

أختبار كفاءة *Aspergillus parasiticus* Spear في مكافحة الأطوار اليرقية

لبعوضة (Diptera:Culicidae) *Culex quinquefasciatus* Say

محمد رضا عنون الحسنوي

كلية العلوم

جامعة القادسية

Mohammad@alhasnawi@qu.edu.iq

سارة نائرعبد الأمير الجميلي

كلية العلوم

جامعة القادسية

Sarah.nair2016@gmail.com

الخلاصة:

تضمن البحث الحالي اختبار كفاءة فطر *A. parasiticus* في مكافحة أطوار بعوضة *Culex quinquefasciatus*. وقد اثرت تراكم معلق الفطر ونواتج الأيض الثانوية الخام في الأطوار اليرقية للبعوضة , إذ أعطى معلق الفطر عند التركيز 10×1 بوع/مل أعلى نسبة هلاك لليرقات فقد بلغت نسبة القتل للطور اليرقي الأول 69 % بعد 120 ساعة , في حين كانت نسبة الهلاك 31.66 % عند التركيز الأوطأ 10×1 بوع/مل وخلال المدة الزمنية نفسها. أما عن تأثير نواتج الأيض الثانوي الخام للفطر *A. parasiticus* فقد بلغت نسبة الهلاك للطور الأول عند التركيز الأعلى 100 % وخلال 72 ساعة 81.66 % بينما كانت نسبة الهلاك عند التركيز الأوطأ 25 % وخلال نفس المدة الزمنية 45 % .

الكلمات المفتاحية: *Plasmodium relictum* , *Aspergillus parasiticus* , *Culex quinquefasciatus* Say

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

المقدمة :

والذي يسبب ملاريا الطيور. ونظرا للأهمية الطبية لأنواع البعوض كافة فقد اهتم العلماء بمكافحته منذ مئات السنين واستعملت مختلف المبيدات الحشرية الكيميائية الا ان هذه المبيدات سببت أضرارا لاتحمد عقباها بلأنسان ومحيطه البيئي, ومن جانب آخران هذه الحشرات المستهدفة امتلكت القدرة على التكيف بسرعه مع المواد السامة وعلى البدء في تطوير مناعة ضدها.

ان بعوض *Culex quinquefasciatus* أحد أنواع البعوض المعروفة بنقلها لمسببات الأمراض التي تفتك بحياة الإنسان والحيوانات الأخرى ويكثر هذا النوع في المناطق الأستوائية وشبه الأستوائية من العالم. ويمتاز هذا النوع بنقله لمسببات الأمراض منها فايروس غرب النيل المسبب لألتهاب الدماغ , كما عرف بنقله لطفيلي البلازموذيوم *Plasmodium relictum*

ولذلك دعت الحاجة لتطوير بدائل غير سامة وآمنة وفعالة تمثل أحد طرائقها المكافحة الحيوية والمقصود بها تخفيض المجموعة السكانية للآفة أو النوع الضار الى الحد الذي لايشكل معه ضررا بالغا للإنسان 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 المهمة وذلك لأنتشارها وتواجدها الواسع في الطبيعة وكذلك لسهولة تطبيق تقنيات الهندسة الوراثية عليها فضلا عن كونها غير مكلفة وتمتاز بتخصصها العالي لمواجهة آفات محده . عدّ الفطر *Spear*

Aspergillus parasiticus أحد الفطريات المراقبة للحشرات ويعود لشعبة الفطريات الكيسية Ascomycota وأختبر تأثيره في يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* وتنمو مستعمرات الفطر على وسط PDA معطية لون أخضر غامق . يفرز الفطر سموم الأفلاتوكسينات B_1, B_2, G_1, G_2 كما ويتملك احماض دهنية هي *linoleic acid* و *linoleinc acid* كما يحتوي على أحماض أمينية منها الفالين والليوسين وكذلك حاوي على كحول الأيثانول ودهون وأحماض عضوية واسترات ويعزى لهذه المواد سبب ضراوة الفطر . وتم عزل هذا الفطر لأول مرة من يرقات البعوض في العراق وتم تحضير معلقات ورواشح من الفطر في المختبر واستعمالها ضد هذا النوع من البعوض لمعرفة تأثيره .

٢.المواد وطرائق العمل :

٢-١: عزلة الفطر *A. parasiticus* :

تم عزل الفطر من يرقات البعوض المصابة طبيعيا ولأول مرة في العراق , حيث تم اختيار بركتين لجمع اليرقات في مدينة الديوانية حيث يكثر البعوض في هذه البرك لكونها غنية بالمواد العضوية وتم الجمع خلال المدة من شهر كانون الأول ٢٠١٥ لغاية شهر آب ٢٠١٦ , ونقلت الى المختبر وعقمت ثم وضعت بواسطة ملقط معقم في أطباق بتري الحاوية على وسط PDA وحضنت بدرجة ٢٥ م° لمدة (٥-٧) أيام , وتم تشخيص عزلة الفطر بأستعانته بالدكتور مجيد متعب ديوان كلية الزراعة /قسم وقاية النبات/جامعة الكوفة .

٢-٢: اعداد المزرعة الدائمة لبعوضة *Cx.*

quinquefasciatus :

تم جمع الأدوار غير البالغه (اليرقات والعدارى) لبعوضة *Cx. quinquefasciatus* واتبعت طريقة () في تربية البعوض وتم تشخيصها بحسب الصفات التصنيفية الواردة في المفاتيح التصنيفية () وذلك بواسطة اعداد شرائح للبالغات وأكدت التشخيص الأستاذ الدكتور/غيداء عباس/كلية الطب البيطري جامعة القادسية على انها *Cx. quinquefasciatus* ولغرض تهيئة الأعداد الكافية من كل طور يرقي والعدارى فقد عزلت أعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الأول أما الطور الثاني والثالث

والرابع فقد هيا كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبقه وتم وضعها في انابيب التربية فرادى ومراقبتها لحين الأنسلاخ ووصولها الطور المطلوب.

٣-٢: تحضير المعلق الفطري للفطر *A.*

parasiticus :

حضر المعلق الفطري بتنمية الفطر على وسط (PDAB) في دوارق زجاجية سعة كل منها 250 مل بمقدار 150 مل من الوسط المستعمل ، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 م لمدة 168 ساعة وكانت ترج يومياً لتوزيع النمو الفطري بعدها رشحت المزرعة بوساطة قطعة من الشاش وأخذ 1 مل من الراشح ووضع على شريحة عد كريات الدم المحورة لعد الأبوغ Improved Neubaur Haemocytometer. لتقدير عدد الأبوغ لكل وحدة حجم حيث تم الحصول على تركيز $10^7 \times 1$ (بوغ/مل) بالنسبة للفطر *A. parasiticus* () ولغرض الحصول على تركيز اقل طبقت المعادلة الاتية () :-

الحجم (مل) المأخوذ من المعلق الاصلي = خطأ!

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق الذي نرغب بالحصول عليه، وهكذا حضرت التراكيز $(10 \times 1)^1$ ، $(10 \times 1)^2$ ، $(10 \times 1)^3$.

٤-٢: الاختبار الحيوي Bioassay :

٢-٤-١: الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق

الفطر *A. parasiticus* في الأطوار اليرقية المختلفة لبعوضه *Cx. quinquefasciatus* :

تم أخذ 40 يرقة من كل طور من الأطوار اليرقية الأربعة والتي هيات كما في الفقرة (٢-٢) لكل تركيز ووزعت على أربع أوانٍ يحتوي كلٌ منها على (100 مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق أما الرابع فيحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) ولمدة دقيقتين ثم نقلت اليرقات المعاملة بوساطة فرشاة ناعمة إلى أوان زجاجية سعة (250 مل) تحوي ماءً مقطراً معقماً اضيف اليه غذاء اليرقات بمقدار 10 ملغم / مل بعد ذلك وضعت الأواني في الحاضنة وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 م[°] وفترة ضوئية (L / D) 10 : 14 ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك خلال 24 ، 72 ، 120 ساعة من المعاملة (35) وصححت القيم بحسب معادلة Orell and Schneider () .

% الهلاك المصححة = خطأ! $\times 100$

٢-٤-٢: تحضير نواتج الأيض الثانوية الخام

للفطر *A. parasiticus* :

حضرت نواتج الأيض الثانوية الخام كما في الفقرة (٢-٢) (٣) وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 م لمدة أسبوعين بعدها تم الترشيح باستعمال ورقة ترشيح

Whatman No.1 بقمع بخنر وبمساعدة جهاز تفريغ

الهواء Vacuum pump واعيد الترشيح باستعمال

يبين الجدول (١) تأثير تراكيز مختلفة لمعلق الفطر قيد البحث في يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* حيث بلغت نسبة القتل للطور اليرقي الأول ٦٩ % وخلال الفترة الزمنيه ١٢٠ ساعة وعند التركيز الأعلى 10×10^{-1} بوغ/مل ، أما عند التركيز الأوطأ 10×10^{-4} بوغ/مل فكانت نسبة الهلاك ٣١,٦٦ % وخلال نفس المدة الزمنية . مما يؤكد وجود فروقات معنوية للتركيز كافة ، فضلاً على العلاقة الطردية بين التركيز ونسب الهلاك وان هذه العلاقة بدت واضحة بين كلا من مدة التعريض ونسبة الهلاك للأطوار الأربعة 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 10×10^{-4} بوغ/مل للطور الأول بينما سجلت نسب القتل (29 , 33 , 49) % في المدة الزمنية نفسها وعند التركيز 10×10^{-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 فضلاً عن اضعاف الجهاز المناعي للحشرة وذلك لأن الجهاز المناعي يستطيع الدفاع عن الجسم عندما يكون التركيز واطئ فقط أما عند التراكيز العالية فقد تقل كفاعته () . ويبين التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية في

المرشح الدقيق (0.22 μ) Millipore filters وحضرت التخافيف ٢٥% , ٥٠% , ٧٥% , ١٠٠% () .
٢-٤-٢-١: تأثير نواتج الايض الثانوية الخام للفطر *A. parasiticus* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضة *Cx. quinquefasciatus* :
استعملت التراكيز المحضرة مسبقا في الفقره (٢-٣) واتبعت نفس الطريقة المذكورة في الفقرة (٢-٤-١) وتم حساب نسبة الهلاك يوميا ولمدة ٢٤ , ٤٨ , ٧٢ ساعة وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (٢-٤-١) .

٥-٢ : التحليل الأحصائي :

حللت جميع النتائج حسب التصميم العشوائي الكامل متعدد العوامل Compleat Randomized Design (C.R.D) واختبرت المعنوية بين المتوسطات باستخدام أقل فرق معنوي Least Significant Differences (L.S.D) وعند مستوى احتمالية (0.05) () .

٣- النتائج والمناقشة :

٣-١: الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطر *A. parasiticus* في الأطوار اليرقية المختلفة لبعوضه *Cx. quinquefasciatms* :

ما وجدت () اذ حصلت على نسبة هلاك 90 % عند تعريض يرقات بعوضة *Cx. quinquefasciatus* لأبواغ الفطر *C. keratinophilum* بتركيز 2×10^6 بوغ/مل⁶ . كما اتفقت النتائج مع ما جاء به () اذ استخدم أربع أنواع فطرية هي *A. niger* , *A. terrus* , *P. chrysogenum* , *oryzae* 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 الأخرى المدروسة . ووجدت () عندما استعملت ثلاث أنواع فطرية ضد الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Cx. quinquefasciatus* حيث سجل الفطر *P. marneffeii* اعلى نسبة هلاك عند المدة الزمنية 120 ساعة بلغت 77.70 % عند التركيز 2×10^4 بوغ/مل.

نسب القتل للأطوار الأربعة عند مستوى معنويه 0.05 . 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 (56, 69 , 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 (Steinhouse,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 ذكر () من أن يرقات الطور الأول والثاني للنوعين *An. stephensi* و *An. gambiae* تكون اكثر حساسية لأبواغ الفطر *M. anisopelidae* من يرقات الطور الثالث والرابع ، ويُعلل هلاك يرقات الطور الاول والثاني بسبب رقة الكيونكل بعد الانسلاخ مما يجعلها اكثر عرضة للاصابة الفطرية بالمقارنة مع يرقات الطور الثالث والرابع التي تكون ذات كيونكل أسمك وبالتوالي أقل عرضة للاصابة الفطرية . وتتفق النتائج ايضا مع

جدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *A. parasiticus* في هلاك الاطوار اليرقية المختلفة

لبعوض *Cx. quinquefasciatus*

الطور	النسبة المئوية للموت بعد (ساعة)		
	٢٤	٤٨	١٢٠
الأول	10×1 ⁴	25	31.66
	10×1 ⁵	29	49
	10×1 ⁶	32.33	69
	السيطرة	0	0
الثاني	10×1 ⁴	19.33	29.33
	10×1 ⁵	26.66	30
	10×1 ⁶	30.33	56
	السيطرة	0	0
الثالث	10×1 ⁴	18.66	26.33
	10×1 ⁵	21	26.33
	10×1 ⁶	21.33	43.66
	السيطرة	0	0
الرابع	10×1 ⁴	17.66	28
	10×1 ⁵	19.66	22
	10×1 ⁶	23	35.32
	السيطرة	0	0

التداخل بين جميع العوامل = ١٢,٨٢٣

وخلال نفس المدة الزمنية . كما وأشارت النتائج الى
أختلاف حساسية الأطوار اليرقية لتراكيز النواتج
الأبيضية الثانوية الخام للفطر فكان الطور الأول أكثر
الأطوار حساسية لجميع تراكيز نواتج الايض الخام بينما
أظهر الطور الرابع مقاومة لجميع التراكيز المستخدمة
ويعود سبب ذلك الى رقة الكيوتكل مما يجعله أكثر
عرضة للأصابة مقارنة بالطور الرابع, ومن جانب آخر
تتناسب نسبة القتل تناسباً طردياً مع كل من التركيز
ومدة التعريض . أتفقت هذه النتائج مع () عندما
استعمل تركيز 20 ملغرام/مل من المستخلص الخام
للفط (Beauvercin) الذي ينتجه فطر *B. bassiana*
ضد يرقات *Ae. egypti* حيث أدى الى هلاكها
بنسبة 86% بعد مرور 48 ساعة من مدة التعريض, كما
واضاف () ان استعمال نواتج الفطر المذكور ضد

٢-٣: تأثير نواتج الايض الثانوية الخام للفطر A.

parasiticus في الاطوار اليرقية الاربعة

لبعوض *Cx. quinquefasciatus*

يبين الجدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج

الايض الثانوية الخام في الاطوار اليرقية الاربعة

لبعوض *Cx. quinquefasciatus* حيث كانت أعلى

نسبة هلاك عند التركيز 100% حيث بلغت نسبة

هلاك الطور الأول وخلال ٧٢ ساعة 81,٦٦% أما

عند التركيز الأدنى 20% بلغت نسبة الهلاك 45%

حيوية لها دور في الأمراض كما أن نواتج الأيض الثانوية تتداخل مع الجهاز المناعي للحشرة وتسبب تغيرات في سلوك المضيف كأختزال نشاط الحشرة وشلل حركتها وقلة التغذية كما تؤدي إلى حدوث تغيرات في تركيب الأنسجة وبهذا يحدث الموت السريع للحشرة.

يرقات الطور الأول لنوعي البعوض *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* أدى إلى هلاكها جميعاً بعد 24 ساعة وبالتركيز 2.17 جزء بالمليون. توصل () إلى أن يرقات *An. stephensi* كانت أكثر حساسية لنواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *B. bassiana* من يرقات *Cx. quinquefasciatus*. وان تعريض يرقات الطور الأول لبعوض *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* لنواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisoplia* بتركيز 100% فإن نسبة الهلاك بلغت 100% و 96.66% على التوالي () . وكما أكدت () أن نواتج الأيض الثانوية للفطر *C. keratinophilum* كانت أكثر تأثيراً على الأطوار اليرقية الثلاثة لبعوض *Cx. quinquefasciatus* في حين كانت أقل تأثيراً على يرقات الطور الرابع . في حين حصلت () عند استعمال نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *P. marneffe* على أعلى نسبة هلاك للطور اليرقي الأول لبعوض *Cx. quinquefasciatus* بلغت 78.93% عند التركيز 100% .

أن الكثير من الفطريات الممرضة للحشرات تسبب موت مضائفاً بسرعة ويعود هذا إلى امتلاك الفطريات نواتج

جدول (٢) تأثير تداخل تراكيز مختلفة من نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *A. parasiticus* في هلاك

الأطوار اليرقية المختلفة لبعوض *Cx. quinquefasciatus*

الطور	النسبة المئوية للهلاك (ساعة)			التراكيز
	٧٢	٤٨	٢٤	الفترة الزمنية
الأول	45	43	36.33	25
	57.33	51.66	41.33	50
	68.66	59.33	53	75
	81.66	73	63	100
	0	0	0	السيطرة
الثاني	38.33	37	33.66	25
	46.32	48.33	37	50
	57.33	56.66	46.66	75
	70.33	72.33	53	100
	0	0	0	السيطرة
الثالث	33	35	27.33	25
	41	42.33	32.66	50
	50.66	53.33	40.66	75
	63.33	61.33	50.66	100
	0	0	0	السيطرة
الرابع	32.66	26.33	21.33	25
	40	34	28.33	50
	44.66	40	37.66	75
	58.33	51	48	100
	0	0	0	السيطرة

التداخل بين العوامل = ١١,٧٥٩

المصادر: