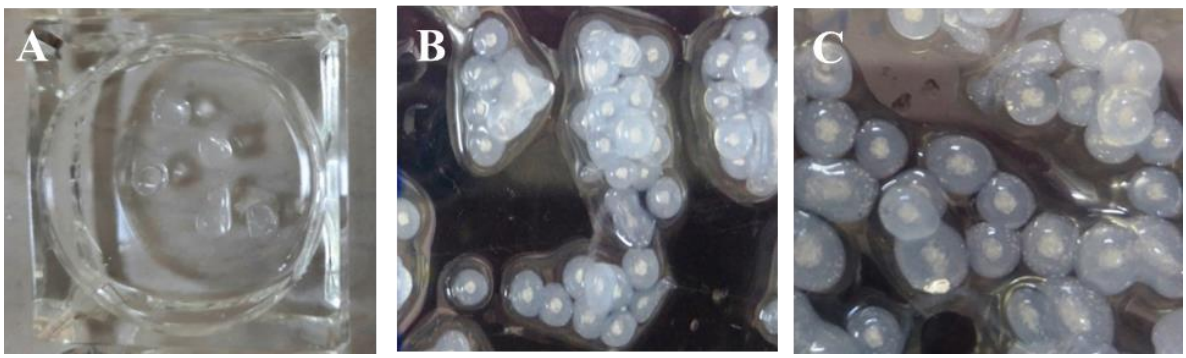
انتخاب غلظت مناسب آلژینات سدیم و کلرید کلسیم برای تشکیل کپسول

بررسی غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و کلرید کلسیم در تشکیل کپسول نشان داد که بهترین غلظت برای آلژینات سدیم، غلظت دو درصد است، در حالی که غلظت سه درصد بسیار بالا بوده و اجازه تهیه محلول یکنواخت از خود آلژینات سدیم در مرحله اول، و سپس مخلوط شدن نماتد در مرحله دوم را نمی دهد و با این حجم آب مورد استفاده، آلژینات به خوبی حل نمی‌شود. اگر قبل از افزودن نماتد محلول آلژینات به خوبی حل نشده و محلول یکنواختی حاصل نگردد، امکان پخش شدن یکنواخت نماتد در محلول وجود ندارد و بنابراین، تشکیل کپسول و فرموله کردن نماتد با این غلظت از آلژینات امکان‌پذیر نیست. از طرف دیگر، غلظت یک درصد آلژینات منتهی به میزان بالای خروج آب از کپسول شده و کپسول حاصل، فاقد استحکام خواهد بود (شکل ۱). علاوه بر این، قطر کپسول در آلژینات یک درصد نسبت به دو درصد کوچکتر است که نشان می‌دهد فرایند تشکیل کپسول به خوبی انجام نمی‌گردد. بنابراین غلظت دو درصد آلژینات سدیم برای ادامه کار انتخاب شد. غلظت نیم تا دو درصد کلرید کلسیم نتایج مشابهی را از نظر حجم آب و تعداد نماتد خارج شده از کپسول حاصل نمود و تفاوتی بین کپسول‌های تشکیل شده با کلرید کلسیم نیم درصد تا دو درصد وجود نداشت. بنابراین غلظت نیم درصد کلرید کلسیم به دلیل مقرون به صرفه بودن و عدم تفاوت در کارایی با غلظت‌های بالاتر برای ادامه کار انتخاب شد.

ارزیابی ویژگی‌ها و پایداری فرمولاسیون

قطر کپسول‌های تشکیل شده با استفاده از سرنگ شیشه‌ای ۵۰ میلی‌لیتری در دامنه ۳/۵ تا ۴/۵ میلی‌متر قرار داشت (شکل ۲). تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان آب خروجی از

کپسول طی فواصل زمانی مختلف پس از فرمولاسیون و مقایسه میانگین بین زمان‌های مختلف مورد بررسی، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین مقدار آب خارج شده از کپسول‌ها در زمان‌های مختلف بود (df=6, 6; F value= 785.51, $P \leq 0.01$). با گذشت زمان، میزان آب خارج شده از کپسول‌ها افزایش یافت (جدول ۱). تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد نماتد خارج شده از کپسول و مقایسه آن‌ها، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تعداد نماتدهای خارج شده از کپسول در فواصل زمانی مختلف پس از فرمولاسیون بود (df=6, 6; F value= 13.90; , $P \leq 0.01$). میانگین تعداد نماتد خارج شده از کپسول نیز در جدول (۱) خلاصه شده است.



شکل ۱- کپسول‌های آلژینات کلسیم حامل *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1. A: آلژینات سدیم نیم درصد و کلرید کلسیم دو درصد، B: آلژینات سدیم یک درصد و کلرید کلسیم دو درصد، C: آلژینات سدیم دو درصد و کلرید کلسیم نیم درصد

Figure 1. Calcium -Alginate capsules of *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1. A: Sodium Alginate (0.5%) and Calcium chloride (2%), B: Sodium Alginate (1%) and calcium Chloride (2%), C: Sodium Alginate (2%) and calcium chloride (0.5%).

جدول ۱- مقایسه میانگین آب خروجی و تعداد نماتد خارج شده از کپسول فرمولاسیون با ترکیب آلژینات سدیم دو درصد و کلرید کلسیم نیم درصد در فواصل زمانی مختلف

Table 1. Mean comparison of the exited water and number of the escaped nematodes from the capsule of formulation composed alginate sodium (2%) and calcium chloride (0.5%) at different time intervals

Time (Days after formulation)	**Parameter (mean±SE)**	
	Number of the escaped nematodes	Exited water (µl)
0	0.5±0.14[c]	0[c]
4	1.9±0.42[b]	10.60±0.52[b]
7	2.37±0.17[ab]	11.0±0.96[b]
14	2.62±0.17[ab]	15.35±1.47[a]
30	2.62±0.17[ab]	15.55±0.96[a]
60	3.12±0.53[a]	16.0±1.73[a]
90	3±0.35[a]	15.60±0.96[a]

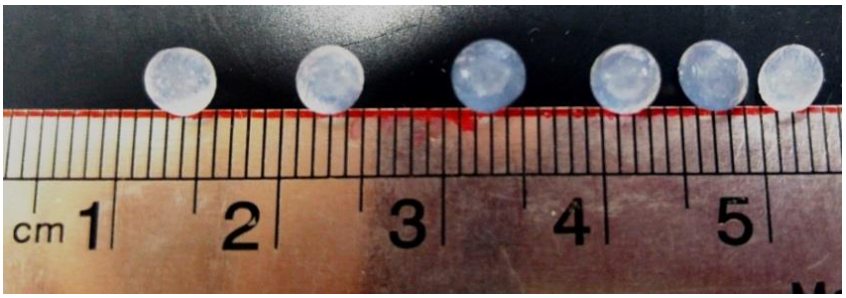
In each column means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.

نتایج تجزیه واریانس پایداری لاروهای آلوده‌کننده نماتد در داخل کپسول، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین فواصل مختلف زمانی بود (df=6, 6; F value= 2824; $P \leq 0.01$). مقایسه میانگین پایداری یا زنده‌ماندن لاروهای آلوده‌کننده نماتد در داخل کپسول‌های فرمولاسیون در فواصل زمانی مختلف در مقایسه با شاهد (آب مقطر سترون) در جدول (۲) ارائه شده است.

نتایج آزمون t-student برای مقایسه پایداری نماتدهای فرموله شده در زمان‌های مختلف پس از فرمولاسیون با پایداری نماتدهای فرموله نشده، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تمام زمان‌های مورد بررسی غیر از زمان صفر روز پس از فرمولاسیون در سطح پنج درصد بود. در تمام فواصل زمانی از چهار روز تا ۹۰ روز پس از فرمولاسیون، نماتدهای فرموله شده درصد بقای بیشتری نسبت به نماتدهای فرموله نشده نشان دادند.

زیست‌سنجی روی *Galleria mellonella*

نتایج تجزیه واریانس زیست‌سنجی فرمولاسیون آلژینات جدایه بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین نقاط مختلف زمانی در درصد مرگ‌ومیر *G. mellonella* بود (df=3, 6, F value= 2113.89, $P \leq 0.01$). مقایسه میانگین درصد مرگ‌ومیر لارو *G. mellonella* در نقاط زمانی مختلف در جدول (۳) ارائه شده است.



شکل ۲- قطر کپسول‌های فرمولاسیون *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1 با ترکیب آلژینات سدیم دو درصد و کلرید کلسیم نیم درصد

Figure 2. Diameters of the capsules of *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1 formulation composed of Sodium Alginate (2%) and calcium chloride (0.5%).

جدول۲- مقایسه میانگین درصد پایداری لاروهای آلوده‌کننده *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1 در کپسول‌های فرمولاسیون با ترکیب آلژینات سدیم دو درصد و کلرید کلسیم نیم درصد در فواصل زمانی مختلف

Table 2. Mean comparison of survival of the infective juveniles of the Iranian isolate of *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1 inside the capsules of formulation composed of alginate sodium (2%) and calcium chloride (0.5%) at different time intervals

Time (Days after formulation)	**%Survival of IJs (mean±SE)**	
	Formulation	Control (distilled water)
0	99.94±0.12[a]	99.70±0.3[a]
4	98.06±0.71[b]	96.83±0.85[b]
7	98.27±0.82[b]	94.73±0.50b
14	98.318±1.42[b]	94.08±0.87b
30	92.72±0.94[c]	89.59±1.31[c]
60	91.52±6.34[d]	70.59±2.35[d]
90	87.56±4.40[e]	60.20±2.76[e]

In each column means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.

جدول۳- میانگین درصد مرگ‌ومیر لارو *Galleria mellonella* تیمار شده با فرمولاسیون آلژینات کلسیم *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1

Table 3. Mean comparison of mortality of *Galleria mellonella* treated with calcium alginate formulation of *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1

Time (Days after formulation)	Mortality (% mean±SE)	
	Formulated IJs (400 IJsLarva^{-1})	Water suspension of IJs (400 IJsLarva^{-1})
30	100±0.0^{a}	94±3.0^{a}
60	47.5±2.50^{b}	40.2±2.3^{b}
90	40.67±1.85^{c}	25.50±1.0^{c}
Control	۰^{d}	۰^{d}

In each column means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.

بحث

مطالعه‌های متعددی فرموله کردن نماتدهای بیمارگر حشرات را در گرانول‌ها یا کپسول‌های آلژینات کلسیم مورد ارزیابی قرار داده‌اند (Chen & Glazer 2005; Hiltpold et al., 2012; Kim et al., 2015). همچنین سه روش فرموله کردن با استفاده از هیدروژل، کائولین و آلژینات کلسیم را روی *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* مقایسه و نتیجه‌گیری شد که فرمولاسیون آلژینات برای *S. carpocapsae* فرمولاسیون بهتری از نظر شدت بیماری زایی روی لاروهای *G. mellonella* و پایداری بیشتر در طول زمان نگهداری می‌باشد (Hussein and Aty –Abdel, 2012).

همانطور که در نتایج پژوهش حاضر اشاره شد، غلظت دو درصد آلژینات سدیم و نیم درصد کلرید کلسیم برای فرموله کردن نماتدها انتخاب شد. محققان دیگر نیز آلژینات سدیم دو درصد و کلرید کلسیم نیم درصد (Chen & Glazer, 2005; Kagimu & Malan, 2019; Kim et al., 2021) و حالت معکوس آن، یعنی آلژینات سدیم نیم درصد و کلرید کلسیم دو درصد (Ruiz-vega et al., 2018; Kim et al., 2015 & 2021) را مورد بررسی و مورد تأیید قرار داده اند. عدم امکان دست‌ورزی مناسب با غلظت بیش از دو درصد آلژینات سدیم توسط Kim et al. (2021) نیز تأیید شده است.

در فرمولاسیون آلژینات علاوه بر غلظت مواد مورد استفاده، تعداد نماتد قابل حمل در هر کپسول و اندازه کپسول‌ها نیز دارای اهمیت است (Kim et al., 2021). هر چند قطر کپسول و تعداد نماتد حمل شده توسط هر کپسول در این فرمولاسیون دارای رابطه‌ی مستقیمی است اما افزایش تعداد نماتد داخل هر کپسول و در عین حال کم بودن قطر کپسول‌ها مطلوب است. افزایش تعداد نماتد نیز تا جایی مجاز است که فرار نماتدها از کپسول طی دوره نگهداری قابل توجه نباشد. در این مطالعه، در زمان واکنش ۲۰ دقیقه (زمان تشکیل کپسول‌ها)، کپسول‌هایی به قطر متوسط چهار میلی‌متر حاوی حدود ۴۰۰ لارو آلوده‌کننده نماتد تشکیل شد. تعداد کمی از مطالعات مانند (Kim et al. 2015 & 2021) به بررسی قطر کپسول در غلظت‌های مختلف پرداخته است. براساس Kim et al. (2015) عوامل دیگری مانند افزایش زمان واکنش، تیمار کپسول‌ها با محلول کلرید کلسیم دو درصد به عنوان یک مرحله اضافی و تشکیل کپسول‌ها روی یخ (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، قطر کپسول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال، افزایش زمان از ۲۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد باعت افزایش ضخامت لایه بیرونی کپسول تا ۰/۹ میلی‌متر می‌گردد، هر چند این افزایش ضخامت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد کمتر از ۰/۴ میلی‌متر گزارش

شده است (Kim et al., 2015). در این مطالعه از سرنگ با قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متری استفاده شده بود و کپسول‌هایی با قطر شش تا ۱۰ میلی‌متر و ۵/۲ تا شش میلی‌متر به ترتیب در دمای ۲۴ و چهار درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی پنج تا ۹۰ دقیقه تشکیل شده بود. جمع‌بندی Kim et al. (2015) نشان داد که تشکیل کپسول‌هایی با اندازه ظریف‌تر و کوچک‌تر و ساختار یکنواخت‌تر منجر به افزایش استحکام کپسول و ممانعت از فرار نماتدها می‌گردد. در مطالعه Kim et al. (2021) نیز کپسول‌هایی با قطر حدود ۴/۵ میلی‌متر و حاوی ۲۰۰ لارو آلوده‌کننده نماتد انتخاب شده است.

در مورد نتایج خروج لارو نماتدها از کپسول همانطور که انتظار می‌رفت میزان فرار نماتدها از فرمولاسیون با گذشت زمان (صفر تا ۹۰ روز) افزایش ملایمی داشت، هر چند به دلیل نوع فرمولاسیون و رفتار گونه نماتد فرموله شده، ۹۰ روز پس از فرمولاسیون نیز تعداد نماتد خارج شده از کپسول (سه لارو آلوده‌کننده نماتد) در مقابل متوسط تعداد نماتد فرموله شده در هر کپسول (حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ لارو آلوده‌کننده) کمتر از یک درصد بوده و ناچیز محسوب می‌شود. در تأیید نتایج به دست آمده، Kim et al. (2021) خروج کمتر از یک درصد لاروهای *H. bacteriophora* را از کپسول ساخته شده با آلژینات سدیم یک و نیم تا دو درصد گزارش نمودند. براساس یافته‌های آنها، با کاهش غلظت آلژینات سدیم میزان فرار لاروهای نماتد از کپسول افزایش می‌یافت، به طوری که در غلظت نیم درصد آلژینات سدیم و یک و نیم تا دو درصد کلرید کلسیم، میزان خروج لاروهای نماتد به ۸۲ درصد رسید. افزایش خروج نماتدها از کپسول با کاهش غلظت آلژینات یا افزایش اندازه قطر کپسول توسط Kim et al. (2015) گزارش شده است. هرچند گونه‌ی نماتد و رفتار حرکتی آن نیز بر میزان خروج لاروها از کپسول موثر است، به طوری که گونه‌ی کم‌تحرکی مانند *S. carpocapsae* در مقایسه با گونه‌ی پرتحرک *H. bacteriophora* به دلیل حرکت و جابه جایی کمتر در داخل کپسول، درصد خروج کمتری نشان خواهد داد (Peters, 2016). تفاوت بین گونه‌ها در میزان فرار نماتدها از کپسول توسط Kagimu and Malan (2019) نیز گزارش شده است. یکی دیگر از عوامل موثر روی فرار نماتدها از کپسول‌ها دمای تشکیل کپسول (Kim et al. 2015) و دمای نگهداری پس از فرمولاسیون (Kagimu & Malan 2019) است. فعالیت نماتدها در دمای پایین (شش درجه سانتی‌گراد) کمتر بوده و با افزایش دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تحرک نماتدها افزایش یافته و میزان خروج نماتدها بیشتر می‌شود (Kagimu & Malan 2019). در مطالعه Kagimu and Malan (2019) تا ۲۸ روز پس از فرمولاسیون به صورت متوسط حدود ۲۳ لارو *H. bacteriophora* از داخل کپسول فرار کرده بود، در حالی‌که در مطالعه حاضر تعداد نماتدهای خارج شده از کپسول در ۳۰ روز پس از فرمولاسیون حدود سه لارو بود و شاید یکی از دلایل این اختلاف، تفاوت در رفتار حرکتی گونه نماتد باشد. البته در مطالعه Kagimu and Malan (2019) به تعداد متوسط نماتد در هر کپسول اشاره‌ای نشده است. Kim et al. (2021) نیز خروج به صورت متوسط، کمتر از پنج لارو (صفر تا پنج لارو) *H. bacteriophora* را تا هفت روز پس از فرمولاسیون گزارش نمودند که با مطالعه حاضر با ۲/۵ نماتد خارج شده در زمان هفت روز پس از فرمولاسیون، همخوانی دارد. در مطالعه اخیر، ۲۰۰ لارو نماتد به ازای هر کپسول استفاده شده است که تقریبا نصف مقدار مطالعه حاضر است. در مورد حجم دقیق آب خروجی از کپسول مطالعه‌ای صورت نگرفته است، هر چند Kim et al. (2021) نیز آبدهی بیشتر کپسول‌ها را با کاهش غلظت آلژینات سدیم به کمتر از یک درصد گزارش نموده است.

پژوهش‌های مختلفی پایداری نماتدهای بیمارگر حشرات را در پیش‌ماده‌های گوناگون مورد ارزیابی قرار

داده‌اند. برای مثال، Andaló et al. (2010) پایداری نماتدهای *S. carpocapsae* را در موادی مانند آگار، رس، ماسه، اسفنج، نشاسته و آب از ۳۰ تا ۱۸۰ روز مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه‌گیری نمودند که اسفنج، کارایی بهتری نسبت به مواد دیگر داشت. در مطالعه دیگری Chen and Glazer (2005) زنده‌مانی بالای ۹۵ درصد لاروهای آلوده‌کننده *S. feltiae* را در شرایط رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد تا شش ماه پس از فرمولاسیون آلژینات سدیم گزارش نمودند، در حالی که در رطوبت نسبی ۸۵ درصد، بعد از چهار ماه تمام نماتدها مرده بودند. افزایش پایداری نماتدها در فرمولاسیون آلژینات کلسیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شاهد (آب) و فرمولاسیون خاک دیاتومه توسط Kagimu and Malan (2019) نیز گزارش شده است. دوره زمانی مورد بررسی در مطالعه اخیر یک تا چهار هفته بود. علاوه بر این، Ruiz-vega et al. (2018) نیز پایداری بیشتر *S. carpocapsae* را در مقایسه با *S. glaseri* و *H. bacteriophora* در فرمولاسیون آلژینات کلسیم گزارش نمود. در مطالعه Ruiz-vega et al. (2018)زنده‌مانی ۵۹ درصدی و صفر درصدی *S. carpocapsae* به ترتیب در ۲۸ روز و ۳۵ روز پس از فرمولاسیون گزارش شده است، در حالی که بقای این گونه در مطالعه حاضر برای ۳۰ روز ، ۹۳ درصد و برای ۶۰ روز ۹۲ درصد به دست آمده است. همچنین، Eivazian Kary et al. (2018) اثر غلظت‌های مختلف گلیسرین در فرمولاسیون آلژینات را روی *H. bacteriophora* بررسی نمودند و بیشترین بازیابی لاروهای آلوده کننده را در غلظت ۱۰ درصد گلیسرین گزارش کردند.

استفاده از لاروهای *G. mellonella* در ارزیابی بیماری‌زایی نماتدهای فرموله‌شده یک روش رایج و استاندارد بین‌المللی برای امکان مقایسه نتایج بررسی‌های مختلف است و در بیشتر مطالعه‌هایی که آزمون بیماری‌زایی نماتدهای فرموله‌شده را بررسی می‌کنند، مورد استفاده قرار گرفته است (Chen & Glazer 2005; Ruiz-vega et al., 2018; Kagimu & Malan 2019). براساس مطالعه Chen and Glazer (2005) آلوده‌سازی لاروهای *G. mellonella* به روش مشابه مطالعه حاضر و با ۲۰۰ لارو آلوده‌کننده *S. feltiae* انجام شده بود، منجر به مرگ و میر حدود ۷۵ درصدی فرمولاسیون آلژینات فاقد گلیسرول و ۱۰۰ درصدی فرمولاسیون آلژینات گردید. این فرمولاسیون در شرایط رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد نگهداری شده بود و زیست‌سنجی، ۱۲۰ روز پس از فرمولاسیون انجام شده بود. در مطالعه حاضر میزان مرگ‌ومیر در اثر استفاده از ۴۰۰ لارو آلوده‌کننده حدود ۵۰ درصد در ۶۰ روز و ۴۰ درصد در ۹۰ روز پس از فرمولاسیون بود. نتایج مطالعه Chen and Glazer (2005) نشان می‌دهد که شرایط نگهداری فرمولاسیون در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد برای نماتدها مطلوب بوده و منجر به حفظ پایداری و بیماریزایی بیشتر شده است. علاوه بر رطوبت نسبی بالا، تفاوت گونه و جدایه مورد استفاده نیز روی نتایج حاصل موثر است، به طوری که میانگین مرگ‌ومیر لاروهای *G. mellonella* بعد از کاربرد *S. carpocapsae* تا ۳۵ روز پس از فرمولاسیون، ۸۰ درصد گزارش شد و بعد از آن به دلیل مرگ‌ومیر تمام نماتدهای داخل کپسول در ۳۵ روز پس از فرمولاسیون، مرگ‌ومیر حشره گزارش نشده است. هرچند در مطالعه اخیر، تعداد نماتد مصرف شده برای تیمار حشره مشخص نشده است و محتویات هر یک کپسول برای هر یک لارو حشره استفاده شده است. همچنین، Kagimu and Malan (2019) نیز مرگ‌ومیر ۳۰ درصدی لاروهای *G. mellonella* در اثر تیمار با ۱۰۰ لارو آلوده‌کننده *H. bacteriophora* خارج شده از فرمولاسیون آلژینات را ۲۸ روز پس از فرمولاسیون گزارش نموده است که نسبت به مطالعه حاضر، کمتر است.

جمع‌بندی نتایج نشان داد که برای تشکیل کپسول، بهترین غلظت برای آلژینات سدیم، غلظت دو درصد و برای کلرید کلسیم نیم درصد بود و قطر کپسول‌های حاصل در دامنه ۳/۵ تا ۴/۵ میلی‌متر قرار داشت. در تمام نقاط زمانی از چهار تا ۹۰ روز پس از فرمولاسیون، نماتدهای فرموله شده درصد بقای بیشتری نسبت به نماتدهای فرموله نشده (در سوسپانسیون آبی) داشتند. با استناد به نتایج ارزیابی پایداری فرمولاسیون و بیماری‌زایی نماتدهای فرموله‌شده و مقایسه نتایج با گزارش‌های قبلی که در منابع آمده است، مطالعه حاضر نشان‌دهنده پتانسل بالای جدایه بومی *S. carpocapsae* IRMoghan1 برای فرمولاسیون آلژینات کلسیم به منظور افزایش مدت زمان نگهداری بدون یخچال و نیز کارایی این فرمولاسیون در افزایش نیمه‌عمر جدایه مورد بررسی است،که می‌تواند مبنای بررسی‌های بعدی با هدف تجاری‌سازی این جدایه باشد. افزایش زمان نگهداری فرمولاسیون تا شش ماه و تهیه فرمولاسیون برای کاربرد در خاک علیه یک آفت زراعی برای پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد.

سپاس‌گزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پروژه انجام یافته در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور است. نویسنده کمال تشکر را از حمایت‌های موسسه و همچنین آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی واقع در کرج دارد.

REFERENCES

Andaló, V., Cavalcanti, R. S., Molina, J. P., & Moino Jr, A. (2010). Substrates for storing entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Scientia Agricola*, *67*, 342-347.

Chen, S., & Glazer, I. (2005). A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*, *32*(1), 104-110. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.006

Ebrahimi, L. (2021) *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (pp-392). Jahade-e Daneshgahi. (Translation, In Farsi).

Ebrahimi, L., Niknam, G., & Lewis, E. E. (2011). Lethal and sublethal effects of Iranian isolates of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *BioControl*, *56*(5), 781-788.https://doi.org/10.1007/s10526-011-9343-0

Ebrahimi, L., Tanha Maafi, Z., & Sharifi, P. (2019). First report of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, from Moghan region of Iran and its efficacy against the turnip moth, *Agrotis segetum* Denis and Schiffermuller (Lepidoptera: Noctuidae), larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*(1), 1-6. https://doi.org/10.1186/s41938-019-0168-y

Georgis, R., & Kaya, H. K. (1998). Formulation of entomopathogenic nematodes. In *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 289-308). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6-9

Grewal, P. S. (2002). *Formulation and application technology* (Vol. 15, pp. pp-311). CABI Publishing Wallingford, UK. https://doi.org/10.1079/9780851995670.0265

Hiltpold, I., Hibbard, B. E., French, B. W., & Turlings, T. C. (2012). Capsules containing entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm. *Plant and Soil*, *358*(1), 11-25. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1253-0

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, *64*, 18-23. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010

Hussein, M. A., & Abdel-Aty, M. A. (2012). Formulation of two native entomopathogenic nematodes at room temperature. *Journal of Biopesticides*, *5*, 23. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03823.x

Kagimu, N., & Malan, A. P. (2019). Formulation of South African entomopathogenic nematodes using alginate beads and diatomaceous earth. *BioControl*, *64*(4), 413-422. https://doi.org/10.1007/s10526-019-09945-1

Eivazian Kary, N., Chahardoli, S., Mohammadi, D., & Dillon, A. B. (2018). Effects of abiotic factors on the osmotic response of alginate-formulated entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Biocontrol Science and Technology*, *28*(7), 688-701. https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1479731

Kaya, H. K., & Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*, *14*(5), 572-574. https://doi.org/10.1093/ee/14.5.572

Kim, J., Jaffuel, G., & Turlings, T. C. (2015). Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, *60*(4), 527-535. https://doi.org/10.1007/s10526-014-9638-z

Kim, J., Hiltpold, I., Jaffuel, G., Sbaiti, I., Hibbard, B. E., & Turlings, T. C. (2021). Calcium-alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms. *Journal of Pest Science*, 1-12. https://doi.org/10.1007/s10340-021-01349-4

Koppenhöfer, A. M., Shapiro-Ilan, D. I., & Hiltpold, I. (2020). Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 125. https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00125

Millar, L. C., & Barbercheck, M. E. (2001). Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. *Biological Control*, *22*(3), 235-245. https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0978

Navon, A., Keren, S., Salame, L., & Glazer, I. (1998). An edible-to-insects calcium alginate gel as a carrier for entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, *8*(3), 429-437. https://doi.org/10.1080/09583159830225

Peters, A. (2016). Formulation of nematodes. In *Microbial-Based Biopesticides* (pp. 121-135). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6_10

Ramakuwela, T., Hatting, J., Laing, M. D., Hazir, S., & Thiebaut, N. (2015). Effect of storage temperature and duration on survival and infectivity of *Steinernema innovationi* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, *47*(4), 332.

Ruiz-Vega, J., Cortés-Martínez, C. I., & García-Gutiérrez, C. (2018). Survival and infectivity of entomopathogenic nematodes formulated in sodium alginate beads. *Journal of Nematology*, *50*(3), 273.

SAS Institute. (2012). SAS Enterprise Guide ver. 9.3.

Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., & Koppenhöfer, A. M. (2002). 16 factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. *Entomopathogenic Nematology*, 333. https://doi.org/10.1079/9780851995670.0000

Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, *67*(3), 380-389. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003

White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, *66*(1709), 302-303. https://doi.org/10.1126/science.66.1709.302.b

© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

45(1), Spring, 2022

doi 10.22055/ppr.2022.17374

Quantitative and qualitative characteristics of alginate-based formulation of a native isolate of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae)

L. Ebrahimi[1*]

1. ***Corresponding Author:** Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran (Ebrahimi.laleh@gmail.com)

Received: 27 December 2021 Accepted: 24 February 2022

Abstract

Background and Objectives

Entomopathogenic nematodes (EPNs), in the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, are potent biocontrol agents that are widely used against various insect pests. The non-feeding and non-developing third stage infective juvenile (IJ), or the dauer juvenile, is the survival stage of EPNs that is able to survive outside the host and is used for formulation. In recent years, alginate has been recognized as the most promising biopolymer in the formulation of living cells and microorganisms. According to the results of scientific research, native isolates of each region have a greater impact than non-native and foreign isolates due to high ecological compatibility.

Materials and Methods

The native isolate of *Steinrnema carpocapsae* IRMoghan1 from the Moghan region, with accession number MF187616 in the NCBI database, was selected for use in the alginate-based formulation owing to its high potential of survival and pathogenicity. The best and most cost-effective capsule composition was selscted by evaluating 0.5%, 1%, 2%, and 3% alginate concentrations with 0.5%, 1%, and 2% concentrations of a calcium chloride solution. Formulation characteristics, the survival rate of the nematodes inside the formulation, exited water volume, escaped nematode rate, and pathogenicity of the formulated nematodes against *Galleria mellonella* larvae as the laboratory host were measured and recorded during 4 to 90 days post formulation. The analysis of variance (ANOVA) and comparison of means by Duncan's test were performed on data using SAS software.

Results

Based on the results, the best concentrations for sodium alginate and calcium chloride were 2% and 0.5%, respectively, which were therefore selected for the next experiments. The diameter of the formed capsules ranged from 3.5 to 4.5 mm. The ANOVA of the amount of water leaving the capsules, the number of nematodes escaped from the capsules, and the

survival rates of the nematodes inside the capsules were significantly different at various time intervals post formulation **(**$P \leq 0.01$**)**. Statistical analysis showed that the formulated nematodes had a higher survival rate than the unformulated congeners in all the time points from (4 to 90 days) after formulation. The results of the ANOVA for bioassay experiments showed significant differences between different time points in the percentage of mortality of *G. mellonella* ($P \leq 0.01$).

Discussion

The present study showed the high potential of *S. carpocapsae* IRMoghan1 native isolate for sodium alginate formulation and, the successful formulation of an entomopathogenic nematode as a biocontrol agent, which is a valuable finding as it increases the shelf life without refrigeration. This finding should be used as the basis of further studies for the commercialization of this isolate.

Keywords: slow-release formulation, sodium alginate, storage formulation, biological control

Associate editor: S. Azimi (Ph.D.)

Citation: Ebrahimi, L. (2022). Quantitative and qualitative characteristics of alginate-based formulation of a native isolate of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(1), 83-95. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17374.