

تقييم كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* كعامل مكافحة حيوية لبالغات طفيلي القراد الصلب *Hyalomma anatolicum*

سعاد شلال شحاذه

جامعة الأنبار، كلية العلوم، قسم علوم الحياة، الأنبار، العراق

(الاستلام ٢٤ حزيران ٢٠١٨؛ القبول ١٠ تشرين الأول ٢٠١٨)

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتقييم كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* كعامل حيوي لمكافحة بالغات (ذكور وإناث) القراد الصلب *Hyalomma anatolicum* المتطفل على الجاموس في حقول المواشي في بعض قرى محافظة الأنبار/ العراق. أظهرت النتائج قدرة التراكيز المختلفة للفطر 1.0×10^4 ، 2.0×10^4 ، 4.0×10^4 بوغ/مل على قتل بالغات القراد. وتناسب نسبة القتل طردياً مع ارتفاع التراكيز المستخدمة، فبعد ٣ يوم من المعاملة سجل التركيز 2.0×10^4 بوغ/مل أعلى كفاءة لقتل القراد والتشويه المظهري لكل من ذكور وإناث طفيلي القراد الصلب.

Evaluation the efficiency of the fungus *Metarhizium anisopliae* as biocontrol agent for adults of hard ticks *Hyalomma anatolicum*

S.Sh. Shahatha

Department of Biology, College of Science, University of Anbar, Anbar, Iraq, alhuda7730@yahoo.com

Abstract

This study was conducted to evaluate the efficacy of the fungus *Metarhizium anisopliae* as a vital agent for the control of the *Hyalomma anatolicum*, which is infested on buffalo fields in some villages of Anbar province, Iraq. The results showed that different concentrations of the fungus 4.2×10^4 , 4.2×10^5 , 4.2×10^6 pg/ml were capable of killing the tick eggs, and the kill rate was proportional to the higher concentrations used. After 3 days of treatment, moreover causing a high proportion of phenotyping deformation in male and female ticks.

Keywords: Fungus, Biocontrol, Ticks, *Hyalomma anatolicum*.

Available online at <http://www.vetmedmosul.com>

المقدمة

مشاكل اقتصادية نتيجة تطفله على المواشي ونقله الكثير من المسببات المرضية إلى الإنسان والحيوان وهذا يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة بسبب قلة الإنتاج في حقول تربية المواشي وإتلاف الجلد والضرع وارتفاع نسبة الوفيات للحيوانات المصابة (٣). يتطفل جنس *Hyalomma* على المواشي ومنها الجاموس ويعود هذا الجنس إلى صنف Arachnida وعائلة Ixodidae (٤)، تعد مكافحة الإحائية للأفات باستخدام الفطريات والبكتريا والفيروسات بديلاً إستراتيجياً للمبيدات الحشرية التي تضر بشكل كبير بصحة الإنسان والحيوان والكائنات الأخرى (٥). وهناك أكثر من ٧٠٠ نوعاً من الفطريات الممرضة للحشرات

يعد القراد من الطفيليات الإجبارية التي تقوم بامتصاص الدم من العائل وتتطفل على عوائل حيوانية مختلفة وتسبب امراضاً مشتركة بين الإنسان والحيوان (١). يؤثر القراد على صحة الحيوان بشكل كبير من خلال تغذيته على دمه وأيضاً يسبب أعراضاً مرضية كثيرة منها الحكة والخمخ الجلدي وفقر الدم والضعف والهزال وإعاقة النمو ورداءة جلود الحيوانات وتؤدي الإصابة الشديدة إلى هلاك الحيوان (٢). ينتشر القراد في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية في العديد من دول العالم ويسبب

الأساسي وغطيت بغطاء الشريحة وتم حساب عدد السبورات في المربعات الخمسة على قوة $\times 40$ وبحسب المعادلة الآتية:

$$\text{عدد الأبواغ} = n \times 80 \times 10 \times 10$$

حيث أن:

n = عدد الأبواغ في المربعات الخمسة.

٨٠ = مجموع المربعات الدقيقة في المربعات الخمسة.

١٠ = معامل تصحيح التركيز.

١٠ = معامل تصحيح الحجم.

وتم تعديل العد للتركيز من ١٠ إلى $4,2 \times 10^3$ بوغ/مل
 $4,2 \times 10^3$ بوغ/مل
 $4,2 \times 10^4$ بوغ/مل

تحضير التراكيز الفطرية

تم الحصول على عزلة الفطر *Metarhizium anisopliae* من قسم وقاية النباتات/ كلية الزراعة /جامعة بغداد وتنمية العزلة في أطباق بتري الحاوية على الوسط الزراعي (PDA) Potato Dextrose Agar المعقم (الشكل ١) وتمت عملية الزرع بطريقة التخطيط streaking، وتم تعقيم الوسط بجهاز autoclave ثم أضيفت للوسط الزراعي المضاد الحيوي كلورامفنكول بواقع ١٢٥ ملغم لكل طبق لمنع النمو البكتيري ونقلت الأطباق إلى الحاضنة بدرجة 25 ± 2 °م ورطوبة نسبية 80 ± 5 % ولمدة ٧-١٠ أيام قبل البدء بالتجارب (١٦). تم تحضير تراكيز الفطر 10^1 ، 10^3 ، 10^4 بوغ/مل بإضافة ٥ مل من الماء المقطر المعقم إلى طبق المزرعة الفطرية وخصدت الأبواغ بالحاصد على شكل حرف L، ورشحت محتويات الطبق بقطعة من الشاش المعقم والمثبت على قمع زجاجي بعد إضافة ٥ مل من الماء المقطر المعقم لنزول جميع الأبواغ وتم جمع العالق الفطري في وعاء زجاجي، وبهذا تم الحصول على العالق الفطري الأساسي ومنه تم تحضير التراكيز الفطرية (١٧) باستعمال ستة أنابيب اختبار معقمة ومعلمة يحتوي كلا منها ٩ مل من الماء المقطر والمعقم وقطرة من محلول توين-٢٠ Tween-20 ٠,٠١ % الذي يساعد على نشر العالق الفطري على سطح جسم الطفيلي، وتم سحب ١ مل من العالق الأساسي بواسطة ماصة معقمة وأضيف إلى الأنبوب رقم ١ وبذلك تم الحصول على التركيز 10^1 ، ثم سحب ١ مل من الأنبوب رقم ١ وأضيف إلى الأنبوب رقم ٢ الحاوي على ٩ مل من الماء المقطر المعقم وبذلك يصبح التركيز 10^4 وهكذا وصولاً للتركيز 10^1 ، تم حفظ الأنابيب في الثلاجة على درجة ٤ °م لحين الاستعمال (١٨).

استخدام تراكيز الفطر ضد بالغات القراد

تم أخذ ١٠ بالغات لكل مكرر من الذكور و ١٠ من الإناث بعمر ٢٤ ساعة وواقع ثلاث مكررات لكل تركيز وتم معاملة البالغات بخمس مليلتر من التراكيز المحضرة بطريقة الرش

والطفيليات (٦) ومنها فطر *Metarhizium anisopliae* الذي يسبب مرض المسكردين الأخضر green muscardine لمضائفه (٧). استعمل هذا الفطر كمبيد إحيائي للآفات الحشرية والطفيلية في المخازن والحقول الزراعية (٨). يتميز المظهر الخارجي للفطر بوجود هايفات mycelia التي تغطي جسم العائل المصاب والحامل البوغوي يكون ذو حواجز عريضة واضحة ويتفرع في طرفه النهائي بشكل الشمعدان وحاملات الأبواغ تصطف بشكل حزم متراسة ويكون شكل الأبواغ ما بين البيضوي والأسطواني وتنتظم بشكل سلسلة متوازية لونها أخضر براق إلى أخضر مصفر (٩). ينتج الفطر *Metarhizium anisopliae* العديد من المركبات الأيضية الثانوية وأهمها السموم الفعالة من مجموعة الببتيدات الحلقية cyclic peptids المسماة destruxins A,B التي تؤثر على قنوات الكالسيوم في الأغشية العضلية للمضائف المصابة (١٠). كذلك E,C destruxins الذي يعمل على تثبيط مناعة العائل وحدث تغيرات انحلالية في خلايا الشبكة الاندوبلازمية والميتوكوندريا لخلايا القناة الهضمية (١١). وينتج أيضا سموم cytochalasins التي توقف عملية الاستطالة في خيوط الأكتين للخلايا العضلية وسموم swainsonins التي تعمل على تنشيط الخلايا السرطانية ونمو الأورام (١٢). هدفت هذه الدراسة للتعرف على مدى تأثير التراكيز المختلفة لعالق فطر *Metarhizium anisopliae* كمبيد إحيائي لبالغات (ذكور وإناث) طفيل القراد الصلب *Hyalomma anatolicum* المتطفل على الجاموس الموجود في حقول تربية المواشي في قرى محافظة الأنبار وذلك لإيجاد الوسائل الكفيلة للقضاء على هذه الطفيليات وما تسببه من أضرار صحية واقتصادية.

المواد وطرائق العمل

جمع القراد

تم جمع بالغات القراد (ذكور وإناث) من الجاموس المصاب في حقول تربية المواشي في بعض قرى محافظة الأنبار، باستخدام قننة مبللة بالكحول الايثيلي ٧٠% يسمح بها مكان التصاق القراد بجسم الحيوان لضمان عدم تمزق أجزاء الفم إذ يعمل الكحول على ارتخاء عضلات الفم وبذلك يسهل سحبه من جسم المضيف (١٣) وبعدها نُقلت لمختبر الطفيليات في قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة الأنبار لإجراء التجارب عليها.

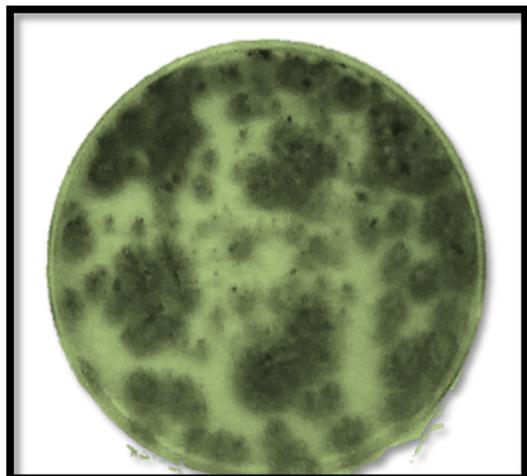
تشخيص القراد

تمت عملية التشخيص اعتماداً على الصفات الشكلية لبالغات القراد الصلب (١٤).

حساب عدد أبواغ الفطر

تم حساب عدد الأبواغ في المعلق الفطري الأساسي وفقاً لطريقة Norris et al. (١٥) وذلك باستخدام شريحة عد خلايا الدم hemocytometer، بوضع قطرة بحجم ٠,١ مليلتر من المحلول

المعاملة وازدادت النسبة إلى ٤٦,٦، ٧٦,٦، ٨٠% بعد ٢ يوم من المعاملة، وبعد ٣ يوم ارتفعت نسبة الهلاك ارتفاعاً معنوياً إلى ٨٠، ٩٣,٣، ١٠٠% للتركيز المستخدمة على التوالي وكان تأثير التركيزات الفطرية المستخدمة اشد ضراوة على الإناث منه على الذكور (جدول ٢).



الشكل ١: مستعمرة نامية لفطر *Metarhizium anisopliae* في الوسط الزراعي PDA.

المباشر، أما معاملة السيطرة فتم رش البالغات بالماء المقطر فقط، وضعت مكررات السيطرة والمعاملات في الحاضنة بدرجة ٢٥±٢ م° ورطوبة ٨٠±٥% وتم متابعة البالغات يوماً لمدّة ٣ أيام وتسجيل نسبة القتل التراكمي وملاحظة التشوهات الحاصلة.

التحليل الإحصائي

أستعمل البرنامج الإحصائي Statistical Analysis System (SAS) (١٩) في تحليل البيانات ودراسة تأثير المعاملات وقورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية $P < 0.05$.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج وجود علاقة طردية بين تراكيز المعلق الفطري المستخدمة ونسبة هلاك البالغات القراد، إذ بلغت نسبة هلاك الذكور ١٦,٦، ٣٦,٦، ٤٣,٣% عند التركيزات ١٠×٤,٢، ١٠×٤,٢، ١٠×٤,٢ بوع /مل على التوالي بعد يوم من المعاملة ويفارق معنوي $P \leq 0,05$ ، بينما بلغت النسبة ٣٠، ٥٠، ٧٣,٣% عند التركيزات أعلاه بعد يومين من المعاملة وازدادت نسبة الهلاك بعد ثلاثة أيام لتصل إلى ٦٣,٣، ٨٦,٦، ١٠٠% عند التركيزات أعلاه على التوالي ويفارق معنوي عن معاملة السيطرة التي سجلت نسبة هلاك ٠% (جدول ١).

أما بالنسبة لإناث القراد فكانت نسبة الهلاك ٢٠، ٥٣,٣، ٦٦,٦% لكل من التركيزات المستخدمة على التوالي بعد يوم من

جدول ١: التأثير التراكمي لتركيز الفطر المستخدمة في نسب هلاك ذكور طفيل القراد *H. anatolicum*

النسبة المئوية للهلاكات خلال المدة الزمنية			التركيز بوع/مل
ثلاثة أيام	يومان	يوم	
c ١,١ ± ٦٣,٣	d ٢,٧ ± ٣٠,٠	c ٣,٠ ± ١٦,٦	١٠ × ٤,٢
b ١,٧ ± ٨٦,٦	c ١,٢ ± ٥٠,٠	b ١,١ ± ٣٦,٦	٣١٠ × ٤,٢
b ٠,٠ ± ١٠٠,٠	b ٢,٠ ± ٧٣,٣	b ٢,٥ ± ٤٣,٣	١٠ × ٤,٢
a ٠,٠ ± ٠,٠	a ٠,٠ ± ٠,٠	a ٠,٠ ± ٠,٠	السيطرة

الأحرف المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروقات معنوية بين المعاملات ضمن مستوى معنوية $P \leq 0,05$.

جدول ٢: التأثير التراكمي لتركيز الفطر المستخدمة في نسب هلاك إناث طفيل القراد *H. anatolicum*

النسبة المئوية للهلاكات خلال المدة الزمنية			التركيز بوع/مل
ثلاثة أيام	يومان	يوم	
b ١,٠ ± ٨٠,٠	c ٢,٣ ± ٤٦,٦	d ١,٠ ± ٢٠,٠	١٠ × ٤,٢
b ٢,٠ ± ٩٣,٣	b ٢,١ ± ٧٦,٦	c ١,٥ ± ٥٣,٣	٣١٠ × ٤,٢
b ٠,٠ ± ١٠٠,٠	b ١,٥ ± ٨٠,٠	b ١,٠ ± ٦,٦٦	١٠ × ٤,٢
a ٠,٠ ± ٠,٠	a ٠,٠ ± ٠,٠	a ٠,٠ ± ٠,٠	السيطرة

الأحرف المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروقات معنوية بين المعاملات ضمن مستوى معنوية $P \leq 0,05$.



الشكل ٣: المظهر العام لطفيلي القراد الصلب *Hyalomma anatolicum* -A الذكور -B الإناث.

يبين الجدول ٣ النسبة المئوية للتشوهات الحاصلة لبالغات الطفيلي القراد إذ أعطت التراكيز الثلاثة المستخدمة نسبة تشوهات متباينة بلغت ٦,٦، ١٦,٦، ٣٦,٦% للذكور ١٦,٦، ٢٣,٣، ٤٠% للإناث على التوالي وبفروقات معنوية عن معاملة السيطرة ٠% (الشكل ٤).

وهذا يتفق مع دراسة Dergousoff and Chilton (٢٥) وذلك لان الكيوتكل من أول المناطق التي تتأثر بشكل كبير والتي يخترقها الفطر ويحللها ويعمل على تحطيم الكيوتكل بفعل إنزيمات محللة للكابتين والبروتين وهذا يسبب تقوس الجسم وانكماشه وكذلك ظهور بقع سوداء اللون في مناطق اختراق الخيوط الفطرية لجسم العائل ونموها داخله وتغذيتها على انسجه الجسم الداخلية مما يسبب تجعد غلاف الجسم وهذه من صفات الفطريات الممرضة للحشرات والطفيليات الخارجية (٢٦).

أوضحت النتائج التأثير الواضح للتراكيز الفطرية لفطر *M. anisopliae* وكفاءتها في قتل ذكور وإناث بالغات القراد الصلب وجماعته (٢١). ويعزى تأثير الفطر على العائل وذلك لاحتوائه على الكثير من المركبات الأيضية الثانوية وتشمل السموم الفعالة مثل Destruxins AB التي تؤثر على قنوات الكالسيوم في الأغشية العضلية للعائل، وdestruxins EC الذي يثبط مناعة العائل وانحلال الميتوكوندريا والشبكة الاندوبلازمية لخلايا الجهاز الهضمي، وسموم cytochalasins الذي يعمل على إيقاف استطالة خيوط الأكتين للخلايا العضلية، وسموم swainsoins الذي يعمل على تنشيط الخلايا السرطانية ونمو الأورام (٢٢). تمثلت أعراض الإصابة بالفطر في قلة نشاط البالغات وعدم قدرتها على الحركة والسير ونمو الخيوط الفطرية الخضراء على أجزاء الجسم المختلفة (الشكل ٢) والذي أدى إلى هلاك البالغات حيث أوضح St Leger (٢٣) أن الفطر يقوم بإفراز أنزيمات تساعد على اختراق جسم العائل ومنها lipase, esterase, protease, chitinase التي تعمل على تكسير الكيوتكل ودخول أنابيب الإنبات إلى الجسم ويخترق الغزل الفطري أعضاء الجسم المختلفة وينكث فيهما وينتج العديد من السموم التي تؤدي إلى هلاك العائل، ومن الجدير بالذكر أن مدة التعريض لتراكيز الفطر لها تأثير على نسبة القتل حيث نلاحظ ارتفاع نسبة قتل بالغات القراد بمرور الزمن نتيجة المعاملة المتكررة لبالغات القراد. كان تأثير الفطر على الإناث أكثر ضراوة منه على الذكور ويعود السبب إلى أن الذكور تكون مغطاة بالدروع على طول السطح الظهري للجسم، بينما يغطي النصف الأمامي من السطح الظهري للإناث فقط والنصف الباقي غير مغطاة بطبقة الكيوتكل وهذا يؤدي إلى سهولة اختراق الفطر لجسم الإناث من تلك المناطق وهذا ما ذكره Dubois وجماعته (٢٤). ويوضح الشكل ٣ المظهر العام لذكور وإناث بالغات القراد الصلب *Hyalomma anatolicum* والتي شُخصت اعتماداً على الصفات الشكلية للطفيلي وأهمها وجود النفوش festoos على الجسم أو انعدامها ولون الأرجل وشكل الرؤيس basis capitulum وشكل الفتحات التنفسية spiracles وموقع الأخدود الشرجي Anal groove والتلون ornamentation، باستخدام المجهر التشريحي dissecting microscope.



شكل ٢: خيوط الفطر *M. anisopliae* النامية على أجسام بالغات إناث طفيلي القراد الصلب.

الجدول ٣: النسب المئوية للتشوهات الحاصلة في بالغات (ذكور وإناث) طفيل القراد *H. anatolicum*

طبيعة التشوهات	% التشوهات		التركيز (بوغ/مل)
	إناث	ذكور	
ظهور بقع سوداء نتيجة اختراق الخيوط الفطرية	١,٠ ± ١٦,٦	٢,٥ ± ٦,٦	١٠ × ٤,٢
تحلل جدار الجسم وخروج الدم	١,١ ± ٢٣,٣	١,٥ ± ١٦,٦	٣١٠ × ٤,٢
تقوس الجسم وانكماشه وتجعد غلاف الجسم	٣,٠ ± ٤٠,٠	٢,٠ ± ٣٦,٦	٥١٠ × ٤,٢
	٠,٠ ± ٠,٠	٠,٠ ± ٠,٠	السيطرة



الشكل ٤: بالغات القراد المشوهة المعاملة بالفطر *M. anisopliae* -A الذكور -B الإناث، بالغات القراد الطبيعية المعاملة بالماء المقطر -C الذكور -D الإناث.

المصادر

1. Sheikha H, Wright I, McGarry J. Parasites and pets: A veterinary nursing guide. London: CABI; 2018. 170 p.
2. GGray TL, Oskam CL, Gofon AW, Rees RL, Ryan UM, Irwin PJA. survey of ticks (Acari: Ixodidae) of companion animals in Australia. Parasites & vectors, 2016; 9(1), 207. DOI: 10.1186/s13071-016-1480-y.
3. Goddard J. Tick-borne diseases. In Infectious diseases and arthropods. London; Humana Press; 2018. 91-147 p. DOI:10.1007/978-3-319-75874-9_4
4. Chegeni AH., Mostafavi E, Mohammadi A, Mahmoudi A, Kayedi MH. The parasitism of Persian jird by immature stages of Hyalomma asiaticum (Acari: Ixodidae) and its identification using molecular

الاستنتاجات

بينت النتائج الكفاءة العالية للفطر *M. anisopliae* بالقضاء على القراد المتطفل على الجاموس وتناسبت نسبة الهلاك طردياً مع التراكيز المستخدمة ومع المدة الزمنية لبقاء الفطر على جسم الطفيلي، وكان للتأثير التراكمي لمعاملة بالغات القراد بتراكيز الفطر أثراً كبيراً في ارتفاع نسب هلاكها، ضرورة استخدام المستحضرات النباتية للسيطرة على القراد الناقل للأمراض المشتركة للإنسان والحيوان لتأثيره الفعال للقضاء على هذا الطفيلي وبدون تأثيرات جانبية على صحة الإنسان والحيوان.

١٦. ديوان، حسين مكطوف. تحضير مستحضر احيائي لفطر (bals) vuill *Brevicoryne brassicae* وتقييم فعاليته على حشرة من الالهانة *Beauveria bassiana* [اطروحة دكتوراه]. بغداد: كلية العلوم، جامعة بغداد؛ ٢٠١٠. ١٦٥ صفحة.
17. Kirkiand B, Cho EM, Keyhani NO. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 2004;31(3),414-421. DOI:10.1016/j.biocontrol.2004.07.007
18. Lecey LA. *Manual of teaching in insect pathology*. London: Academic Press; 1997. 408 p.
19. SAS. *Statistical Analysis system, users guide. statistical version 9th ed.* New York: SAS Institute Inc; 2012. 5121 p.
٢٠. اللهبي، لمياء كاظم. دراسة تأثير الفطر *Metarhizium anisopliae* في الأداء الإحيائي لخنفساء ذات الصدر المنشاري *Oryzaephilus suinamensis* [رسالة ماجستير]. بغداد: كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد. ٢٠١٠. ١٢٧ صفحة.
21. Hajeck A, Huany B, Dobois T, Smith M, Li Z. Field studies of control of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. *J Bio Sci Technol*. 2006;16(4):329-343. DOI: 10.1080/09583150500335962.
22. Dumas C, Matha J, Vey A. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. *J Comp Biochem Physiol*. 1996;(114):213-219. DOI:10.1016/0742-8413(96)00041-2
23. St Leger RJ. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian J Biot*. 1997;(73):1119-1125. DOI: 10.1139/b95-367
24. Dubois T, Hajek AE, Jiafu H, Li Z. Evaluating the efficiency of entomopathogenic fungi against the asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), by using cages in the field. *Enviro Entomol J*. 2004;33(1):62-74. DOI: 10.1603/0046-225X-33.1.62
25. Dergousoff SJ, Chilton NB. Abnormal morphology of an adult Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae). *J of Parasitology*, 2007;93(3), 708-710. DOI: 10.1645/GE-1073R.1.
26. Charnley AK. Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv Bot Res*. 2003;40: 241-321. DOI: 10.1016/S0065(05)40006-3
- approaches in Iran. *Persian J of Acarology*, 2018; 7(4)381-392. DOI: 10.22073/pja. v7i4.39233.
5. van Lenteren JC, Bolckmans K., Köhl J, Ravensberg, WJ., Urbaneja, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 2018; 63(1), 39-59. DOI: 10.1007/s10526-017-9801-4
6. Chander J. *Textbook of medical mycology*. 3rd ed. India: JP Medical Ltd; 2017. 921p.
7. Williams SC, Stafford IKC, Molaei G, Linske MA. Integrated control of nymphal *Ixodes scapularis*: Effectiveness of white-tailed deer reduction, the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, and fipronil-based rodent bait boxes. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018;18(1):55-64. DOI:10.1089/vbz.2017.2146.
8. Rehner SA, Kepler RM. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. *J Invertebr Pathol*. 2017;(148):60-66. DOI: 10.1016/j.jip.2017.05.008.
9. Deshayes C, Siegwart M, Pauron D, Froger JA, Lapied B, Apaire MV. Microbial pest control agents: are they a specific and safe tool for insect pest management. *Curr Med Chem*. 2017;24(27):2959-2973. DOI: 10.2174/0929867324666170314144311.
10. Arroyo MN, Di Mavungu JD, Garrido JI, Arce L, Vanhaecke L, Quesada-Moraga E, De Saeger S. Analytical strategy for determination of known and unknown destruxins using hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(13):3347-3357. DOI: 10.1007/s00216-017-0276-z.
11. Ismaiel AA, Papenbrock J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agri*. 2015;5(3):492-537. DOI: 10.3390/agriculture5030492
12. Sim KL, Perry D. Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of *Metarhizium anisopliae*. *Glycoconj J*. 1997;14(5):661-668. DOI: 10.1023/A:1018505130422
١٣. الحياي، حميد شاحوذ عبد. دراسة تأثير التمنيع بمستضدات طفيلي فراد *Hyalomma anatolicum* في الأرانب والعجول [أطروحة دكتوراه]. الأنبار: كلية العلوم، جامعة الأنبار؛ ٢٠٠٣. ١٧٦ صفحة.
14. Hoogstraal H, Kaiser M. The tick (Ixodoidea) of Iraq: Keys, host and distribution. *J Iraqi Med Prof*. 1958; 6:1-22.
15. Norris A, Elewsk BE, Channauem M. Optimal growth condition for the dermatophytes of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with use of amicro dilution method. *J Amer. Aca. Dermat*. 1999;40(6):509-513. DOI: 10.1016/s0190-9622(99)7092-0.