وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تقييم كفاءة بعض الفطريات المرافقة لبعوض *Culex quinquefaciatus* في مكافحته حياتيا

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم/جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان

من قبل

ساره نائر عبد الأمير الجميلي

بإشراف

أ.م.د.محمد رضا عنون الحسناوي

١٤٣٨هـ ٢٠١٧ م

الأهداء

إلى الهادي البشير والسراج المنير...

سيدنا محمد صلى الله عليه وآله وسلم

إلى الذي بالامان أشعرني

والى طريق الخير أرشدني

...أبي

الى نور عيني وجنة أحلامي

الى من أغرقتني بحنانها

...أمي

الى سندي في الحياة

الى رفيق دربي

...زوجي

الى كل من يحبني ويسعده نجاحي أهدي ثمرة بحثي هذا...

الباحثة

بسم الله الرحمن الرحيم

قَالُواْ سُبحَنَكَ لاعِلمَ لَنَآ إِلّاَ مَا عَلّمتَنَآ إِنّكَ أَنتَ العَلِيمُ الحَكِيمُ

صدق الله العلي العظيم

(سورة البقرة – آية ٣٢)

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين **ابي القاسم محمد (صلى الله عليه وآله الطيبين الطاهرين) .**

يطيب لي وانا انهي رسالتي هذه ان اوجه أسمى آيات الشكر والأعتزاز الى أستاذي الفاضل **الدكتور محمد رضا عنون** لأقتراحه موضوع البحث وعلى توجيهاته القيمة التي كان لها أثر في انجاز هذا البحث متمنية له دوام التوفيق والأزدهار في حياته العلمية والعملية .

كما واتقدم بجزيل الشكر والأمتنان الى عمادة كلية العلوم /جامعة القادسية ممثلة بالدكتور **نبيل عبد عبد الرضا** والى رئاسة قسم علوم الحياة ممثلة بالدكتور **حبيب وسيل شبر** لما قدمه لي من رعاية وتسهيلات عديدة في الجانب الأداري والعلمي .

كذلك اقدم جزيل الشكر الى **الأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان** كلية الزراعة/قسم وقاية النبات/جامعة الكوفة ,**والدكتور ماجد كاظم الشلبي** جامعة القادسية /كلية التربية /قسم علوم الحياة لما بذلوه من جهد في تشخيص الفطريات . كما واقدم شكري الى الأستاذ الدكتور **هادي مزعل الربيعي** كلية علوم البنات/ جامعة بابل والدكتور **علي محمد غازي** كلية الطب البيطري/جامعة القادسية لما قدماه لي من مساعدة في جانب الإحصاء , كما اعرب عن شكري الى **الدكتورة غيداء عباس** كلية الطب البيطري/جامعة القادسية لتشخيصها عينات البعوض .

كما واقدم خالص شكري وامتناني الى زميلتي ايمان سلمان رهيف لمساعدتها لي في جمع العينات.

والى من بعثو في الأمل أعزائي الأهل والأحبة وزوجي الحبيب أقدم لهم الشكر والأمتنان وأن يطيل أعمارهم على مساعدتهم اياي وتحملهم العبء الأكبر أسأل الله أن يجعلهم ذخرا لي لمواصلة مسيرتي العلمية .

وأخيرا اقدم شكري الى كل من مد لي يد العون والمساعدة في انجاز هذا البحث والى كل من سار معي بقدم أو خط لي بقلم أو فاه لي بفم والله ولي التوفيق .

الباحثة

سارة

إقرار المقوم اللغوي

أشهد انه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة **ساره نائر عبد الأمير** الموسومة ب (**تقييم** كفاءة بعض الفطريات المرافقة لبعوض ***Culex quinquefaciatus*** في مكافحته حياتيا) .

التوقيع :

الأسم : خالد عبد فزاع

اللقب العلمي :أستاذ مساعد

العنوان:كلية التربية/جامعة القادسية

التاريخ: / / 2017

إقرار المشرف

أشـهد ان رسـالة الماجسـتير الموسـومة ب (**تقييم كفـاءة بعـض الفطريـات المرافقـة لبعـوض *Culex quinquefaciatus* فـي مكافحتـه حياتيـا**) قـد أعـدتها الطالبـة **سـاره نـائر عبـد الأميـر** بأشـرافي , وهـي جـزء مـن متطلبـات نيـل شـهادة الماجسـتير فـي علـوم الحياة /علم الحيوان .

التوقيع :

الأسم : د. محمد رضا عنون

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان:كلية العلوم /جامعة القادسية

التاريخ: / /2017

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشـارة الـى التوصـية المقدمـة مـن الأسـتاذ المشـرف احيـل هـذه الرسـالة الـى المقـومين اللغوي والعلمي لدراستها وبيان الرأي فيها .

Assis proof
Dr Habeeb Waseel Kadhum Shubber

التوقيع:

الأسم : د. حبيب وسيل شبر

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان:كلية العلوم /جامعة القادسية

التاريخ: / /2017

الـخلاصة

استهدف البحث الحالي عزل الفطريات المرافقة ليرقات البعوض واختيار بعض الأنواع التي لم تسجل مسبقا في اصابة اليرقات واستعمالها كعوامل مكافحة حيوية ضد مختلف ادوار حياة البعوضة *Culex quinquefasciatus* كما تم التحري عن عوامل ضراوة تلك الفطريات وتشخيص نواتج الأيض الثانوي لها بتقنية السائل ذي الأداء العالي (HPLC) وتم الحصول على النتائج الآتية :

1. تم عزل 28 نوعا من الفطريات والتي تعود الى 16 جنسا من الفطريات الكيسية واللاقحية والناقصة وتشخيصها وهذه الأجناس هي (*Aspergillus* و*Bipolaris* و*Fusarium* و *Penicillium* و*Trichoderma* و*Alternaria* و*Pythium* و*Rhizopus* و *Rhodotorula* و*Mucor* و*Candida* و*Metarhizium* و*Rhizoctonia* و*Beauveria* و *Chaetomium* و*Trichothecium*) وشخصت مختبريا وتم اختيار الفطريات *Aspergillus parasiticus*, *Bipolaris australiensis*, *Fusarium oxysporum* لكونها الأكثر تكرارا بين الأنواع المعزولة فضلا عن انها تعزل لأول مرة من يرقات البعوض المصابة طبيعيا .

2. أثرت تراكيز عالق أبواغ الفطريات في جميع أدوار حياة البعوضة قيد البحث وكان أكثر الفطريات تفوقا على باقي الفطريات الفطر *A. parasiticus* حيث بلغت نسبة هلاك البيوض 50.66% عند استعمال التركيز الأعلى من معلق الفطر 1×10^{6} بوغ/مل بعد 24 ساعة , بينما كانت نسبة هلاك كل من الأطوار اليرقية الأول والثاني والثالث والرابع وعلى التوالي (56,69, 43.66, 35.32)% بعد 120 ساعة , أما بالنسبة للعذارى فبلغت نسبة الهلاك 49 % عند استعمال التركيز الأعلى 1×10^{6} بوغ/مل بعد مرور 72 ساعة , أما عن تأثيره في البالغات فقد كانت نسبة الهلاك عند التركيز الأعلى ذاته 70% للذكور و59.66% للأناث بعد مرور 168 ساعة . أما عند استعمال التركيز الأعلى لكل من الفطرين *B. australiensis* و *F. oxysporum* فقد بلغت نسبة هلاك البيوض 40% و 29.66 % على التوالي وذلك بعد مرور 24 ساعة , في حين كانت نسبة قتل الأطوار اليرقية الأربعة وبالترتيب (55.33 ,47 ,45.33, 42)% , (51 ,44 ,37.23 ,36.63) % لكل منهما على التوالي وذلك بعد مرور 120 ساعة , وهلكت العذارى بنسبة 34 % و28.33 % بعد مرور 72 ساعة ,أما البالغات فهلكت بنسبة (54 % ,40 %) و (42% , 39.66 %) لكل من الذكور والأناث وذلك لكلا الفطرين على

التوالي بعد مرور 168 ساعة , وقد اشارت النتائج الى وجود علاقة طردية بين التراكيز ونسب الهلاك فضلا عن وجود علاقة عكسية بين نسب الهلاك وعمر اليرقة .

3. اما عن تأثير نواتج الايض الثانوية الخام لرواشح الفطريات المذكورة في الأطوار اليرقية الأربعة فتفوق أيضا فطر *A. parasiticus* حيث بلغت نسبة الهلاك التي سببها الفطر للأطوار اليرقية الأربعة (81.66, 70.33 ,63.33, 58.33)% على التوالي وبالتركيز الأعلى وبعد مرور 72 ساعة , بينما كانت نسب الهلاك عند استعمال الفطرين *B. australiensis* و *F. oxysporum* (55, 58, 63.33, 66.62) % و(46, 50.33, 56, 61.66)% عند التركيز الأعلى والمدة الزمنية نفسها وهذه النتائج أعلى تأثيرا من عالق أبواغ الفطريات .

4.كما أثرت نواتج الأيض الثانوية للفطر بعد تنقيتها بتقنية عمود الفصل Column Chromatography على الأطوار اليرقية الأربعة فكان تفوق الفطر *A. parasiticus* واضحا فسجل أعلى نسب هلاك بلغت (70, 73.63 , 85, 95) % على التوالي عند التركيز 1.8% وخلال 72 ساعة , بينما بلغت نسب الهلاك على الترتيب (55 , 59, 71, 75.66) % و (51, 53.33, 65.66 , 66.56) % عند استعمال الفطرين *B. australiensis* و *F. oxysporum* لنفس التركيز ولنفس المدة الزمنية .

5. أظهرت نتائج فحص HPLC ان رواشح الفطريات تحتوي على العديد من نواتج الأيض الثانوي والتي تعدعوامل ضراوة للفطريات حيث يفرز فطر *A. parasiticus* (سموم الأفلاتوكسينات B1 ,B2,G1,G2) كما يفرز الأنزيمات التالية (Alkaline protease, N- Serineprotenase, Aminopeptidase, acetyl-β- glcosaminindase) بينما تحتوي نواتج أيض الفطر *B. australiensis* على السموم (Ophiobolin I, Ophiobolin A , 6-epianhydroophiobolin , 6-epiophiobolin, Prehelminthosporo (PHL) أما انزيماته شملت (Pectinlyase ,Carboxy methyl cellulose , Glycosidase , Phenoloxidas , Serineprotenase,Endopeptidase) في حين وجدت المركبات التالية في الفطر *F. oxysporum* حيث كانت سموم الفطر (Fusaric , Zearalenone (Moniliformin, 9,10-dihydrofusaric acid,acid , أما انزيماته (Pectinlyase, Galactanase, Xylanase, Hemicellulase, Cellulase , Pectinmethyleserase , Chitinsynthase) ,وتعد هذه الطريقة من أفضل وأسرع الطرق للكشف عن نواتج الأيض الثانوي للفطريات .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	أ- ب
1	الفصل الأول/ المقدمة	2-1
2	الفصل الثاني/ استعراض المراجع	31-3
1-2	بعوض *Cx. quinquefasciatus* Say	3
1-1-2	دورة حياة البعوض	3
2-1-2	الأهمية الطبية	4
2-2	طرائق مكافحة البعوض	4
1-2-2	المكافحة الفيزيائية	4
1-1-2-2	مكافحة الأدوار غير البالغه	5
2-1-2-2	مكافحة البالغات	6
2-2-2	المكافحة الكيميائية Chemical control	6
3-2-2	المكافحة الوراثية Genetic control	7
4-2-2	المكافحة بأستعمال منظمات النمو الحشرية Insect growth regulator	7
5-2-2	المكافحة الحيوية Biological control	8
3-2	الفطريات الممرضة للحشرات	9
1-3-2	شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota	9
1-1-3-2	الفطر *Aspergillus parasiticus* Spear	9
1-1-1-3-2	الصفات التشخيصية للفطر *A. parasiticus*	10
2-1-1-3-2	نواتج الأيض الثانوية للفطر *A. parasiticus*	10
3-1-1-3-2	التخليق الحيوي للأفلاتوكسين Biosynthesis of Aflatoxin	14
4-1-1-3-2	التأثيرات السمية للأفلاتوكسينات في النظم الحيوية	20
5-1-1-3-2	علاقة الفطر *Aspergillus* بالحشرات	21
2-1-3-2	فطر *Bipolaris australenisis* Shoemaker	21
1-2-1-3-2	تصنيف الفطر ووصفه	21

2-2-1-3-2	علاقة الفطر *B. australiensis* بالحشرات	23
3-2-1-3-2	عوامل الضراوة في الفطر	23
3-1-3-2	فطر*Fusarium oxysporium* Schlecht	24
1-3-1-3-2	تصنيفه ووصفه	24
2-3-1-3-2	علاقة فطر *F. oxysporium* بالحشرات	25
3-3-1-3-2	امراضية فطر *F. oxysporium*	26
4 -2	العلاقات بين الفطريات والحشرات	30
3	الفصل الثالث/ طرائق العمل	42-32
1-3	موقع جمع العينات	34
1-1-3	عزل الفطريات	34
2-1-3	تشخيص ووصف الفطريات	35
2-3	اعداد المزرعة الدائمية لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*	35
3-3	الأوساط الزرعية	36
1-3-3	الأوساط الزرعية الخاصة بعزل الفطريات	36
1-1-3-3	وسط اكار السابرويد المدعم بخلاصة الخميرة Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract (SDAY)	36
2-1-3-3	وسط Peptone Yeast Glucose (PYG)	36
3-1-3-3	وسط Emerson ypps agar	37
4-1-3-3	وسط خلاصة الشعير Malt extract agar (MEA)	37
5-1-3-3	وسط خلاصة الخميرة Yeast extract agar(YEA)	37
6-1-3-3	وسط أكار البطاطا Potato dextrose agar (PDA)	37
4-3	تحضير المعلق الفطري للفطريات *B. , A. parasiticus* *F. oxysporium, australiensis*	38
5-3	الأختبار الحيوي Bioassay	39

1-5-3	الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطريات *B. australenisis, F .oxysporium* و *A. parasiticus* في مختلف ادوار حياة البعوضة *Cx. quinquefasciatus*	**39**
1-1-5-3	الأختبار الحيوي في البيوض	**39**
2-1-5-3	الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة	**39**
3-1-5-3	الأختبار الحيوي في العذراء	**40**
4-1-5-3	الأختبار الحيوي في البالغات	**40**
2-5-3	تحضير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B. australenisis* و *F. oxysporium*	**41**
1-2-5-3	تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B.australenisis* و *F. oxysporium* في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*	**41**
3-5-3	عزل نواتج الأيض الثانوية للفطريات *A. parasiticus* و *B. australenisis* و *F. oxysporium* وتنقيتها بعمود الفصل	**41**
1-3-5-3	الأختبار الحيوي لنواتج الأيض الثانوية المنقاة بعمود الفصل ضد الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	**42**
6-3	التحري عن عوامل الضراوة بواسطة اختبار كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي High Perform Liquid Chromatography (HPLC)	**43**
1-6-3	فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *A. parasiticus*	**43**
2-6-3	فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *B. australiensis*	**43**
3-6-3	فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *F. oxysporium*	**44**
4-6-3	الكشف عن انزيمات الفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium*	**44**
5-6-3	التحليل الأحصائي	**45**
4	الفصل الرابع/ النتائج والمناقشة	**79-46**
1-4	عزل الفطريات المرافقة للبعوض وتشخيصها	**46**

2-4	النسب المئوية لظهور الأجناس الفطرية وأعداد الأنواع المعزولة	**48**
3-4	عزل الفطريات *F. , B. australeinsis, A. parasiticus oxysporium* وتشخيصها	**50**
5-4	الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلقات الفطريات *A. parasiticus* و *B. australeinsis* و *F. oxysporium* كلا على حدة في مختلف ادوار الحياة للبعوضة *Cx. quinquefasciatus*	**53**
1-5-4	الأختبار الحيوي في البيوض	**53**
2-5-4	الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة	**55**
3-5-4	الأختبار الحيوي في دور العذراء	**58**
4-5-4	الأختبار الحيوي في البالغات	**59**
6-4	تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	**62**
7-4	الأختبار الحيوي لنواتج الأيض الثانوية للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* المنقاة بعمود الفصل في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	**65**
8-4	التحري عن عوامل الضراوة بواسطة اختبار كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium*	**70**
	الأستنتاجات والتوصيات	**81-80**
	المصادر	**111-82**
	الملاحق	**117-112**
	الخلاصة باللغة الأنكليزية	**b-a-c**

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الخواص الفيزيوكيميائية لسموم الأفلاتوكسينات	14
2	أنواع الفطريات المعزولة من يرقات بعوضة *Cx. quinquefasciatus*	47
3	الأجناس الفطرية وعدد أنواعها والنسبة المئوية لظهورها خلال المدة من شهر كانون الأول 2014 لغاية شهر حزيران 2016 المعزوله من البعوضة *Cx. quinquefasciatus*	49
4	النسب المئوية لظهور أنواع الأجناس الفطرية *Aspergillus* و*Bipolaris* و*Fusarium* خلال المدة من شهر كانون الأول لغاية شهر حزيران 2016	50
5	تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطريات *A. parasiticus* و *B. australeinsis* و *F. oxysporium* في بيوض بعوض *Cx. quinquefasciatus*	54
6	تأثير تراكيز مختلفه من معلقات الفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* في الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	57
7	تأثير تراكيز من معلق الفطريات *A .parasiticus* و *B. australiensis* و *F.oxysporium* في دور العذراء لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	59
8	تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطريات *A. parasiticus* و *B.australiensis* و *F. oxysporium* في بالغات (ذكور واناث) البعوض *Cx. quinquefasciatus*	61
9	تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* في الأطوار اليرقية الأربعه لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	64
10	تأثير مركبات نواتج الأيض الثانوية للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* المنقاة بعمود الفصل في الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	67

11	قيم ثابت التحرك النسبي R.F نواتج الأيض الثانوية للفطريات *A. parasiticus, B. australiensis, F. oxysporium* المنقاة بعمود الفصل في الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*	68
12	أزمان احتجاز المركبات في الفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporium* من خلال المقارنه مع عينات قياسية	72
13	تراكيز المركبات المفصولة (السموم والأنزيمات) للفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و*F. oxysporium*	73

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	الصيغة الكيميائية لسموم الأفلاتوكسين	13
2	التركيب الكيميائي لحامض (Linolenic acid) و (Linoleic acid)	17
3	تركيب الحامض الأميني Valine	18
4	تركيب الحامض الأميني Isoleucine	19
5	تركيب الحامض الأميني Leucine	20
6	التركيب الكيميائي Fusaric acid	27
7	التركيب الكيميائي Bikaverin	28
8	التركيب الكيميائي Enniatin	28
9	التركيب الكيميائي Moniliformine	29
10	التركيب الكيميائي Oxysporone	29
11	التركيب الكيميائي Fusaproliferin	30
12	عمود الفصل Column chromatography المستعمل في تنفية نواتج الأيض الثانوي للفطريات بأستعمال مادة السليكا جل Silica gel	42

13	A- مستعمرة فطر *A. parasiticus* على وسط اكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع , B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X	51
14	A-مستعمرة الفطر *B. australiensis* على وسط أكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع, B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X	52
15	A - مستعمرة الفطر *F. oxysporium* على وسط أكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع , B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X	52
16	صفيحة هلام السيليكا باستعمال بخار اليود للفطريات (A) *A. parasiticus* (B) , *B. australiensis* (C) , *F. oxysporium*	69
17	صفيحة هلام السيليكا باستعمال الاشعة فوق البنفسجية للفطريات (A) *A. parasiticus* (B) , *B. australiensis* (C) , *F. oxysporium*	69
18	بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لسموم الفطر *A. parasiticus* (A) القياسي (B)	74
19	بيانات كروماتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي لأنزيمات الفطر *parasiticus* (A) القياسي (B) العينة	75
20	بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لسموم الفطر *B. australiensis* (A) القياسي (B) العينة	76
21	بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لأنزيمات الفطر *B. australiensis* (A) القياسي (B) العينة	77
22	بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لسموم الفطر *F. oxysporium* (A) القياسي (B) العينة	78
23	بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لأنزيما ت الفطر *F. oxysporium* (A) القياسي (B) العينة	79

1- المقدمة

ان بعوض *Culex quinquefaciatus* Say أحد أنواع البعوض المعروفة بنقلها لمسببات الأمراض التي تفتك بحياة الأنسان والحيوانات الأخرى ويكثر هذا النوع في المناطق الأستوائية وشبه الأستوائية (Womack ,1993) من العالم . حيث ينقل هذا النوع مسببات الأمراض التالية منها الديدان الخيطية المسببة لداء الخيطيات اللمفاوي والفايروسات منها سانت لويس (CDC june,2007) وفايروس غرب النيل (Nash *et al.*,2001) المسبب التهاب الدماغ وكذلك فايروس زيكا Zikaالمسبب للحمى المعروفه ب Zika fever (Fernandes *et al.*,2016) كما وينقل ديدان الفيلاريا *Wuchereria bancrofti* والتي يصاب بها الملايين من البشر حول العالم والتي تسبب مايعرف بداء الفيل , وعرف كذلك بنقله طفيلي البلازموديوم *Plasmodium relictum* والذي يسبب ملاريا الطيور (Cirimotich *et al.*,2011) .

نظرا للأهمية الطبية لأنواع البعوض كافة فقد اهتم العلماء بمكافحته منذ مئات السنين واستعملت مختلف المبيدات الحشرية الكيميائية الا ان هذه المبيدات سببت أضرارا بلأنسان ومحيطه البيئي, ومن جانب آخر اكتسبت هذه الحشرات المستهدفة القدرة على التكيف بسرعه مع المواد السامة وعلى البدء في تطوير مناعة ضدها (Ibaraa and Castero, 2008).

اشارت منظمة الصحة العالمية (2013) WHO الى ان حوالي 23-25 مليون من الأشخاص يصابون سنويا بسموم المبيدات وان مايقارب 20 الف شخص منهم يموتون سنويا (Schmutterer,2002).

لذلك دعت الحاجة لتطوير بدائل غير سامة وآمنة للأنسان والحيوان تمثل أحد طرائقها المكافحة الحياتية والمقصود بها تخفيض المجموعة السكانية للآفه أو النوع الضار الى الحد الذي لايشكل معه ضررا بالغا للأنسان أو حيواناته أو نشاطاته وذلك بواسطة أنواع احيائية اخرى من الحشرات أو الديدان الخيطية أو البكتريا أو الفطريات أو غيرها , وعدت الفطريات الممرضة للحشرات من العوامل المهمه وذلك لأنشارها وتواجدها الواسع في الطبيعة فضلا عن كونها غير مكلفة وتمتاز بتخصصها العالي لمواجهة آفات محدده (Rajesh *et al.*,2014;Shiff ,2002).

يعد الفطر *Aspergillus parasiticus* Spear أحد الفطريات المرافقة للحشرات ويعود لشعبة الفطريات الكيسية Ascomycota (Hom *et al.*,2009) , وأختبر تأثيره في يرقات بعوض *Cx. quinquefaciatus* (Govindarajan *et al.*,2005) .

أما الفطر *Bipolaris australiensis* Shoemaker فينتمي لشعبة الفطريات الكيسية , وقد اشير الى تأثيره في الآفات الحشرية المتغذية على الأعشاب ومنها خنفساء برغوث الذرة *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle) التي تعود لرتبة غمدية الأجنحه Coleoptera وللعائلة Chrysomelidae (Parrish and Fike,2005) .

وبالنظر للأهمية الطبية لبعوض *Cx. quinquefasciatus* والتقصي عن وسائل جديدة لمكافحته حياتيا ولأن الأبحاث السابقة التي أسهمت بعزل انواع محلية من الفطريات الممرضة قليلة جدا فضلا على انها لم تتطرق مسبقا الى الفطرين *Aspergillus parasiticus* و*Bipolaris australiensis*.

لذا استهدف البحث الحالي عزل الفطرين المذكورين من يرقات البعوض المصابة طبيعيا لأول مرة في العراق وتقويم كفاءتهما في مقاومة بعوض *Cx. quinquefasciatus* وضمن المحاور الآتية:

1- عزل الفطريات المرافقة للبعوض في البيئة المحلية وتشخيصها واختيار بعض الأنواع التي لم يتم تسجيلها سابقا في اصابة يرقات البعوض ومقارنتها مع فطر Schlecht *Fusarium oxysporum* وذلك لغرض معرفة أي منها أقوى في اصابة اليرقات .

2-الأختبار الحيوي Bioassay لعالق أبواغ الفطريات المعزولة في الفقرة (1) في ادوار الحياة (البيضة,اليرقة (أربعة أطوار) ,العذراء,البالغة (ذكور واناث) للبعوضة المذكورة.

3-الأختبار الحيوي لتراكيز مختلفة من نواتج الأيض الثانوية الخام لرواشح الفطريات المذكورة في الأطوار اليرقية الأربعة للبعوضه قيد البحث.

4- تنقية نواتج الأيض الثانوية لبعض الفطريات المعزولة في الفقره (1) بطريقة عمود الفصل (Column chromatography) واستعمال النواتج المنقاة ضد الأطوار اليرقية الأربعة للبعوضة المذكوره.

5- التحري عن عوامل الضراوة بواسطة اختبار كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) .

2- استعراض المراجع

2-1:بعوض *Cx. quinquefasciatus* Say

ينتمي بعوض *Cx. quinquefasciatus* Say الى العويلة Subfamily:Culicinae من العائلة Family:Culicidae التابعة لرتبة ثنائية الأجنحه Order:Diptera (ابو الحب,1979) ويسمى هذا النوع من البعوض بالبعوض المنزلي لصلته القريبه بالأنسان.

وقد ذكر Hill and Connelly (2013) اسماء مرادفه لبعوض *Cx. quinquefasciatus* وهي:

- *Cx. pungens* Wiedemann,1828
- *Cx. fatigans* Wiedemann,1828
- *Cx. auestuans* Wiedemann,1828
- *Cx. acer* Walker,1848
- *Cx. cingulatus* Doleschall,1856

2-1-1:دورة حياة البعوض:

تضع انثى البعوض البالغة بيوضها في المياه الساكنه والغنية بالمواد العضوية مثل البرك والمستنقعات واماكن تصريف المياه (Mosquito Information website,2009) تكون تغذية الدور اليرقي بصورة رئيسية على المواد العضوية , ويمر هذا الدور بأربعة اطوار وعندما يوشك الطور الرابع على الأنتهاء تتوقف عن التغذي وتتحول الى دور العذراء او ماتعرف بالخادرة ثم تتحول الى البالغة , وان الوقت اللازم لنمو الأطوار الأربعه تحت الظروف الطبيعية يعتمد على درجة الحرارة ,ويعد بعوض *Cx. quinquefasciatus* من الحشرات مختلفة التغذية حيث يتغذى على اللبائن والطيور خلال الليل وان الذكور فقط تتغذى على السكريات,اما الأناث فتتغذى على الدم لأنضاج البيوض وبعد ان تهضم وجبة الدم تتطور البيوض وبعد ذلك تختار الأنثى مكانا ملائما لوضع البيض,وبهذا تبدأ دورة الحياة من جديد وتضع الأنثى الواحدة مايقارب خمس قوارب بيض خلال حياتها (Gerberg *et al.*,1994).

2-1-2: الأهمية الطبية:

يعد بعوض *Cx. quinquefasciatus* ناقلا رئيسيا للعديد من الممرضات للأنسان والحيوان فهو الناقل الرئيسي لعدة انواع من ديدان الفيلاريا *Brugia timoria,B.malayi, Wuchereria bancrofti* المسببه لداء الفيل.كما وانه ناقل لعدة انواع من الفيروسات والتي تسبب التهاب الدماغ ومنها:

- فايروس Rift Valley Fever Viruse
- فايروس غرب النيل West Nile Viruse
- فايروس (Ross Viruse)
- فايروس Chikungunya Viruse
- ناقل رئيسي لفايروس Sant Louis Encephalitis Viruse حيث تزداد الأصابة بهذا الفايروس خلال فصل الربيع لأن البعوض ينقله من الطيور.
- فايروس التهاب الدماغ الياباني (Japanese Encephalitis)
- Zika virus

(CDCJune,2007; Foster and Walker ,2002)

2-2:طرائق مكافحة البعوض:

لغرض اختيار الطريقة الأفضل لمكافحة البعوض يجب توفر الشروط الآتية (Becker *et al.*,2010)

- تقليل اعداد البعوض وذلك بمعاملته حيويا في أمد طويل وبأقل كلفة.
- تقليل كمية المبيدات المستعملة في البيئة ضد البعوض.
- اختيار طريقة لاتؤثر على الأنسان او الحيوان اي الحفاظ على الصحه العامه.
- تقدير نسب الكلفة والعائد المتوقع من طرائق المكافحه المعينه مع اخذ فكره عن اختيار احسن الطرائق العلاجية.

وتتلخص طرائق المكافحه كلآتي:

2-2-1:المكافحة الفيزيائية: وتشمل هذه الطريقة:

2-2-1-1:مكافحة الأدوار غير البالغه بأستعمال

1- النفط

يعد النفط ساما ليرقات البعوض حيث يشكل طبقة على سطح الماء يمنع البالغات من وضع البيوض (Beehler and Mulla,1996).

2- Surface films and polystyrene Beads

هي عبارة عن شرائح سميكة مكونه من مادة البولستيرين وتوضع على سطح الماء حيث تمنع البالغات من وضع البيض كما وتؤثر هذه الطريقة أيضا في العذارى واليرقات لأنها لاتستطيع اختراق هذه الطبقة لأخذ الأوكسجين (Garrett and White,1977).

3 - Liparol

ان هذه المادة عباره عن خليط من البارافين Paraffin و Soybean Lecithin مع سلاسل الكاربون والحاوية على 12-14 ذرة كاربون .

ان مادة Lecithin عبارة عن جزيئات كبيرة تحتوي على نهايات محبة للماء أو كارهه للماء حيث ترتبط بالأنبوب التنفسي لليرقه أو الأبواق التنفسيه في العذارى بحيث يسمح للماء بالدخول الى الأنابيب او الأبواق ويؤدي الى قتلها حيث تقل كمية الأوكسجين المذاب ولزيادة فعالية هذه المادة يتم مزجها مع زيت فول الصويا . وتعد هذه الطريقة فعاله ضد الطور اليرقي الرابع والعذارى حيث يحصل هلاكها بعد ساعه من استعمال هذه التقنية (Becker et al,2010,Schnetter and Engler,1978).

4- Monomolecular Surface Film (MSF)

تتوفر تجاريا بشكل مادة غير ايونية Non ionic products وتعد هذه الطريقة فعالة لأنها تتكون من جزء غير أيوني حيث تنتشر هذه المادة بسرعة في الماء وتكون طبقة على سطح الماء تمنع نمو الأدوار غير البالغة حيث تؤثر على القصبات التنفسية مسببه صدمة ومايعرف anoxia (Ali,2000).

5 - Polystyrene Beads

في هذه التقنية يتم استعمال طبقات طافية من مادة البلاستك سمكها 1سم على سطح الماء حيث تمنع تنفس اليرقات وتكون غير قابلة للتحلل وذات امد طويل للمعاملة وعندما تتحد المادة العضوية Diethylcarbamazine(DEC) مع هذه الطبقات تؤدي الى السيطرة على النواقل بصورة اسرع بينما عند استعمالها لوحدها لاتعطي نتيجة قتل عالية (Curtis *et al*.,2002).

2-2-1-2: مكافحة البالغات

هناك عدة طرائق لمكافحة البالغات منها الصيد الكثيف Mass trapping لكن هذه الطريقة أصبحت محدودة الأستعمال,ويمكن تطوير هذه الطريقة وذلك بوسائل عدة أو مجموعه من الأجهزه المتوفره تجاريا مثل الضوء وثنائي اوكسيد الكاربون وبخار الماء والحراره والأوكتينول وجميعها جاذب للبعوض (Kline,2007) .

ان استعمال المكافحة الفيزيائية لها فوائد عديدة منها ان البعوض يكون غير قادر على تطوير مقاومة ضدها على عكس المبيدات الكيميائية كما انها تساهم في مكافحة جميع ادوار البعوض البالغه وغير البالغه

. (Becker *et al*.,2010)

2-2-2:المكافحة الكيميائية Chemical control:

هناك أربع مجاميع للمبيدات الكيميائية (Becker *et al*.,2010; Zaim and Jambulingam 2007,) وهي:

المبيد	**تأثيره على البعوض**
Chlorinated hydrocarbos-1	يؤثر على المعدة
Organophosphate-2	له تأثير عصبي مثبط لمادة الأسيتايل كولين استريز
Carbamates-3	عصبي يثبط مادة اسيتايل كولين استريز
Pyrethroids-4	تأثير عصبي يؤثر على قنوات الصوديوم

لقد عدت هذه المكافحة الأكثر فعالية في القضاء على البعوض لأنها ذات تأثير سريع ,لكن ايضا نجمت عنها اضرار كثيرة نتيجة لأستعمالها المفرط والعشوائي مما أدى الى ظهور مقاومة في النواقل وتلوث للبيئة والسمية العالية للمركبات الكيميائية للأنسان والحيوان والكلفة العالية لها فضلا عن بقاء هذه المبيدات في التربة والأنسجة النباتية والحيوانية (Rajesh *et al*.,2014) .

3-2-2:المكافحة الوراثية Genetic control:

هناك عدة طرائق للمكافحة الوراثية لغرض السيطره على البعوض ومنها استعمال الحشرات العقيمة أو ماتسمى بالذكور العقيمة لأن الذكور يمكن ان تعقم بسهولة وعند اطلاقها

فأنها تتزاوج مع اناث برية خصبة لاتعطي بيوضها العقيمة نسلا ومن ثم تؤدي الى تقليل ذريتها(Helinski *et al*.,2006) .كما وتوجد هناك طريقة اخرى من طرق المكافحة الوراثية تتضمن استخدام هجائن عقيمة Sterile hybrids تتضمن ادخال سلالات غريبه مما يشجع في التأثير على المجتمع حيث يتم تضريب السلالات وتحت النواع أو الأنواع القريبة قد يؤدي الى انتاج جيل هجين عقيم لكنه حيوي كما وبلأمكان تربية الهجائن العقيمة واطلاقها لأبادة المجتمعات الطبيعية (Catteruccia *et al*.,2005) .كما وهناك طريقة تتضمن نقل الكروموسومات عن طريق ازالة الصفات غير المرغوبه لبعض الحشرات مثل قابليتها على نقل مسببات الأمراض وتسمى هذه الطريقه Chromosomal translocation (CT) (Franz *et al*.,2006) . تمتاز المكافحة الوراثية بالتخصص وبأنها لاتؤثر على الأحياء الأخرى غير المستهدفة كما في المكافحة الكيميائية كما انها غير مكلفة اقتصاديا وتتزايد كفاءتها كلما انخفضت كثافة المجتمعات المستهدفة (Becker *et al*.,2010) .

2-2- 4:المكافحة بأستعمال منظمات النمو الحشرية Insect growth regulator :

تعرف منظمات النمو بأنها مبيدات حشرية من الجيل الثالث وهي مواد كيميائية تشبه في تركيبها الهرمونات الحشرية واحيانا تكون بقوة أكثر من (300) ضعف الهرمونات الأصلية وهي مواد فعالة للسيطرة على مختلف الآفات الحشرية ,كما تظهر فعالية عالية ضد البعوض(Amalraj *et al*.,1988)

ويوجد منها نوعان هما نظيرهرمون الصبا Juvenile hormone analogs الذي يتداخل مع عملية الأنسلاخ والتي تؤدي الى انسلاخ مبكر كما قد يسبب تشوهات في الأجنحه والأعضاء التناسلية مثل Fenoxycarb وMethoprene (Seccacini *et al*.,2008) .أما النوع الآخر هو مثبطات تصنيع الكايتين الذي يمنع تخليق الكايتين كما انه يمنع وضع البيوض مثل diflubenzuron (Dimilin) (Thavara *et al*.,2007) .ومن عيوب هذه الطريقة هو عدم وجود التخصص كما انها تكون فعالة في مراحل معينة من تطور الحشرة كما انها ضعيفة التأثير في البالغات عند رشها (Becker *et al*.,2010) .

2-2- 5 :المكافحة الحياتية Biological control :

تتلخص عوامل المكافحة الحيوية بما يلي: (Kamareddine,2012)

1-الفطريات الممرضة للحشرات مثل *Coelomyces, Culicinomyces, Beauveria, Metarhizium, Lagenidium, Entomophthora* حيث يكون تأثيرها في عادات التغذية وسلوك النواقل ومن ثم زيادة انتاج نواتج الأيض الثانوي في التجويف الدموي للحشرات.

2-البكتريا الممرضة للحشرات مثل *Bacillus thuringiensis, B. sphaericus,* Acetic acid bacteria (genus *Asaia*) ,WMeLPOp strain of *Wolbachia* ويكون تأثير هذه الأنواع بقتل الأطوار غير البالغة (اليرقات) حيث يؤثر في أمعاء اليرقات عن طريق افراز سموم بروتينية.

3-الأسماك مثل *Gambusia affinis, Cyprinodontidae, Cyprinu scarpio, Tilapia* spp., *Catla , Cirrhinus mrigala , Aphanius dispar*

حيث تقلل من اعداد اليرقات.

4-الطفيليات مثل *Vauraia culicis , Edhazardia aedis* حيث تؤثر في الأدوار غير البالغة (اليرقات والعذارى) والأدوار البالغة أي المكافحة ذات الأمد الطويل.

5-الفايروسات مثل فايروس Densonucleosis viruses or denso viruses (DNVs) يعمل على اختزال اعداد البعوض وذلك بتكوين جينات ضد الطفيلي او يولد سموما داخل خلايا البعوض ضد الطفيليات.

6-الديدان الخيطية مثل ديدان *Romanomermis* and *Romanomer misiyengari culicivorax* حيث تعمل على تقليل أعداد البعوض عن طريق التأثير في السلوك التكاثري مما يؤدي للعقم وكذلك يقلل من معدلات الأصابة بالطفيليات.

2-3:الفطريات الممرضة للحشرات

تتوزع الفطريات الممرضة للحشرات على أربع شعب هي البازيدية *Basidiomycota* والكيسية *Ascomycota* واللاقحية *Zygomycota* والناقصة *Deuteromycota*

(Samson *et al*.,1988).

2-3-1:شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota

تعد الفطريات الكيسية واسعة الأنتشار في التربه والمياه ومترممه على بقايا النباتات ومن مميزاتها تكوين الأبواغ الجنسية Spores والتي تكون محمولة بداخل كيس Ascus ويحتوي كل كيس على 8 أبواغ يطلق عليها Ascospores ,وتضم هذه الشعبة أصنافا عديدة أهمها صنف Class: Sordariomycetes الذي يعرف سابقا بالفطريات القارورية Pyrenomycetes ومن أهم الرتب التي تعود لهذا الصنف هي رتبة Order:Hypocreales التي تضم أجناسا عديدة من الفطريات الممرضة للحشرات .حيث يسمى الطور اللاجنسي للفطر بال Anamorph والطور الجنسي يعرف بال Telomorph.

2-3-1-1:الفطر *Aspergillus parasiticus* Spear

ان تصنيف الفطر على وفق ماجاء به (Ellis *et al*.,2007) :

Kingdom:Fungi

Subkingdom:Eumycotina

Phylum:Ascomycota

Class:Eurotiomycetes

Order:Eurotiales

Family:Trichocomaceae

Genus: ***Aspergillus***

Species:***Parasiticus*** **Spear**

2-3-1-1-1:الصفات التشخيصية للفطر *A. parasiticus*

تنمو مستعمرات النوع *A. parasiticus* على وسط PDA(Potato Dextrose Agar)معطية لونا اخضرا غامقا والكونيدات في هذا النوع تكون مائلة للشكل البيضوي وتكون نتوءاتها مشوكة بشكل ملحوظ (Rodrigues *et al*.,2007a).

وان الطور الجنسي أو الحالة الجنسية للفطر تم اكتشافها من قبل طبيب في جمعية المزارعين في نبات قصب السكر عام ١٩١٢ في جزر هاواي واوهاوا حيث لاحظ ان ابواغ الفطريات تنتشر على نباتات قصب السكر بسبب هلاك حشرة البق الدقيقي Mealy bugs الذي يتغذى على اوراق هذه النباتات وجاء الأهتمام بهذا الفطر مع اكتشاف الأفلاتوكسينات التي تنتجها هذه الفطريات (Culle and Newbernr,1994)

2-3-1-1-2: نواتج الأيض الثانوية للفطر *A. parasiticus* :

ينتج هذا الفطر :

أولا:سموم الأفلاتوكسينات Aflatoxins:

الأفلاتوكسينات هي مركبات أيضية ثانوية مسرطنة وسامه تعود الى مجموعة ثنائي الفيورانوكومارين (Difuranocoumarine) وتنتجها مجموعة من الفطريات أهمها *A. flavus* والذي ينتج كلا من الأفلاتوكسين B1,B2 والفطر *A. parasiticus* المعروف بانتاجه لأفلاتوكسينات B1,B2,G1,G2 ومن الفطريات الأخرى التي تنتج السم أفلاتوكسين B1 لكن بكفاءة أقل *A. niger, A. wentii, A. rubber* وأنواع من الجنس *Penicillium* مثل *P. citrinum, P. frequentans, P. puberulum* فضلا عن الفطر *Rhizopus sp.* (Vanwalbeek *et al*.,1968) .

تمتاز مجموعة الأفلاتوكسينات بشدة توهج الفلورة المنبعث منها عند تعرضة للموجات الطويلة من الأشعة فوق البنفسجية وهذه الخاصية تجعل من الممكن الكشف عن تواجد هذه المركبات السامه بمستويات واطئة جدا (0.5 نانوغرام أو اقل من ذلك لكل بقعة من بقع الكشف المثبته على ألواح الفحص الكروماتوغرافي) كما تمتاز بكونها بلورات عديمة اللون أو بيض تذوب بشكل كامل في المذيبات متوسطة القطبية مثل الكلوروفورم والميثانول وبشكل خاص في مذيب اوكسيد الكبريت ثنائي المثيل الذي يستعمل كمادة حاملة عند تجريع الأفلاتوكسينات

للحيوانات المختبرية أما قابلية ذوبانه في الماء فهي محدودة اذ تكون بحدود (10-20) ملغم/لتر,لاتتحطم بالمعاملات الحرارية اثناء الطبخ الأعتيادي او البسترة لوجود حلقة الاكتون في جزيئة الأفلاتوكسين والتي يجعلها أكثر عرضة للتحلل المائي في المحاليل القاعدية (ابراهيم والجبوري ,1998).

يوجد في الوقت الحاضر (18) نوع مختلف من الأفلاتوكسينات ,وتعد الأنواع B1,B2,G1,G2 من أهم أنواع الأفلاتوكسينات المدروسة زيادة على M1, M2 اللذان يمثلان الناتج الأيضي لل B1 و B2 على التوالي (Carlson *et al*.,2002) .

تقسم سموم الأفلاتوكسينات الى مجموعتين رئيسيتين هما :

1- مجموعة سم افلاتوكسين B (difuranocoumaro cyclopentenone series) :

وتضم سم افلاتوكسين $B_1,B_2,B_{2a},M_1,M_2,M_{2a}$,Ro,P1,Q1 وجميعها تعطي عند تعريضها للأشعه فوق البنفسجية وميضا أزرق ماعدا M_{2a} الذي يعطي وميضا أخضر مزرق.

2- مجموعة سموم الأفلاتوكسين G :

وتضم سم الأفلاتوكسين $G_1,G_2,G_{2a},GM_1,GM_2,GM_{2a},B_3$ وجميعها تعطي عند تعريضها للأشعه فوق البنفسجية وميضا ازرق مخضر ماعدا سم افلاتوكسين B_3 فيعطي لونا أزرق (نوار والناطور,1989).

ويعد الباحث Hartley *et al*.(1963) اول من عزل واستخلص أربعة أنواع من الأفلاتوكسينات المنتجة من قبل *A. flavus* و*A. parasiticus* بشكل بقع متألقة اطلق عليه B_1,B_2,G_1,G_2 اذ تشير الأحرف الى لون التألق الذي تظهره البقع على صفائح هلام الطبقة الرقيقة (TLC) عند فحصها تحت الأشعه فوق البنفسجية , ويرمز الحرف B الى اللون الأزرق والحرف G الى اللون الأخضر أما الأرقام 1 و2 فترمز الى معامل الترحيل Rate of flow(Rf) للبقع على صفائح ال TLC (Cocker *et al*.,1984)

كما تم التعرف على نوعين آخرين من الأفلاتوكسينات وهما M1, M2 وتسمى سموم الحليب Milk toxins وتنتج من الأفلاتوكسين B1,B2 على التوالي بعملية Hydroxylation في الحيوانات الحلوبه (الأبقار والأغنام) التي تتغذى على عليقة ملوثة بسم الأفلاتوكسين B1,B2 .

تفرز سموم الحليب M1,M2 بمعدل يقارب %(1.5) من معدل الأفلاتوكسين B المستهلك (Forbish *et al*.,1986) .

درست الأفلاتوكسينات بعد ذلك بشكل مستفيض وقسمت حسب درجة سميتها ونسب تواجدها في الأغذية والأعلاف وسم الأفلاتوكسين B1 أكثرها خطوره وتواجدا في الأغذية البشرية والأعلاف من بقية السموم يليه الأفلاتوكسين G1 ثم B2 وG2 (Turcksess and Wood,1997) .

وتم تحديد الصيغة الجزيئية لمركبات سموم الأفلاتوكسين B1 وG1 من قبل Asao *et al*.(1963) بينما حددت الصيغة التركيبية لسم الأفلاتوكسين B2 وG2 من قبل Chang *et al*.(1963) وقد وجد ان الفطر *A. parasiticus* ينتج B1,B2,G1,G2 (Agarwal and Sinclair,1996) .شكل (1).

وهناك مشتقات هيدروكسيلية لهذه الأفلاتوكسينات الرئيسية يمكن ان تنتج من قبل أنواع الفطر *Aspergillus* وتسمى الأفلاتوكسين B2a وG2a (Dutton and Heathcote,1969) .

3-1-1-3-2:التخليق الحيوي للأفلاتوكسين Biosynthesis of Aflatoxin

الأفلاتوكسينات تتكون من خلال المسار الحيوي الذي يسمى Polyketide pathway والذي يمثل المسلك الرئيسي لعملية الأيض في الفطريات .تعقب عمليات الأيض الثانوية عمليات الأيض الأولية وهي تحدث بعد طور النمو المتوازن Stationary phase .ويشمل المسار الحيوي لعملية Polyketide تكثيف لوحدة من acetyle unit مع وحدتين من ال Malonyl يرافقها فقدان جزيئة CO_2 .

ان عملية التخليق الحيوي تستغل مركبات الخلات بشكلها الفعال ومنها Acetyl-COA والذي يتفاعل مع Malonate بشكل Malonyl –COA (Yu *et al*.,1998; Moss and Smith,1985) ان تفاعل كل من الخلات مع Malonate يحدث خلال تكوين Adenosine Tri Phosphate (ATP) عند تفاعل الأسترات مع المرافق الأنزيمي A (COA) أو مع Pentetheine. ان عملية التخليق تتضمن تفاعل acetyl-COA مع وحدتي Malonyl-COA والتي تشابه عملية التخليق الحيوي للأحماض الدهنية لانتاج Hexanoate والذي يتفاعل بدوره بصورة متعاقبة مع سبع وحدات من ال Manolate

. (Bennett and Christensen ,1983)

منتجة مرحلة وسطية أساسية أو سلسلة Polyketide وكما يلي :

R – CO – CH_2 – CO – CH_2 – CO – CH_2 –CO – CH_2 – CO – S – COA

حيث ان R تمثل الجذور الحرة للبادءات المختلفة (Betina ,1989). تمر هذه المركبات بعد ذلك بمرحلة Cyclization و Aromatization لتعطي في النهاية المركب الوسطي الثابت والذي يدعى Norsolorinic acid والحامض الأخير يمر بعدة تحولات أيضية ليتكون بالنهاية سم Aflatoxin B_1 (Cleveland and Bhatnagar ,1990) وخلاصة القول فأنه يبدو ان المسلك الأيضي العام Polyktide . وفقا لما ذكره Yabe and Hamasaki (1993a) تسلك مركبات الكيتيدات المتعددة الخطوات التالية أثناء عملية التخليق :

Hexanoyl COA precursor

⇓

Norsolorinic

⇓

Averantin(AVN)

⇓

Hydroxyaverantin (HAVN)

⇓

Averufin (AVF)

⇓

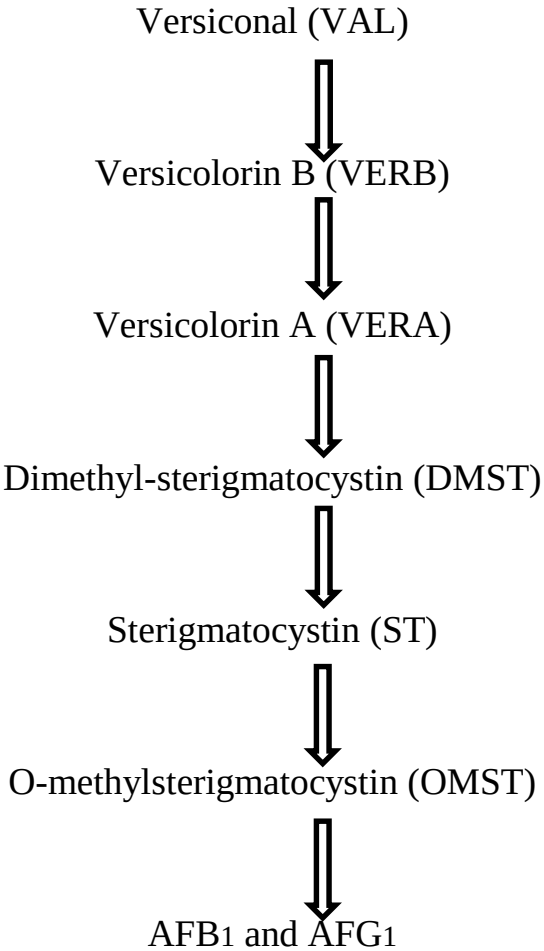
Hydroxyversicolorone (HVN)

⇓

⇓

Versiconal hemiacetal acetate (VHA)

⇓



المخطط (1) التخليق الحيوي للافلاتوكسين AFG1 وAFB1 (Yab and Hamasaki ,1993a)

ثانيا: الأحماض الدهنية Fatty acids

ينتج فطر *A. parasiticus* أيضا الحوامض الدهنية وهما linoleic acid ($C_{18}H_{32}O_2$) وlinoleinc acid (C18H30O2) ,اللذان لهما دور بتحفيز عملية التكاثر الجنسي في فطر *Aspergillus* (Calvo *et al*.,1999) .ويعد هذان النوعان أحماض غير مشبعه والأكثر شيوعا التي ينتجها الفطر *Aspergillus* ; Evans *et al*.,1986; (Bewely and Black,1985;

Calvo *et al*.,2001)

ثالثا : كحول الأيثانول ومواد أخرى:

ينتج فطر *A. parasiticus* كحول الأيثانول وبعض الدهون والأحماض العضوية وأسترات (Kroken,2009) .

2-3-1-1-4: التأثيرات السمية للأفلاتوكسينات في النظم الحيوية :

حظيت سموم الأفلاتوكسينات بأهتمام كبير جدا بسبب تأثيرها الفعال في الأنسان والحيوان وكذلك الحشرات (Ellis *et al*.,1991) .فهي تعد من أهم مسببات سرطان الكبد في الأنسان (Groopman *et al*.,1991) كما ان لها تأثيرات مثبطة للجهاز المناعي فضلا عن تأثيراتها المطفره واحداثها للتشوهات الخلقية(Fannelli *et al*.,1988; Massey *et al*.,1995) .

ويكون للجرعة دور كبير في تحديد نوع الإصابة بسموم الأفلاتوكسين حيث تؤدي الجرعة العالية عند التعرض لها الى تسمم حاد ينتج عنه تدمير مباشر للكبد ومن اعراضه ايضا النزف, وتنخر الكبد ,وانسداد قناة الصفراء, ويؤدي بالنهاية الى الموت, في حين تؤدي الجرعة الواطئة غير المميتة الى تأثيرات مناعية في الغالب وكلا الجرعتين العالية والواطئة للأفلاتوكسين لهما تأثير تراكمي خطر يؤدي الى حدوث السرطان(Adhikari *et al*.,1997).

وتختلف جرع الأفلاتوكسين المميتة بأختلاف انواع الأفلاتوكسين اذ ان AFB1 هو أكثرها خطورة يليه AFG1, اما الأفلاتوكسين B2,G2 فإنهما أقل خطورة من الأفلاتوكسين B1 أما الأفلاتوكسين M1 فيعد مسببا للسرطان عند الإنسان والحيوان(Cocker *et al*.,1984 ; Smith *et a*l.,1994).

أما بالنسبة لتأثير الأفلاتوكسينات في الحشرات فقد تم دراسة تأثيره على ثلاث أنواع من الحشرات هي *Aedes aegypti, Musca domestica and Drosophila melanogaster* وفي كل الأنواع تسبب الأفلاتوكسين في انخفاض انتاج البيض ونسبة الفقس (Matsumura and Knight,1967) .

2-3-1-1-5: علاقة الفطر *Aspergillus* بالحشرات:

عدتّ أنواع من الفطر *Aspergillus* عوامل مكافحة حيوية لحشرات عديدة حيث ان أنواع *A. fumigatus ,A. nidulans ,A. flavus* تصيب يرقات وبالغات نحل العسل مسببة مرض الحضنة الحجرية Stone brood ويعتمد نجاح الأصابة على وراثة الفطر كسرعة نموه وقدرته

على استغلال مواد الحشرة من أجل النمو وكذلك قدرته على انتاج انزيمات محللة للأدمة والسموم والتغلب على مقاومة الحشرة (Cole and Rolinson,1972).

وكما اختبرتأثير الفطر*A. parasiticus* على بعوض *Cx. quinquefasciatus* كما مر سابقا (Govindarajan *et al*.,2005).

كما وجد ايضا ان للفطر *A.flavus* تأثير على ديدان الحرير حيث يفرز هذا الفطر سموم الأفلاتوكسين من نوع B1 ذات السمية الشديدة (Raper *et al*.,1965) . ووجدت المركبات الأيضية التالية في هذا الفطر والتي قد يكون لها دور في قتل الحشرة حيث يفرز فطر *A. parasiticus* (سموم الأفلاتوكسينات B1 ,B2,G1,G2) كما يفرز الأنزيمات التالية (Alkaline protease, N-acetyl-β- glcosaminindase, Aminopeptidase , Serineprotenase) .

2-1-3-2: فطر*Bipolaris australenisis* Shoemaker :

1-2-1-3-2:تصنيف الفطر ووصفه:

ان تصنيف الفطر وفق ماجاء به (Ellis *et al*.,1971):

Kingdom:Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Dothideomycetes

Order: Pleosporales

Family: Pleosporaceae

Genus:*Bipolaris*

Species:*australenisis* Shoemaker

تكون مستعمرات الفطر في بداية نموها ذات لون أبيض ثم تتحول بعد مرور ثلاث أيام الى لون رمادي يميل الى البني المسود غالبا ويمتلك شكل مخمليا عند زراعته على وسط أكار البطاطا PDA في طبق البتري (Sivanesan,1987). كما ويضم هذا الجنس أنواعا كثيرة ممرضة

للنبات بصورة عامه تتوزع بكثره حول العالم ويسبب له أمراضا مختلفة (Berbee *et al*., 1999) .

ان الشكل أو الطور الجنسي للفطر غير معروف في الطبيعه لكنه قد يتكون تحت ظروف مختبريه خاصة(Alcorn,1990; Tsuda & Ueyama,1985).

بعض أنواع الجنس *Bipolaris* تستخدم على نطاق واسع في تطبيقات التكنلوجيا الحيوية والوراثية وذلك لأنه يسبب أمراضا عديدة للنبات وكذلك الأنسان (Ohm *et al*., 2012).

وعرف هذا الجنس قديما (*Cochliobolus*) ,لكن *Bipolaris* الأسم الأكثر شيوعا واستخداما من قبل علماء التصنيف ,كما ان هذا الأسم مدعوما من قبل اللجنة الدولية لتصنيف الفطريات (Rossman *et al*., 2013).

2-2-1-3-2:علاقة الفطر *B. australiensis* بالحشرات:

لم يذكر استعمال الفطر في مكافحة الآفات الحشرية في الأبحاث السابقة .وان المعلومات حوله قليله بالرغم من التقصي ولمدة غير قصيرة في شبكة المعلومات العالمية (الأنترنت) والمجلات العلمية ذات الأختصاص وقد ذكر انه يصيب النباتات ويسبب لبعض النباتات أمراضا مثل تبقع الأوراق في النخيل وخاصة النوع *Phoenix* spp (Elliote *et al*.,2004) ويسبب كذلك تعفن الجذور وغيرها من الأمراض (Ellis,1971; Sivanesan, 1987; Berbee *et al*., 1999) وله مدى واسع من المضائف النباتية وأكثرها شيوعا النبات العشبية (Manamgoda *et al*., 2011) .

وقد ذكر Nabity *et al*.(2011) انه قد يكون للفطر تأثير أيضا في الحشرات التي تتغذى على النباتات ويكون تأثير الحشرة في النبات أشد من تأثير الفطر نفسه ومن هذه الحشرات الديدان المعروفه بأسم (Army worm) *Spodoptera frugiperda* (Noctuidea :Lepidoptera)التي تصيب النباتات العشبية Switchgrass .

كما وذكر Parrish and Fike (2005) ان للفطر تأثير أيضا على الآفات الحشرية المتغذية على الأعشاب ومن هذه الآفات خنفساء برغوث الذرة (corn flea) *Chaetocnema pulicaria* العائدة لرتبة Coleoptera وللعائلة Chrysomelidae .

2-2-1-3-3:عوامل الضراوة في الفطر:

1- يحتوي الفطر على انزيمات عديدة لها القابلية على تحليل المواد السليلوزية في النباتات (Apoga *et al*.,2002) وهذه الأنزيمات هي:

Glycosidase-a

Carboxymethyl cellulose-b

Pectin lyase-c

Endopeptidase-d

Serine proteinase-e

Phenoloxidase-f

2-السموم Toxins

تنتج أغلب أنواع الجنس *Bipolaris* سموما نباتية تعرف ب Phytotoxins ولكن البحوث المتوفره بصددها قليلة :

أ- **Prehelminthosporol (PHL)** هو سم تفرزه أغلب أنواع الجنس *Bipolaris* وأكثرها شيوعا النوع *Bipolaris sorokiniana* وكذلك تنتجه أنواع اخرى مثل *B. setariae* , *B. zeicola*

B. victoria لكن هذه العزلات تنتجه بكميات أقل ويكون هذا السم أكثر شيوعا في النباتات ويسبب أمراضا لها (Apoga *et al*.,2002) .

ب- سموما أخرى منها Ophiobolin A , 6-epiophiobolin, 6- epianhydroophiobolinA ,

Ophiobolin C, Ophiobolin I وتنتج بشكل خاص من النوع *B. oryzae* وتكون هذه السموم فعالة جدا وتسبب تبقع الأوراق (Kim *et al*.,1984) .

2-3-1-3: فطر *Fusarium oxysporium* Schlecht

2-3-1-3-1: تصنيفه ووصفه:

ان تصنيف الفطر وفق ماجاء به (Ellis *et al*.,2007) هو:

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Nectriace

Genus*: **Fusarium***

Species:**oxy*sporium***
Schlecht

تكون مستعمرات الفطر ذات لون أبيض أو وردي, سريعة النمو وتظهر بصورة واضحة على وسط مستخلص أكار البطاطا والدكستروز Potata Dextrose Agar (PDA) وكذلك على وسط الأكار المغذي Nutrient Agar (NA) (Nelson *et al*.,1997) . ويكون ثلاثة أنواع من الكونيدات كبيرة وصغيرة وكلاميدية (Agarios,2005) كما يعمل الفطر على تكوين الأجسام الحجرية عند تعرضه للظروف غير الملائمة (حسين ,2009) .

ويعود هذا الجنس لعائلة Nectriaceae والتي تمتلك طيفا واسعا من السموم يمكن استعمالها ضد يرقات البعوض لأن هذا الفطر ينمو بشدة في الأماكن ذات الرطوبة العالية ويمتلك هذا الفطر ثلاث أنواع من الأبواغ وهي Macrogonidia و Microconidia والكلاميدية , وقد استعمل هذا الفطر أيضا لأنتاج جزيئات الذهب المتناهية في الصغر(Nano particle) التي تستعمل في العديد من بحوث الطب الحيوي (Chung *et al*.,2009).

2-3-1-3-2: علاقة فطر *F. oxysporium* بالحشرات:

يعد جنس *Fusarium* من الفطريات الخيطيه واسعة الأنتشار في الطبيعة ,حيث يوجد في التربة في المواد العضوية المتفسخه للنباتات والحيوانات وكذلك بقايا الأغذية , وانواع عديدة منه تسبب أمراضا كثيرة للنبات مثل مرض تعفن الجذور والذبول الوعائي ,كما ان انواع منه ترتبط

مع الحيوانات مثل الديدان الخيطية والعناكب والبرمائيات والزواحف , ولكنه أيضا يرتبط ارتباطا وثيقا بالمجاميع الحشرية بكونه متطفل وممرض للحشرات (Alekseev *et al*.,1980).

ذكر Roberts (1981) ان سموم هذا الفطر لها تأثير كمبيدات حشرية ضد حشرات مختلفة.وان هذا الفطر عزل ولعدة مرات من البعوض *Ochlerotatus detritus* كما تبين ان الفطر يمتلك ضراوه عالية ضد البعوض من النوع *Cx. Pipiens* (Hasan and Vago,1972 ; Breaud *et al*., 1980)

وكما بينت الأبحاث اصابة الفطر لقافزات الأوراق عندما وجدت حشرات بالغة ميتة من قافزات الأوراق (Leaf hoppers) *Pyrilla perpusilla* والتي تعود لرتبة متشابهة الأجنحة

(Homoptera: Cicadelliadae) ملتصقة بنبات قصب السكر وحاوية أيضا على خيوط بيض في الجانب البطني للحشرة نتيجة وجود الفطر (Varma *et al*.,1977) .

كما اختبر تأثير الفطر ايضا ضد بعوض *Cx. quinquefasciatus* و *Anopheles stephensi* (Prakash *et al*.,2010).

3-3-1-3-2: امراضية فطر *F. oxysporium* :

يعنى بلأمراضية اصابة الفطر لمضيف معين عن طريق ظهور أعراض في المضيف سواء كان حشرة أو نبات (Lucas,1998) وان امراضية الفطر ترتبط بالأفرازات التي يفرزها الفطر مثل السموم والأنزيمات والتي تمثل عوامل الضراوة للفطر (Knogge,1996) وتشمل :

1-الأنزيمات Enzymes:

ينتج فطر *F. oxysporium* عدة انزيمات والتي تعمل على المواد البكتينية والسليلوزية والتي تعد من اهم مكونات جدران الخلايا النباتية (Agarios,1997) وتشمل:

1- Pectinase

2- pectin methylesterase(PME)

3- polygalacturonase(PGs)

4- Pectate lyases (PLs)

5- Cellulase Enzyme

6- Hemicellulase

7- Xylanases

8- Mannanase

Xylanase-10 Arabinose-**9**

Chitin synthases-12 Galactanase-11

كما أشارت الأبحاث الى ان هذا الفطر يفرز منظم النمو Indol acetic acid (IAA) . (Manners,1982)

2- السموم Toxins

أ- Fusaric acid (FA)

عزل هذا السم لأول مرة من قبل Yabe and Hamasaki (1993) حيث عزله من الفطر *F. heterosporum*. وهو عبارة عن مشتق لحامض البيكولينيك Picolinic acid يتم عزله من أنواع عديدة من فطر *F.* منها *F. crookwellense*, *F. moniliform*, *F.* *napiforme*, *F. oxysporium* و*F. solani* (Bacon *et al.*,1996) , وقد اقترح استعماله في العلاج لكن آلية عمله غير مفهومة لحد ما لكن هناك ابحاث تبين انه قد يثبط Dopamine Beta-Hydroxydase وهو الأنزيم المسؤول عن تحويل الدوبامين الى النورادرينالين كما ان سميته عالية جدا وان صيغته الكيميائية ($C_{10}H_{13}NO_2$) (Tung *et al*.,2016) .

ب- **Bikaverins** ($C_{20}H_{14}O_8$) : هو عبارة عن سم فطري (Hidaka *et al.*, 1969; Kitagawa *et al.*, 1997) ذو لون أحمر تنتجه أنواع مختلفة من الفطريات ولكن أكثرها شيوعا الجنس *Fusarium* , لكن سميته تختلف بأختلاف الأنواع ويمتلك خصائص كمضاد حيوي ضد أنواع من الأبتدائيات والفطريات ,ومن الناحية الكيميائية هو عبارة عن مركب من polyketide مع tetracyclic benzoxanthone, في بعض الفطريات يوجد bikaverin ولكن بكميات أقل وعرف بـnorbikaverin , ومن الناحية الحياتية يمتلك خاصية مضاد للأورام في الخلايا السرطانية (Limón *et al.*,2010) .

ج-**Enniatin** ($C_{33}H_{57}N_3O_9$) **:** هو عبارة عن مركب حلقي سداسي ببتيدي cyclohexadepsipeptides تنتجه أغلب أنواع الجنس *Fusarium* وكذلك عزل من أجناس اخرى مثل *Verticillium* و*Halosarpheia* وتم وصفه قديما قبل 60 سنة تقريبا ويمتلك

سميه عاليه وكذلك يمتلك خصائص كمضاد حيوي وفطري وقد استعمل في صناعة عقار عندما دمج مع fusafungine (Cordero *et al.*,2012) .

د- **Moniliformin :** هو عبارة عن سم فطري يتكون من (3-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione) , وقد عزله لأول مره Cole *et al.*, (1973) من فطر *F. moniliforme* وسمي على اسم الفطر كما وجد انه ينتج ايضا بواسطة فطر *F. oxysporium* و*F. avenaceum* و*F. subglutinans* لكن بنسبه أقل ويوجد هذا السم في الطبيعه بشكل أملاح البوتاسيوم والكالسيوم (Jestoi,2008).

ه- **Oxysporone ($C_7H_8O_4$):** وهو مركب dihydrofuropyranone وتم عزله من الفطر *F. oxysporium* ويمتلك فعالية كمضاد حيوي حيث استخدم لعلاج الأسهال المتسبب عن الديدان في نيجيريا (Adegosan and Alo,1979) واختبرت سميته ضد أنواع فطريه ممرضة للنبات منها *Athelia rolfsii* و *Phytophthora cinnamomi* و *P. plurivora*

(Andolfi *et. al.*,2014)

و- **Fusaproliferin ($C_{27}H_{40}O_5$) :**هو مركب تربيني ثنائي حلقي bicyclic sesterterpene يتألف من خمس وحدات آيزوبرين isoprenic وتم عزله ولأول مرة من فطر *F. proliferatum* وله فعالية سمية (Randazzo *et al.*, 1993) .

2-4: العلاقات بين الفطريات والحشرات:

توجد أنواع عديدة من الفطريات تتعايش مع الحشرات وقد تكون مترممه أو متطفلة,والتطفل قد يكون خارجيا Ectoparasites أو داخليا Endoparasites ,وتقريبا جميع رتب الحشرات معرضة للأصابة الفطرية ومن ضمنها رتبة ثنائية الأجنحه Diptera (Scholte *et al.*,2004) ومن أهم شعب الفطريات التي تصيب مجاميع البعوض هي :

اولا-الفطريات البيضية Oomycota أفراد هذه الشعبة تعرف بأعفان الماء أو الفطريات المائية Watermolds وبعض الأجناس تتطفل اختياريا على يرقات البعوض (Seymour and Briggs,1985) ومنها:

1- *Leptolegnia caudata* حيث عزل من البعوض الناقل للملاريا *Anopheles culicifacies* Giles حيث أدى الى نسبة هلاك وصلت الى 100% عند معاملة اليرقات

(Seymour ,1984; Bisht *et al*.,1996).

2- *L. chapmanii* حيث تم عزله لأول مره من يرقات*Ochlerotatus triseriatus*

. (McInnis and Zattau,1982)

3- *Pythium* واغلب انواعه معروف بأمراضيته للنباتات الوعائية فيما تكون بعض الأنواع ممرضه للحشرات مثل *P. flevoense* الذي عزل من يرقات البعوض البري *O. sierrensis* في ولاية كاليفورنيا (Saunders *et al*.,1988).

كما ذكر(1985) Nnakumusana ان أنواع غير معروفه من الفطر *Pythium sp.* قد سببت هلاكا بلغ 50% ليرقات بعوض *A. africanus, A. aegypti* , *A. simpsoni* , *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tigripes* .

واشار(2001) Su *et al.* ان النوع *P. carolinianum* قد أدى الى هلاك 13.3% من يرقات

Cx. quinquefasciatus .

4-*Lagenidium* حيث سجل النوع *L. giganteum* تطفل على يرقات البعوض *Cx. restuans* و*Cx. quinquefasciatus* في ولاية كارولينا الشمالية وحقق نسب هلاك عالية وخاصة في النوع الثاني (Suh and Axtell ,1999) .

5- *Crypticola* حيث وجد ان النوع *C. clavulifera* يصيب أنواع البعوض *A. notoscriptus* و *A. farauti* و *Cx. Annulirostris* و*Cx. quinquefasciatus* .(Frances,1991)

ثانيا- الفطريات الكايتريدية Chytridiomycota حيث يعد الجنس *Coelomomyces* الجنس الممرض الوحيد للبعوض في هذه الشعبة وهو اجباري التطفل كما يصيب العديد من

العائلات الحشريه مثل Culicidae وPsychodidae وChironomidae وSimuliidae وTabanidae (Chapman,1974; Roberts,1970) .

ثالثا- الفطريات اللاقحية Zygomycota: العديد من أجناس هذه الشعبة يكون ممرض للحشرات وخاصة واغلب اجناسها تعود لرتبة Entomophthorals (Humber,1997) وتشمل:

1- *Conidiobolus* وخصوصا النوع *Conidiobolus coronatus* والذي يصيب بعوض *Cx. quinquefasciatus* وسجل نسبة قتل عالية (Lowe and Kennel,1972) .

2- *Entomophthora* وخاصة النوع *Entomophthora culicis* حيث سجل اصابة لنوعي البعوض *A. stephensi* و*Cx. Pipiens* وقد سجل نسبة هلاك بلغت 100% للنوع الأول و20% للنوع الثاني على التوالي (Kramer,1983).

3- *Trichomycetes* يعيش هذا الجنس داخل القناة الهضمية للعديد من مفصليات الأرجل ضمن الرتب التالية Diptera , Ephemeroptera, Ephemeroptera , isopoda, Cladocerans ,

Coleoptera, Collembola, Copepods , Amphipods وكذلك Diplopods

. (Lichtwardt *et al*.,1999)

4- *Erynia* ويشمل النوع *Erynia aquatica* الذي يصيب بالغات *Cx. pipiens*

(Anderson and Ringo, 1969)

و *E. conica* الذي يصيب بالغات الذباب الأسود blackfly (Nadeau *et al*., 1996) ويصيب أيضا بعوض *A. aegypti* حيث احدث نسبة هلاك لبالغات البعوض وصلت ل 24% . (Cuebas-Incle,1992)

رابعا- الفطريات الناقصة Deuteromyces وتضم الفطريات الخيطية filamentous fungi والتي تصيب العديد من أنواع البعوض وتشمل:

1- ***Culicinomyces*** وخصوصا النوع *Culicinomyces clavosporus* الذي يصيب يصيب يرقات *Culiseta inornata* وكذلك هناك نوع يتطفل على يرقات بعوض *A. kochi*

. (Goettel *et al.*,1984)

2- ***Metarhizium*** مثل النوع *M. anisopliae* حيث تم تسجيل اصابة الفطر لعدة أنواع من البعوض منها *A. stephensi* , *A. aegypti* , *Ochlerotatus atropalpus* , *Cx. Pipiens*,*Cx. salinarius* و*Cx. quinquefasciatus* حيث سجل نسبة هلاك بلغت 50% ضد النوع الأخير (Alves *et al.*,2002) .

3- ***Beauveria*** خاصة النوع *B. bassiana* الذي يصيب العديد من أنواع البعوض منها *Cx. pipiens* , *Cx. tarsalis* , *Cx. tritaeniorhynchus* وكذلك *A. albimanus* لكنه أكثر فعالية ضد يرقات *A. aegypti* و*Ochlerotatus sierrensis* وكذلك *Cx. quinquefasciatus* (Sandhu *et al.*, 1993; Geetha and Balaraman ,1999 ;Alves *et al.*, 2002).

4- ***Tolypocladium*** حيث تم عزله لأول مره من يرقات *Ochlerotatus sierrensis* في كاليفورنيا عام 1971 وأحدث نسب قتل عالية لأنواع البعوض (Soarés ,1982).

5-***Aspergillus*** مثل النوع *A. niger* الذي يصيب بعوض *Cx. quinquefasciatus* (الغانمي,2016).

6 -***Fusarium*** حيث اختبرت امراضية الأنواع التالية *F.equiseti, F.graminearum,* *F.moniliforme, F.oxysporum , F.poae, F.semitectum ,F.sacchari* على يرقات *Galleria mellonella* (Ameen,2012) .

7- ***Paecilomyces*** حيث بينت الدراسات تاثيره على حشرات رتبة ثنائية الأجنحه وخاصة البعوض (Pereira *et al.*,2009) .

8- ***Penicilium*** مثل النوع *Penicilium marneffi* حيث سجل اصابة ليرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* (الغانمي,2016) .

9- ***Verticillium*** وخصوصا النوع *Verticillium lecanii* حيث اختبرتأثيره على حشرة المن (Hall,1980) .

3- المواد وطرائق العمل: Materials and Methods

3-1:موقع جمع العينات:

لقد تم أختيار بركتين لجمع يرقات البعوض في مدينة الديوانية حيث تقع الأولى في منطقة ام الخيل والثانية في قضاء الدغارة التابع لمدينة الديوانية.حيث يكثر البعوض في تلك البركتين لكونها غنية بالمواد العضوية وبعد ان اجري فحص تمهيدي للمياه تم اخذ ١٠ عينات لتغطية المساحة المراد دراستها وتم الجمع كل اسبوعين من مواقع متباينة لكل بركة خلال المدة من شهر كانون الأول ٢٠١٥ولغاية شهر آب ٢٠١٦ بواسطة مغرفة طويلة الذراع وتم وضع اليرقات والعذارى في عبوات بلاستيكية مثقبة الغطاء للسماح بدخول الهواء ونقلت الى المختبر وافرغت في احواض زجاجية وتم تزويدها بماء خالي من الكلور واضيف غذاء اليرقات (الخميرة) بمقدار ٣٠ ملغم لكل حوض وغطيت الأحواض بالتول (Soni and prakash , 2012).

3-1-1: عزل الفطريات:

لغرض عزل الفطريات الممرضة للبعوض من اليرقات تم تعقيم اليرقات بواسطة الكحول الأثيلي بتركيز 70% لغرض التخلص من الفطريات الموجودة على السطح الخارجي لمدة دقيقة واحده وثم تم غسلها بالماء المقطر ثم تعقيمها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 1% لمدة ٣٠ ثانية ثم غسلها بالماء المقطر ووضعت على اوراق ترشيح وبعدها تم نقلها بواسطة ملقط معقم الى الأوساط الزرعية الخاصة بعزل الفطريات المرافقه ليرقات البعوض المذكورة في الفقرة (3-3) وبمعدل اربعة مكررات حيث وضعت خمس يرقات في كل مكرر(Pereira *et al.*,2009) وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25±2 ولمدة 5-7 ايام بعدها تم تنقية الفطريات المعزولة على وسط غذائي جديد وذلك بأخذ قرص قطره 0.3 سم من حافة المستعمرات الفطرية النامية حول اليرقة ونقل هذا القرص بواسطة ابرة معقمه الى مركز طبق بتري بلاستيكي حاو على 20 مل من الوسط الغذائي حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 لمدة 7 ايام .

2-1-3 :تشخيص ووصف الفطريات:

تم تشخيص الفطريات المعزولة من يرقات البعوض المصابة مظهريا من خلال النمو الفطري ولون اليرقه وسلوكها وذلك بأخذ جزء صغير من النمو الفطري ووضعه على شريحة زجاجية مع وضع قطرة من صبغة المثيلين الزرقاء ثم وضع غطاء الشريحة وفحص تحت المجهر الضوئي وتم تشخيص الفطريات بلأعتماد على المفتاح التصنيفي(Ellis *et al*., 2007) والأستعانه بالأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان /كلية الزراعة/قسم وقاية النبات /جامعة الكوفة.

تم حساب النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة بحسب المعادلات الآتية(الجبوري,2008)

النسبة المئوية للظهور=(عدد مرات ظهور الفطر في العينات الكلية/عدد العينات الكلي)×100

2-3: اعداد المزرعة الدائمية لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

اخذت عينات اضافية من الأدوار غير البالغة (اليرقات والعذارى) لبعوضة *Cx. quinquefasciatus* من مناطق جمع العينات المشار اليها في الفقرة (3-1) اتبعت طريقة (المشكور,2014) في تربية البعوض وتم تشخيصها بحسب الصفات التصنيفية الواردة في المفاتيح التصنيفية

(Becker *et al*.,2010, 2008,عبد القادر,Abul-hab,1968) وذلك بواسطة اعداد شرائح للبالغات وأكدت التشخيص الأستاذ الدكتور/غيداء عباس/كلية الطب البيطري جامعة القادسية على انها *Cx. quinquefasciatus* ولغرض تهيأة الأعداد الكافية من كل طور يرقي والعذارى والبالغات فقد عزلت أعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الأول أما الطور الثاني والثالث والرابع فقد هيأ كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبقه وتم وضعها في انابيب التربية فرادى ومراقبتها لحين الأنسلاخ ووصولها الطور المطلوب .

3-3:الأوساط الزرعية

3-3-1:الأوساط الزرعية الخاصة بعزل الفطريات :

لقد استعملت العديد من الأوساط الزرعية للتقصي عن الفطريات المرافقة للبعوض منها:

3-3-1-1: وسط اكار السابرويد المدعم بخلاصة الخميرة

Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract (SDAY)

(Benserradj and Mihoubi,2014)

يتكون هذا الوسط من :

- ببتون peptone 10غم
- دكستروز Dextrose 40غم
- خلاصة الخميرة Yeast extract 2غم
- أكار Agar 15غم

وتم تحضيره بأذابة المواد بحسب الكميات الموصى بها في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعة 1000 مل وعقم الوسط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/ أنج^2 لمدة 15 دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد ثم اضيف له المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/ لتر ثم صب الوسط في اطباق بتري بقطر9 سم وترك ليتصلب,بعد ذلك لقحت الأطباق بالنمو الفطري بواسطة ناقل معقم وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م لمدة 168 ساعة كما استعمل وسط Sabouraud dextrose broth supplemented with yeast extract(SDBY) لغرض اكثار الفطر والمكون من مكونات وسط Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract(SDAY) لكن بدون اضافة الأكار.

3-3-1-2: وسط Peptone Yeast Glucose (PYG) (Fuller and Jaworski,1987)

يتكون هذا الوسط من:

- ببتون Peptone 1.25غم
- خلاصة الخميرة Yeast extract 1.25 غم
- كلوكوز Glucose 3غم
- اكار Agar 15غم

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة(3-3-1-1)

.

3-3-1-3: وسط Emerson ypps agar (Thennis,1971)

يتكون هذا الوسط:

- خلاصة الخميرة Yeast extract 4غم
- نشاء Starch 15غم
- كبريتات المغنيسيوم $MgSo_4$ 0.5 غم
- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجينKH_2PO_4 1 غم
- اكار Agar 20 غم

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة (3-3-1-1).

3-3-1-4: وسط خلاصة الشعير Malt extract agar (MEA) (Samson *et al*., 2011)

تم تحضيره بحسب الشركة المجهزة:

- وسط خلاصة الشعير Malt extract agar 50 غم
- ماء مقطر Distilled water 1000 مل

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة (3-3-1-1).

3-3-1- 5: وسط خلاصة الخميرة Yeast extract agar(YEA) (Pereira *et al*;2009)

تم تحضيره بحسب الشركة المجهزة:

- وسط خلاصة الخميرة Yeast extract agar 20 غم
- ماء مقطر Distilled water 1000 مل

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة (3-3-1-1).

3-3-1-6: وسط أكار البطاطا Potato dextrose agar (PDA) (Harrington,1992)

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة له وذلك بأذابة 39 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر المعقم.

3- 4: تحضير العالق الفطري للفطريات

B. australienisis , F. oxysporum , A. parasiticus

تم تحضير المعلق لكل فطر على حدة وذلك بتنميته على وسط Potato dextrose broth (PDB) في دوارق زجاجية سعة كل منها 150 مل من الوسط . وحضنت المزرعة بدرجة

حرارة 25 م° لمدة 7 ايام وتم رجها بصوره يومية لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بواسطة قطعه من الشاش, واخذ 1 مل من الراشح ووضع على شريحة عد كريات الدم الحمر المحورة لعد الأبواغ Improved Neubauer Haemocytometer وذلك لتقدير عدد الأبواغ لكل وحدة حجم حيث حسب عدد الأبواغ في كل مربع من المربعات الأربعة الكبيرة الموجوده في أركان الشريحة, بعد ذلك قسم عددها الكلي على أربعه للحصول على معدل عدد الأبواغ في المربع الواحد, ثم ضرب هذا الناتج في1×10^4 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الأبواغ في 1 مل من المعلق الفطري.حيث تم الحصول على:

A. تركيز 1×10^7 (بوغ/مل) بالنسبة للفطر *A. parasiticus*

B. تركيز 2×10^6 (بوغ/مل) بالنسبة للفطر *B. australenisis*

C. تركيز 3×10^5 (بوغ/مل) بالنسبة للفطر *F. oxysporum* (Goettel and Inglis,1997)

ولغرض الحصول على تركيز اقل من ذلك طبقت المعادلة الآتية (Lacey,1997):

الحجم (مل)المأخوذ من المعلق الرئيسي $=\frac{\text{التركيز المطلوب}}{\text{تركيز المعلق الأصلي}}$

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره,وهكذا حضرت تراكيز:

A. معلق الفطر *A. parasiticus* (1×10^6 ,1×10^5, 1×10^4).

B. معلق الفطر *B. australenisis* (2×10^5, 2×10^4, 2×10^3).

C. معلق الفطر *F. oxysporum* (3×10^4, 3×10^3, 3×10^2).

3- 5: الأختبار الحيوي Bioassay

3- 5-1:الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز عالق أبواغ الفطريات *B. australenisis, F .oxysporum* في مختلف ادوار حياة البعوضة *A. parasiticus, Cx. quinquefasciatus*

3-5-1-1: الأختبار الحيوي في البيوض :

تم اخذ قارب البيض بعمر24 ساعة بعد ان تم وضعه من قبل احدى اناث البعوض المتغذية على الدم بفرشاة ناعمة لكل مكرر ووضع في اناء بلاستيكي سعة 250 مل يحتوي على 100 مل من كل تركيز من تراكيز معلق كل فطر من الفطريات المختبرة كما رش البيض

سطحيا بالتركيز نفسه الذي وضع فيه بواسطة مرشة يدوية وبمقدار 5 مل لكل مكرر من ارتفاع 15 سم تقريبا لضمان تعريض كل البيض للمعلق الفطري كررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز اما معاملة السيطرة فقد رشت بالماء المقطر المعقم فقط . وضعت الأواني في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م° وتمت مراقبة البيض لحين الفقس وحسبت نسب الهلاك (علي,2007).وصححت القيم بحسب معادلة Orell and Schnieder (Abbot,1925) .

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

3-1-5-2: الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة:

تم اخذ 40 يرقة من كل طور من الأطوارالأربعة والتي هيأت في الفقرة (3-2) لكل تركيز من تراكيز معلق كل فطر من الفطريات المختبرة ووزعت على أربعة أوان ثلاثة كل منها حاوي على (100مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق اما الرابع فيحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) لمدة دقيقتين ثم نقلت اليرقات المعاملة بفرشاة ناعمة الى أوان زجاجية سعة (250 مل) تحتوي ماءا مقطرا معقما اضيف اليه غذاء اليرقات بمقدار 10 ملغم / مل بعد ذلك وضعت الأواني في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م° وفترة ضوئية (D/L) 14:10 ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك بعد 24, 72, 120 ساعة (Soni and prakash,2011) وصححت القيم كما ذكر في الفقرة (3-5-1-1).

3-1-5-3: الأختبار الحيوي في العذراء:

تم عزل العذارى بعد انسلاخ يرقات الطور الرابع وبعدد مساو لما تم استعماله في تجربة الأطوار اليرقية وتم تطبيق طريقة الأختبار ذاتها في الفقرة(3-5-1-2) مع مراعاة عدم اضافة غذاء لليرقات ومراعاة تغطية اواني المعاملات بقماش التول تحسبا لظهور البالغات وحسبت نسبة الهلاك لمدة 24, 72,48 ساعة (المشكور,2014),وصححت القيم كما في الفقرة (3-5-1-1)٠

3-1-5-4: الأختبار الحيوي في البالغات:

اخذ من المزرعة الدائمية اعداد كافية من العذارى وتم وضعها بصورة منفردة في انابيب سعة كل انبوب 10 مل وتم غلق فوهتها بقطعة قطن وانتظار تحولها الى بالغات.ولقد تم توزيع 10 بالغات من كل من الذكور والأناث بصوره منفردة في اناء عريض الفوهه سعته 1 لتر ورش كل مكرر بواسطة مرشة يدوية على بعد 15 سم ورشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم وتم تكرارهذه التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ومثلها لمعاملة السيطرة وغطيت بقطعة من التول تحتوي على قطنة مشبعه بمحلول سكري 10% في طبق بتري قطره 9 سم.وحضنت القناني في نفس الظروف المار ذكرها في الفقرة (3-5-1-2) (Scholte *et al*.,2003).وتم حساب نسبة الهلاك يوميا لمدة 168,120,72,24 ساعة وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (3-5-1-1) .

3-5-2: تحضير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B .australenisis* و*F. oxysporum* :

تم تحضير وسط PDB وتوزيعه في دوارق سعة 250 مل بمقدار 150 مل للدورق.تم تلقيح الوسط بأقراص قطرها 0.5 سم من مزارع الفطريات المذكورة اعلاه بعمر 7 ايام كلا على حدة.

حضنت الدوارق بدرجة 25±2 م° لمدة اسبوعين بعدها رشح بورقة ترشيح Whatman No.1 بقمع بخنر وبمساغدة جهاز تفريغ الهواء Vacuum pump واعيد ترشيحه بأستعمال المرشح الدقيق Milipore filter (0.22µ) لتعقيم نواتج الأيض الثانوية من البكتريا الملوثه المحتمل وجودها وتم تحضير التخافيف التالية 25,%50,%75,%100 % (Singh and Prakash,2010).

3-5-2-1: تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطريات *A. parasiticus* و *B.australenisis* و*F. oxysporum* في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوضة *Cx.quinquefasciatus*:

لقد استعملت التراكيز المحضرة مسبقا ولكل فطر على حدة في الفقرة (3-5-2) واتبعت نفس الطريقة المذكورة في الفقرة (3-5-1-2), وتم حساب نسبة الهلاك يوميا ولمدة ثلاثة أيام وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (3-5-1-1)٠

3-5-3: عزل نواتج الأيض الثانوية للفطريات *A. parasiticus* و *B. australenisis* و *F. oxysporum* وتنقيتها بعمود الفصل:

تم الحصول على الراشح كما في فقرة (3-5-2) بأستعمال وسط (PDB) بحسب طريقة (Soni and Prakash,2011) حيث لقحت الدوارق الزجاجية الحاوية على وسط (PDB) من مزرعة كل فطر لوحده بعمر 168 ساعة وحضنت الدوارق في الظروف السابقة نفسها بعد ذلك تم اعادة ترشيح ال Broth الحاوي على مستعمرة الفطر بأستعمال ورقة ترشيح Whatman No.1 لعدة مرات . وتم تهيئة 4 مل من العينة مع 1 مل من المذيب المتكون من (الأيثانول / ماء مقطر معقم) شكل (12) وتم جمع الناتج elution بنسبة 2:8 (ethanol:metabolites) بعدها نقيت نواتج الأيض بواسطة عمود الفصل بأستعمال مادة السليكا Silica gel 100-200) (mesh size ثم وضع في انابيب اختبار وعلمت بصوره متسلسلة ومن ثم تم اختبارها على صفيحة هلام السليكا بأبعاد (10×2) سم ثم تترك الشريحة لتجف ويتم بعدها تحديد مواقع البقع والكشف عنها بواسطة بخار اليود والأشعه فوق البنفسجية ,بعد ذلك يتم تحديد قيم التحرك النسبي Relative Flow (RF) على وفق المعادلة التالية :

قيمة التحرك النسبيR.F = $\frac{\text{المسافة قطعها التي المركب}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$ (Harborn,1984).

3-5-3-1: الأختبار الحيوي لنواتج الأيض الثانوية المنقاة بعمود الفصل ضد الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*:

تم اختبار فعالية نواتج الأيض المنقاة لكل فطر من الفطريات المختبرة وذلك بلأعتماد على الطريقة القياسية لمنظمة الصحة العالمية (WHO,2005).وهيأت الأطوار اليرقية كلا على انفراد كما في الفقرة (3-5-1-2) وتم وضعها في اواني حاوية على ماء مقطر فقط . بعد ذلك حضرت خمسة تراكيز للأختبار الحيوي وهي (1.8, 1.5 ,1 ,0.8 ,0.5) % وقد تم الأختبار ب3 مكررات لكل تركيز .وتم حساب نسب الهلاك يوميا ولمدة 72 ساعة وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (3-5-1-1).

شكل(12) عمود الفصل Column chromatography المستعمل في تنفية نواتج الأيض الثانوي للفطريات بأستعمال مادة السليكا جل Silica gel

3- 6: التحري عن عوامل الضراوة بواسطة اختبار كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي High Perform Liquid Chromatography (HPLC)

لغرض اعداد عينة الفطريات السائلة هيجت باستعمال حمام الموجات فوق الصوتية ولمدة ٣٠ دقيقة وبعدها رشحت باستعمال ورق الترشيح Whotman NO.1 لأزالة الالياف والمواد غير المرغوبة , وبعدها تم حقن 20 مايكروليتر وان تركيز كل مركب يقدر كميا بمساحة الحزمة للمادة القياسية مع العينة .تم فصل المركبات باستعمال جهاز الفصل السائل ذي الاداء العالي من نوع Shimadzu 10 AV-LC equipped والمضخة من نوع LC-10A shimadzu روقبت الحزم بواسطة UV-Vis 10A –SPD Spectrophotometer .المادة القياسية المجهزة من شركة Sigma-Alderich (St.Louis USA)

ولحساب تركيز المادة المجهولة = مساحة حزمة النموذج /مساحة حزمة القياسي ×تركيز القياسي ×عدد مرات التخفيف

3-6-1: فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *A. parasiticus* :

الكشف عن سموم الأفلاتوكسينات :

العمود: نوع العمود Zorbax clipse XDB _C-18,3 um particle size (50×4.6mm I.D)

الطور المتحرك يتكون من : , deionized water :methanol :acetonitrile (50:40:10 v/v)

الكاشف: الأشعة فوق البنفسجية 365 nm

معدل الجريان :1.0 ml/min

3- 2-6 : فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *B. australiensis* :

الكشف عن سموم الفطر :

العمود: نوع العمود UPLC BEH C-18 ,1.7 um partical size (50×2.1 mm I.D)

الطور المتحرك يتكون من 0.01 ammonium acetate buffer PH 8.2:acetonitrile (60:40 V/V)

الكاشف : الأشعة فوق البنفسجية 231 nm

معدل الجريان :1.2 ml/min

3-6-3: فصل نواتج الأيض الثانوي للفطر *F. oxysporum*

الكشف عن سموم الفطر :

العمود : نوع العمود UPLC BEH C-18 ,1.7 um particle size (50×2.1 mm I.D)

الطور المتحرك يتكون من : 0.01 ammonium acetate buffer PH 8.2:acetonitrile (60:40 V/V)

الكاشف:الأشعة فوق البنفسجية 231 nm

معدل الجريان :1.2 ml/min

3-6-4: الكشف عن انزيمات الفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و *F. oxysporum* :

العمود: نوع العمود 7 um particle size , NUCLOSI,4000-7PEI, anion exchange for protein and peptide (125 ×4.0mm I.D)

الطور المتحرك يتكون من نوعين من المحاليل :

محلول رقم (**1**) :2 m M/L tris-acetate PH 8.0

محلول رقم (**2**) : 20m M tris-acetate PH 8.0, 0.01 phosphate buffer +1.5 m M KCL

الكاشف : الأشعة فوق البنفسجية 280 nm

معدل الجريان :1.2 ml/min

3-6-5: التحليل الأحصائي

حللت جميع النتائج حسب التصميم العشوائي الكامل متعدد العوامل Complete Randomized Factorial Design (C.R.D) واختبرت المعنوية بين المتوسطات بأستخدام أقل فرق معنوي Least Significant Differences (L.S.D) وعند مستوى احتمالية (0.05) (الراوي وخلف الله,1992) .

4- النتائج والمناقشة:

4-1:عزل الفطريات المرافقة للبعوض وتشخيصها:

تم عزل 28 نوعا من الفطريات وتشخيصها وهي تعود الى 14 جنسا وكانت النسبة الأكبر منها تنتمي الى الفطريات الناقصه تليها الكيسية والاقحية ويعود السبب الى ان الأولى تنتج وحدات تكاثرية صغيرة الحجم وبأعداد كبيرة جدا فضلا عن قابليتها على الأنتشار لمسافات بعيدة وقدرتها على تكوين تراكيب معينة لمقاومة الظروف البيئية غير الملائمة لنموها (Samson *et al.*,1988). ان نتائج العزل الحالي اتفقت مع خلف (1995) اذ تمكن من عزل 13 نوع تعود الى ثمانية أجناس من

حشرة المن شملت ستة أجناس من الفطريات الناقصة هي *Aspergillus* و *Alternaria* و *Penicillium* و*Geotrichum* و *Beauveria* وجنسين من الفطريات الاقحية هما *Mucor* و *Rhizopus* . واتفقت النتائج أيضا مع عباس وجماعته (2004) حيث تم عزل 9 أجناس فطرية من حشرتي الأرضة وهي *Aspergillus* spp. و *Alternaria* sp. و *Chaetomium* sp. و *Mucor* sp. و *Scytalidium* sp. و *Penicillium* spp. و *Paecillomyces* sp. و *Cladosporium* sp. و *Trichoderma* sp. . كما عزل Govindarajan وآخرون (2005) عدة أجناس فطرية من بعوض *Cx. quinquefasciatus* وهي *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Trichoderma* . وتتفق نتائج البحث الحالي مع ماتوصل اليه الجبوري (2007) حيث عزل 36 نوعا من الفطريات من أنواع من المن من ضمنها *Alternaria spp* و*Aspergillus spp.* و *Cladosporium spp.* . كما وعزل اليوسف (2008) الفطريات *A. niger* و *A. alternate* من حشرة من الباقلاء الأسود . أما صالح وآخرون (2011) فقد عزلو مجموعه من الفطريات من حشرة الباقلاء الأسود وهي *A. alternata* و *A. chlamydospora* و *A. niger* و *B. bassiana* و *C. oxysporum* و*P. chrysogenum* و*P. compactum* و *Ulocladium atrum*.كما و عزلت الغانمي (2016) 39 نوعا من الفطريات من يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* .

جدول (2) أنواع الفطريات المعزولة من يرقات بعوضة *Cx. quinquefasciatus*

ت	الأسم العلمي للفطر	ت	الأسم العلمي للفطر
1	*A. terreus*	15	*Rhadotorula* sp.
2	*A. niger*	16	*Candida* sp.
3	*A. nidulans*	17	*Trichothecium* sp.
4	*A. parasiticus*	18	*Pythium solcatum*
5	*A. flavus*	19	*Pythium* sp.
6	*A. ochracious*	20	*Penicillium* sp.
7	*A. candidus*	21	*P. marneffei*
8	*Trichoderma harzianum*	22	*P. chrysogenium*
9	*T. viride*	23	*P. digitatum*

Rhizoctania solani	24	*Fusarium solani*	10
P. griseofolvum	25	*F. oxysporium*	11
P. italicum	26	*Chaetomium* sp.	12
Mucor sp.	27	*Geotrichum candidum*	13
Bipolaris australeinsis	28	*Metarhizium anisopliae*	14

2-4:النسب المئوية لظهور الأجناس الفطرية وأعداد الأنواع المعزولة :

يبين الجدول (2) ان الجنس *Aspergillus* ظهر في العينات جميعها بنسبة 95.43 % يليه الجنس *Bipolaris* بنسبة 84.51 % ثم الجنس *Fusarium* على التوالي بنسبة 60.31 % في حين ظهر الجنسان *Penicillium* و*Trichoderma* على التوالي بنسبة 48.14 % و 32.80 % كما وحقق الفطر *Alternaria* نسبة ظهور 28.03 % بينما انحصرت نسبة ظهور الأجناس الباقية بين (3.25-23.80) % .

أما من حيث عدد الأنواع فقد اظهرت الأجناس الفطرية اختلافا كبيرا في عدد الأنواع التابعه لها وكان الجنس *Aspergillus* أكثرها من حيث عدد الأنواع اذ عزل منه 8 أنواع تلاه الجنس *Penicillium* حيث عزل منه 7 أنواع يتبعه الأجناس *Fusarium* و *Trichoderma* و *Pythium* بنوعين لكل منهم أما بقية الأجناس الفطرية فقد عزل منها نوعا واحدا فقط واتفقت هذه النتيجه لما وجده الجبوري (2008) , كما جاءت النتائج مشابهه لما وجده الباحث Pereira *et al*.,(2009) حيث وضح ان الأنواع المعزولة الأكثر كانت للجنس *Aspergillus* تلاه الجنسان *Penicillium* و*Fusarium* . بينما أشار صالح وآخرون (2011) الى ان اكثر الفطريات ظهورا هو الفطر *A. chlamydospora* في حين حقق الفطر *A. niger* أقل نسبة ظهور .

وذكر الراضي (2003) ان سبب ظهور الفطر *Aspergillus* المتكرر وفي مقدمة الأجناس الأخرى يعود الى كونه من الفطريات ذات الأنتشار الواسع في المناطق الدافئة فضلا عن تكوينه اعداد كبيره من الأبواغ .

جدول (3) الأجناس الفطرية وعدد أنواعها والنسبة المئوية لظهورها خلال المدة من شهر كانون الأول 2014 لغاية شهر حزيران 2016 المعزوله من البعوضة *Cx. quinquefasciatus*

ت	الأجناس	عدد الأنواع	عدد المستعمرات	النسبة المئوية للظهور %
1	*Aspergillus*	7	27	95.43
2	*Bipolaris*	1	24	84.51
3	*Fusarium*	2	21	60.31
4	*Penicillium*	6	18	48.14
5	*Trichoderma*	2	10	32.80
6	*Alternaria*	1	9	28.03
7	*Pythium*	2	8	23.80
8	*Rhodotorula*	1	3	10.02
9	*Mucor*	1	2	5.64
10	*Candida*	1	2	5.64
11	*Metarhizium*	1	1	3.25
12	*Rhizoctonia*	1	1	3.25
13	*Chaetomium*	1	1	3.25
14	*Trichothecium*	1	1	3.25

جدول(4) النسب المئوية لظهور أنواع الأجناس الفطرية *Aspergillus* و*Bipolaris* و*Fusarium* خلال المدة من شهر كانون الأول لغاية شهر حزيران 2016

الأجناس والأنواع	النسبة المئوية للظهور %
Aspergillus parasiticus	98
A.niger	71
A. terreus	55
A. flavus	50
A. ochracious	37.5
A. nidulans	20
A. candidus	12.5
B. australiensis	88
F. oxysporium	80
F. solani	55

4- 3 :عزل الفطريات *F. oxysporum , B. australeinsis, A. parasiticus* وتشخيصها:

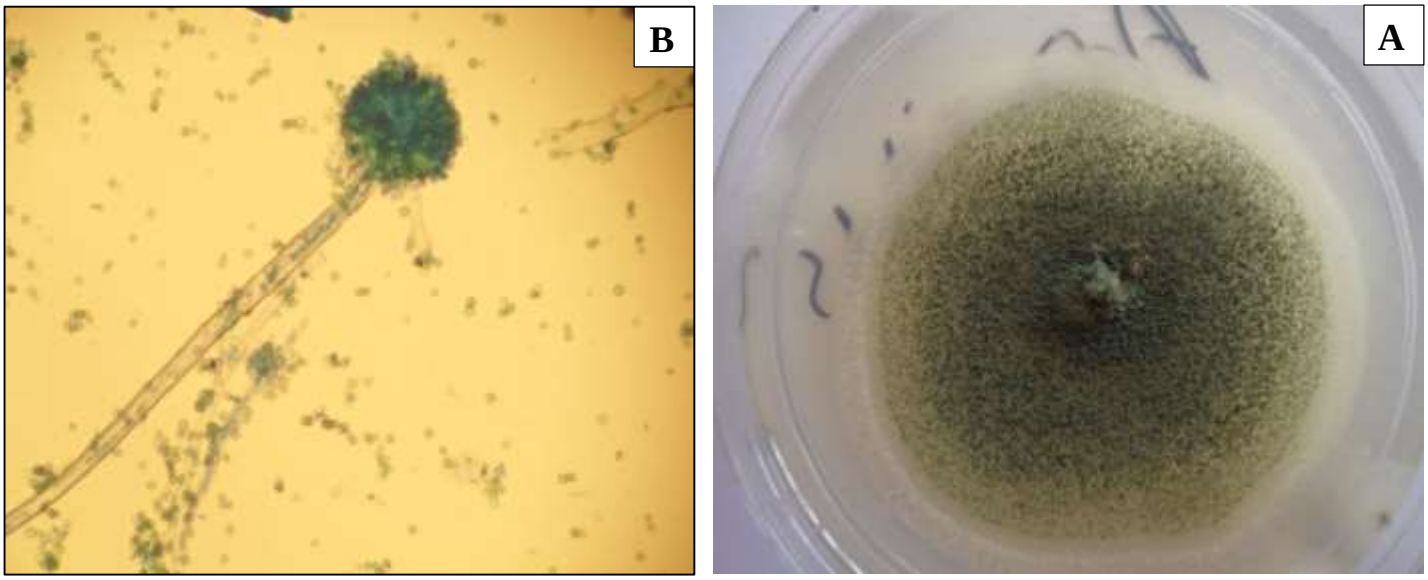
لقد تم اختيار الفطريات *F. oxysporum, B. australeinsis, A. parasiticus* اعتمادا على نسب ترددها المبينه في الجدول (3) وذلك لتقويم كفائتها في امراضية يرقات البعوض *Cx. quinquefasciatus* وتجدر الأشارة الى ان عزل الفطرين *A. parasiticus* **و** *B. australeinsis* من اليرقات المصابة طبيعيا قد سجل لأول مرة في هذا البحث , وتم اختبار فرضية كوخ الأمراضية وذلك بتصويب الحشرة بالفطريات المذكورة ثم عزلها منها ,كما تم تشخيصها لمستوى النوع اعتمادا على الصفات الواردة في المفتاح التصنيفي للفطريات (Ellis,1971) و (Ellis, 2007) وشملت هذه الصفات :

1-ظهور غزل فطري في جسم اليرقة الميته حيث يكون جسمها هشا وتبدو كأنها محنطه.

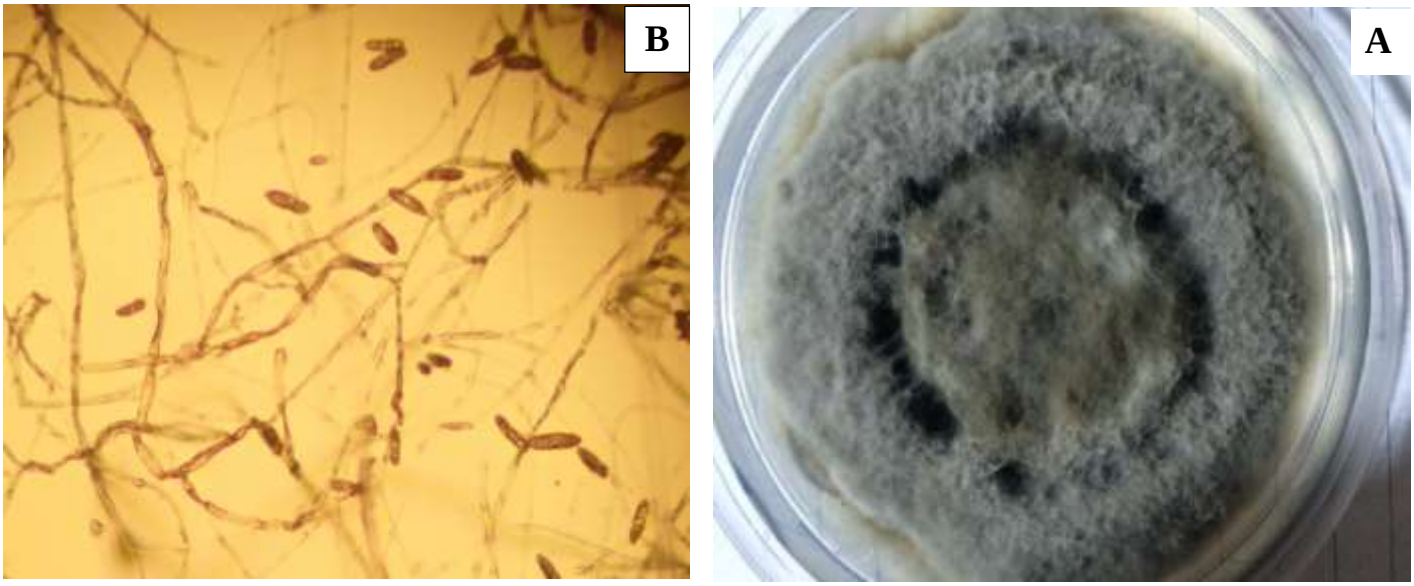
2- تنمو مستعمرات النوع *A. parasiticus* بصورة سريعة على وسط أكار البطاطا وعند درجة حرارة 25 ºم معطية لونا اخضرا غامقا ويعود اللون الأخضر الى لون الأبواغ ويكون شكل الكونيدات بيضوي ونتوءاتها مشوكة (Rodrigues *et al.*,2007a) . (شكل -13-)

3- تكون مستعمرات الفطر *B. australiensis* في بداية نموها ذات لون أبيض ثم تتحول بعد مرور ثلاث أيام الى لون رمادي يميل الى البني المسود غالبا ويمتلك شكل مخمليا عند زراعته على وسط أكار البطاطا وتكون ابواغه كروية ثنائية الخلية على الحوامل الكونيدية لذلك يعرف ب *Bipolaris* اي ان أبواغه ثنائية القطب (Sivanesan,1987). (شكل-14-)

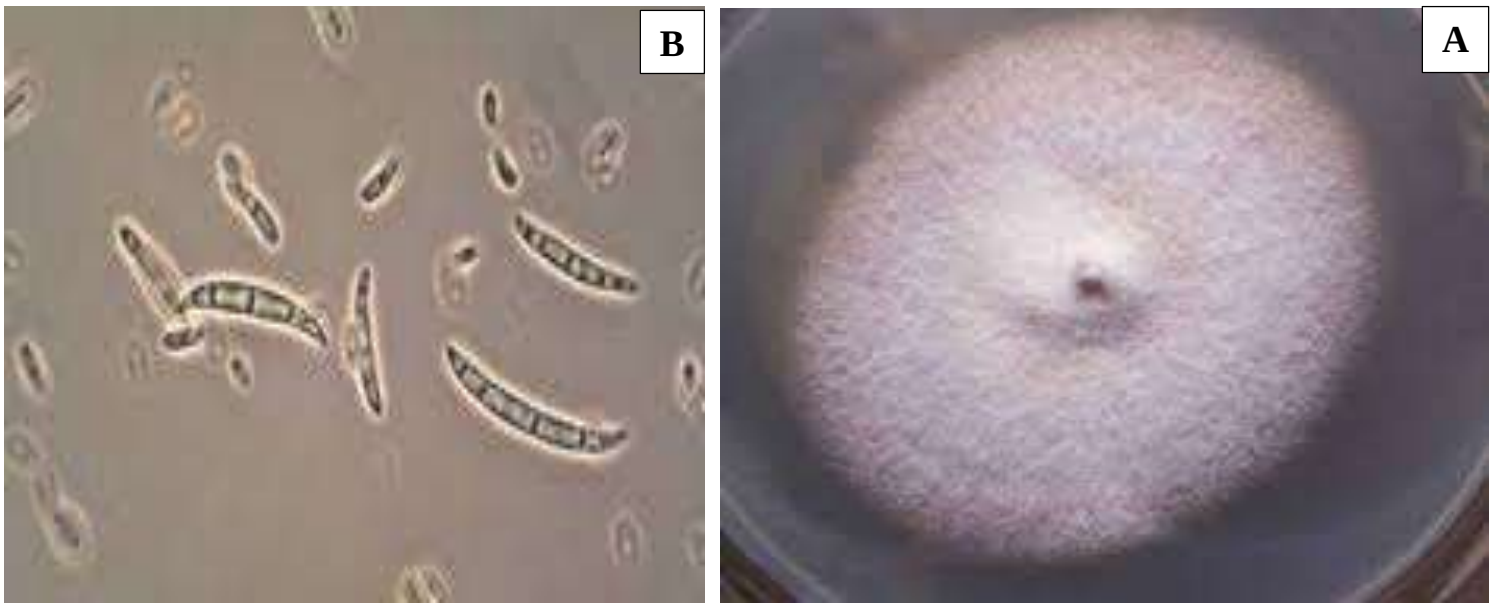
4- تكون مستعمرات الفطر *F. oxysporum* ذات لون أبيض أو وردي على وسط أكار البطاطا (Nelson *et al.*, 1997) كما ينتج هذا الفطر ثلاث أنواع من الكونيدات وهي الكونيديا الكبيرة Macroconidia تحتوي على ثلاث حواجز (خماسية الخلايا) أما النوع الثاني فهي لاتحتوي على حواجز (خلية واحدة) كلوية الشكل وتعرف ب Microconidia أما النوع الثالث هي الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores تكون ذات جدار سميك قد تكون كروية او متطاولة الشكل (Agarios,2005) .فضلا عن تكوين الأجسام الحجرية عندما تكون الظروف غير ملائمة (حسين,2009) .(شكل -15-)



شكل (13) A- مستعمرة فطر *A. parasiticus* على وسط اكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع , B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X



شكل (14) A-مستعمرة الفطر *B. australiensis* على وسط أكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع, B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X



شكل (15) A - مستعمرة الفطر *F. oxysporum* على وسط أكار البطاطا والدكستروز بعمر اسبوع , B –صورة مجهرية للفطر تحت قوة تكبير 400X

4- 5 : الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز عالق أبواغ الفطريات *A. parasiticus* و *B. australeinsis* و *F. oxysporum* كلا على حدة في مختلف ادوار الحياة للبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

4- 5-1 : الأختبار الحيوي في البيوض :

يبين الجدول (5) نتائج تأثير تراكيز مختلفه من معلقات الفطريات *A. parasiticus* , *F. oxysporum, B. australeinsis* كلا على حدة في هلاك بيوض بعوض *Cx. quinquefasciatus* . حيث لوحظ تفوق الفطر *A. parasiticus* بفروق معنويه على الفطريات الأخرى عند استعمال التركيز الأعلى من معلق الفطر حيث بلغت نسبة القتل 50.66 % للبيوض بعد 24 ساعة بالمقارنة مع معاملة السيطرة بينما كانت نسبة القتل عند استعمال معلقي الفطرين *B. australeinsis* و *F. oxysporum* 40 % و 29.66 % في المدة نفسها , بينما عند استعمال التركيز الأدنى لمعلق كل فطر أعطى نسب هلاك أقل فعند استعمال التراكيز 2×10^4 و 3×10^3 بوغ/مل لمعلقي كل فطرين على التوالي اعطى نسب هلاك (21.66% و20.33%) مما يشير الى وجود علاقة طردية بين التركيز ونسبة الهلاك ,على خلاف ماكده Clark *et al.* (1968) من ان فقس بيوض بعوض *Cx.pipiens* لا يتأثر عند تعريضها لأبواغ الفطر *B. bassiana* . كما وذكر صالح (1999) إن تعريض بيض الذبابة البيضاء لمعلق الفطر*B. bassiana* سبب هلاكا بنسبة 81.1 % بعد سبعة ايام من التعريض . واتفقت نتائج البحث مع ماوجده Santos *et al.*,(2009) عندما عرض بيوض بعوضة *Aedes aegypti* الى أبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 2.8×10^2 بوغ/مل حيث أدى الى خفض نسبة الفقس الى 50 %.

اما المحنة (2011) فذكر أن معاملة بيوض بعوض *Cx. quinquefasciatus* و *An. stensphensi* بأبواغ الفطر *M. anisopliae* ادى الى هلاكها بنسبة 58.66% و 60.33% على التوالي عند التركيز 2×10^5 بوغ / مل. أما الكرعاوي (2012) فقد أشارت الى هلاك بيوض بعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. pulcharrhimus* بنسبة 56% و 59.33% على التوالي بفطر *Leptographium lundbergii* عند التركيز 3×10^7 بوغ/ مل . كما وجد الياسري (2014) عند معاملة بيوض الذبابة المنزلية *M. domestica* بأبواغ الفطر *M. anisopliae* فأدى الى هلاكها بنسبة 36.66% عند التركيز 2×10^6 بوغ/ مل . كما وسجلت المشكور (2014) انخفاضا في نسبة فقس بيوض بعوضة *Cx. quinquefasciatus*

بنسبة 59% عند التركيز 2 ×10 ^{6} بوغ/مل عند تعريضها لأبواغ فطر *Chrysosporium keratinophilum* . واتفقت النتائج كذلك مع نتيجة الباحثة الموسوي (2015) عند استعمال أبواغ الفطر *M. anisopliae* ضد بيوض عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* حيث ادى الى هلاكها بنسبة 36.66 % عند التركيز 2 ×10 ^{6} بوغ/مل . واتفقت النتائج أيضا مع نتيجة الغانمي (2016) عند تعريض بيوض بعوض *Cx. quinquefasciatus* لأبواغ الفطر *P. marneffei* حيث ارتفعت نسبة الهلاك بزيادة التركيز حيث بلغت 46.03 % عند التركيز 2×10^{4} بوغ/مل .

جدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطريات *A. parasiticus* و*B. australeinsis* و *F. oxysporium* في بيوض بعوض *Cx. quinquefasciatus*

نوع الفطر	التركيز (بوغ/مل)	النسبة المئوية لهلاك البيوض بعد 24 ساعة
A. parasiticus	4 10×1	23.33
	5 10×1	29.33
	6 10×1	50.66
	السيطرة	0
	المعدل	**35.44**
B. australiensis	3 10×2	16.66
	4 10×2	21.66
	5 10×2	40
	المعدل	**26.10**
	السيطرة	0
F. oxysporum	2 10×3	18.33
	3 10×3	20.33
	4 10×3	29.66
	السيطرة	0
	المعدل	**22.77**

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 بالنسبة لنوع الفطر 3.930 والتراكيز 4.738

والتداخل بين العوامل=3.02

2-5-4 :الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة :

يبين الجدول (6) تأثير تراكيز مختلفة لمعلقات الفطريات قيد البحث في يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* اذ أعطى معلق الفطر *A. parasiticus* عند التركيز 1×10^{6} بوغ/مل أعلى نسبة هلاك لليرقات فقد بلغت نسبة القتل للطور اليرقي الأول 69 % بعد 120ساعة بينما بلغت نسبة القتل عند استعمال معلقي الفطرين *B. australiensis* و*F. oxysporum* (55.33 % ,51 %) على التوالي وذلك عند استعمال التركيز الأعلى فقط وبالمدة نفسها , وبينما انعدمت الهلاكات في معاملة السيطرة , ومما يؤكد وجود فروقات معنوية للتراكيز كافة ، فضلاً على العلاقة الطردية بين التركيز ونسب الهلاك وان هذه العلاقة بدت واضحة بين كلا من مدة التعريض ونسبة الهلاك للأطوار الأربعه حيث ازدادت نسب الهلاك مع ازدياد التركيز ونسبة التعريض عند استعمال معلق الفطر*A. parasiticus* حيث بلغت نسب القتل (25 , 29.33 , 31.66) % بعد 24 , 72 , 120 ساعة على التوالي عند التركيز 1×10^{4} بوغ/مل للطور الأول بينما سجلت نسب القتل (29 , 33 ,49) % في المدة الزمنية نفسها وعند التركيز 1×10^{5} بوغ/مل بينما وصلت نسب القتل (32.33 , 51.66 ,69) % في نفس الفترة وعند التركيز الأعلى .ان سبب الزيادة في نسب الهلاك بزيادة التركيز يعود الى زيادة عدد الأبواغ ومن ثم ازدياد الأبواغ النامية عند مهاجمتها للمضيف فضلا عن اضعاف الجهاز المناعي للحشرة وذلك لأن الجهاز المناعي يستطيع الدفاع عن الجسم عندما يكون التركيز واطئ فقط أما عند التراكيز العالية فقد تقل كفاءته (Scholete *et al.*,2003) ,ويبين التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية في نسب القتل للأطوار الأربعة عند مستوى معنويه 0.05 بالنسبة لمعاملة السيطرة . كما ان نسب الهلاك تقل بزيادة عمر اليرقه فمثلا عند تعريض الأطوار اليرقية الأربعة وبالتوالي لمعلق الفطر *A. parasiticus* وبالتركيز الأعلى وخلال الفتره الزمنية 120 ساعة كانت نسب الهلاك (69, 56 , 43.66 , 35.32) % على التوالي ويعود السبب الى ان النظام المناعي للأطوار اليرقية الأولى يكون غير مكتمل كما ان جدار الجسم يكون رقيقا نوعا ما مما يسهل اختراقها من قبل أبواغ الفطر (Steinhause,1949) . وقد أتفقت النتائج مع ما ذكره الجبوري (2007) حيث وصف العلاقة ما بين تركيز الابواغ ونسب الهلاك بانها طردية حيث كلما ازداد تركيز المعلق البوغي للفطر أرتفع معدل الهلاك وقد يعود السبب في ذلك الى زيادة عدد الأبواغ (الوحدات الاساسية للاصابة الفطرية) . كما وجد المحنة (2011) أن تعريض يرقات الطور الأول لبعوض *Cx. quinquefasciatus* و *An.stephensi* لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 2×10^{5} بوغ/مل ادى الى هلاكها بنسبة 93.33 % و100% بعد مرور خمسة أيام .

وتتفق النتائج ايضا مع ما وجدت المشكور (2014) اذ حصلت على نسبة هلاك 90 % عند تعريض يرقات بعوضة *Cx. quinquefasciatus* لأبواغ الفطر *C. keratinophilum* بتركيز 2 ×10 ^{6} بوغ/مل . كما اتفقت النتائج مع ماجاء به الحسيني (2014) اذ استخدم أربع انواع فطرية هي *A.niger A. oryazae, P. chrysogenum ,A. terrus* لأختبار الفعالية السمية ضد يرقات الطور الرابع للنوع *Cx. quinquefasciatus* وقد بينت النتائج ان الفطر *A. terreus* أكثرها سمية اذ بلغت نسبة الهلاك للطور الرابع عن التركيز 1 مل بلغت 90 % مقارنة بالأنواع الاخرى المدروسة . ووجدت الغانمي (2016) عندما استعملت ثلاث أنواع فطرية ضد الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Cx. quinquefasciatus* حيث سجل الفطر *P. marneffei* اعلى نسبة هلاك عند المدة الزمنية 120 ساعة بلغت 77.70 % عند التركيز 2 ×10 ^{4} بوغ/مل .

جدول (6) تأثير تراكيز مختلفه من معلقات الفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporum* في الأطوار اليرقية لبعوض *Cx. quinquefasciatus*

نوع الفطر	الطور	التراكيز بوغ/مل	النسبة المئوية لهلاك الطور اليرقي بعد مرور (ساعة)		
			24	72	120
A. parasiticus	الأول	4 10×1	25	29.33	31.66
		5 10×1	29	33	49
		6 10×1	32.33	51.66	69
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**28.77**	**37.99**	**49.88**
	الثاني	4 10×1	19.33	21.33	29.33
		5 10×1	26.66	26.66	30
		6 10×1	30.33	47.66	56
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**25.44**	**31.33**	**38.44**
	الثالث	4 10×1	18.66	18.66	26.33
		5 10×1	21	22.33	26.33
		6 10×1	21.33	25.66	43.66
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**20.33**	**22.21**	**32.10**
	الرابع	4 10×1	17.66	19.33	28
		5 10×1	19.66	20.66	22
		6 10×1	23	25.33	35.32
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**20.10**	**21.77**	**28.44**
B. australiensis	الأول	3 10×2	28.33	31.66	34
		4 10×2	34	38.56	51.34
		5 10×2	42.66	46	55.33
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**34.99**	**38.74**	**46.89**
	الثاني	3 10×2	27.54	30.66	37
		4 10×2	21.33	32.23	40
		5 10×2	35	39.66	47
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**27.95**	**34.18**	**41.33**

	الثالث	2×10^{3}	25.66	28.34	33
		2×10^{4}	28	30.66	38
		2×10^{5}	26	35	45.33
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**26.55**	**31.33**	**38.77**
	الرابع	2×10^{3}	25.66	26.31	30
		2×10^{4}	23.61	25.6	36
		2×10^{5}	24.63	30	42
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**24.63**	**27.30**	**36**
F. oxysporum	الأول	3×10^{2}	22.33	25.66	33
		3×10^{3}	33.33	34.33	45
		3×10^{4}	38	41	51
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**31.33**	**33.66**	**43**
	الثاني	3×10^{2}	20.33	25	32
		3×10^{3}	28.66	30.66	34.33
		3×10^{4}	35.66	35.33	44
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**28.21**	**30.33**	**36.77**
	الثالث	3×10^{2}	18.33	25.33	29.33
		3×10^{3}	29	31.34	32.66
		3×10^{4}	23.66	34	37.23
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**23.66**	**30.22**	**33.07**
	الرابع	3×10^{2}	16	23.33	28.43
		3×10^{3}	27	33.65	35
		3×10^{4}	30	3	36.63
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	**24.33**	**19.99**	**33.35**

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 بالنسبة للتراكيز 4.402 وللزمن 3.81 وللأطوار اليرقية 4.402 وللانواع الفطرية 3.81 والتداخل بين العوامل =4.823

- 5- 4 :الأختبار الحيوي في البالغات :

يبين الجدول (8) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطريات *A. parasiticus* , *B. australiensis* , *F. oxysporum* في بالغات بعوض *Cx. quinquefasciatus* اذ تفوق المعلق الفطري للفطر *A. parasiticus* بفروق معنوية عن باقي الفطريات عن استعمال أعلى تركيز من معلق الفطر حيث بلغت نسبة القتل 70 % بالنسبة للذكور و59.66 % بالنسبة للأناث بعد 168 ساعة, بينما بلغت نسبة الهلاك عند استعمال التركيز الأعلى من معلقي الفطرين *B. australiensis, F. oxysporium* ولكل من الذكور والأناث على التوالي (54%,40%) و (42%, 39.66 %) , لقد ازدادت نسب الهلاكات ولجميع البالغات مع زياده المدة الزمنية للتعريض فكانت العلاقة طردية بين تراكيز المعلق الفطري وكل من نسب الهلاك ومدة التعريض ,كما بين التحليل الأحصائي وجود فروق معنويه تبعا للجنس وان الأناث قد أظهرت مقاومه أكبر من الذكور. اتفقت النتائج مع (1982) Soares حيث ذكر أن تعريض بالغات بعوض *Ochlerotatus sierrensis* للعالق البوغي للفطر *T. cylindrosporum* بتركيز 5×10^{6} بوغ/مل يؤدي إلى هلاك 50% من البالغات بعد خمسة أيام و 100% بعد تسعة أيام من المعاملة

. وأظهرت النتائج الحالية تشابها بشكل عام مع بعض الأبحاث حول تأثير أنواع فطرية اخرى في بالغات البعوض حيث عند استعمال فطر *Fusarium pallidorosum* ضد اناث *Cx. quinquefasciatus* يؤدي إلى هلاكها جميعا خلال أربعة أيام

(Mohanty *et al*.,2008) , وعند استعمال الفطر *M.anisopeliae* ضد بالغات *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* فذكور كلا النوعين كانت أكثر تاثرا من الأناث حيث كانت نسبة هلاك الذكور على التوالي 93.33% و 100% عند تركيز 2×10^5 بوغ/مل بعد مرور 168 ساعة في حين كانت نسبة هلاك الأناث لكلا النوعين 90% و 96% على التوالي بالتركيز نفسه والمدة نفسها(المحنه ,2011) .كما وذكرت الكرعاوي (2012) ان تعريض بالغات بعوض *An. pulcharrhimus* و *Cx. quinquefasciatus* لعالق الفطر *L. lundbergii* بتركيز 3×10^7 بوغ/مل ادى الى هلاك ذكور *An. pulcharrhimus* 93.33% وللأناث 90% بعد مرور 168 ساعة بينما بلغت نسبة هلاك ذكور *Cx. quinquefasciatus* 90% والأناث 86.66% في المدة ذاتها . كما واكدت المشكور (2014) ان استعمال الفطر *C. keratinophilum* في مكافحة بعوضة *Cx. quinquefasciatus* ادى الى هلاك البالغات بنسبة 90 % للذكور و86.66 للاناث بعد مرور خمسة أيام . واتفقت نتائج البحث مع الغانمي (2016) حيث استعملت الفطريات *P. marneffei* , *A. niger* , *G.candidum* أيضا في مكافحة بعوض *Cx. quinquefasciatus* حيث أعطى الفطر *P. marneffei* أعلى نسبة هلاك للبالغات وعند استعمال التركيز الأعلى وخلال نفس المدة حيث بلغت النسبة 76.77 % للذكور و73.9 % للأناث . ان ميكانيكية عمل الفطر ضد البالغات (الذكور والأناث) تتم من خلال الملامسة فبعد رش البالغة بالمعلق الفطري يحدث اختراق لجدار جسم الحشرة (من المناطق الرقيقة بالكيوتكل) ثم تدخل الفطريات تجويف الجسم حيث تبدأ بمهاجمة انسجته المختلفة وتستمر بالنمو والتكاثر حتى يمتلأ جسم الحشرة المصابة بالنموات الخيطية (الهايفات) ، بعد ذلك يرسل الفطر حوامل كونيدية الى الخارج يتبعها تكوين الجسم الثمري وتموت الحشرة عند هذه الحالة (Scholete *et al*.,2004) .

- 8: التحري عن عوامل الضراوة بواسطة اختبار كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) للفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و *F. oxysporum*

ان تقنية السائل ذي الاداء العالي تعد من أسرع وأفضل الطرائق للكشف عن الانزيمات والسموم قيد البحث (Ergan and Andre,1989) وقد كان ناجحا عند الكشف عن نواتج الايض الثانوية للفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و*F. oxysporum* حيث اعطى عند حقن النموذج عملية فصل لنواتج الايض الثانوية وادت الى ظهور قمم فصل جاءت متطابقة في قيم زمن احتجازها (Retention Time, Rt) وتسلسل اشكالها مع قمم فصل وازمان احتجاز لعينات قياسية (Authentic Samples) .

وكما يبدو من الجدول (12) والملاحق (السموم والأنزيمات) ان ازمان الاحتجاز لمركبات نواتج الأيض الثانوية للفطريات المذكورة قد امتدت بمدى (1- 8) دقيقة يمكن ان تعود هذه المركبات الى (كحولات وكيتونات وايبوكسيدات وفينولات وقلويدات ....) ويعلل كون ان ازمان احتجازها قليلة بسبب قطبيتها العالية وسرعة مرورها في العمود اللاقطبي المستعمل حيث تم التعرف على نوعية المركبات المفصولة للنماذج المحللة بمقارنة أزمان الأحتجاز لها مع تلك للمركبات القياسية.

أما الجدول (13) فيبين تراكيز المركبات المفصولة (سموم وأنزيمات) للفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و*F. oxysporum* , فبالنسبة للفطر *A. parasiticus* كان لسم الأفلاتوكسين B_2 أعلى تركيزبين السموم بلغ (7.85) µg/m وتمت دراسة تأثيره على ثلاث أنواع من الحشرات هي *Aedes aegypti, Musca domestica and Drosophila melanogaster* وفي كل الأنواع تسبب الأفلاتوكسين في انخفاض انتاج البيض ونسبة الفقس (Matsumura and Knight,1967) . أما بالنسبة للأنزيمات فسجل الأنزيم N-acetyl-β-glcosaminindase أعلى تركيز بلغ (26.80)ويليه الأنزيم Alkaline protease حيث كان تركيزه (16.87) , وأشار الباحثان Frisvad and Thrane (1987) الى فصل نواتج الأيض الثانوية للفطريات *Aspergillus* و *Fusarium* وشملت السموم منها الأفلاتوكسينات B_1,B_2,G_1,G_2 وكذلك سموم fusarin C و zearalenone الذي تفرزه اغلب أنواع الجنس *Fusarium* فضلا عن انزيمات وقلويدات وتربينات .كما استطاع Frisvad *et al.*,(1990) تشخيص سم الأوكراتوكسين من فطر *Penicillium* بواسطة تقنية السائل ذي الأداء العالي .

كما تمكن Tunga *et al.*(2003) من الكشف عن وجود انزيم Alkaline protease في فطر *A. parasiticus* .

أما فطر *B. australiensis* فكان للسم Prehelminthosporal (PHL) أعلى تركيز بلغ (21.69) , كما كان لأنزيم Serineprotenase أعلى تركيز بلغ (40.89) يليه الأنزيم Glycosidase بتركيز (34.28) . بينما فطر *F. oxysporium* كان للسم Zeralonine أعلى تركيز بين المركبات الأخرى التي يفرزها الفطر حيث كان تركيزه (45.06) يليه السم Fusaric acid بتركيز (21.55) والذي تكون سميته عالية جدا , أما الأنزيم Pectin methyl esterase (PME) فقد وجد بنفس التركيز الأخير ويعمل هذا الانزيم على كسر الاصرة الاسترية بين galacturonan والبكتين هوعبارة عن سكريات متعددة وان الكايتين الذي يكون جدار الجسم في الحشرات هو مجموعة من السكريات المتعددة (Matteo *et al.*,2005) . وربما تعود ضراوة الفطر الى وجود هذه المركبات . كما اختبر الباحث Jimenez-Flores *et al.* (2010) قدرة الفطر *Trichoderma reesei* على افراز انزيم Celluase وتم الكشف عنه بواسطة تقنية السائل ذي الاداء العالي ,اذ يعمل هذا الانزيم على تحليل مادة السليلوز كون السليلوز يشابه في تركيبه الكايتين لكن بدون مجموعة الاسيتاميد (NHCOCH3-)عند موقع ذرة الكاربون الثانية (Dutta *et al* ., 2004) . كما بين الباحثان Sood and Mathur (2014) ان فطر *A.niger* و*C.albicans* له القدرة على افراز انزيم Pectinesterase وتم الكشف بواسطة تقنية السائل ذي الاداء العالي . كما تمكنت الغانمي (2016) من الكشف عن نواتج الأيض الثانوي للفطريات *P. marneffei* و*G.candidum* و*A.niger* بأستخدام التقنية نفسها . وتبين الأشكال من (18- 23) بيانات كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي للفطريات أعلاه.

جدول (12) أزمان احتجاز المركبات في الفطريات *A. parasiticus* و *B. australiensis* و *F. oxysporum* من خلال المقارنه مع عينات قياسية

Rt (Test) min	Rt (Stand.) min	المركبات	الفطريات
1.59	1.64	G_2	*A. parasiticus*
2.75	2.79	G_1	
3.69	3.72	B_2	
4.85	4.85	B_1	
1.39	1.41	Alkaline protease	
2.57	2.57	N-acetyl-β-glcosaminindase	
3.46	3.49	Aminopeptidase	
4.65	4.68	Serineprotenase	
1.85	1.86	Ophiobolin A	*B. australiensis*
3.22	3.21	Prehelminthosporo (PHL)	
4.70	4.71	6-epiophiobolin	
6.13	6.14	6-epianhydroophiobolin	
1.79	1.74	Pectinlyase	
2.68	2.65	Carboxy methyl cellulose	
4.00	3.99	Glycosidase	
5.11	5.13	Endopeptidase	
5.92	5.91	Serineprotenase	
7.11	7.08	Phenoloxidase	
2.22	2.26	Zearalenone	*F. oxysporum*
3.56	3.56	Fusaric acid	
4.57	4.54	9,10-di hydrofusaric acid	
5.44	5.41	Moniliformin	
1.72	1.75	Pectinlyase	
3.14	3.20	Pectinmethyleserase	
4.11	4.17	Cellulaes	
4.98	5.07	Hemicellulase	
6.93	6.94	Galactanase	
7.99	8.03	Chitinsynthase	

جدول (13) تراكيز المركبات المفصولة (السموم والأنزيمات) للفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و*F. oxysporum*

الفطريات	المركبات	تركيز العينة في 25 µg/ml
A. parasiticus	G_2	6.27
	G_1	5.66
	B_2	7.85
	B_1	4.39
	Alkaline protease	16.87
	N-acetyl-β-glcosaminindase	26.80
	Aminopeptidase	7.65
	Serineprotenase	4.48
B. australiensis	Ophiobolin A	10.84
	Prehelminthosporo (PHL)	21.69
	6-epiophiobolin	14.44
	6-epianhydroophiobolin	6.22
	Pectinlyase	16.50
	Carboxy methyl cellulose	30.57
	Glycosidase	34.28
	Endopeptidase	31.68
	Serineprotenase	40.89
	Phenoloxidase	17.76
F. oxysporum	Zearalenone	45.06
	Fusaric acid	21.55
	9,10-dihydrofusaric acid	19.19
	Moniliformin	12.26
	Pectinlyase	19.89
	Pectinmethyleserase	45.82
	Cellulaes	20.86
	Hemicellulase	18.16
	Galactanase	11.66
	Chitinsynthase	9.65

الأستنتاجات :

1. ان الفطرين *Aspergillus parasiticus* و*Bipolaris australiensis* يصيبان اليرقات بصورة طبيعية ويؤثران في خفض أعداد الحشرة .

2. أثرت تراكيز العالق الفطري ونواتج الأيض الثانوية الخام لرواشح الفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* في أدوار حياة البعوض حيث أبدت البيوض والعذارى مقاومة ملحوظة بينما أرتفعت نسبة هلاك الاطوار اليرقية والبالغات بصورة اكبر وكان أكثر الأطوار هلاكا الطور الأول .

3. أثرت تراكيز نواتج الأيض الثانوية الخام بشكل ملحوظ حيث ارتفعت نسب الهلاك بدرجة كبيرة .

4.أظهر فحص HPLC ان الفطريات *A. parasiticus* و*B. australiensis* و *F. oxysporium* أنتجت العديد من السموم وكذلك الأنزيمات والتي تعد عوامل ضراوة للفطر ضد ادوار نمو البعوض المدروس .

التوصيات :

1. التقصي عن الفطريات الممرضة للبعوض والتي تصيب البعوض بصورة طبيعية وتقويم كفاءتها كعوامل مكافحة حيوية لنوع البعوض المدروس أو الأنواع الأخرى .

2. استعمال نواتج الأيض الثانوية المنقاة بعمود الفصل في تصنيع مبيد فطري لغرض مكافحة البعوض .

3. التوصية بأستخدام الفطريات في المكافحة لكونها رخيصة الثمن وغير مكلفة .

المصادر باللغة العربية :

- **إبراهيم ، إسماعيل خليل ؛ الجبوري و كركز محمد ثلج. (١٩٩٨).** السموم الفطرية أثارها ومخاطرها. مركز أباء للأبحاث الزراعية . ٢٣٤صفحة: ٦٩ -٧٧ .
- **أبو الحب , جليل كريم.(١٩٧٩)** .الحشرات الطبية والبيطرية في العراق , (القسم النظري) .كلية الزراعة – جامعة بغداد . ٤٥٠ صفحة .
- **الجبوري , دينا حسين هاتف .(٢٠٠٨).** دراسات مختبرية حول استخدام رواشح بعض الفطريات كطعوم سامة لمكافحة حشرة الذبابة المنزلية *Musca domestica*. رسالة ماجستير –كلية الزراعة /جامعة الكوفة.١٠٠ صفحة .
- **الجبوري ، أميرة ناجي حسين (٢٠٠٧).** عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض أنواع حشرات المنّ وتقويم قدرتها التطفلية والإفرازية ضد(حشرة منّ الدفلة *Aphis nerii* Boyer (Homoptera : Aphididae) . رسالة ماجستير . الكلية التقنية المسيب . ٦٣ صفحة.
- **الراضي .زهراء فلاح عزيز.(٢٠١٣).** تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات القسط الهندي *Costus speciosus* على بعض انواع الفطر .*Aspergillus* spp في الجرذان المخمجة تجريبياً بداء الرشاشيات الرئوي .كلية العلوم /جامعة القادسية.١٢٦ صفحة .
- **الراوي, خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله.(١٩٩٢)**.تصميم وتحليل التجارب الزراعية .دار الكتب للطباعة والنشر .جامعة الموصل.
- **الغانمي ,عامرة عبد الهادي رحمن (٢٠١٦)** .مقارنة كفاءة بعض الفطريات ونواتج أيضها في مكافحة بعوض *Culex quinquefasciatus*. رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة القادسية .123 صفحة .
- **المحنة ، احمد غانم نوري (٢٠١١)** . تقييم كفاءة الفطر.Sorok (Metsch.) *Metarhizium anisoplia* في مكافحة نوعين من البعوض (Diptera: Culicidae) في محافظة الديوانية.رسالة ماجستير /كلية العلوم / جامعة القادسية . ١٢٧ صفحة.
- **المشكور ,براء جليل سعيد .(٢٠١٤)** . تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الجرثومية في السيطرة على البعوض (Diptera:culicidae) *Culex quinquefasciatus* ,رسالة ماجستير .كلية العلوم /جامعة القادسية .٦٤ صفحة.

- **الياسري ، علي مرتضى كاظم (٢٠١٤)** . تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية في بعض الجوانب الحياتية للذبابة المنزلية *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae) . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة القادسية .
- **اليوسف ، عقيل عدنان(٢٠٠٨) .** كفاءة بعض الفطريات في المقاومة الإحيائية لحشرة منّ الباقلاء الأسود (Homoptera : Aphididae) *Aphis fabae* Scopolli. على نبات الباقلاء . *Vicia fabae* مجلة ميسان للدراسات الاكاديمية **خلف** ، جنان مالك.(١٩٩٥).المقاومة الحيوية للذبابة المنزلية (Diptera;Muscidae) *Musca domestica L.*باستخدام الفطريات .رسالة الماجستير _كلية الزراعة/جامعة البصرة.٥٧ صفحة .
- **شريف , فياض محمد .(٢٠١٢).** أساسيات الفطريات /تصنيف وتقسيم الفطريات ,دار الكتب للطباعة والنشر, بغداد/ العراق.الذاكرة للنشر والتوزيع .784 صفحة .
- **صالح .يحيى عاشور, جنان مالك خلف وثامر سلمان جبر .(٢٠١١)** . عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لحشرة منّ الباقلاء الأسود وامكانية استخدام بعضها في المقاومة الإحيائية للحشرة. مجلة الكوفة للعلوم.٣ (١):٨٩-٩٤ .
- **عبد القادر، أياد عبد الوهاب . (٢٠٠٠).** دراسة تصنيفية لعائلة البعوض (Diptera: Culicidae) في محافظة البصرة. أطروحة دكتوراه. علوم حياة. جامعة البصرة.٢٣٠ صفحة.
- **علي ، هالة هيثم محمد .(٢٠٠٧).** دراسة تأثير المستخلص الايثانولي لاوراق وثمار نبات الدورانتا .*Duranta repens L* وفطر *Beauveria bassiana* على الاداء الحياتي لبعوضة *Culex pipiens pipiens L* . رسالة ماجستير . كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد . ١٣٧ صفحة.
- **نوار, مصطفى والناطور , رشاد.(١٩٨٩).**الميكوتوكسينات والتسمم الميكوتوكسيني في الأنسان والحيوان . ج1 و ج2 منشورات الجامعة الأردنية .

المصادر باللغة الأنكليزية:

- **Abbot , W. (1925).** A method of computing the effectiveness of insecticide . J. Econ. Entomol. 18 : 265 – 267 .
- **Abul-hab , J.K. (1968)**. Larvae of Culicine mosquitoes of Iraq with a key for their Identification . Bull. End – Dis . Baghdad . X(1 – 4) : 23 .
- **Adhikari, K., E. Chambers, R. Miller, L. Váquez-Araúo, N. Bhumiratana, and C. Philip.(2011).** Development of a lexicon for beef flavor in intact muscle. J. Sens. Stud. 26:413-420.

  doi:10.1111/j.1745-459X.2011.00356**.**
- **Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. (1996).** Principles of seed pathology . Second edition.Lewis publishers. NewYork, 539pp.
- **Agrios, G.N. (1997)**. Plant Pathology 4th ed. Academic Press 635pp.
- **Alcorn, J.L. (1978).** Two new *Cochliobolus* species. Transactions of the British Mycological Society 70: 61–65.
- **Alekseev, N. E. Gapontsev , V. P. Zhabotenski, M. E. (1980)**. Laser phosphate.
- **Alexopules , C.G.; Mims ,C.W. and Blackwell, M. (1996)** . Introductory Mycology . 4th . ed. John Wiley & Sons , New York.p:127.
- **Ali ,A .(2000).** Evaluation of Agnique MMF in man-made ponds for the control of pestiferous midges (Diptera: Chironomidae). J. Am. Mosq Control Assoc. 16:313–320.
- **Alves S.B., Rossi. L.S., Lopes R.B., Tamai M.A., and Pereira R.M., (2002**). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against Diatraea

saccharalis(Lepidoptera: Crambidae) and Tetranychusurticae(Acari: Tetranychidae), J. Invert. Pathol., 81: 70-77

- **Amalraj , D. ; Vasuki, V. ; Kalyanasundaram, M. ; Tay, B.K. and Das, P.K. (1988).** Laboratory and field evaluation of three insect growth regulators against mosquito vectors. Indian J. Med. Res. 87: 24 – 31 .
- **Anderson, J.F.; Ringo, S.L. (1969) .** *Entomophthora aquatica* sp, n. infecting floodwater mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology. 13:386–393.
- **Andolfi, L.; Bourkoula, E.; Migliorini, E.; Palma, A.; Pucer, A.; Skrap, M.; (2014)**. Investigation of Adhesion and Mechanical Properties of Human Glioma Cells by Single Cell Force Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. PLoS ONE 9(11): e112582. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112582.
- **Apoga,D.; Helena, Å.; Hans-Börje, J.;Odham, G. (2002).** Relationship Between Production of the Phytotoxin Prehelminthosporol and Virulence in Isolates of the Plant Pathogenic Fungus *Bipolaris sorokiniana*. European Journal of Plant Pathology ,Volume 108, Issue 6, pp 519–526.
- **Asao, T.; Buchi, G.; Abdel Kader,M.; Chang, S. B.; Wick, E. L. and Wogan, G. N. (1963).** Aflatoxin B and G. J. Am. Chem. Soc., 85:1706- 1707.
- **Rajesh, B.; Arockia John Paul, J.; Karmegam, N. (2014)** .Composting of Pressmud Using Microbial Inoculants Isolated from Earthworm Gut. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology. 2349-8080Volume 1 Number 4 pp. 52-60 .

- **Bacon, G., Beckman, S., Mowery, D., & Wilson, E. (1996).** Managing product definition in high- technology industries: a pilot study. California Management Review, 36(3), 32-56. http://dx.doi.org/10.2307/41165754.
- **Badran ,R.A.M and Aly, M.Z.Y.(1995).** Studies on the mycotic inhabitants of *Culex pipiens* collected from fresh water ponds in Egypt. Mycopathologia . 132: 105–110.
- **Balachander, M.;Remadevi, O.K.; Sasidharan, T.O and Bai, N.S.(2012)**.Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer, *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera:pyralidea). Journal of Forestry Research.23(4):651-659.
- **Bannete, J. W. and Christensen, S. B. (1983).** New perspectives on aflatoxin biosynthesis. Adv. Appl. Microbial.,29:53-92.
- **Bartnicki-Garcia, S. (1963).**Mold-yeast dimorphism of *Mucor*. Bact. Rev. 27:293—304.
- **Becker ,N.; Petric ,D.; Boase, C.; Madon, M.; Dahl ,C. and Kaiser,A. (2010).** Mosquitoes and Their Control, Springer Heidelberg Dordrecht London. New York. Library of Congress .Second Edition.608pp.
- **Beehler,J.W.; and Mulla, M.S.(1996).**Larvicidal oils modify the oviposition behaviour of *Culex* mosquitoes. J Vector Ecol21(1):60–65pp.
- **Benoit, J.B.; Yoder, J.A.; Zettler, L.W. and Hobbs, H.H. (2004)**. Mycoflora of a trogloxenic cave cricket, *Hadenoecus cumberlandicus (Orthoptera:Rhaphidophoridae),* from two small caves in Northeastern Kentucky. Annals of the Entomological Society of America. 97: 989–993.

- **Benserradj ,O. and Mihoubi,I.(2014).**Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against *mosquito larvae in Algeria* . International Journal of Current Microbiology. 3(1): 54-62.
- **Berbee, M.L.;Pirseyedi, M.; Hubbard, S. (1999).** *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 91:964–977.
- **Betina, V., E.d. (1989)**. Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects-bioactive molecules , Vol.9, Elsevier, New York, 32-51pp.
- **Bewley, J. D. & Black, M. (1985).**Seeds: Physiology of Development.
- **Bisht, G.S.; Joshi, C. and Khulbe, R.D. (1996).** Watermolds: potential biological control agents of malaria vector *Anopheles culicifacies*. Current Sci. 70: 393-395.
- **Bommakant , A.S. and Waliyar , F.(2002)** . *Aspergillus* and Aflatoxin in groundnuts . Carcinogen. J., 124 : 535-545pp .
- **Boucias, D .G and Pendland , J.C. (1998).** Entomopathogenic fungi ; fungi Imperfect. Princip. insec.pathol. 10:321-359.
- **Bradford, M. (1976)** . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry .72: 248-254.
- **Bukhari, S.B.; Muhammad, I.B.; Shahabuddin, M.(2008)** .Antioxidant activity from the extract of fenugreek seeds Pak. J. Anal. Environ. Chem., 9 (2), pp. 78–83.

- **Butt T.M., (2002).** Use of entomogenous fungi for the control of insect pests, In: Esser K., and Bennett J.W. (eds.), Mycota, Springer, Berlin, pp.111 -134.
- **Buzina, W., Braun, H., Schimpl, K. and Stammberger, H. (2003**). *Bipolaris spicifera* Causes Fungus Balls of the Sinuses and Triggers Polypoid Chronic Rhinosinusitis in an Immunocompetent Patient. J. Clin. Microbiol., 41: 4885-4887.
- **Calvo, A. M., Gardner, H. W. & Keller, N. P. (2001)**.Genetic analytical.
- **Calvo, A. M., Hinze, L. L., Gardner, H. W. & Keller, N. P. (1999)**. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. Appl Environ Microbiol 65 , 3668–3673.
- **Carlson ,H.K.;Fares,B.I .;Garder ,J.O. (2002).** Aflatoxins,In:mMycotoxins .Let.Rev.London. Press.P,1-7.
- **Catteruccia ,F.; Benton ,J.P.;and Crisanti, A. (2005).** An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. Nat Biotech. 23(11): 1414–1417.
- **CDC. (June 2007).** CDC answers your questions about St.Louis encephalitis. *Centerfor Disease Control*. http://www.cdc.gov/sle/technical/fact.html.(2June 2009).

- **Chang, S. B.; Abdel-Kader, M. M.; Wick, E. L. and Wagon, G. N. (1963).** Aflatoxin B_2 :Chemical identify and biological activity. Scince., 142: 1191-1192.
- **Chapman, H.C. (1974).** Biological control of mosquito larvae . Annual Review of Entomol.19: 33-59.

- **Chung WH, Chuang WC, Ting PF, Rue CC, Huang HC, Huang JW (2009)**. Nature of resistance to methyl benzimidazole carbamate fungicides in *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli* in Taiwan. J Phytopathol 157(11–12):742–747.
- **Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM**, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G.(2011) .Science.332:855–858.
- **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.
- **Cleveland, T. E. and Bhatnagar.(1990)**. Evidnce for denovo synthesis of an aflatoxin pathway methyltransferase near the cessation of active growth and the on set of aflatoxin biosynthesis in *A. parasiticus* mycelia. Can. J. Microbial., 361:1-5.
- **Cocker,R. D.; Jones, B. C.; Nagler, M. J. and Jnpart, G. A.; Gillman, A. J.; Wellbridge; S. Panigrahi. (1984)**. Mycotoxin training manual tropical development and research Institute oversea development administration , 127 Clerken Well Road, London,Eric 5DB.
- **Cole, M. and Rolinson, G.N. (1972)**. Microbial metabolites with insecticidal properties. Appl Microbiol, 24, 660‑2.connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*.J Biol Chem276, 25766–25774.
- **Cordero, J. B.; Stefanatos, R. K.; Scopelliti, A.; Vidal, M.;and Sansom , O. J.(2012)**.Inducible progenitor –derived Wingless

regulater adult midgut regeneration in *Drosophila*.EMBO J. V31(19) :3901-3917.

- **Cuebas-Incle, E.L.;(1992).** Infection of adult mosquitoes by the entomopathogenic fungus *Erynia conica* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) Journal of the American Mosquito Control Association. 8:367–371.
- **Cullen,J.M and Newberne,P.M.;(1994).** Acutehepatotoxicity of aflatoxins. In thetoxicology of the aflatoxins.HumanHealth, Veterinary and AgricultureSignificance . Eaton,D.L,Groopman,J.D (eds) Academic press,Toront, Ont.pp.3-26.
- **Curtis, C.F.; Malecela-Lazaro, M.R.; Reuben, R.and Maxwell, C.A. (2002).** Use of floating layers of polystyrene beads to control populations of the filaria vector *Culex quinquefasciatus.* Ann Trop Med Parasitol. 96(2):97–104.
- **Desjardins, A.E.; (2003).** *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). Annu.Rev. Phytopathol. 41, 177–198.
- **Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M.I.G. (2003)**. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal.
- **Dutton, M. F.; and Heathcote, J. G.; (1969).** Two new hydroxyl aflatoxin. Chem. Ind.,983.
- **Elliott, R.; Greenberg, L. S.; & Lietaer, G.; (2004).** Research on experiential psychotherapies. In M. J. Lambert (Ed.), Bergin & Garfield's handbook of psychotherapy and behaviour change (5th ed., pp. 493–540). New York, NY: Wiley.
- **Ellis , D.; Davis , S.; Alexiou, H.; Hondke , R. and Bartley , R. (2007).** Descriptions of medical fungi. second edition . University of Adelaide . AUSTALIA: 204pp.

- **Ellis, M.B.; (1971).** Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- **EMAN.(1999).** The aflatoxins . eman @leatherheadfood.com.
- **Enrique, Q.; and Alain, V.E.Y.; (2004**). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, Mycol. Res., 108(4): 441-452 http://dx.doi.org/10.1017/S0953756204009724.
- **Ergan,F.** and Andre,G.(1989).Lipids,24.76-78.
- **Evans, J. L.; Moclock, M. A.; & Gealt, M. A.; (1986).**The fatty acid composition of the conidia and mycelia of the fungus *Aspergillus.* Adv Exp Med Biol 896:137-53 PMID:27165323.
- **Fannelli, C.F.; Fabbri, A. A.; Luca , C. D. E.; Passi, M. and Passi, S. (1988).** Different effect of some antioxidants on the production of aflatoxins on starchy and oilseeds. in: Nutrition and toxicogical aspects of food processing (Walker, R. and Quattrucci, E. Eds.), 61-73.
- **FAO, (1999).**food insecurity in the word.
- **Fernandez, F.J. (2016)**. Production of Protein Complexes in Non-methylotrophic and Methylotrophic Yeasts : Nonmethylotrophic and Methylotrophic Yeasts. Adv Exp Med Biol 896:137-53 PMID:27165323.

  for insect cuticle sclerotization: participation of amino groups in the
- **Forbish ,R. A.; Bradley , B.D.; Wagnar, D. D; Long-Bardly, P.E. and Hairston , H. (1986).** Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally Contaminated grain. J. Food Prot.,44: 781-785.

- **Foster, W.A.; and Walker, E.D.;(2002).** Mosquitoes (Culicidae). In: Mullen G, Durden L. (editors) Medical and Veterinary Entomology. New York, NY: Academic Press. 245-249pp.
- **Fothergill, A.W.; (1996)**. Identification of Dematiaceous Fungi and Their Role in Human Disease. Clin. Infect. Dis., 22: S179-184.
- **Frances, S.P.;(1991).** Pathogenicity, host range and temperature tolerance of *Crypticola clavifera* (Oomycetes: Lagenidiales) in the laboratory. Journal of the American Mosquito Control Association. 7:504–506.
- **Franz, A.W.E.; Sanchez-Vargas, I.; Adelman, Z.N.; Blair, C.D.; Beaty, B.J.; James, A.A. and Olson, K.E. (2006)**. Engineering RNA interferencebased resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. Proc Nat Acad Sci USA .103(11):4198–4203.
- **Freimoser , F.M. ; Hu , G.; and St Leger , J.; (2005)**. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro . Microbiology.151:361 – 371 .
- **Frisvad, J.C. ; Samson, R.A.; and Stolk, A.C.; (1990).** Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Plenum Press, NewYork. pp. 445.
- **Fuller , M. S.; and Jaworski, A.; (1987).** Zoosporic fungi in teaching and research southeastern publishing Company, Athens, Georgia, 303 pp.
- **Garcia ,D.; Ramos, A.J.; Vicente Sanchis, V.; and Marín, S. (2009).** Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiology. 26(8):757-769.

- **Garcia-Rivera, J. and Casadevall, A. (2001).**Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silvernitrate." Med Mycol .39(4): 353-357.
- **Garret, W.D.;and White, S.A. (1977).**Mosquito control with monomolecular organic surface films: I-selection of optimum film forming agent. Mosq News. 37:344–348 .
- **Gauthier.G.;(2015).**Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects, PLOS Pathogens, 11(2): 106-116.
- **Geetha, I.; Balaraman, K.;(1999).** Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. Indian Journal of Experimental Biology. 37:1148–1150.
- **Gerberg ,E.J.; Barnard, D.R.;and Ward, R.A.; (1994).** Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques. American Mosquito Control Association Bulletin . 5: 61-62.
- **Ghosh,P.K.; Saxena,R.K.; Gupta, R.;Yadav,R.P. and Davidson S.(1996).** Microbial lipases: production and applications. Science progress,79(2) :119-157 .
- **Goettel, M.S. and Inglis, D.(1997).** Fungi: Hyphomycetes. In. : Lacey, L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego.409 pp.
- **Goswami, R.S.; and Kistler, H.C.; (2004).** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol. 5, 515–525.
- **Govindarajan, M.; Jebanesan, A.;and Reetha, D.; (2005)** .Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus Say*. Trop Biomed .22(1):1–3.

- **Greer, C. A.; and Webster, R. K.; (2001).** Occurrence, distribution, epidemiology, cultivar reaction, and management of rice blast disease in California. Plant Dis. 85:1096-1102.
- **Groopman, J. D.; Sabbion, G. and Wild, C.P.;(1991).** Molecular dosimetry of aflatoxin exposure of human cancer in epidemiological , analytical and social consideration (Groopman, J. D. and Skipper, P. Eds. CRC Press, Bocaration, F1. pp.302-324.
- **Grove , J.F.; and Pople , M.;(1980)** . The insecticidal activity of *Beauveria* and enniation complex . Mycopathology .70 : 103 – 105.
- **Hagstrum, D.W.;and Mulla, M.S.; (1968).**Petroleum Oils as Mosquito Larvicides and Pupicides. I Correlation of Physicochemical Properties with Biological Activity. J Eco Ent .61(1):220–225.
- **Hajek, A.E.; and St.leger, R.J. (1994).**Interaction between fungal pathogens and insect hosts . Ann. Rev. Entomol.39 : 293-322
- **Hall, R.A.(1985)**.The fungus *Verticillium lecanii* as amicrobial insecticide against aphids and scales ,Microbial control of pest and plant diseases .Academic Press.London .484-498pp.
- **Hartley ,R. D.; Nesbitt, B.F.; and O'Kelly, J. (1963).** Toxic metabolites of *Aspergillus flavus* .Nature.,198:1056-1058.
- **Hasan ,S.; and Vago, C. (1972) .** The pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to mosquito larvae. Journal of Invertebrate PatholAAogy. 1973;19:268–271.
- **Heathcot, J. G.; and Hibbert, J. R.; Eds.(1978).** Aflatoxin chemical and biological aspects, Elsevies, New York, 55-82.
- **Helinski, M.E.H.**; **Parker, A.G.;and Knols, B.G.J.; (2006).**Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. Malariol J 5(41):1-10.

- **Herborne , J. B.; (1984)**. Phytochemical method, A guide to modern technique of plant analysis. Chapman and Hall, 2nd ed. New York. 288 pp.
- **Hidaka, Y.; Palella, T. D.; O'Toole, T. E.; Tarle, S. A.; Kelley, W. N. (1987).** Human adenine phosphoribosyltransferase: identification of allelic mutations at the nucleotide level as a cause of complete deficiency of the enzyme. J. Clin. Invest. 80: 1409-1415. [PubMed: 3680503.
- **Hill,S. and Connelly ,C.(2013).**Southern House Mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. Entomology and Nematology Department,Cooperative Extension Service,Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 5:100-105pp
- **Hom, P. W., Tsui, A. S.; Wu, J. B.; Lee, T. W.; Zhang,A. Y.; Fu, P. P.; & Li, L.(2009)**. Explaining employment relationships with social exchange and job embeddedness. Journal of Applied Psychology, 94:277–297.
- **Humber, R.A**. **(1997).** Fungi : Identification. In Manual of Techniques in Insect Pathology (L.A.Lacey,ed.) .Academic Press : London. 153-185pp.
- **Ibaraa,J.**; **and Castero,N.(2008).** Insect viruses diversity ,biology and user as bioinsecticides ,Tropical biology and conservation management.5:1-10.
- **Inglis, D.O**.; **Voorhies, M.; Murray ,D.R.and Sil, A. (2013).** Comparative transcriptomic of infectious spores from the fungal pathogen Histoplasma capsulatum reveals a core set of transcripts that specifyinfectious and pathogenic states. Eukaryot Cell .12: 828–852.

- **Ismail, M.A.**and Abdel-Sater, M.A.(1993). Fungi associated with the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisdoval, Mycopathologia .124: 79–86.

- **ITIS. (2009).** *Integrated Taxonomic Information System. (14 June 2016) "Mosquito Ecology and Surveillance Laboratory". Retrieved 7 August 2014.*

- **Jahn, B.; Koch, A.; Schmidt, A. ; Wanner, G. ; Gehringer, H.; Bhakdi, S.and Brakhage, A. A. (1997).** Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. Infect Immun .65(12): 5110-5117.

- **Jestoi, M.(2008).**Emerging *fusarium* -mycotoxins fusaproliferin , beauvericin, enniatins, and moniliformin :areview.pubmed, crit Rev Food Sci Nutri.jan;48(1):21-49. dio:10.1080/10408390601062021.

- **Kalvish, T.K**.and Kukharchuk, I.P.(1974).Pathogenic mycoflora of blood sucking mosquitoes of western Siberia and the Far East. Med Parazit Balenzi .43: 57–64.

- **Kamareddine ,L.(2012).** The Biological Control of the Malaria Vector. Toxins . 4: 748-767.

- **Kang, S.** ; Park, S. & Lee, D. (1999) . Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* . Journal of Invertebrate Pathology. 73: 276-281.

- **Khachatourians, G.G**.; **and Sohail, S.Q. (2008**). Entomopathogenic Fungi, In: Brakhage A.A., and Zipfel P.F. (eds.), Biochemistry and molecular biology, human and animal

relationships, 2ndEdition. The Mycota VI, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- **Khan, S.;Guo, L.;Shi,H.,Mijit, M. and Qiu, D.(2012b).**Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids myzus persicae. African Journal of Biotechnology.11(77):14193-14203.
- **Khan,S**.;Guo,L.;Maimaiti,Y.;Mijit,M.and.Qiu,D.(2012a).Entomop athogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent. Molecular Plant Breeding .3(7):63-79.
- **Kim, N.J.;Chang, K.S.; Lee ,W.J.and Ahn, Y.J. (2007).** Monitoring of Insecticides Resistance of Field-collected populations of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). J Asia Pacific Ent. 10(3):257–261.
- **Kitagawa, Y.; Ichikawa,H.; King, A.; Begeman,C. (1997).** A severe ankle and foot injury in frontal crashes and its mechanism. Proc 42th stap car crash ,conference ,SAE,983145.
- **Kline, D.L. (2007).** Semiochemicals, Traps/Targets and Mass-Trapping Technology for Mosquito Management. J. Am Mosq Control Associ .23(2):241–251.
- **Knogge, W. (1996)** . Fungal Infection of Plants. The Plant Cell, Oct; 8(10): 1711–1722. doi: 10.1105/tpc.8.10.1711.
- **Kobayashi, H.; Sano, A.; Aragane, N.; Fukuoka, M.; Tanaka, M.; Kawaura, F.; Fukuno, Y.; Matsuishi, E.; and Hayashi, S. (2008)**. Disseminated Infection by *Bipolaris spicifera* in an Immunocompetent Subject. Med. Mycol., 46: 361-365.
- **Kornberg ,H.L. (1966**).The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. Biochem J . 99(1):1–11.

- **Kramer, J.P.(1983).** Pathogenicity of the fungus *Entomophthora culicis* for adult mosquitoes: *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens quinquefasciatus*. Journal of the New York Entomological Society. 91:177–182.
- **Kroken** S.;(1996).Evolution of Secondary Metabolism in Microbes. Annu Rev.pp.34.
- **Lacey , L.A. (1997)** . Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques) . Acadmic press . Sandiego .London. Boston .408 pp.
- **Lichtwardt, R.W.; Ferrington, L.C Jr.; Lópes Lastra C. (1999)** .Trichomycetes in Argentinean aquatic insect larvae. Mycologia. 91:1060–1082.
- **Limón, A. (2010).** Kaitocephalin antagonism of glutamate receptors expressed in Xenopus oocytes. XenBase . 1 (3): 175-181. PubMed ID: 20436943.
- **Lowe, R.E.; Kennel, E.W.(1972).** Pathogenicity of the fungus Entomophthora coronata in *Culex pipiens*, *quinquefasciatus* and *Aedes taeniorhynchus*. Mosquito News32:614–620.
- **Lucas, P. W.; and Corlett, R. T.(1988).** Seed dispersal by long-tailed macaques. American Journal of Primatology. Volume 45 ,Pages 29–44. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2345.
- **Berbee,M.L.; Pirseyedi,M.; Hubbard, S.; (1999).** *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia: Vol. 91, No. 6, pp. 964-977.
- **Maggio-Hall, L.A.; Lyne, P.; Wolff, J.A.; Keller, N.P.A.;(2008)**.single acyl-CoA dehydrogenase is required for

catabolism of isoleucine, valine andshort-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*.Fungal Gene Biol,45(3):180-189.

- **Manamgoda, D.S.; Cai, L., Bahkali, A.H.; Chukeatirote, E. and Hyde, K.D. (2011**). **Cochliobolus**: an Overview and Current Status of Species. Fungal Diversity, 51: 3-42.
- **Massey, T. E.; Stewart, R. K.; Danials, J. M.and Ling, L.(1995).** Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B_1 carcinogencity. Proc. Soc. Exp. Bid-Med., 208:213-227.
- **McInnis, T. Jr.; Zattau, W.C.(1982).** Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. Journal of Invertebrate Pathology. 39:98–104.
- **Meierhenrich**,(2008). Amino acids and the asymmetry of life, Springer-Verlag, , ISBN 978-3-540-76885-2.
- **MEYLING**, **N. & EILENBERG, J. (2007).** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control43: 145-155
  Microbial lipases as virulence factors, J. of Molec. Catalysis B: Enzy., 22: 347-355http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00049-3.
- *Mike Service, (2008).* Medical Entomology for Students. *Cambridge University. pp. 53–54.* ISBN 978-0-521-70928-6
- **Mosquito Information website**. **(2009).** University of Florida, Florida MedicalEntomologyLaboratory.http://mosquito.ifas.ufl.edu/Index.htm.

- **Moss, M. O.; and Smith, J. E.; (1985).** Mycotoxins: formation, analysis and significance, John Wily and Sons, Chichester,7.
- **Mulla, M.S .(1967)**. Biological activity of surfactants and some chemical intermediates agains pre-imaginal mosquitoes. Proc Calif Mosq Contr Assoc .35:111–117.
- **Nabity, P. D.; Zavala, J. A.; & DeLucia, E. H. (2011).** Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defenses reduce photosynthesis in Nicotiana attenuata . Journal of Experimental Botany, 64, 685–694.
- **Nadeau, M.P.; Dunphy, G.B.; Boisvert, J.L.(1996).** Development of *Erynia conica* (Zygomycetes: Entomophthorales) on the cuticle of the adult black flies *Simulium rostratum* and *Simulium decorum* (Diptera: Simuliidae) Journal of Invertebrate Pathology. 68:50–58.
- **Nadia , N.; Nehad , Z.A.; Elsayed , A.E.; Essam , M.A. and Hanan M.A.(2010).** Optimization of lipase synthesis by *Mucor racemosus*- production in atriple impeller bioreactor . Malaysian Journal of Microbiology. 6(1) :7-15.
- **Naidu,K.S.(2011).**Characterization and Purification of Protease enzyme . Journal of Applied Pharmaceutical Science 01(03):107-112.
- **Nash RS, *et al*. (2001)**. Isolation and characterization of WHI3, a size-control gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 157(4):1469-80 PMID:11290704.
- **Nazari,S.H.(2011).**Sonicated data syrup media preparation for microbial culture. African Journal of Biotechnology . 10(3): 424-432.

- **Nelson,** R.R. (1964). The perfect stage of *Helminthosporium cynodontis*. Mycologia 56: 64–69.
- **Nelson, D. L.; Cox, M. M.** (2000).Lehninger, Principles of Biochemistry" 3rd Ed. Worth Publishing: New York. ISBN 1-57259-153-6.
- **Nisbet, L.J.; and Fox, F.M. (1991).**The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role In Sustainable Agriculture. London: CAB International.p. 445-650.
- **Nnakumusana, E.S.(1985).** Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to sporal infections in larval stages. Current Science. 54:1221–1228.
- **Rodrigues, O.; Lhmanby, J.C.B.; Didonet, A.D.; Marchese, J.A.(2007)** .Fifty years of wheat breeding in South Brazil: yield improvement and associated changes Pesq. Agropec. Bras. Bras., 42 (6), pp. 817–825 .
- **Ohm RA, Feau N, Henrissat B, et al. (2012).** Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. PLoS Pathogens 8: e1003037.
- **Park,S. ; Lee,J.; and Lee,H.; (2000)** . Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio sp*.98CJ11027. The Journal of Microbiology. 38(4) : 224-229.
- **Parrish ,D.J.; Fike, J.H.(2005).** The biology and agronomy of switch grass for biofuels . Crit Rev plant sci 24:423 -459.
- **Paul, R.; Parbery, D.G.** (**1966)**. The perfect stage of *Helminthosporium* bicolor.Transactions of the British Mycological Society 49: 385–386.

- **Pelizza , S.A. ; Lopezlastra , C.C. and Becnel , J.J.(2008)** . Research on the production , Longevity and Infectivity of the zoospores of *Leptolegnia chapmanii Seymor* (Oomycota : Peronosporomycetes) . J. Invertbr. Pathol ., 98 : 314 – 319 .

- **Pereira,E.; Sarquis,M.; Keppler,R.; Hamada,N.; and Alencar,Y.(2009).** Filamentous Fungi Associated with Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae)in Municipalities of the Brazilian Amazon. Neotropical Entomology. 38(3):352-359.

- **Perfect, J. R.; Cox, G.M.;Lee,J. Y.; Kauffman, C. A.;De Repentigny , L.; Chapman , S.W.; Morrison , V.A.; Pappas , P.; Hiemenz , J.W. and Stevens , D.A. (2001)** . The impact of culture isolation of *Aspergillus* species : A hospital-based survey of Aspergillosis . Clin. Infect. Dis. 33: 1824-1833.

- **Pitt , J.I. and Hocking, A.D. (1997**) . Fungi and food Spoilage. Blackie Academic professional. 366-368.
  PMid:15209284.

- **Po-Yuan, T.; John D. B.; Chiaowen, H.; David A. K.; Jonathan, E. B.; Jonathan K. P.; Yoav, G.(2016)** . Batch effects and the effective design of single-cell gene expression studies.BioRexiv. doi:https://doi.org/10.1101/062919.

- **Prakash, S.; Singh, G.; Soni, N.and Sharma, S.(2010).** Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* against the larvae of *Culex quinquefasciatus (Say)* and *Anopheles stephensi (Liston)* in laboratory. Parasitol Res .107(3): 651-655.

- **Rajesh ,K.**; **Dhanasekaran,D. and Tyagi,K. (2014).**Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against

Culex larvae (Diptera: Culicidae), Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2 (6): 233-239 .

- **Randazzo, F.M.; Seeger, M.A.; Huss, C.A.; Sweeney, M.A.; Cecil, J.K.; Kaufman, T.C. (1993)**. Structural changes in the Antennapedia complex of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 134(1): 319—330.
- **Rao,M.; Tanksale,A.; Ghatge,M.; and Deshpande, V. (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases . Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3):597-635
- **Raper, K.B.and Fennell, D.I.(1965).** The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company Research.99:441-446.
- **Revankar, S.G.; and Sutton, D.A. (2010**). Melanized Fungi in Human Disease. Clin.Microbiol. Rev., 23: 884-928.
- **Richard J.S., Neal T.D., Karl J.K., and Michael R.K., (2010).** Model reactions.
- **Roberts, D.W. (1974).** Fungal infections of mosquitoes . Mosq Contr.8(6):143-193.
- **Roberts, H.A.(1981).** Seed banks in the soil. Advances in Applied Biology, Cambridge, Academic Press.v.6, 55p.
- **Rodrigues,B.S.S.(2011).** Production and Purification of New Microbial Cellulases.thesis Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em.Engenharia Biológica.80 pp.
- **Rossman AY, Manamgoda DS, Hyde KD (2013).** Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae).Taxon 62: 1331–1332.
- **Roy, H.E.; Steinkraus D.C.; Eilenberg, J.; Hajek, A.E.; and Pell, J.K.; (2006).** Bizarre interactions and endgames:

entomopathogenic fungi and their arthropod hosts, Annu. Rev. Entomol., 51: 331-357.

- **Saha, R. and Das**, **S. (2005).** *Bipolaris* Keratomycosis. Mycoses, 48: 453-455.
- **Samson, A.R.** ; **Evans,H.C. and Latge , J.P. (1988).** Atlas of the Entomopathogenic fungi , Spring – Verlgar . Berlin . 187 pp.
- **Samson,R.;Yilmaz,N.;Houbraken,J.;Spierenburg,H.;Seifert,K.; Peterson,S.; Varga,J.;and Frisvad,J.(2011).** Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodatedin *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. Studies in Mycology 70: 159–183.
- **Samuel, P.; Prince, L.; and Prabakaran, P. (2011).** Antibacterial activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamil Nadu, India. J Microbiol Biotech Res, 1: 86-94
- **Sandeman, R.A.; Hynes, M.J.; Fincham ,J.R.and Connerton, I.F. (1991).** Molecular organisation of the malate synthase genes of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet, 228(3):445–452.
- **Sandhu, S.S.; Rajak, R.C.; 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 Microbiology. 33:191–194.
- **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.

- **Saunders, G.A.; Washburn, J.O.; Egerter, D.E.; Anderson, J.R.(1988).** Pathogenicity of fungi isolated from field-collected

larvae of the western treehole mosquito, *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae) Journal of Invertebrate Pathology.52:360–363.

- **Schmutterer, H**. **(2002).** Toxicity of neem to vertebrates and side effects o beneficial and other ecologically important non-targeted organisms. Side effects on beneficials. In: The Neem Tree (*Azadirachta indica A.Juss*.) and Other Meliaceous Plants. (Schmutterer, H. ed.), Weinhiem, Germany: VCH Publications, 628–656 PP.

- **Schnetter, W. and S. Engler (1978).** Oberflnchenfilmezur Bekiimp fung von Stechri;rucken in den Brutge-wiissern. fn: E. D<ihring and E. Iglisch (eds.), Prob-lerre der Insekten- und Zeckenbekdmpfung. E.Schmitt Verlag, Berlin.
- **Schnitzler, N.; Peltroche-Llacsahuanga, H. ; Bestier, N. ; Zundorf, J. ; Lutticken, R. and Haase, G. (1999).** "Effect of melanin and carotenoids of Exophiala (Wangiella) 183 dermatitidis on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils." Infect Immun. 67(1): 94-101.
- **Scholete , E.J. ; Taken , W. and Knols , B.G.J.(2003)** . pathogencity of five East African entomopathogenic Fungi to adult *Anopheles gambiae* (*Diptera : Culicidae*) mosquitoes , Netherlands Entomol. society 14 : 25 –29.
- **Scholte** ,E-J.,K. Ng'habi ,J. Kihonda, W. Takken, K. paaijmans, S Abdulla ,G. F. Killeen and B. G. Knols.(2005).An entomopathogenic fungus for control of adult african malaria mosquitoes.Science,308:1641.
- **Scholte,E-J,B.G.J Knols,R.A. Samson and W. Takken.(2004).** Entomopathogenic fungi for mosquito control :A review.24pp.

Jornal of Insect Science ,4:19, Available online insectscience.org/4.19.

- **Seccacini, E.; Lucia, A.; Harburger, A.; Zerba ,E.; Licastro, S.and Masuh, H. (2008).** Effectivness of Pyriproxifen and Diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. J. Am Mosq Cont Assoc .24(3):398–403.
- **Seymour, R.L. (1984).** *Leptolegnia chapmanii* , an Oomycete pathogen of mosquito larvae. Mycologia.76:670-674.
- **Seymour, R.L.; Briggs, J.D.(1985).** Occurrence and control of *Aphanomyces* (Saprolegniales: Fungi) infections in laboratory colonies of larval Anopheles. Journal of the American Mosquito Control Association. 1:100–102.
- **Shiff ,C. (2002).** Integrated approach to malaria control. Clin. Microbiol.Rev. 15: 278-293.
- **Shoreit,M.N.; and Bagy,H.M.; (1995).** Mycoflora associated with stonebrood disease in honey bee colonies in Egypt .Microbiol. Res.150 :207–211.
- **Singh, G.; and Prakash, S. (2010).** Fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) metabolites for controlling malaria and filarial in tropical countries. Advan. in Biomed. Res.9: 238-242.
- **Singh,G.**; **and Prakash,S.(2012).** Efficacy of the *Trichophyton ajelloi* and *Lagenidium giganteum* metabolites against mosquitoes after flash chromatography. Parasitol Res .110(5):2053–2060.
- **Sirisha,S. ; Gurvinder, K . and Padmini,P. (2010).** Strain improvement of entomopathogenig fungal species *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by Protoplast Fusion. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.1(3):115-124.

- **Sivanesan, A.; (1987).** Graminicolous species of *Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers 158: 1–261.
- **Smith, A.D.; Datta,S.P. ; Howard, S.G.; Campbell, P.N.; Bentley R. and McKenzie,H.A. (1997)** . Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford.738pp.
- **Smith, J. E.; Solomons, G. L.; Lewis, C. W. and Anderson, JC. (1994).** Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate-General XII Scince, Res. Develop .,300 pp.
- **Soarés, G.G.; Jr. (1982).** Pathogenesis of infection by the hyphomycetous fungus *Tolyplcladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) Entomophaga. 27:283–300.
- **Soni , N. and Prakash, S.E.(2013).** Possible Mosquito Control by Silver Nanoparticles Synthesized by Soil Fungus (*Aspergillus niger* 2587). *Advances in Nanoparticles*.2: 125-132.
- **Soni ,N.; and Prakash,S. (2012).** Larvicidal effect of *Verticillium lecanii* metabolites on *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae. Asian Pacific Journal of Tropical Disease . 2(3):220-224.
- **Soni ,N.; and Prakash,S.(2011).** *Aspergillus Niger* Metabolites Efficacies Against the Mosquito Larval (C*ulex Quinquefasciatus, Anopheles Stephensi* and A*edes Aegypti*) Population after Column Chromatography. American Journal of Microbiology . (1): 15-20.
- **Soni, N.and Prakash, S.(2010).** Effect of *Chrysosporium keratinophilum* metabolites against *Culex quinquefasciatus* after chromatographic purification. Parasitol Res . 107(6): 1329-1336.

- **St Leger, R.J**.; **and Wang, C.(2009**). Entomopathogenic fungi and the genomic era, In: Stock S.P., Vandenberg J., G lazer I., and Boemare N. (eds.), Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques. CABI, Wallingford, UK, pp.366-400.
- **Stehr F**., Kretschmar M., Kroger C., Hube B., and Schafer W., (2003). A report on a mosquito-killing fungus.
- **Steinhause, E.A**.(1949).Principle of In Pathology .New York.Tornto.
- **Su, X.; Zou, F.; Guo, Q.; Huang, J.; Chen, T.X.(2001)**. A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. Fungal Diversity. 7:129–133.
- **Suh ,S.O.; McHugh, J.V.; Pollock, D.D.and Blackwell, M.(2005).** The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. Mycological Research 109: 261–265.
- **Suh, C.P.; Axtell, R.C.(1999).** *Coelomomyces giganteum* zoospores: effects of concentration, movement, light, and temperature on infection of mosquito larvae. Biological Control. 15:33–38.
- **Thavara, U.; Tawatsin, A.; Chansang, C.; Asavadachanukorn, P.;Cm, M. and Mulla, M. S .(2007)** .Simulated Field Evaluation of the Efficacy of two Formulations of Diflubezuron, a Chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) in water storage containers. Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth .38(2):269–275.
- **Thennis , W. (1971)** . Techniques and media for Isolation , Culture , Sorage and Bioassay of *Metarhizium anisopeliae* and *Beaveria brongniartii* . Pacific Regional Agriculture Progrmme . 4: 1 – 11 .

- **Tsuda, M.; Ueyama, A. (1985).** Two new Pseudocochliobolus and a new species of *Curvularia*. Transactions of the Mycological Society of Japan 26: 321–330.
- **Turcksess, M.W.; & Wood, G. E.(1997).** Immunochemical methods for Mycotoxins in food. Food test. Anal., 3:24-27.
- **Vago**, **C., (1963**). Predispositions and interrelations in insect diseases. In: Insect Pathology, An Advanced Treatise (Steinhaus,E. A., ed.), Vol. 1, pp. 339 379. Academic Press, NewYork.
- **Vanwalbeek ,W.;Scott ,P.M. and Thateher ,F. S. (1968).** Mycotoxins from food-borne fungi. Can. J. Microbial., 14:131-137.
- **Varma, A., Avasthi, P. N. & Agnihorti, V. P., (1977).** Record of three entomogenous fungi on sugarcane leaf hopper, *Pyrilla perpusilla* Wlk. Science and Culture 43: 282-283.
  vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 4, 315–325.
- **W.H.O. (2005)** . Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13,Geneva, Switzerland.
- **W.H.O.(2013).**Lymphaticfilarias. http//:www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/e/.
- **Wang, C.; Hu, G.; and St. Leger, R.J.; (2005)**. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (Manduca
- **Wang, Y**.; **Crocker, R.L.; WilsonL,T.; Smart, G.; Wie, X.; Nailon, W.T.; and Cobb, P.P.; (2001)** . Effect of nematode and fungal treatments on nontarget turfgrass-inhabiting arthropod and nematode populations, Environmental Entomology, 30: 196-203.

- **Washburn, R.G**.; **Kennedy, D.W.; Bagley, M.G.; Henderson, D.K.; and Bennett, J.E.; (1988)**. Chronic Fungal Sinusitis in Apparently Normal Hosts. Medicine, 67:231-247.
- **Womack, M.; (1993).** The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Wing Beats, Vol. 5(4):4.
- **Xiao, Fei; Yu, Junjie; Guo, Yajie; Deng, Jiali; Li, Kai; Du, Ying**; Chen, Shanghai; Zhu, Jianmin; Sheng, Hongguang (2014). "Effects of individual branched-chain amino acids deprivation on insulin sensitivity and glucose metabolism in mice". Metabolism: Clinical and Experimental. 63 (6): 841–850.
- **Yabe, D.N. and Hamasaki , F.R.(1993).** Divervative of polyketides , Mycotoxins,Physical and Chemical propreties. The university Press, Pp534.
- Yabuta , T. (1935) .Agric .Hortic. 10- 17-22.
- **Yamada, Toshio**; Watanabe, (1971). Shinzo On the uniqueness of solutions of stochastic differential equations. J. Math. Kyoto Univ. 11, no. 1, 155--167. doi:10.1215/kjm/1250523691. http://projecteuclid.org/euclid.kjm/1250523691.
- **Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C.; Cary, J. W.; Montalbano, B.; Dyer, J. M.; Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E.(1998).** Characterization of the critical amino acid of an *A. parasiticus* cytochrome P-450 monooxygerase encoded by Ord A that is involved in the biosynthesis of aflatoxin B_1,B_2,G_1 and G_2. Appl. Environ. Microbial., 64(12): 4834-4841.
- **Zaim ,M.; and Jambulingam, P.; (2007).** Global insecticidide use for vector-borne diseases control. WHO. Department of control of

neglected tropical diseases (NTD),WHO pesticide evaluation scheme (WHOPES) Third edition.89pp.

SUMMARY

Current search targeted isolation of fungi associated with mosquito larvae and choose fungal species did not register in advance in infect larvae and use them as agents of vital combat against various roles of the life of the mosquito *Cx. quinquefasciatus* has also been investigating the ferocity of the fungus and the diagnosis of secondary metabolic products of a liquid with a high-performance technology factors (HPLC) were obtained the following results :

1. were isolated 28 species of fungi, which belong to 16 genera of fungi Ascomycetes and Zygomycetes and Deutromycetes , and diagnosis this species are *(Aspergillus* and *Bipolaris* and *Fusarium* and *Penicillium* and *Trichoderma* and *Alternaria* and *Pythium* and *Rhizopus* and *Rhodotorula* and *Mucor* and *Candida* and *Metarhizium* and *Rhizoctonia* and *Beauveria* and *Chaetomium* and *Trichothecium*) in laboratory and has been selected fungi *A. parasiticus*, *B. australiensis*, *F. oxysporium* for being among the most frequently isolated species as well as isolat it for the first time from the mosquito larvae infected naturally .

2. Influenced concentrations The fungal suspension in all roles of life of mosquitoes , and the fungus *A. parasiticus* giving ahigher percent reaching destruction of eggs% 50.66 ratio at the highest concentration of suspended $^{6}10 \times 1$ spore / ml after 24 hours, while the to destroy all of the phases of the proportion of larval I, II, III, IV, respectively (69.56, 43.66, 35.32%) after 120 hours, while for virgins amounted to perdition 49 percent at the highest concentration $1 \times {}^{6}10$ spore / ml after 72 hours,

while for adult influence in the loss ratio was the same at higher concentration of 70% for males and 59.66% for females after 168 hours. The two fungi *B. australiensis* and *F. oxysporium* When concentrations of 2×10^5 and 3×10^4 spore / mL, where the destruction of the eggs of 40% and 29.66%, respectively, accounted for after the passage of 24 hours, while the ratio was killed eccentric larval (55.33 0.47, 45.33 0.42%) (51.44, 37.23, 36.63)% for each respectively, after the passage of 120 hours, and perished virgins by 34% and 28.33% after 72 hours, while the adult Vhlkt rate (54%, 40%) and (42%, 39.66)% for both males and females, after the passage of 168 hours, and the results indicated that there is a direct correlation between the concentrations and ratios of perdition to the existence of an apositive relationship between the loss ratios and the age of the larva.

3. While the secondary metabolism of raw fungi notice in phases four larval outperforming also fungus *A. parasiticus* where the percentage of the loss caused by the fungus phases four larval (81.66, 70.33, 63.33, 58.33)%, respectively, and by focusing up and after 72 hours, while the loss ratios when using two fungi *B. australiensis* and *F. oxysporium* (66.62, 63.33, 58, 55)% and (61.66 0.56, 50.33 0.46%) at higher concentration and the same period of time.

4. Also influenced the outputs of the secondary metabolism of the fungus after purification technology separation column Column Chromatography on phases four larval was outweigh the fungus *A. parasiticus* apparent scored higher loss ratios of (95.85, 73.63 0.70)%, respectively, when the concentration of 1.8 and within 72 hours, and the two fungi *B. australiensis* and *F. oxysporium* amounted to perdition respectively ratios (75.66 0.71, 59.55)% and (66.56, 65.66, 53.33, 51)% for the same focus and the same length of time.

5. Assay results HPLC that filtrates showed the fungi contain many of the products of secondary metabolism, which is the virulent fungal agents where secreted mushroom *A. parasiticus* is aflatoxins (B1, B2, G1, G2) also secretes these enzymes (Alkaline proteiase, N-acetyl-β-glcosaminindase , Aminopeptidase, Serineprotenase) while also outputs fungus *B. australiensis* contain (Ophiobolin a, Ophiobolin I, Prehelminthosporo (PHL), 6-epiophiobolin, 6-epianhydroophiobolin, Pectinlyase, Carboxy methyl cellulose, Glycosidase, Endopeptidase, Serineprotenase, (Phenoloxidas while I found the following vehicles (Zearalenone, Fusaric acid, 9,10-dihydrofusaric acid, Moniliformin, Pectinlyase, Pectinmethyleserase, Cellulase, Hemicellulase, Xylanase, Galactanase, Chitinsynthase) in leaky fungus *F. oxysporium*, this is the way of the best and fastest ways to detect metabolites secondary fungi.

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of AL-Qadisiya

Collage of Science

Biology of Department

Testing of the efficiency of some fungi associated with the *Culex quinquefasciatus* in biological control

A thesis

Submitted to The Council of The College of Science ,University of Al-- Qadisiya in Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree of Master of Science in Biology /Zoology

By

Sarah Nair Abdul ameer Aljumaily

Supervision by

Assist. Prof. Dr. Mohammed R. Anno*n*

2017 A.D 1438 A.H