* تأثيرالفطر *Metarhizium anisopliae* في بعض الجوانب الحياتية لعثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera:Pyrallidae)

د.محمد رضا عنون **منى ابراهيم جاسم**

كلية العلوم /جامعة القادسية **كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء**

email:-ELWEA12@YAHOO.COM

الخلاصة :- استعملت تراكيز مختلفة من العالق البوغي للفطر *Metarhizium anisopliae* ضد الأدوار المختلفة لعثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) ، وقد بلغت اعلى نسبة هلاك للبيوض 62.88 % عند التركيز 1× 10^7 بوغ\مل. بينما بلغت اقل نسبة هلاك 31.78 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل، وكانت قيمة التركيز اللازم لهلاك نصف العدد (LC_{50}) من البيوض 1×$10^{5.82}$ ، اما بالنسبة لليرقات فقد كانت اعلى نسبة هلاك (100 و 96.99 و 90.97)% ليرقات الطور الأول والرابع والسابع على التوالي بعد 120 ساعة عند التركيز 1× 10^7 بوغ\مل وكانت قيم الجرع الأوطأ(62.90 ،58.88 ، 50.86) % للأطوار المذكورة وعلى نفس الترتيب عند التركيز 1× 10^4 بوغ/ مل بعد مرور المدة ذاتها ، اما قيم الجرع نصف القاتلة (LC_{50}) فكانت (1 × $10^{3.72}$ و 1 × $10^{3.86}$ و1 × $10^{3.99}$) بوغ / مل ليرقات الطور الأول والرابع والسابع بعد 120 ساعة . اما بخصوص العذارى فقد سجلت أعلى نسبة هلاك 54.89 % عند التركيز 1× 10^7 بوغ\مل واوطأ نسبة هلاك 36.85 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل وبلغت قيمة الجرعة نصف القاتلة (LC_{50}) 1× $10^{6.18}$ بوغ / مل . وأخذت العلاقة بين تراكيز المعلق الفطري ونسبة هلاك البالغات منحى مشابها لما حصل مع ادوار الحياة السابقة ، فقد سببت المعاملة بالتركيز الأعلى أقصى نسب هلاك (69.95 و 63.94) % للذكور والأناث على التوالي خلال 168 ساعة. بينما كانت أدنى نسبة هلاك (41.91 و 43.91) % للذكور والأناث على التوالي عند معاملتها بالتركيز 1×10^4 بوغ / مل وبالمدة ذاتها وبما يدل على أن الذكور كانت أكثر استعداد لتراكيز معلقات الفطر من الإناث ، اما قيم الجرع نصف القاتلة فكانت (1× $10^{4.77}$ و 1× $10^{5.11}$) بوغ\مل للذكور والأناث على التوالي .

الكلمات المفتاحية :- الفطر *Metarhizium anisopliae* ، عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* ،العالق الفطري

المقدمة :-

ان المكافحة الكيمائية من اكثر الطرائق استعمالاً في مكافحة آفة عثة الشمع الكبرى(*G. mellonella* (L. ويتطلب ذلك عناية وترتيباً خاصاً لئلا تصل هذه المبيدات الى العسل ، ومن هذه المبيدات بروميد المثيل وفوسفات الألمنيوم وسيانيد الكالسيوم (1) . ونظراً إلى السلبيات المسجلة على المبيدات الكيميائية وتأثيراتها السمية في نحل العسل وغيرها من الحشرات المفيدة فضلا عن ظهور صفة المقاومة ولأكثر من (600) نوع من الآفات الحشرية ضد مختلف المبيدات الكيميائية مما يتطلب إيجاد البديل المناسب لمكافحة هذه الآفات أو على الأقل دعم وسائل المكافحة الكيميائية بوسائل أخرى تؤدي إلى الترشيد من استهلاك المبيدات الكيميائية وتقليل تأثيراتها السلبية (2 ; 3).لذا أصبحت عوامل المقاومة الجرثومية من اكثر عوامل الجذب لدى الباحثين للسعي في تطوير عواملها واستعمالها في مجال السيطرة المتكاملة للآفات ، الا ان الفطريات الممرضة للحشرات Entomopathogenic fungi (EPF) تعد من اهم هذه العوامل لعدة اسباب منها سهولة اطلاقها الى الطبيعة ، وسهولة تحميلها ، والعدد الكبير من السلالات الممرضة المعروفة منها فضلا عن سهولة تطبيق التقنيات الهندسية الوراثية عليها (4) . يعد الفطر *M.anisopliae* من اهم الفطريات المستعملة في المقاومة الجرثومية كونه من الفطريات الآمنة غير الملوثة للبيئة ويمكن استعماله كبديل للمبيدات الكيميائية بكفاءة ، وله القدرة على اصابة عدد واسع من الافات الحشرية تقدر بـ 200 نوع تعود الى 50 عائلة حشرية فضلاً عن اصابته للقراد والحلم (5). وبهدف ايجاد احد الوسائل الحيوية الآمنة و البديلة عن المبيدات الكيميائية في مكافحة عثة الشمع الكبرى تضمن البحث استعمال الفطر في مكافحة عثة الشمع الكبرى كوسيلة بديلة للمبيدات الكيميائية .

---

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

طرائق العمل :-

1- إعداد مستعمرة دودة الشمع الكبرى(*G. mellonella* (L. : جمعت مختلف الأطوار اليرقية لدودة الشمع الكبرى فضلا عن بالغاتها من مزارع التربية المهيأة لها في مختبر الحشرات في كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة ، جمعت اليرقات بوساطة ملقط ووضعت في قناني التربية وهي قناني بلاستيكية حجم 800 سم^{3}مغطاة بقماش التول ومزودة بقطع من شمع نحل داكن عقم بواسطة التبريد بعد وضعه في المجمدة لمدة (3) ايام على درجة حرارة (– 7 م°) لغرض تغذية اليرقات (6 ؛ 7)، ثم نقلت الى المختبر و تم مراقبتها لحين التعذر ولغرض الحصول على مزرعة دائمية نقية نقلت العذارى الحديثة ووضعت في اطباق بتري مفتوحة ووضعت داخل قفص خشبي أبعاده 30 × 30 × 30 سم قاعدة القفص من الخشب وواجهته الأمامية من قماش التول فيما بقية الواجهات صنعت من السلك المشبك ،تم مراقبة العذارى لحين خروج البالغات ثم وضع في سقف القفص قطع من القطن المشبع بمحلول سكري 10 % لتغذية البالغات وتحفيزها لوضع البيض. ووضع داخل القفص قطع من الورق المقوى لغرض وضع البيض عليها ، جمع البيض كل 24 ساعة لغرض اجراء التجارب اللاحقة عليه ، ولغرض تهيئة الأعداد الكافية من كل طور يرقي فقد عزلت اعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الأول اما الطورين الرابع والسابع فقد هيأ كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبقه ووضعها في قناني التربية ومراقبتها لحين الانسلاخ ووصولها الطور المطلوب للتجربة ، وللحصول على الدور العذري فقد عزلت اعداد كافية من يرقات الطور السابع في قناني التربية وتم مراقبتها لحين التعذر واخذت الاعداد الكافية لاجراء التجارب في حين تركت الأخرى لأكمال دور العذراء وخروج البالغات الفتية والتي جمعت لغرض اجراء التجارب عليها ايضا.

2- العزلة الفطرية المستعملة في البحث : استعمل في هذا البحث عزلة من الفطر *M.anisopliae* تم الحصول عليها من السيد المشرف د. محمد رضا عنون في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية ونشطت العزلة على الوسط الزرعي اكار دكستروز البطاطا (Potato Dextrose Agar, PDA) ذي الرقم الهيدروجيني 5.6 على درجة حرارة 28 مْ ولمدة 7 – 10 ايام .

3- تحضير المعلق الفطري للفطر *M.anisopliae* :-حضر المعلق الفطري بتنمية الفطر على وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB) في دورق زجاجي سعته 250 مل بمقدار 150 مل من الوسط المستعمل . حضنت المزرعة بدرجة حرارة 25مْ لمدة 7 أيام وكانت ترج يومياً لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بوساطة قطعة من الشاش ، اخذ 1 مل من الراشح ووضع على شريحة عد كريات الدم الحمر المحورة لعد الأبواغ Improved Neubauer Haemocytometer لتقدير عدد الأبواغ لكل وحدة حجم حيث حُسب عدد الأبواغ في كل مربع من المربعات الأربعة الكبيرة الموجودة في أركان الشريحة ، بعد ذلك قُسم عددها الكلي على أربعة للحصول على معدل عدد الأبواغ في المربع الواحد ، ثم ضُرب هذا الناتج في 1×10^4 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الأبواغ في 1مل من المعلق الفطري . حيث تم الحصول على تركيز 1×10^7 (بوغ/مل) (8) ولغرض الحصول على تركيز اقل من ذلك طبقت المعادلة الآتية (9) : الحجم (مل) المأخوذ من المعلق الرئيس = $\frac{\text{التركيز المطلوب}}{\text{تركيز المعلق الاصلي}}$

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره ، فمثلاً للحصول على 100 مل من المعلق بتركيز 1×10^6 نطبق المعادلة . حجم (مل) المأخوذ من المعلق الرئيس = $\frac{^6 10\times1}{^7 10\times1}$= $= 0.1 \times 100$= 10 مل.

وعليه يؤخذ 10 مل من المعلق الأصلي ويضاف إليه 90 مل ماء مقطر معقم لإكماله إلى 100 مل للحصول على تركيز 1×10^6 بوغ/مل ، ثم أضيفت بضع قطرات من Tween 80 كمادة ناشرة وهكذا حُضرت التراكيز (1×10^5 و 1×10^4).

4-الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

4-1الاختبار الحيوي في البيوض :- اخذ البيض بعمر 24 ساعة بعد أن وضعته إناث دودة الشمع الكبرى بعدد 100 بيضة لكل مكرر بعد ان تم حساب عدد البيض تحت المجهر ووضعت القطع الكارتونية الحاوية على البيض في أطباق بتري قطر 9 سم ، رشت البيوض بـ 5 مل من كل تركيز من تراكيز المعلق الفطري بوساطة مرشة يدوية نظيفة من ارتفاع 15 سم تقريباً. كررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ومعاملة السيطرة التي تحتوي على بيوض رشت بالماء المقطر المعقم . تم مراقبة البيض لحين الفقس ، وحسبت نسبة الهلاك .

4-2 الاختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الثلاثة :- لدراسة التأثير الحيوي لمعلق الفطر في الأطوار اليرقية الثلاثة (الاول والرابع والسابع)، أخذت 40 يرقة من كل طور من الأطوار الثلاثة ولكل تركيز بصورة منفصلة (كلاً على حدة) ووزعت على خمسة من اطباق بتري اربع منها تحتوي على 20 مل من كل تركيز من تراكيز المعلق أما الخامسة فتحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) ولمدة دقيقة عدا يرقات الطور الأول فقد تم رشها كما في معاملة

البيض . ثم نقلت يرقات الطور الاول المعاملة فقط بوساطة فرشاة ناعمة إلى اطباق بتري قطر 9 ملم تحوي غذاء يرقات معقم (قطع من الشمع) اما يرقات الطور الرابع والسابع فقد تم نقلها الى قناني بلاستيكية معقمة ومزودة بقطع الشمع للتغذية ، حضنت الأطباق الحاوية على اليرقات المعاملة في الحاضنة بدرجة 25 ± 2 مْ وفترة ضوئية (L/D) 14:10 . ثم حُسبت نسبة الهلاك خلال 24و72و120 ساعة من المعاملة (10) وصُححت القيم بحسب معادلة Orell and Shneider (11)

$$\text{الهلاك المصححة \%} = \frac{\text{نسبة الهلاك في المعاملة} - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}}{100 - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}} \times 100$$

4-3 الاختبار الحيوي في دور العذراء :- عزلت عذارى بعد انسلاخ عدد كاف من يرقات الطور السابع وبعدد مساوٍ لما استخدم في تجربة الأطوار اليرقية كما طبقت طريقة الاختبار ذاتها في الفقرة 4-2 باستثناء عدم إضافة الغذاء ومراعاة تغطية قناني المعاملات بقماش التول تحسباً لظهور البالغات ، تم مراقبة العذارى لحين تحولها الى بالغات وحسبت نسبة الهلاك . وصححت القيم كما في الفقرة 4-2.

4-4 الاختبار الحيوي في البالغات:- أخذت إعداد كافية من العذارى من المزرعة الدائمية ووضعت في قناني سعة 800 سم ^{3} مغطاة فوهتها بقماش التول ، حتى تحولها إلى بالغات . وزعت (10 بالغات) من الذكور والإناث في قناني بلاستيكية سعة 800 سم ^{3} مغطاة بقطعة من قماش التول ورش كل مكرر بمرشة يدوية من ارتفاع 15 سم تقريباً بعد عمل ثقب يسمح برش المعلق الفطري ومن ثم يتم اغلاقه ثانياً بعد انتهاء الرش فيما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم . نقلت البالغات المعاملة إلى قناني بلاستيكية سعة سم ^{3}مغطاة بقماش التول ووضع في اعلاها قطنة مشبعة بمحلول سكري10% ، كررت هذه التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ومثلها لمعاملة السيطرة . حضنت القناني في الظروف نفسها المارة الذكر في الفقرة (4-2) . حُسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 7 ايام . صُححت قيم الهلاك كما في الفقرة سابقة الذكر.

النتائج والمناقشة :-

4-1 الاختبار الحيوي في البيوض

يتبين من الجدول (1) نتائج تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في نسب هلاك بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* ، اذ بلغت أعلاها 62.88 % عند التركيز 1× 10^7 بوغ\مل. بينما سُجلت أوطأها 31.78 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل . و يُشير إلى وجود علاقة طردية بين كل من التركيز ونسبة الهلاك . كما اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية بين التراكيز لصالح التركيز الرابع 1× 10^7 بوغ\مل . قد يرجع السبب في قدرة الفطر على اختراق قشرة البيض الى التكامل في النشاطين الأنزيمي والميكانيكي لديه ، اذ انه قادر على افراز انزيمات البروتييز والكايتنيز واللايبيز والسموم فضلاً عن قوة الفعل الميكانيكي (12) .

جدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* في بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

التركيز (بوغ / مل)	عدد البيوض المعاملة	النسبة المئوية المصححة للهلاك
1×10^4	**100**	**31.78**
1×10^5	**100**	**43.82**
1×10^6	**100**	**49.84**
1×10^7	**100**	**62.88**
Control	**100**	**0**

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 =1.25 ، قيمة التركيز اللازم لهلاك نصف العدد (LC_{50}) لمعلقات الفطر ضد بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* = 1×10$^{5.82}$

وتتفق هذه النتائج مع ماكده (13) إلى أن نسبة فقس بيوض بعوضة *Aedes aegypti* المعرضة لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 2.8×10^2 بوغ /مل أدى إلى اختزال نسبة الفقس الى 50% عند درجة رطوبة 98 %. وقد حصل (14) في نتائجه على انخفاض في نسبة فقس بيوض الخابرا *Trogoderma granarium* الى 56.67 % و 48.33 % عند التركيزين 2×10^6 و 2×10^8 بوغ/مل على التوالي عند تعريضها للفطر *M. anisopliae* .اما (15) فقد استعملوا معلق الفطر *Nomuraea rileyi* ضد عثة التبغ *Spodoptera litura* ووجدوا ان نسبة فقس البيض كانت 0 % عند التراكيز 2.4× 10^5 و 2.4×10^6 و 2.4×10^7 بوغ /مل وقد اعطى التركيز 2.4× 10^4 بوغ /مل نسبة فقس 10 % فقط مقارنة بـ 90% عند معاملة السيطرة .وقد كانت نسبة البيض غير الفاقس 59% بعد معاملة بيض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* بالعالق الفطري 133× 10^5 بوغ /مل للفطر *N. rileyi* ، اما تراكيز العالق الفطري 250× 10^5 و 250×10^3 و 250×10^1 بوغ /مل للفطر *B. bassiana* فقد حققت نسبة (45.4 و 24.9 و 45.2) % من البيض غير الفاقس للعثة آنفة الذكر (7) .

كما استعمل (16) سبورات الفطر *M. anisopliae* في احداث الهلاكات في بيوض االبعوض *An.stephensi* و *Cx. Quinquefasciatus* اذ سبب التركيز 2×10^5 اقصى نسبة هلاكات في البيوض قد بلغت قيمتها (60.33 و 58.66) % على التوالي . جرب (6) معلق البكتريا *Bacillus thuringiensis* في احداث الهلاكات في بيض عثة الشمع

الكبرى وقد حققت هذه المعاملة انخفاض في نسبة الفقس بلغت (47.48 و 48.71)% في الحاضنة والمختبر على التوالي .

2-4 الاختبار الحيوي للأطوار اليرقية الثلاثة

يتبين من الجدول (2) تأثير تراكيز مختلفة لمعلقات الفطر قيد الدراسة في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* إذ كانت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 1×10^{7} بوغ/مل والتي بلغت 51.87 % خلال 24 ساعة وترتفع هذه النسبة مع زيادة مدة التعريض لتصل الى 76.94 % بعد 72 ساعة و 100.00% بعد 120 ساعة ليرقات الطور الأول في حين كانت اقل نسبة هلاكات في التركيز 1×10^{4} بوغ/مل اذ بلغت (17.77 ، 37.83 ، 62.90) % بعد مرور 24 و72 و120 ساعة على التوالي مما يشير الى وجود علاقة طردية بين مدد التعريض ونسب القتل سواءً في التراكيز العالية اوالواطئة وكذلك تظهر العلاقة ذاتها في يرقات الطور الرابع والسابع ، تعزى الزيادة في نسب الهلاك بزيادة التركيز الى الزيادة في عدد الأبواغ ومن ثم ازدياد نسبة الأبواغ النامية عند مهاجمة العائل واضعاف النظام المناعي للحشرة وبالتالي الزيادة في النسب المئوية للهلاك ، وقد اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية في النسب المصححة للقتل بين الاطوار اليرقية الثلاث عند مستوى معنوية 0.05 وان العلاقة بين نسب القتل والطور اليرقي كانت علاقة عكسية ، قد يعود السبب الى كون انسجة الجسم في الطور اليرقي الأول رهيفة مما يسمح بسهولة اختراقها من قبل ابواغ الفطر اذ ان الطريقة الأساسية لدخوله بواسطة الأختراق المباشر لجدار الجسم عن طريق الأنبوب الجرثومي الذي يتكون بعد يومين من وقوع الأبواغ على الحشرة وتحصل الأصابة عند توفر الحرارة والرطوبة المناسبتين (17) غير انه قادر على الدخول وبشكل اقل عن طريق القصيبات الهوائية المفتوحة او عن طريق القناة الهضمية (18) وتتميز يرقات عثة الشمع الكبرى بأن بناء الكايتين فيها يصل الى اقصى درجة عند يرقات الطور الأخير وعند مرحلة ماقبل العذراء Prepupae ومرحلة العذراء البيضاء White pupae ومرة اخرى يضاعف تكوين الكايتين قبل بوغ البالغات بـ 4-6 يوم (19) .وقد بين (20) ان لعثة الشمع الكبرى مقاومة عالية ضد مختلف الكائنات المجهرية ومنها الفطر *M. anisopliae* و *B. bassiana* وتتجلى عوامل الدفاع الخلوي بالبلعمة والكبسلة وتكوين العقد (21) . كما اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية وعلى مستوى 0.05 تبعاً للتراكيز المستخدمة ومدد التعريض . كما تشير النتائج إلى اختلاف استعداد الأطوار اليرقية لمختلف تراكيز المعلق البوغي ، اذ كان الطور الأول أشدها استعداداً مقارنة مع بقية الأطوار(شكل1) والسبب في انخفاض حساسية اليرقات تجاه الفطر بتقدم عمرها اليرقي يعود الى إنه كلما تقدم عمر اليرقات ازداد عدد خلايا الدم والتي من خلالها يزداد عدد خلايا الدم الملتهمة المتجولة (السابحة في الدم) مثل خلايا الدم البلازمية صغيرة (دقيقة) النواة (Micro-Plasmatocytes) وخلايا الدم الحبيبية (Granular haemocytes) والخلايا الدهنية (Adipohaemocytes) وخلايا الدم النجمية (Podocytes) التي يعود لها جميعاً الفضل الأكبر في التهام الأجسام الغريبة التي تدخل إلى داخل جسم اليرقات ، في حين إن يرقات الأطوار الأولى لم تكتمل أجهزتها الدفاعية خاصةً خلايا الدم المتكونة التي اغلبها تكون من النوع البدائي (Prohaematocytes) والتي لا تشترك عادة في التهام البكتريا الداخلة إلى تجويف جسمها (22) ، ولقياس ضراوة فطر المقاومة الجرثومية (virulence) حُسبت قيم LC_{50} التي تمثل القيمة الأساسية في طرائق الاختبار الحيوي (23) . حيث يلاحظ الأنخفاض التدريجي في قيمها مع زيادة مدد التعريض (جدول 3) .

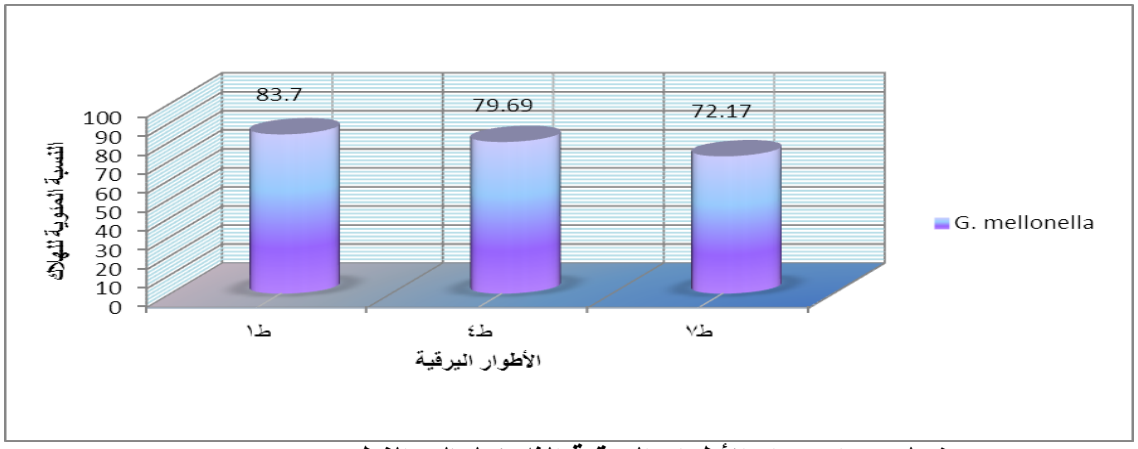
جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الطور	التراكيز (بوغ/مل)	النسبة المئوية المصححة للهلاك بعد (ساعة)		
		24	72	120
الأول	1×10^{4}	17.77	37.83	62.90
	1×10^{5}	23.79	48.86	77.94
	1×10^{6}	35.82	58.88	93.98
	1×10^{7}	51.87	76.94	100.00
	Control	0	0	0
الرابع	1×10^{4}	16.77	34.82	58.88
	1×10^{5}	22.78	46.85	74.93
	1×10^{6}	36.82	61.89	87.97
	1×10^{7}	44.85	76.94	96.99
	Control	0	0	0
السابع	1×10^{4}	14.76	31.81	50.86
	1×10^{5}	18.77	35.82	68.91
	1×10^{6}	31.81	53.87	77.94
	1×10^{7}	40.83	69.92	90.97
	Control	0	0	0

- قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للتراكيز = 5.67 للزمن = 11.95 للاطوار = 4.23

جدول (3) قيم LC_{50} لمعلق الفطر *M. anisopliae* ضد الأطوار اليرقية الثلاث لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الطور اليرقي	24 ساعة	72 ساعة	120 ساعة
الأول	$10\times1^{5.33}$	$10\times1^{4.1}$	$10\times1^{3.72}$
الرابع	$10\times1^{5.92}$	$10\times1^{4.71}$	$10\times1^{3.86}$
السابع	$10\times1^{6.31}$	$10\times1^{5.12}$	$10\times1^{3.99}$



شكل(1) استعداد الأطوار اليرقية الثلاث لعالق الفطر *M. anisopliae*
ط1 = الطور اليرقي الاول ، ط4= الطور اليرقي الرابع، ط7= الطور اليرقي السابع

ومن خلال سير الدراسة تمت ملاحظة سلوك اليرقات غير الطبيعي والمتمثل ببطء الحركة وفي اغلب الأحيان تشاهد متوقفة عن الحركة والتغذية ، كما كانت اليرقات ممتدة بشكل طولي على السطح الداخلي لقناني التجارب تحت ورق الترشيح ولوحظ أن اليرقات المصابة يظهر عليها بقع سوداء ويصبح لونها داكن ومن ثم يتحول الى اللون الأسود بعد موت اليرقة (صورة 1)، ان تلون الكيوتكل بالبقع السوداء يدل على فرط الميلانين وهذا بدوره مؤشر عن مهاجمة الفطر للجهاز المناعي لليرقة وهذا الأمر يعمل على تحفيز النظام الأنزيمي Phenoloxidase وهو المسؤول عن عمليتي الملننة Melanosis ومقاومة الممرضات Pathogen resistance (24) .

-A - يرقة سليمة **-B - يرقة مصابة** **-C - يرقة ميتة**

صورة (1) تأثير معاملات الفطر *M. anisopliae* في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

وهذه النتيجة تشابه لما وجده (6) عند تعريض يرقات الطور السادس لعثة الشمع الكبرى لمعاملات البكتريا *Bacillus thuringiensis* اذ ذكر ان لونها يميل إلى اللون الداكن ويبدو جلدها وكأنه ذو ملمس رقيق كيسي الشكل ، يعقب ذلك موت اليرقة وتركها لسوائل بنية اللون تخرج من فمها أو مؤخرتها على الأسطح التي تموت عليها قبل حدوث عملية الموت ، واكد (25) هذا الأمر اذ وجدوا ظهور بقع سوداء اللون على كيوتكل يرقات الطور الرابع لعثة الشمع الكبرى ويميل لونه الى الأسود عند تعريضها لعالق الفطرين *M. anisopliae* و *B. bassiana* . تشابه نتائج الأختبار الحيوي للدراسة الحالية نتائج (26) اذ حصل على نسبة هلاك 100% ليرقات *An. gambiae* عند تعريضها لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.02 mg بعد مرور أربعة أيام ، وان عزلات *M. anisopliae* الأكثر أمراضية ليرقات بعوض *Cx. pipiens pipiens* أدت إلى هلاكها بنسبة 100% خلال خمسة أيام (27) وبين (28) أن تعريض يرقات الطور الثاني لبعوض *An.walkeri* لأبواغ هذا الفطر أدى إلى هلاك اليرقات جميعاً بعد مرور أربعة أيام ، ان الحشرات

المصابة بالفطر *M. anisopliae* قد تعيش لمدة 3-5 ايام نتيجة لاستنبات الأبواغ واختراق الخيوط الفطرية بشكل واضح بعد 48 ساعة من مهاجمة جسم عائلها وذلك عبر الفتحات التنفسية والقصبات الهوائية والذي يُسبب اختناق اليرقات نتيجة لإغلاق الفتحات التنفسية ثم تمتد لتخترق خلايا البشرة ثم ينمو الفطر في القناة الوسطى لليرقات واستنزاف المواد الغذائية لليرقات ، وبعد 72 ساعة تتحطم الأنسجة الدهنية وبالتالي قد تصل نسبة هلاك الحشرات الى 100% بعد 96 ساعة (29 ; 30).كما أن بعض اليرقات المعاملة تموت خلال الانسلاخ (26 ; 31) وأضاف (32) أن ابتلاع اليرقات للأبواغ يتبعه إفراز سموم من الفطر والذي يؤدي إلى تسمم الدم ونتيجة لذلك يؤدي إلى موت اليرقات خلال 24 ساعة . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكراه (33) أن معاملة يرقات دودة براعم التبغ *Heliothis virscens* (Lepidoptera : Noctuidae) (Fabricius) بالمستحضر التجاري Dipel الحاوي على بكتريا *Bacillus thuringiensis* إن نسب القتل تتزايد مع زيادة الجرعة القاتلة التي تتناولها اليرقات من البكتريا فضلاً عن زيادة مدة التعرض لها ، كذلك بين كلَ من (14) و (34) ان العلاقة ما بين تركيز الأبواغ ونسب الهلاك بأنها طردية اذ كلما ازداد تركيز العالق البوغي للفطر أرتفع معدل هلاك الحشرة ، وقد يعود السبب في ذلك إلى زيادة عدد الأبواغ (الوحدات الأساسية للإصابة الفطرية) فضلاً عن أن الجهاز المناعي لليرقات يستطيع الدفاع عن الجسم فقط عند التراكيز الواطئة وعند زيادة التركيز يفقد الجهاز المناعي كفاءته (35) ، بين (7) ان نسب الهلاكات في الأطوار اليرقية المختلفة لدودة الشمع الكبرى تزداد بزيادة تراكيز العالق الفطري للفطر *B. bassiana* اذ كانت نسب القتل لليرقات (38 ، 28.9 ، 22)% عند التراكيز (2.317×10^5 ، 2.317×10^3 ، 2.317×10^1) على التوالي . كذلك حصل (16) على نفس النتيجة عندما عرض الأطوار الأربعة ليرقات البعوض *An. stephensi* و *Cx. Quinquefasciatus* لتراكيز العالق الفطري للفطر *M. anisopliae* اذ وجد ان نسب الهلاك تزداد بزيادة تركيز العالق الفطري ومدة التعرض ، ولم يختلف (25) عن نتائج من سبقه اذ وجد ان نسبة الهلاك تزداد طرديا مع زيادة تركيز المعلق الفطري فقد كانت نسبة الهلاكات في يرقات الطور الرابع لعثة الشمع الكبرى (10 ، 20 ، 65 ، 90 ، 100)% عند التركيز (4.8×10^2 ، 4.8×10^3 ، 4.8×10^4 ، 4.8×10^5 ، 4.8×10^6) على التوالي للسلالة الفطرية Man3085AUMC للفطر *M. anisopliae* . أما بخصوص حساسية الأطوار اليرقية فقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه (36) عندما وصف العلاقة بين الأطوار اليرقية لبعوض *An. stephensi* ونسبة الهلاك حيث وجد أن نسبة الهلاك تقل كلما تقدم عمر الطور ، وأضاف أن نسبة هلاك يرقات الطور الأول بلغت 100% يليه الطور الثاني بنسبة 89% والثالث بنسبة 73% والرابع بنسبة 71% عند معاملتها بالعالق الفطري للفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.033 mg وهذه النتيجة تشابه ما توصل إليه (37) عند استعماله المبيد الجرثومي Bactospeine ضد حشرات دودة ورق القطن ودودة البنجر السكري والدودة القارضة السوداء اذ أشار إلى إن نسبة القتل لكل عمر يرقي تزداد بزيادة الجرعة المستعملة من قبل اليرقة وإن الحساسية تقل بتقدم العمر. وتتفق النتائج الحالية مع ما توصل اليه (38) من ان يرقات الطور الأول والثاني للنوعين *An. gambiae* و *An. Stephensi* تكون اكثر حساسية لأبواغ الفطر *M. anisolpliae* من يرقات الطور الثالث والرابع ، ويُعلل هلاك يرقات الطور الأول بسبب رقة الكيوتكل بعد الانسلاخ مما يجعلها أكثر عرضة للإصابة الفطرية بالمقارنة مع يرقات الطور الثالث والرابع التي تكون ذات كيوتكل متثخن وبالتالي أقل عرضة للإصابة الفطرية (39 ; 40) .

3-4 الاختبار الحيوي في دور العذراء :- توضح النتائج في الجدول (4) تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في عذارى عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* اذ سجلت أعلى نسبة هلاك 54.89 % عند التركيز 1×10^7 بوغ/مل واوطأ نسبة هلاك 36.85 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل ، وقد اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية في النسب المصححة لهلاكات العذارى تبعا للتراكيز المستخدمة ، اذ يلاحظ من هذه النتائج وجود علاقة طردية بين التراكيز ونسب الهلاك . ان سبب انخفاض تأثير العالق في العذارى يعود الى وجود الشرانق التي تنسجها والتي تعمل كبيئة كارهة للماء ، كما انها تقلل من اختراق الأبواغ فضلا عن كيوتكل العذارى أكثر صلابة من الأطوار اليرقية وذلك لان بناء الكايتين يصل الى اعلى مستوى له في مراحل ماقبل العذراء والعذراء البيضاء وقبل بزوغ البالغات (19) . وظهرت أعراض الإصابة على العذارى المريضة التي تمثلت بلونها البني الداكن عند بداية الإصابة متحولا إلى اللون الأسود في نهاية الإصابة صورة -2- .

جدول (4) تأثير تراكيز مختلفة من العالق الفطري في دور العذراء لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

التركيز (بوغ / مل)	عدد العذارى المعاملة	النسبة المئوية للهلاك
1×10^4	40	36.85
1×10^5	40	45.87
1×10^6	40	49.88
1×10^7	40	54.89
Control	40	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للتراكيز=1.2 ، قيمة التركيز اللازم لهلاك نصف العدد (LC_{50}) لمعلقات الفطر ضد عذارى عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* = $1 \times 10^{6.18}$

صورة (2) تأثير معاملات الفطر *M. anisopliae* في عذارى عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* (الى الأعلى العذارى المصابة ويلاحظ تغير لونها الى اللون الأسود ، الى الأسفل العذارى السليمة)

شابهت النتائج الحالية نتائج (41) عندما عرض عذارى بعوضة *An. nigromaculis* لأبواغ الفطر *B. bassiana* وأدى إلى هلاكها بنسبة 40% ، في حين بلغت نسبة بزوغ البالغات 58% عند التركيز 3.5×10^{9} بوغ/مل . وأشار (42) إلى أن تعريض عذارى ذبابة القرن *Haematobia irritans* إلى ثلاثة أنواع من الفطريات *M. anisopliae* و *B. bassiana* و *P. fumosoroseus* سبب هلاكها بنسب انحصرت بين (50% - 71.3%) وبلغت نسبة هلاك عذارى بعوض *Cx. pipiens pipiens* 30% عند تعريضها لأبواغ الفطر *B. bassiana* بتركيز 10^{4} بوغ /مل (43) ،اثرت السلالة المحلية لبكتريا *Bacillus thuringiensis* في نسب بزوغ البالغات اذ كانت نسبة العذارى الهالكة والمتعرضة لعالق البكتريا 50 % في جو المختبر و 60 % في جو الحاضنة كما اثرت السموم البكتيرية في لون العذارى اذ كان لونها بني داكن عند بداية الأصابة ثم تحول الى اللون الأسود في نهاية الأصابة (6) . وقد اكدا (44) ان للفطر *B. bassiana* تاثير قليل في عذارى دودة ورق القطن قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغ معدل الموت فيها صفر ، اما (15) فقد اكدوا ان تراكيز العالق الفطري للفطر *Nomuraea rileyi* لم تؤثر على نسب هلاك العذارى لحشرة *Spodoptera litura* بقدر تاثيرها في احداث التشوهات للبالغات البازغة من هذه العذارى وقد بلغت نسبة التشوه لبالغات الحشرة 96.7 % عند تعريض العذارى للتركيز 2.4×10^{6} سبور / مل . كما تدنت نسب الهلاك في عذارى بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. Quinquefasciatus* عند تعرضها لعالق الفطر *M. anisopliae* اذ بلغت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 2×10^{5} بوغ/مل بلغت 50% لعذارى الانوفليس و 46.66% لعذارى الكيولكس وبعد 72 ساعة من بداية التعرض لعالق الفطر (16) ، وجد (7) عند معاملته عذارى عثة الشمع الكبرى بالعالق الفطري للفطر *Nomuraea rileyi* ان نسب الهلاك بلغت 100 % وعلل ذلك بصغر سبورات الفطر وقدرتها على اختراق شرنقة العذراء ومن ثم اتمام عملية التطفل اما عند معاملته هذه العذارى بعالق الفطر *B. bassiana* فقد كانت نسب الهلاك (25 ، 35 ، 15) % عند التركيز (218.7×10^{5} ، 218.7×10^{3} ، 218.7×10^{1}) بوغ / مل على التوالي وقد كانت هذه اقل نسب الهلاكات من بين كل المعاملات التي جربه في بحثه ، درس (45) تاثير تراكيز العالق الفطري للفطر *M. anisopliae* في عذارى خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculates* وقد وجدوا ان نسب الهلاك للعذارى بعمر 120 ساعة بلغت (100 ، 70 ، 70) % عند التركيز (5×10^{5} ، 5×10^{3} ، 5×10^{1}) سبور/مل على التوالي .

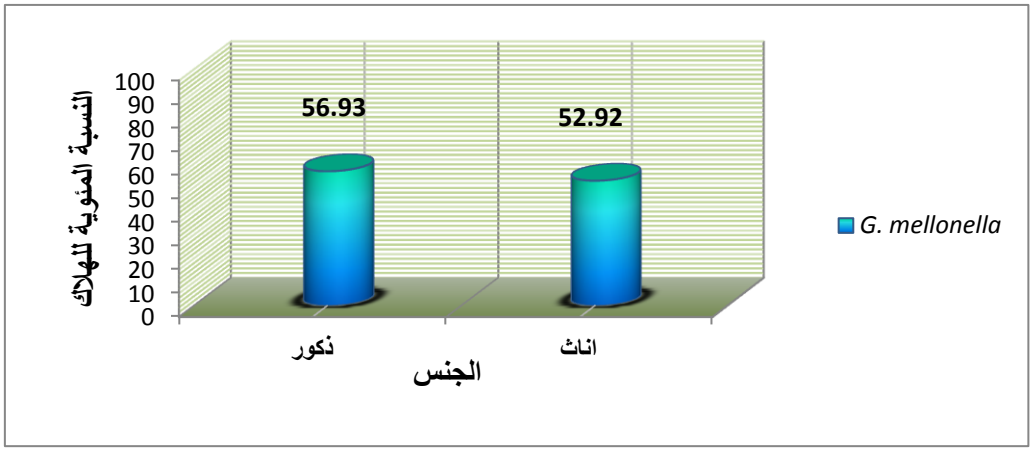
4-4 الاختبار الحيوي في البالغات

يُشير الجدول (5) إلى تأثير تراكيز مختلفة من العالق الفطري في بالغات *G. mellonella* حيث دلت النتائج أن أعلى نسبة هلاك سُجلت عند التركيز 1×10^{7} بوغ /مل لكل من الذكور والإناث،اذ كانت نسبة هلاك الذكور 69.95 % والإناث 63.94 % بعد مرور 168 ساعة ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك عند التركيز 1×10^{4} بوغ /مل اذ كانت نسبة هلاك الذكور والأناث 41.91 % و 43.91 % على التوالي . وقد اثبت التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية تبعاً للجنس ولصالح الاناث التي اظهرت مقاومة اكبر من الذكور ، ويؤيد ذلك ان الجرعة النصف قاتلة للذكور اقل مما هي عليه للأناث وفضلاً عن ذلك يُستنتج من الجدول أدناه أن العلاقة بين تراكيز المعلق الفطري وكل من نسب الهلاك كانت طردية ، أما بخصوص حساسية جنس الحشرة فيوضح الشكل (2) أن الذكور كانت أكثر حساسية للإصابة من إناث عثة الشمع . ويوضح الجدول (10) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات عثة الشمع ، اذ تفوق التركيز 100% على باقي المعاملات بنسبة هلاك (68.90 و 58.98) % للذكور والأناث على التوالي بعد 72 ساعة ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت (37.98 و 32.97) % للذكور والأناث على التوالي وفي المدة نفسها . في حين لم تسجل معاملة السيطرة أية نسبة هلاك ، وتوضح النتائج وجود علاقة طردية بين كل من نسب الهلاك والتركيز . ودُعمت جميع النتائج من خلال الفروقات المعنوية بين المعاملات ،كما بينت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين الذكور والأناث في معدلات الهلاك على الرغم من ان الذكور كانت اكثر حساسية من الأناث .

جدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من العالق الفطري في دور البالغات لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الجنس	التركيز	النسبة المئوية للهلاك
ذكور	1×10^{4}	41.91
	1×10^{5}	53.93
	1×10^{6}	61.94
	1×10^{7}	69.95
	Control	0
اناث	1×10^{4}	43.91
	1×10^{5}	47.92
	1×10^{6}	55.93
	1×10^{7}	63.94
	Control	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 = 1.3 قيمة التركيز اللازم لهلاك نصف العدد (LC_{50}) لمعلقات الفطر ضد البالغات الذكور والأناث لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella* = $1\times10^{4.77}$ و $1\times10^{5.11}$ على التوالي



شكل (2) استعداد ذكور واناث عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* لتراكيز معلقات الفطر *M. anisopliae*

تشابه النتائج الحالية نتائج دراسات اخرى لتجريب اثر الفطريات *M. anisopliae* و *B.bassiana* في بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية جرب (46) 12 عزلة فطرية من الفطرين ووجد ان اكثر عزلتين اثرت في بالغات الحشرة هي *B.bassiana* 0362 و *M. anisopliae* 0351 وكانت الجرعة نصف القاتلة (9.10×10^{4} و 7.10×10^{4}) بوغ/ مل على التوالي ، اما (47) فقد جربوا خمس عزلات للفطرين *M. anisopliae* و *B.bassiana* في بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية ووجدوا ان اكثر عزلة فطرية مؤثرة في البالغات هي *B.bassiana* IRAN 715C اذ حققت اعلى نسبة هلاك بلغت 76 % عند غمس بالغات الحشرة بالعالق الفطري ذو التركيز 1×10^{8} بوغ / مل ، بين (16) في دراسته تأثير العالق الفطري للفطر *M. anisopliae* في بالغات البعوض *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* وكانت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 2×10^{5} بوغ /مل لكل من الذكور والإناث ولكلا النوعين ، وكانت نسبة هلاك ذكور بعوض *An. stephensi* 100% والإناث 96.66% بعد مرور 168 ساعة ، بينما بلغت نسبة هلاك ذكور بعوض النوع الثاني93.33% و الإناث 90% في المدة ذاتها ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك عند التركيز 2×10^{2} بوغ /مل وكانت نسبة هلاك ذكور وإناث بعوض النوع الأول 66.66% و 56.66% على التوالي بالمقارنة مع نسب هلاك ذكور وإناث بعوض النوع الثاني والتي بلغت 56.66% و 50% في المدة نفسها . استعمل بعض الباحثين تأثير الغذاء المخلوط اما بالبكتريا او العالق الفطري في احداث مختلف التأثيرات في عثة الشمع الكبرى فقد اكد (6) انخفاض معدل عدد البيض للبالغات المتغذية على محلول سكري 10 % ملوث بمعاملات المبيد $Avaunt_{150sc}$ ومعاملات الخلط بينه وبين البكتريا *Bacillus thuringiensis* ليتراوح معدل عدد البيض بين41 – 71.50 بيضة لكل أنثى للجيل الأول و 13 – 33.62 بيضة لكل أنثى للجيل الثاني مقارنة بمعاملة المقارنة التي تغذت فيها البالغات على محلول سكري 10 % لوحده فكان عدد البيض الموضوع 186.75 و 222.25 بيضة لكل أنثى في الحاضنة و 140.12 و 147.62 بيضة لكل أنثى في جو المختبر للجيلين الأول والثاني على التوالي ، كما انخفضت النسبة المئوية لفقس البيض

للجيلين الأول والثاني مقارنة بمعاملة المقارنة ، اما (7) فوجد ان الغذاء المعامل بالعالق الفطري قد اثر على عمر الأناث و وضعها للبيض وكان اكثر التراكيز تاثيرا هو 265.1×10^5 بوغ /مل في معاملة (ذكور معاملة × اناث معاملة) اذ كان عمر الاناث 5 يوم وعدد البيض الموضوع من قبلها 347 بيضة لكل انثى مقارنة بمعاملة السيطرة (ذكور سليمة × اناث سليمة) اذ بلغ عمر الاناث 13.33 يوم وعدد البيض الموضوع 1064 بيضة لكل انثى . وفيما يتعلق بحساسية ذكور وإناث بالغات عثة الشمع الكبرى لأبواغ الفطر ، فقد جاءت نتائج الدراسة مشابهة لما وجده (35) عندما استخدم الفطر قيد الدراسة بتركيز 1.6×10^8 بوغ /مل ضد ذكور وإناث *An. gambiae* مما أدى الى هلاكها جميعاً خلال سبعة أيام ، كما أوضح ايضاً أن هلاك بالغات *Cx. quinquefasciatus* بلغت 100% بعد مرور ستة أيام للذكور وسبعة أيام للإناث . بين (48) أن الفطر المذكور من سلالة IP46 يُصيب ذكور وإناث النوعين *An. gambiae* و *An. arabiensis* اذ وجد ان ذكور كلا النوعين تكون أكثر تأثيراً بالإصابة الفطرية من الإناث . وفيما يخص أنواعا أخرى من الحشرات الطبية، فقد وجد (49) ان ذكور ذبابة التسي تسي *G. morsitans morsitans* أكثر حساسية للإصابة بالفطرين *M. anisopliae* و *B.bassiana* من الإناث . وتتعارض في الوقت نفسه مع ما وجداه (50) من ان الذبابة المذكورة عند تعريضها لأبواغ الفطر قيد الدراسة تكون الإناث أكثر حساسية للإصابة بالفطر من الذكور ، حيث كانت نسبة هلاكها 98% للإناث و 89.6% للذكور ، كذلك (7) وجد في دراسته ان البالغات الذكور اقل تاثرا بالعالق الفطري للفطر *B.bassiana* من الأناث .

المصادر :-

1- **Goodman, R. D**., Williams, P., Oldroyd, B. P., & Hoffman, J.(1990). Studies on the use of phosphine for the control of greater wax moth, Galleria mellonella in stored honeybee comb. American Bee Journal, 130, 437–477.

2- **Ambethgar,V**.(2009). Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. Journal of Biopesticides. 2(2): 177-193.

3- **Hasan ,S**. ; Ahmed, A. ; Purwar ,A. ;Nausheen , K. ; Kundan , R. & Gupta, G. (2013). Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* . Bioinformation 9(5):238-242 .

4- **Khan,S.** ; Guo,L. ; Maimaiti,Y. ; Mijit,M. & Qiu,D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent . Molecular Plant Breeding . Vol.3. No.7 .

5- **Samuels, K. D. Z.**, Pinnock, D. E. & Allsopp, P. G. (1989). The potential of Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin (Deutermycotina, Hyphomycetes) as a biological control-agent of Inopus rubriceps (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). J Aust Entomol Soc 28, 69–74.

6- **تقي** ، حقي إسماعيل داوي (2007) . تقييم كفاءة بعض طرق المكافحة في السيطرة على دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae) وتأثيراتها على نحل العسل . رسالة ماجستير .

كلية زراعة / جامعة بغداد .

7- **كريم** ، حسنين طاهر .(2011) . دراسة القدرة الأمراضية لبعض المسببات المرضية في دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae) مختبريا . رسالة ماجستير . كلية زراعة / جامعة بغداد .

8- **Goettel, M.S.** and Inglis, D.(1997). Fungi: Hyphomycetes. In. : Lacey, L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego. pp.409 .

9- **Lacey, L.A**. (1997). Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques) . Academic Press. Sadiego.London.Boston. pp.408.

10- **Skrobek , A**.; Shah, F.A; Butt, T.M.(2008). Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. Biocontrol.53:361-373.

11 - **شعبان**، عواد والملاح ، نزارمصطفى .(1993). المبيدات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 520 صفحة.

12- **Charnley,** AK.(2003). Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical* Research. 40: 241-321.
13- Santos, A.H.; Tai, M.H.; Rocha, L.F.; Silva, H.H.G. and Luz, C.(2009).Dependence of Metarhizium anisopliae on high humidity for ovicidal activity on Aedes aegypti.Bio control.1:37-42.

14 -الامارة، محمد صبري جبر (2009). تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية والكيميائية في بعض اوجة حياتية حشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae) رسالة ماجستير. كلية الزراعة / جامعة البصرة.113 صفحة.

15- Shanthakumar, S.P.; P.D. Murali; S. Malarvannan; V. R. Prabavathy and S.Nair.(2010). Laboratory evaluation on the potential of entomopathogenic fungi, *Nomuraea rileyi* against tobacco caterpillar, *Spodopteralitura Fabricius* (Noctuidae: Lepidoptera) and its safety to *Trichogramma* sp. J. Biopesticides 3(1 Special Issue) 132-137.
16 -المحنة ، احمد غانم نوري (2011) . تقييم كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. في مكافحة نوعين من البعوض(Diptera: Culicidae) في محافظة الديوانية .رسالة ماجستير /كلية العلوم / جامعة القادسية .
17- Steinhause, E.A.(1949).Principle of In Pathology .New York.Tornto. London.Mc Graw-Hill book company INC.757.
18- Boucias, D. G. and J. C. Pendland. (1998) . Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. London. pp. 537.
19- Ferkovich,S.M.;Oberlander,H. and Leach, C.E.(1981).Chitin synthesis in larval and pupal epidermis of the Indian meal moth ,*Plodia interpunctella* (Hubner), and the greater wax moth *Galleria mellonela* (L.). Journal of insect Physiology ,27,509-514

20- Eguchi, M.;Y. Matsui and T. Matsumoto. (1986). Developmental change and hormonal control of chymotrypsin inhibitors in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 84: (3):27-32.
21- Lavine, M.D and M.R. Strand .(2002). Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem. Mol. Biol. 32(10): 295-309.
22 -الزبيدي، حمزة كاظم (1992) .المقاومة الحيوية للآفات . دار الكتب للطباعـــة والنـشر. جامعة الموصل .63-167 .

23- Papierok, B. and Hajek, A. (1997). Fungi : Entomophthorales. In: Lacey,L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego. 188-212.

24- Bitondi , M.M., Mora, I.M., Simose,Z.L.P. and Figueiredo, V.L.C. (1998).The *Apis mellifera* pupal melanisation program is affected by treatment with ajuvenile hormone analogue. Journal of Insect Science,3,34-38.
25- Hussein, K.A.; Abdel-Rahman,M.A.A.; Abdel-Mallek, A.Y.; El-Maraghy, S.S. and Joo, J.H.(2012). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*.phytoparasitica 40:117-126 .
26- Roberts, D.W. (1970).*Coelomomyces, Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. Miscellaneous publications of the Entomological Society of America.7:140-155.
27- Daoust, R.A. and Roberts, D.W. (1982). Virulence of natural and insect passed strain of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J . Invert. Pathol.40:107-117.

28- De Andrade, C.F. (1993). *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. : potential to recycle in mosquito larvae. Boyce Thompson Institute at Cornell University.

29- El-Sinary, N. H. (2002). Influence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) on the mature larvae of the potato tuber moth, Phthorimaea operculella (Zeller) under different degrees of temperature and relative humidity. Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 27, 4151–4161.

30- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 99, 1955–1966.

31- Ravallec, M.; Riba, G. and Vey, A. (1989). Sensibilite *d'Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) a I'hyphomycete entomopathogen *Metarhizium anisopliae* . Entomophaga.34:209-217.

32- Lacey, C.M.; Lacey, L.A. and Roberts , D.W. (1988). Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus* .J.Invert.Pathol.52:108-118.

33- Ali, A. A. and Watson, T. F. (1982). Efficacy of Dipel and Geocoris punctipes (Hemiptera : Lgaeiidae) against the tobacco budworm (Lepidoptera : Noctuidae) on cotton. J. Econ. Entomol. 75(6): 1002-1004.

34 -الجبوري، ابراهيم جدوع.(2007). حصر وتشخيص العوامل الحيوية في بيئة نخلة التمر واعتمادها لوضع برنامج أدارة متكاملة لآفات النخيل في العراق . مجلة جامعة عدن للعلوم الطبيعية والتطبيقية . المجلد (11) العدد3 .63-70.

35- Scholte, E.J.; Njiru, B.N.; Smaliegange, R.C.; Takken, W. and Knols, B.G.J. (2003a). Infection of malaria(*Anopheles gambiae* S.S) and filariasis(*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Malaria Journal.2:1-10.

36- Balaraman, K.; Bheemarao, N.S. and Rajagopalan ,P.K. (1979). Isolates of Metarhizium anisopliae , Beauveria tenella and Fusarium oxysporum (Deuteromycetes) and their pathogenicity to Culex fatigans and Anopheles stephensi. Indian J.Med.70:718-722.

37 -الزبيدي، عايد نعمة عويد. (1987). تأثير المبيد البكتيري Bactospeine على ثلاثة حشرات حرشفية الأجنحة وتوافقه مع بعض المبيدات الكيمياوية في البيوت المحمية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.

38- Bukhari, T.; Middelman, A.; Koenraadt, C. J.M.; Takken, w. and Knols, B.G. (2010). Factors affecting fungus induced larval mortality in Anopheles gambiae and Anopheles stephensi. Malaria Journal.9:22.

39- Lord, J.C. and Fukuda, T.(1990). Aleptolegnia (Saprolegniales) pathogenic for mosquito larvae. J. Invert. Pathol.55:130-132.

40- Sandhu, S.S.; Rajak, R.C. and Sharma, M. (1993). Bioactivity of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae as pathogens of Culex tritaeniorhynchus and Aedes aegypti : Effect of instar, dosages and time. Indian Journal of microbiol.33:191-197.

41- Clark, T.B.; Kellen, W.R.; Fukuda, T. and Lindegren, J.E. (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes . J.Invert. Pathol.11(1):1-7.

42- Angel-Sahagun,C.A.; lezama-Gutierrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; Lopez-Edwards, M.; Rebolledo-Dominguez, O.; Cruz-Vazquez, C; Reyes-Velazquez, W.P; Skoda,S.R, and Foster,J.E.(2005).Susceptibility of biological stages of the hornfly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). J. insec. Sci..33:1-8.

43 -علي، هالة هيثم محمد. (2007) . دراسة تأثير المستخلص الايثانولي لأوراق وثمار نبات الدورانتا *Duranta repens* L. وفطر (Balsamo) *Beauveria bassiana(*على الاداء الحياتي لبعوضة *Culex pipiens pipiens* L. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد.137 صفحة.

44 -العبيدي ، شيماء حميد و سمير، صالح حسن.(2011). كفاءة الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. في المكافحة الاحيائية لدودة ورق القطن (Boisd.) *Spodoptera littoralis* . مجلة وقاية النبات العربية . الحجم 29 . العدد1. 77- 82 .

45 - محمود ، عماد احمد ؛ محمد ، حسام الدين عبدالله ؛ النعيمي ، مروة ثامر عبد الستار .(2012) تأثير فطر *Metarhizum anisopliae*(Metchnikoff)Sorokin ومبيد الأكتلك في الدور العذري بعمر 24 و 120 ساعة لخنفساء اللوبيا الجنوبية (Coleoptera:Bruchidae) *Callosobruchus maculatus* F. مجلة بغداد للعلوم . مجلد 9 (3) .

46- Cherry AJ, Abalo P, Hell K (2005). A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. J. Stored Prod. Res., 41: 295-309.

47- Mahdneshin,Z.;Vojoudi.S.;Ghosta,Y.;Safaralizadae,M.H. and Saber, M.(2011).Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin against the control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae) .African Journal of Microbiology Research .Vol.5 (29),pp.5215-5220.

48- Mnyone, L.L.; Russell,T.L.; Lyimo, I.N.; Lwetoijera, D.W.; Kirby, M.J. and Luzm, C. (2009). First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* S.S and *An. Arabiensis*(Diptera: culicidae) . Parasites and Vectors.1-4.

49- Kaaya, G.P. (1989). *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi . Acta tropica. 46: 107-114.

50- Maniania, N.K. and Odulaja, A. (1998) .Effect of species ,age and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae* .Biocontrol.43:311-323.

* Effect of *Metarhizium anisopliae* in some biological aspects of the greater wax moth *Galleria mellonella* (L.)(Lepidoptera:Pyrallidae)

Mohammed Reddah Annon
Sciences College /Al-Qadisiya University

Muna Ibrahim Jasim
Education of sciences freehold College / Kerballa University
email:-ELWEA12@YAHOO.COM

Summary:-
Different concentrations of the fungal suspension of *Metarhizium anisopliae* have been used against different stages of *Galleria mellonella* (L.) . The highest percentage of eggs mortality reached 62.88 % at the concentration of 1×10^{7} spore/ml and decreased to 31.78 % at the concentration of 1×10^{4} spore/ml , The value of LC_{50} of eggs was $1\times10^{5.82}$. The larval instars have showed highest mortality rate reached (100 , 96.99 and 90.97) % for 1^{st} , 4^{th} and 7^{th} larval instars respectively during 120 h at the concentration of 1×10^{7} spore/ml , The values of lowest mortality rate when treated with the concentration 1×10^{4} spore /ml during 120 h were (62.90 , 58.88 , 50.86) % for 1^{st} , 4^{th} and 7^{th} larval instars respectively , The values of LC_{50} were ($1 \times 10^{3.72}$, $1 \times 10^{3.86}$, $1 \times 10^{3.99}$) spore/ml for 1^{st} , 4^{th} and 7^{th} larval instars respectively after 120 h . 54.89 % the highest mortality rate for the pupae when exposed to $1\times^{7}10$ spore /ml and 36.85 % were dead when exposed to $1\times^{4}10$ spore /ml , The LC_{50} was $1 \times 10^{6.18}$. The relationship between fungal suspension concentration and rate of adult mortality took the same trend , and the treatment with highest concentration caused a high adult mortality, i.e 69.95 % and 63.94 % for adult males and females at 168 hours, while the lowest mortality percentages were 41.91 % and 43.91 % when treated with 1×10^{4} spore/ml at the same time, indicating that the males were more readiness than females to the fungal suspensions , The values of LC_{50} were ($1 \times 10^{4.77}$ and $1 \times 10^{5.11}$) spore/ml for males and females respectively .

Key words : *Metarhizium anisopliae* , *Galleria mellonella* (L.) , fungal suspension

* the research is a part of the Ph. D. thesis by the second author .