



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. تقييم كفاءة الفطر.
في مكافحة نوعين من البعوض (Diptera: Culicidae) في محافظة الديوانية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم-جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة -علم الحيوان

من قبل

احمد غانم نوري الحنة

بكالوريوس علوم /علوم حياة

بأشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

محمد رضا عنون الحسناوي

أيلول ٢٠١١

شوال ١٤٣٣ھ

سُمْ الَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحِي أَن يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بِعُوْضَةٍ فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ
مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضْلِلُ بِهِ كَثِيرًا
وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضْلِلُ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة البقرة الآية (٢٦)

إِقْرَار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (تقييم كفاءة الفطر *Metarhizium* في مكافحة نوعين من البعوض (*anisopliae* (Metsch.)*Sorok.*) في محافظة الديوانية)

وناقشنا الطالب احمد غانم نوري المحنـة في محتوياتها وفيما له علاقـة بها بتاريخ / ٢٠١١ وإنـها جديـرة لنـيل درـجة الماجـستير عـلوم / عـلوم الحـيـاة / عـلوم الحـيـوان.

التـوـقـيع:

رئيس اللـجـنة

الاسم: د. سعـدي محمد هـلال السـرارـاتـي

اللقب العلمـي: أـسـتـاذ

العنـوان: كلـيـة العـلـوم للـبنـات / جـامـعـة بـاـيـلـ

التـارـيخ: / ٢٠١١

التـوـقـيع :

عضو اللـجـنة

الاسم: د. ثـائـر مـحـمـود طـه الـرـبيـعـي

اللقب العلمـي: أـسـتـاذ مـسـاعـد

العنـوان: كلـيـة التـرـبـيـة للـبنـات / جـامـعـة الـكـوـفـة

التـارـيخ: / ٢٠١١

التـوـقـيع:

عضو اللـجـنة

الاسم: د. عبد الأمـير سـمير سـعدـون الـيـوسـف

اللقب العلمـي: أـسـتـاذ مـسـاعـد

العنـوان: كلـيـة العـلـوم / جـامـعـة الـقـادـسـيـة

التـارـيخ: / ٢٠١١

التـوـقـيع:

عضو اللـجـنة (المـشـرـف)

الاسم: د. محمد رضا عنـون الحـسـنـاـوي

اللقب العلمـي: أـسـتـاذ مـسـاعـد

العنـوان: كلـيـة العـلـوم / جـامـعـة الـقـادـسـيـة

التـارـيخ: / ٢٠١١

إقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته المنعقدة في / / ٢٠١١ وقرر منحه شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / علم الحيوان

التوقيع:

الاسم: د. نجم عبد الواحد عبد الخضر الحساني

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: ٢٠١١ / /

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ (تقييم كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* في مكافحة نوعين من البعوض (Diptera:Culicidae) في محافظة الديوانية) قد أعدها الطالب احمد غانم نوري المحنة بإشرافي، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع:

الاسم : د. محمد رضا عنون الحسناوي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ : ٢٠١١ / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشاره إلى التوصيه المقدمة من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم : د. عبد الأمير سمير سعدون

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسيه

التاريخ : ٢٠١١ / /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد إنه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالب احمد غانم نوري المحنـة الموسومة بـ (تقييم
كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorok. في مكافحة نوعين من البعوض
. في محافظة الديوانية (Diptera:Culicidae)

التوقيع:

الأسم: د.عبد الله حبيب كاظم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية / جامعة القادسية

التاريخ: ٢٠١١ / /

Abstract

The present study aimed at isolating *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin from mosquitoes larvae cadavers and propagating it invitro to be used as biocontrol agent against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae).

The results showed the followings:

1- *M. anisopliae* was isolated from *Cx. quinquefasciatus* larvae cadavers for the first time in Iraq and succefully propagated on (SDAY)media.

2- -The different concentration of fungal suspension have affected the life stages of *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* . The mortality percentages of eggs were 28% and 26% at the concentration of 2×10^2 spore/ml and increased to 60.33% and 58.66% at the concentration of 2×10^5 spore/ml for both species respectively . The values of LC₅₀ of eggs were $2 \times 10^{4.3}$ and $2 \times 10^{4.6}$ for the two mentioned species.The first larval instars have showed highest mortality rate reached 100% and 93.33% when treated with 2×10^5 spore/ml while 60% of them were dead at concentration of 2×10^2 spore /ml for both species . Besides there was an inverse correlation between the age of larval instars and the mortality rate . The LC₅₀ of 1st, 2nd , 3rd and 4th larval instars of *An. stephensi* were equal to $2 \times 10^{1.8}$, $2 \times 10^{1.9}$, $2 \times 10^{2.3}$ and $2 \times 10^{2.6}$ respectively while these values were $2 \times 10^{1.9}$, 2×10^2 , $2 \times 10^{2.6}$ and $2 \times 10^{2.8}$ for the successive larval instars of *Cx. quinquefasciatus* . 50% and 46.66% of the pupae of the two mentioned species were dead when exposed to 2×10^5 spore /ml. The relationship between fungal suspension concentration and rate of adult mortality took the same trend, and the treatment with highest concentration caused ahigh adult mortality,i.e 100% ,96.66%, 93.33% and 90% for adult males and females of the two species at 168 hours, while the lowest mortality percentages were 66.66% ,56.66%, 56.66% and 50% when treated with 2×10^2 spore/ml at the same time, indicating that the males of both species were more readiness than females to the fungal suspensions.That was supported by calculating LC₅₀ which were equal to $2 \times 10^{1.7}$ and $2 \times 10^{2.1}$ for males and females of the first species while these values were $2 \times 10^{1.9}$ and $2 \times 10^{2.3}$ for males and females of the second species.

3- -The relationship between secondary metebolites concentrations and percentage of mortality of larvae and adult of the two species were positive. All first larval instars of *An. stephensi* were dead and 96.66% of

the second species when treated with concentration 100% at 72 hours. And the mortality rate decreased to 66.66% and 60% for the same larval instars and for the two mentioned species at concentration 25% at the same period. Besides the secondary metabolites of the fungal were more effective on 1st larval instars than the fourth instars as shown from the values of LC₅₀ which were equal to 18.9%, 20.6%, 22.90%, 27.01% for the 1st, second, third and fourth larval instars of the first species while that values were 20.02%, 21.01%, 27.20% and 27.64% for larval instars of the second species . As for adults the results revealed that highest mortality was 100% for adults of *An. stephensi* and 96.66% for *Cx. quinquefasciatus* at aconcentration of 100% while the lowest rate of mortality were 70% and 60% at aconcentration of 25% for the two mentioned species . The values of LC₅₀ were 16.57% and 20.8% for the two species respectively.

- 4- -The temperature had aclear effect on the effectiveness of fungal suspension where mortality of 3rd larval instars was increased to 86.66% at 30c⁰ and decreased to 30% at 10c⁰ .
- 5- PH values have affected the fungal suspension effectiveness when the third larval instar of *Cx. quinquefasciatus* were treated they dead at a rate of 86.66% at PH=6 while lowest mortality was 50% at PH=10 while all instars were alive at control treatment .
- 6- The results showed that there was inverse correlation between NaCl concentration and the fungal effectiveness. The highest rate of mortality was 83.33% at 0ppt and 36% at 6ppt.
- 7- The Fungicides carbendazim inhibited the fungal growth totally while the insecticides chlorpyrifos and malathion caused 64.3% and 47.05% inhibition rate respectively.

المقدمة Introduction

يعود البعوض إلى العائلة Family: Culicidae من رتبة ثنائية الأجنحة Order : Diptera .
للبعوض توزيع عالمي ، فهو يوجد في جميع المناطق الاستوائية والمعتدلة ويمتد مداه ناحية الشمال في داخل الدائرة القطبية الشمالية والمنطقة الوحيدة التي يغيب عنها هي القارة القطبية الجنوبية ، يوجد على ارتفاعات ٥٥٠٠ م فوق سطح البحر وفي المناجم على عمق ١٢٥٠ م تحت مستوى سطح البحر (Sierfes، ١٩٨٤).

تعد بعض أنواع البعوض نواقل للمسربات المرضية لبعض الأمراض الخطيرة للإنسان مثل الملاريا التي ينقلها أنواع عدة من الجنس *Anopheles* حيث يصاب أكثر من ٣٠٠ مليون شخص فضلا عن مليون حالة وفاة كل سنة في العالم ، وداء الفيلاريا (Filariasis) التي ينقلها بعوض *Culex quinquefasciatus* حيث سجلت أكثر من ١٢٠ مليون إصابة وان ١,٣ مليار شخص في أكثر من ٨٠ بلدا يواجهون خطر العدوى (WHO,2007) فضلاً عن الأمراض الفيروسية مثل الحمى الصفراء وحمى الضنك التي ينقلها بعوض *Aedes aegypti* (Verma and Prakash, 2010) .

إن الاعتماد على المكافحة الكيميائية للبعوض بصورة رئيسية أدى إلى ظهور مشاكل عديدة مثل المقاومة للمبيدات الكيميائية والتأثيرات السامة في الأعداء الحيوية للافات وتأثير بقايا السموم في محاصيل النباتات والتاثير التراكمي للمبيدات على صحة الإنسان وتلوث البيئة بالإضافة إلى زيادة تكاليف الإنتاج (Loc and Chi,2005) ، مما دفع الباحثين ومنذ مدة ليست بالقصيرة لإيجاد بدائل أخرى ومنها المكافحة الحيوية التي تمتاز بالشخص في مواجهة آفة معينة والزيادة والانتشار طبيعيا وعدم قدرة الآفة في اضهار مقاومة ضد الأعداء الحيوية مقارنةً لمبيدات الكيميائية فضلاً عن أنها لا تسبب ضررا بالنظام البيئي ولا تخل بالتوازن الطبيعي للبيئات. ولعل استعمال الأحياء المجهرية هي أشهر الوسائل في تلك المكافحة إذ تميز أكثر هذه الأحياء بأنها مساوية لتأثير المبيدات الكيميائية في السيطرة على الحشرة المستهدفة وأمينة من الناحية البيئية علاوة على بقائها لمدة طويلة بعد إطلاقها في المحيط البيئي وانسجامها مع طرائق المكافحة الأخرى مما يحقق النجاح المنشود (الزبيدي, ١٩٩٢) .

لقد حققت بعض الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic fungi) نجاحا ملحوظا في مجال المكافحة الجرثومية للبعوض مثل الفطر (*Lagenidium giganteum* (Couch) و *Crypticola L. caudata* (deBary) و *Leptolegnia chapmanii* (Seymour) (Class: *Coelomomyces spp.* و *clavulifera* (Humber) (Class:Oomycetes) و *E. muscae* (Cohn) و *Entomophthora culicis*(Braun) و Chytridiomycetes) *Beauveria bassiana* و *Conidiobolus coronatus*(Const.) (Class:Zygomycetes) و *Culicinomyces clavisporus* (Couch) و *B.tenella* (Delacroix) و (Balsamo)

و *Paecilomyces farinosus* (Holm) و *Tolypocladium cylindrosporum* (Gams) (Scholte et *Verticillium lecanii* (Class: Hyphomycetes) (Zimmermaun al., 2004)

عُد الفطر *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin من الفطريات المتطفلة اختياريا Facultative parasite و ذو مدى واسع من المضائق تشمل اكثر من ٢٠٠ نوعاً من مختلف رتب الحشرات ومفصليات الأرجل (Boucias and Pendland, 1998) وقد حقق نجاحا ملحوظاً في مكافحة يرقات البعوض (Roberts, 1967; 1970; 1974; Ramoska, 1982; Daoust and Roberts, 1983; Agudelo-silva and Wassink, 1984; Ravellec et al., 1989; Sandhu et al., 1993; Alves et al., 2002)

لقد تناولت الأبحاث السابقة في العراق خاصة مكافحة هذه الحشرة استعمال المبيدات الكيميائية (خلف, ٢٠٠٤) والأسماك المفترسة (عبد القادر, ١٩٩٤) ونال تأثير المستخلصات النباتية في مختلف أنواع البعوض في العراق الاهتمام الأكثر (الجلبي, ١٩٩٨؛ الغزالي, ١٩٩٩؛ الطائي, ١٩٩٩؛ الخفاجي, ٢٠١٠) وفي مجال المكافحة الحيوية استخدمت بعض الفطريات في مكافحة بعض أنواع البعوض (خلف وآخرون, ٢٠٠٤؛ علي, ٢٠٠٧).

ونظراً لندرة الأبحاث حول عزل المسببات المرضية للبعوض بصورة عامة والفطريات بصورة خاصة واستعمالها في المكافحة الجرثومية . كما إن عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات البعوض المصابة طبيعيا لم يجر سابقا في العراق . ولكون البعوض *An. stephensi* يعد الناقل الرئيس للملاريا في جنوب العراق (أبو الحب، ١٩٧٩) وعد *Cx. quinquefasciatus* الناقل الرئيس لداء الفيلاريا في أنحاء مختلفة من العالم . استهدفت الدراسة عزل الفطر من يرقات البعوض وتنميته واستخدامه في مكافحة نوعين من البعوض ولتحقيق هذا الهدف تضمنت الدراسة المحاور الآتية :

١ - عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات بعوضة *Cx. quinquefasciatus* بعد تهيئة الوسط

الملائم للعزل في المختبر وتنمية وإكثار الفطر على الأوساط الزرعية

٢- الاختبار الحيوي Bioassay لمعقلات الفطر في ادوار الحياة (البيضة – اليرقة – العذراء –

البالغة (ذكور وإناث)) وحساب قيمة LC_{50} ولكل من البعوضتين *An.stephensi* و

Cx.quinquefasciatus

٣- الاختبار الحيوي لتركيزات مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام للفطر في دوري (اليرقة –

البالغة) ولكل من البعوضتين *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

٤- تأثير بعض العوامل غير الحياتية في استعمال الفطر في المكافحة الجرثومية مثل درجة الحرارة والأس الهيدروجيني (pH) والملوحة وبعض المبيدات الحشرية والفطرية .

٢- استعراض المراجع

١-٢ البعوض

ينتمي البعوض إلى العائلة Family: Culicidae والتي تضم العواليتين الرئيسيتين Subfamily: Anophelinae والذى يعد الـ *Anopheles* اكبر أجناسها، وعواليه Subfamily: Anophelinae التي تضم الجنس *Culex*. يضم جنس الانوفلس ما يزيد عن ٤٠٠ نوعاً أما جنس الكيلوكس فيضم أكثر من ٧٦٩ نوعاً (Knight and Stone, 1977)، وقد وضع (Knight, 1978) قائمة بأكثر من ٣٠٠٠ نوعاً في عائلة البعوض، بينما أشار (Service, 1993) إلى حوالي ٣٤٥٠ نوعاً ونوعاً. ويضم جنس الانوفلس ١٦ نوعاً أما الجنس *Culex* فيضم ١٨ نوعاً في العراق (أبو الحب, ١٩٧٩). وصفت دورة حياة البعوض بأنها كاملة Holometabola إذ تضع أنثى *Anopheles* بيوض فرادى وبعد ١٠٠-١٥٠ بيضة في الليل عادة على سطح الماء (Mer, 1931) أما أنثى *Culex* فتضع البيض على شكل قوارب يتكون كل واحد منها من ٣٠٠-٣٠ بيضة، تفتقس البيوض عن يرقات تمر بأربعة أطوار تتحول إلى عذراء نشطة غير متغذية تتسلخ بعدها إلى البالغة، الذكور منها تتغذى على المواد السكرية في حين تتغذى الإناث على الدم من مختلف المضائق الفقيرية (سيرفس، ١٩٨٤) يطلق على الأنواع التي تعرض الإنسان عادة بالمحبة للإنسان Anthropophilic ، بينما يطلق على تلك التي تتغذى بالدرجة الأولى على الحيوانات بالمحبة للحيوان Zoophilic . وتحتاج أماكن تغذية البعوض إذ تدخل أنواع قليلة من البعوض المنازل غالباً ويطلق عليها متغذية داخلية Endophagic ، بينما يطلق على تلك التي تتغذى على مضائقها في الخلاء متغذية خلائية Exophagic (سيرفس، ١٩٨٤) . معظم أنواع البعوض ذات نشاط ليلي وإن بزوع الكلمات وعملية التزاوج والتغذية على الدم ووضع البيض تحدث خلال المساء أو في الصباح الباكر قبل موعد شروق الشمس (أبو الحب, ١٩٧٩) .

٢-٢ الأهمية الطبية للبعوض

عدت عائلة البعوض أكثر الحشرات أهمية للإنسان من الناحية الطبية كما يتضح من الآتي

١- عضة البعوض

يسbib البعوض الإزعاج والضرر من جراء خسارة الدم والحكمة والحساسية (أبو الحب, ١٩٧٩)

٢- نقل الأمراض

ينقل البعوض العديد من الأمراض كما هو موضح في (الجدول ١-٢)

جدول (2-1) الأمراض التي ينقلها البعوض (WHO, 1989)

اسم المرض	المسبب الممرض	الناقل	الأعراض	الأصابات سنوياً
-----------	---------------	--------	---------	-----------------

النوع	السبب	الحالة المرضية	<i>Anopheles spp.</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	المalaria الثالثة الحميدة
			<i>Anopheles spp.</i>	<i>P. falciparum</i>	المalaria الثالثة الخبيثة
			<i>Anopheles spp.</i>	<i>P. malariae</i>	المalaria الرابعة
			<i>Anopheles spp.</i>	<i>P. ovale</i>	المalaria الثالثة الحميدة المبisticية
يُصيب حوالي ١٠٠-٣٠٠ مليون شخص ويؤدي إلى موت ٢-١ مليون شخص	حمى كل ٤٨ ساعة ناتجة عن نضوج الطفيلي في الدم				
يُصيب حوالي ١٢٠ مليون شخص	تضخم الأجزاء البارزة من الجسم مثل الأيدي والأرجل والثدي وكيس الصفن	<i>Anopheles, Culex,Aedes</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>	داء الفيلاريا	
يُصيب حوالي ٢٠٠٠٠ شخص ويؤدي إلى وفاة ٣٠٠٠ شخص	ارتفاع درجات الحرارة المفاجئ ثم اصفرار شديد وظهور الزلال بالبول بكثرة يعقب ذلك غالباً الوفاة	<i>Ae. aegypti</i>	فايروس من جنس <i>Flavivirus</i>	الحمى الصفراء	
يُصيب حوالي ٥٠ مليون شخص وموت ٢٤٠٠٠ شخص	مرض حاد يتميز بصداع وحمى وإعياء وألم العضلات وانتفاخ الغدد وطفح	<i>Ae. aegypti Ae. albopictus Ae. sampsoni</i>	فايروس من جنس <i>Flavivirus</i>	حمى الضنك	
١٧-١٢ إصابة سنوياً أما الوفيات تتراوح من ٣٣٪-٧٠٪ في أمريكا	حمى وألم عضلي وألم المفاصل	<i>Culiseta melanura Mansonia perturbans</i>	فايروس من جنس <i>Alphavirus</i>	التهاب الدماغ الخلالي الشرقي	
نسبة الأصابة ١:١٠٠٠ في البالغين و ١:٥٨ في الأطفال من عمر ١ إلى ٤ سنوات في حين تبلغ نسبة الوفيات ٣-٤٪ من هذه الإصابات	حمى، صداع، غثيان، تقيأ، فقدان الشهية وتذمر	<i>Cx. tarsalis</i>	فايروس من جنس <i>Alphavirus</i>	التهاب الدماغ الخلالي الغربي	
٦٠-٣٠ إصابة كل سنة في أمريكا	صداع، رؤية مشوشة، أعراض تشبه الأنفلونزا	<i>Ae. melonimon</i>	فايروس من جنس <i>Alphavirus</i>	التهاب الدماغ الكاليفورني	
يُصيب حوالي ٤٠٠٠-٣٠٠٠ و الوفيات تصل إلى ١٠٠٠	صداع، حمى، غيبوبة، شلل عام، فقدان التوازن	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	فايروس من جنس <i>Flavivirus</i>	التهاب الدماغ الياباني	
في عام ١٩٧٥ سُجلت حوالي ١٨١٥ إصابة بهذا المرض	يتميز هذا المرض بتذمر عام وحمى وصداع وخمول، فقدان الشهية، غثيان، ألم عضلي والتهاب الحنجرة	<i>Cx. tarsalis</i>	فايروس من جنس <i>Flavivirus</i>	مرض سانت لويس	

٢-٣ طرائق مكافحة البعوض

ويمكن تلخيص طرائق مكافحة البعوض بما ياتي:

٢-٣-١ المكافحة الكيميائية :

منذ اكتشاف الـ DDT في عام ١٩٣٩ أصبح الاعتماد كاملاً تقريباً على مبيدات الآفات الكيميائية في برامج المكافحة حيث استخدمت أنواع عديدة من المبيدات الكيميائية في مكافحة البعوض اذ قسمت المبيدات المستخدمة في مكافحة البعوض إلى قسمين الأول يستخدم في مكافحة البرقات ويطلق عليه العود الأساسي لأي برنامج مكافحة كيميائية اما القسم الثاني فيستخدم في مكافحة البالغات ويطلق عليها الاستخدام الأمثل والعقلاني لمختلف المبيدات كان من الممكن ان يؤدي الى مكافحة الكثير من الامراض التي تنقلها انواع عديدة من الحشرات ولكن ذلك لم يحدث بل ظهرت مشكلات عديدة بدأت تتزايد حدتها باضطراد ومنها مقاومة الحشرات للمبيدات الكيميائية فضلاً عن تلوث النظام البيئي وتزايد تكاليف انتاج المبيدات . وبهذا الصدد يتركز تقرير لـ WHO انه تم تسجيل ١٠٨ نوعاً من أنواع المفصليات ذات الأهمية الطبية بضمنها أنواع عديدة من البعوض أصبحت بالفعل ذات مقاومة عالية للعديد من المبيدات الكيميائية . وقد أشار Subra (1983) إلى انه تم تسجيل أكثر من ٥٠ نوعاً من مجموع أنواع العوائل Culicinae و Anophlelinae و ١٩ نوعاً من أنواع العويلة . وأكثر هذه الانواع هي ناقلات مهمة للعديد من الامراض التي تصيب الإنسان .

٢-٣-٢ المكافحة الوراثية

تعد السيطرة على الحشرات بالطرق الوراثية واحدة من السبل التي تميزت بوضع الحلول الأكثر تأثيراً في استراتيجيات مكافحة الآفات وتشمل برامج المقاومة الوراثية في الوقت الحاضر استخدام الحشرات العقيمة Sterile insects عن طريق التشيع بالمواد الكيميائية المشعة او المعقمات الكيميائية وكذلك استخدام أشعة كاما في استحداث العقم الموروث في الحشرات (الربيعي، ١٩٩٧) او استخدام هجائن عقيمة Sterile hybrids بوساطة تضريب سلالتين او أكثر لنوع واحد من الآفة بهدف الحصول على ذرية عقيمة او عن طريق تضريب سلالتين تابعة لنوع نفسه او لأنواع تابعة للجنس نفسه فان الناتج اما ان يكون ذرية عقيمة او افراداً خصبة وعقيمة معاً او ذكوراً عقيمة (الزبيدي، ١٩٩٢) او عن طريق إنشاء مستعمرة في المختبر من أعداد كبيرة من البعوض الذي تم تغيير تركيبة الوراثي للحصول على بعوض ذو مناعة لاصابة بامراض الإنسان كالملاريا والفيلاريا ومن ثم يطلق هذا البعوض في البيئة على أمل أن يتنافس بنجاح مع العشيرة الطبيعية للأفراد الحساسة ويحل محلها أخيراً (سيرفس، ١٩٨٤)

٢-٣-٣ المكافحة باستخدام منظمات النمو الحشرية Insect growth regulators

تعرف بانها مبيدات حشرية من الجيل الثالث وهي مواد فعالة للسيطرة على مختلف الآفات الحشرية ونواقل الامراض , كما تظهر فعالية عالية تجاه البعوض (Amalraj et al., 1988) . يوجد هناك نوعين من منظمات النمو الحشرية هي نضير هرمون الصبا Juvenile hormone analogs

الذى يتداخل مع عملية الانسلاخ والتى تؤدى الى انسلاخ مبكر وكذلك يسبب تشوهات في الاجنحة والاجزاء التكاثرية كما ان البيوض المنتجة تكون غير مخصبة مثل Methoprene و Fenoxy carb والنوع الاخر هو مثبطات تصنيع الكايتين Chitin synthesis inhibitors الذى يمنع تخلق الكايتين (Mulla,1991)AC-291898 (Dimilin) diflubenzuron كما انه يمنع عملية وضع البيض مثل

٤-٣-٢ المكافحة الحيوية: وتشمل استعمال

١- المفترسات Predators

أ- الأسماك

استخدمت الأسماك المفترسة التي تتغذى على يرقات البعوض في مجال المكافحة الحيوية مثل الانواع الآتية *Gambusia affinis*, *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Oreochromis niloticus niloticus*, *Clarias gariepinus*, *Poecilia reticulata* (Chapman et al.,1972; Mackay,1995; (carps and minnows) Cyprinids وبعض (Ghosh et al.,2005) . وفي العراق استخدمت اسماك *Gambusia affinis* في مكافحة يرقات البعوض (عبد القادر, ١٩٩٤) .

ب- الحشرات

توجد أنواع عديدة من الحشرات المفترسة للبعوض وتشمل يرقات البعوض *Toxorhynchites* الذي يعود لعويلة (Subfamily: Toxorhynchitinae) الذي يتغذى على الانواع الأخرى من يرقات البعوض (Sub order: Chapman et al.,1972) . كما ان حوريات الرعاشات من رتبة (sub order: Zygoptera) مثل *Libellula depressa* و *Sympetrum striolatum* Anisoptera) *Enallagma cyathigerum* و *Ischnura elegans* و *Coenagrion puella* Zygoptera) تكون ذات قابلية افتراسية عالية ليرقات البعوض (Onyeka,1983; Jeffries,1988) أن بالغات ويرقات خنافس *Hydroporus sp.* و *Dytiscus marginalis* و *Agabus bipustulatus* (Family: Dytiscidae) ويرقة *Peltodytes sp.* (Family: Halaplidae) ويرقة *Notonecta undulata* (Order: Hemiptera) (Onyeka,1983). و تعتبر حشرة *Microvelia streiti* (family: Reduviidae) وحشرتي *Tachydromia* (Family: Vellidae) *Emesopsi streiti* كما تفترس حشرة *Paravelia myersi* و *cavicola*

An. plumbeus من رتبة ثنائية الاجنحة بالغات بعوضة (Family:Empididae) . (Service,1967)

ج- الطيور

هناك دراسات قليلة حول تأثير تغذية الطيور على بالغات البعوض حيث لوحظ افتراس بالغات البعوض بواسطة (Medlock and Snow, 2008) *Hirundo rustica* و طير السنونو *Apus apus*

٢- الديدان الثعبانية الممرضة للحشرات **Entomopathogenic Nematode**

حققت بعض الأنواع من هذه المجموعة مثل *Hydromermis churchiliensis* و *Culicimermis* و *Romanomermis culicivorax* و *Octomyomermis muspratti* (Nematoda: Mermithidae) *Empidomermis cozii* و *schakhovii* البعوض (Petersen and chapman,1979; Poinar,1975;1979).

٣- الاحياء المجهرية الممرضة للحشرات **Entomopathogenic micro-organism**

تسبب مختلف الاحياء المجهرية امراض مختلفة للحشرات , وان الاكثر شيوعاً في مجال المكافحة الجرثومية هي تلك التي تظهر قدرة عالية عند استعمالها ولعل أشهرها بكتيريا *Bacillus* لمكافحة يرقات البعوض , اما الفايروسات التي تعود الى *Bacillus sphaericus* و *thuringensis* Cytoplasmic و Nucleopolyhedrosis و Adenonucleovirus و Iridoviruses فقد استعملت في مكافحة يرقات وبالغات البعوض Entomopox viruses و polyhedrosis viruses . (Yadav, 2009)

وتعد الفطريات من المسببات الممرضة الفعالة تماماً , اذ يهلك عدد كبير من الآفات بالأمراض الفطرية سنويا ولم يعد استخدام هذه الفطريات في طور التجريب والاختبار بل ان كثيرا منها متوفرا بشكل مستحضرات تجارية في الاسواق مثل Mycotrol و Luginex و-0 Naturalis (Khetan,2001; Scholte et al.,2004) ومنها ما زال في طور الإنتاج. وتتنوع الفطريات الممرضة للحشرات على أربعة شعب ضمن المملكة الفطرية هي شعبة الفطريات اللااقحية Zygomycota والفطريات الكيسية Ascomycota وشعبة الفطريات البازيليدية Basidiomycota وشعبة الفطريات الناقصة Deuteromycota . (Samson et al.,1988)

٤- شعبة الفطريات الكيسية **Ascomycota**

تضم شعبة الفطريات الكيسية عدة أصناف ومن أهمها صنف Class: Sordariomycetes الذي كان يعرف سابقاً بالفطريات القارورية Pyrenomycetes إلا أنه شوهدت بعض التغيرات المهمة بين أجنسها تمثلت بإنتاج السبورات الكيسية داخل أجسام ثمرة (perithecia) دورقية الشكل تقريباً ومن أهم الرتب التي تعود إلى هذا الصنف هي رتبة Hypocreales order: Ascomycota

الفطريات الممرضة للحشرات. يسمى الطور اللاجنسي بالـ Anamorph والطور الجنسي يطلق عليه بالـ Telomorph . (جدول ٢-٢).

جدول(٢) : العائلات والأجناس المهمة في رتبة Hypocreales (Sung et al., 2007)

	Family: Clavicipitaceae	Family: Cordycipitaceae	: Family Ophiocordycipitaceae
Telomorphs	<i>Hypocrella,</i> <i>Netacordyceps,</i> <i>Regiocrella,</i> <i>Torrubiella</i>	<i>Cordyceps</i>	<i>Ophiocordyceps,</i> <i>Elaphocordyceps</i>
Anamorphs	<i>Ascherosonia,</i> <i>Metarhizium,</i> <i>Paecilomyces,</i> <i>Pochonia,</i> <i>Rotiferophthora,</i> <i>Verticillium</i>	<i>Beauveria,</i> <i>Engyodontium,</i> <i>Isaria,</i> <i>Lecanicillium,</i> <i>Maliannaea,</i> <i>Microhilum,</i> <i>Simplicillium</i>	<i>Haptocillium,</i> <i>Harposporium,</i> <i>Hirsutella,</i> <i>Hymenostible,</i> <i>Paraisaria,</i> <i>Sorosporella,</i> <i>Syngliocladium,</i> <i>Tolypocladium</i>

١-٤-٢ الفطر *Metarhizium anisopliae*

١-٤-٢ التصنيف

ان اول من صنف الفطر *M. anisopliae* هو العالم الروسي Metschnikoff عام ١٨٧٩ والذى اسماه *Entomophthora anisopliae* . وفي عام ١٨٨٣ اسماه العالم Sorokin .

وقد جاءت تسمية الفطر بـ *M. anisopliae* لأنه عزل أصلاً من خفف새 *Anisoplia austriaca* . (Cloyd,1999)

صنف هذا الفطر سابقاً ضمن صنف Hyphomycetes من شعبة Deuteromycota التي تُعرف بالفطريات الناقصة Imperfect fungi لانه لم يلاحظ فيها عملية التكاثر الجنسي . اما التصنيف الحديث للفطر فهو ما جاء به : (Sung *et al.*,2007)

Kingdom: Fungi

Subkingdom: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Clavicipitaceae

Genus: *Metarhizium*

Species: *anisopliae* (Metschn.) Sorokin

وقد وصف petch (1935) أنواعاً أخرى من الجنس *Metarhizium* هي *M. album* و *M. brunneum* كما أشار Holley (٢٠٠٩) إلى أنواع الجنس *Metarhizium* ومصادرها كما في (الجدول ٣-٢)

جدول (٣-٢): أنواع الجنس *Metarhizium* ومصادرها (Holley,2009)

المضيف	النوع	ت
يُصيب أكثر من ٢٠٠ نوع من الحشرات ومفصليات الأرجل	<i>M. anisopliae</i>	١
<i>Schistocerca piceifrons</i> , <i>Locusta migratoria</i> , <i>Austracris guttulosa</i>	<i>M. acridium</i>	٢

(Orthoptera: Acrididae)		
(Orthoptera:Pyrgomorphidae) <i>Zonocerus elegans</i>		
<i>Recilia dorsalis</i> , <i>Nephrotettix virescens</i> , <i>Cofana spectra</i> (Homoptera:Cicadellidae)	<i>M. album</i>	٣
(Acari: Ixodidae) <i>Boophilus</i> (Coleoptera: Cerambycidae) <i>Anoplophora glabripennis</i> (Coleoptera:Curculionidae) <i>Sitona lineatus</i> , <i>Otiorhynchus sulcatus</i> , (Coleoptera:Elateridae) <i>Agriotes</i> , ,(Diptera:Culicidae) <i>Ochlerotatus triseriatus</i> , <i>Aedes crinifer</i> <i>Solenopsis invicta</i> ,(Homoptera:Delphacidae) <i>Nilaparvata lugens</i> <i>Coptotermes formosanus</i> , (Hymenoptera:formicidae) (Lepidoptera: <i>Bombyx mori</i> , (Isoptera:Rhinotermitidae) (Lepidoptera:Pyralidae) <i>Galleria mellonella</i> , Bombycidae)	<i>M. brunneum</i>	٤
, (Coleoptera:Curculionidae) <i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Orthoptera:Acrididae) <i>Chortoicetes terminifera</i>	<i>M. flavoviride</i>	٥
, (Coleoptera: Scarabaeidae) <i>Adoryphorus</i> (Isoptera:Rhinotermitidae) <i>Coptotermes lacteus</i>	<i>M. frigidum</i>	٦
, (Lepidoptera:Pyralidae) <i>Pyrausta machaeralis</i>	<i>M. globosum</i>	٧
,(Coleoptera:Curculionidae) <i>Mylllocercus discolor</i> , (Lepidoptera: Bombycidae) <i>Bombyx mori</i> (Orthoptera:Acrididae) <i>Pseudosphingouotus savignyi</i>	<i>M. guizhouense</i>	٨
, (Coleoptera: Scarabaeidae) <i>Dermolepidae albohirtum</i>	<i>M. lepidiotae</i>	٩
(Coleoptera: Scarabaeidae) <i>Oryctes</i> , <i>Anoplognathus</i>	<i>M. majus</i>	١٠
(Coleoptera:Chrysomelidae) <i>Zygogramma bicolorata</i> ,(Coleoptera:Curculionidae) <i>Diaprepes abbreviata</i> (Isoptera:Rhinotermitidae) <i>Coptotermes lacteus</i>	<i>M.pingshaense</i>	١١
, (Coleoptera:Cerambycidae) <i>Dectes texanus</i> , (Coleoptera:Tenebrionidae) <i>Tribolium castaneum</i>	<i>M. robertsii</i>	١٢

٢-١-٤-٢ صفات الفطر *M. anisopliae*

بعد الفطر *M. anisopliae* من فطريات التربة ويسبب امراضاً لمختلف الحشرات بسبب تطفله عليها (Driver et al.,2000) وتدعى الأمراض التي يسببها Green muscardine disease لكون السبورات التي ينتجها ذات لون اخضر (Freimoser et al.,2003) يصيب هذا الفطر أكثر من ٢٠٠

نوعاً من الآفات الحشرية (Cloyd, 1999). يتميز هذا الفطر بخصائص عدّة تجعله عامل مقاومة حيوية مهم، إذ يُسبب هلاكات عالية في مجتمعات الآفات الحشرية كما يتميز بنموه الواسع على الأوساط الزرعية الصناعية وحفظة بسهولة (Roberts, 1970) كما يمتاز بالانتشار الجيد والبقاء طويلاً تحت الظروف غير الملائمة حتى في غياب المضائق حيث بإمكانه البقاء في التربة لأكثر من سنة واحدة (Latch and Falloon, 1976; Rath, 1992).

٢-١-٤-٢ آلية اصابة الفطر

تحدث الإصابة بالفطر *M. anisopliae* بوساطة ابواغ فطرية لاجنسية وحيدة النواة تتكون خارجياً (Humber, 1997) وتشمل الإصابة المراحل الآتية:

٢-١-٤-٣-١ التصاق البوغ بالمضيف

أن المرحلة الأساسية للإصابة هي ملامسة البوغ للمضيف وبذلك يجب أن يتصل بكيوتكل الحشرة لغرض أنباته ، وان عملية الالتصاق تتأثر بالمكونات الكيميائية للطبقات الخارجية لكل من البوغ وكيوتكل الحشرة ، اذ أن ابواغ هذا الفطر كارهة للماء وان غلافها الخارجي يحتوي على بروتينات دهنية وكاربوهيدرات حيث ترتبط بكيوتكل المضيف بوساطة ارتباط القوة الكارهة للماء والقوة الكهربائية . (Boucias et al., 1988)

٢-١-٤-٣-٢ الانبات واختراق الكيوتكل

في هذه المرحلة يحدث انبات للبوغ وتكوين الانبوب الجرثومي Germ tube والذي يكون في نهايته عضو الالتصاق (Appresorium) الذي يخترق كيوتكل الحشرة بمساعدة الضغط الميكانيكي والانزيمات المحطمّة للكيوتكل والتي تشمل Protease , chitinase, lipase, esterase, phosphatase, (Freimoser et al., 2003). هذه المرحلة تحدث خلال ساعات قليلة وربما تحدث بعوامل عدّة تتضمن عوامل حيوية وربما غير حيوية مثل درجات الحرارة المثلثى ، اذ يجب ان تكون الأبواغ قادرة على الانبات والنمو في درجات حرارية واسعة وainما يظهر مجتمع الافة ، كذلك يجب توفر الرطوبة النسبية لأحداث الإصابة الفطرية (Ibrahim et al., 1994) ، وأشار Moorhouse et al., (1994) ان ابواغ *M. anisopliae* تحتاج الى رطوبة ٩٨% للإنبات وان نجاح انبات البوغ يعتمد على ذلك كثيراً فضلاً عن كمية المواد الغذائية والطبقة السطحية للمضيف (Dillon and Charley, 1990) . St.leger et al., 1991)

٢-١-٤-٣-٣ النمو والتكاثر داخل المضيف

بعد نجاح البوغ في الانبات ثم اختراق كيوتكل الحشرة ، يدخل إلى المجرى الدموي ويبدأ بالنمو ويعتمد النمو على قابلية الفطر في التغلب على الأنظمة المناعية للمضيف (Entz, 1985) ويتبع نمو الفطر داخل تجويف جسم الحشرة استنزاف المواد الغذائية للحشرة بليه موتها نتيجة تكاثر الفطر داخل

التجويف والنقص الحاد للغذاء او نتيجة إفراز السموم الفطرية من قبل الأبواغ المتبرعة Vilcinskas *et al.*, (Zacharuk, 1971) وذكر (blastospores) أن فطر *M. anisopliae* يُنتج مركب destruxins الذي له القابلية على التكيف مع الانظمة المناعية للمضيّف . كما اشار (James *et al.*, 1993) أن هذا المركب يؤدي إلى اضطراب الايض الخلوي للمضيّف.

٤-٣-١-٤-٢ اعادة نشوء الأبواغ من المضيّف Re-emergence from the host and conidiation

تحت الظروف البيئية الملائمة يُستأنف نمو الغزل الفطري وتنمو الخيوط الفطرية بعد موت المضيّف الى مستعمرات على سطح الحشرة الميّة . كما ان الفطريات الممرضة للحشرات تمتلك آلية فعالة في قذف الأبواغ لتنشر بشكل واسع بوساطة الرياح او الامطار او بالتماس المباشر بين الحشرة المصابة والسليمة وعند تماس الأبواغ بالمضيّف المناسب تبدأ مباشرة بالإنبات وتعيد دوره حياتها (Hajek and st. leger, 1994).

٤-١-٤-٢ السموم التي يُنتجها الفطر *M. anisopliae*

ينتج هذا الفطر العديد من النواتج الايضية الثانوية السامة والتي تؤدي دوراً مهما في مجال المكافحة الجرثومية وتشمل مركب viridoxins حيث تم الحصول عليه من المستخلص الكحولي للغزل الفطري للفطر المذكور وهو مركب مشابه لعمل المركبين colletochin و colletotrichin المنتجة من قبل الفطر الممرض للنبات *Colletotrichum nicotianae* (Gupta *et al.*, 1993) ويُستخدم viridoxins كمبيد لخنفسيات كولرادو *Leptinotarsa decemlineata* . ان (1969) Aldridge هما أول من عزل مركب cytochalasins (سموم فطرية) من الفطر المذكور ومع ذلك فان هنالك العديد من الفطريات التي تُعرف الآن بإنتاجها لهذا المركب وان للمركب المذكور دوراً في منع تكون خيوط الاكتين ويخترل عملية البلعمة الخلوية وانتشار خلايا الدم للحشرات (Vilcinskas *et al.*, 1997a,b) وان لهذه المركبات دوراً واضحاً في التداخل مع عملية الاستجابة المناعية للمضيّف وعملية الإصابة الفطرية . كما يفرز الفطر *M. anisopliae* مركب Swainsonine الذي يُرتبط تكون α -mannosidase (Charnley, 2003). ومن أهم المركبات السامة التي يُفرزها الفطر المذكور هو مركب destruxins الذي يعود إلى عائلة البيتيدات الحلقيّة cyclic peptide حيث يتكون من خمسة احماض أمينية و hydroxyl acid (Kodaria, 1961; Suzuki *et al.*, 1970; Suzuki and Tamura, 1972; Pais *et al.*, 1981; Gupta *et al.*, 1989; Wahlman and Davidson, 1993; Chen *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1996; Jegorov *et al.*, 1998) يُنتج الدستركسين اثناء النمو الفطري النشيط (Amiri-Besheli *et al.*, 2000) كما أنه عُزل ايضاً من الفطر الممرض للحشرات (Krasnoff *et al.*, 1996) *Achersonia sp.*

(Bains and Tewari,1987) *Alternaria brassicae* هي فطريات تُنتج بوساطة ثلاثة فطريات هي *Ophiostoma herpotricha* (Springer et al.,1984) *Trichothecium roseum* (Venkatsubbaiah et al.,1994) وهنالك العديد من النظائر الطبيعية للدستركسين تشمل (Kawazu et al.,1993) *Bursephalocids* (Engstrom et al.,1975) *Roseotoxin* الدستركسين في يرقات حرشفية الاجنحة وبالغات ثنائية الاجنحة تُسبب فوراً شللاً عضلياً ، والجرع العالية من الدستركسين تكون قاتلة (Kodaira,1961; Roberts,1966b; Samuels et al.,1988) كما ان الدستركسين يُسبب تأثيرات أخرى حيث يُثبط إفراز سائل أنابيب مالبيجي في جرادة *Schistocerca gregaria* (James et al.,1993) كما يُثبط إفراز سترويدات الانسلاخ (Sloman and *Manduca sexta* ecdysteroid Reynolds,1993) ويفحز ضربات قلبها (Samueles,1998) كما لوحظ بعض التأثيرات المرضية في خلايا القناة الهضمية الوسطى وأنابيب مالبيجي المعاملة خارج الجسم او في داخل الجسم مع جرعة واطئة من الدستركسين مثل ظهور الحويصلات على الزغيبات الدقيقة وتجمع الكروماتين في النواة (Quiot et al.,1985;Dumas et al.,1996) . ان أنتاج الدستركسين لا يتأثر بشكل كبير بمكونات الوسط الزراعي لذلك فإن الفطر *M. anisopliae* ينتج الدستركسين على الوسط الزراعي بصورة طبيعية (Roberts,1966a; Jegorov et al.,1989) . ان تشخيص النواتج الايضية الثانوية الفطرية في الحشرات المصابة بالفطريات هي دليل على دور هذه المواد الكيميائية في الامراضية ، حيث شخص مركب الدستركسين B في حشرة *Bombyx mori* مصابة بالفطر *M. anisopliae* من قبل Suzuki et al.,1971) وفضلا عن ذلك فان إنزيم protease المنتج من الفطر المذكور يؤدي دوراً كبيراً في المكافحة الحيوية حيث درس (Kucera 1980,1981) تأثير إنزيم protease كمبيد حشري وأوضح العديد من الباحثين بان الإنزيم المذكور يعيق تكوين الهيكل الخلوي ويُثبط عملية البلعمة الخلوية . (G. mellonella Charnley,2003) لحشرة (Phagocytosis)

٤-١-٥ دور الفطر في المكافحة الجرثومية

استعمل الفطر *M. anisopliae* منذ زمن بعيد في مكافحة الآفات الحشرية ، حيث أشار Metchnikoff (1880) إلى أن هذا الفطر أدى إلى هلاكات عالية بين افراد خنفساء شمندر السكر *Conotrachelus punctiventris* . وكذلك في السيطرة على خنفساء فاكهة الخوخ

Cosmopolites (Tedders *et al.*, 1982) كما أُستعمل الفطر في مكافحة سوسة الموز *nenuphar Musca* (Kaaya *et al.*, 1993)) *sordidus* (Barson *et al.*, 1994; Renn *et al.*, 1994; Langewald, 1999) حساسية عالية عند تعريضها لأبوااغ هذا الفطر على الجراد (Bateman, 1997) وفي أفريقيا استعمل الفطر للسيطرة على الجراد (Langewald, 1999) (1999) أن سكان الجراد اختزلت إلى ٩٠٪ تقريباً بعد مرور ٣-٤ أسابيع من المعاملة. واستعمل هذا الفطر في مكافحة أنواع عديدة من القراد مثل *Amblyomma variegatum* و *Hyalomma* (Kaaya and Hassan, 2000) *Rhipicephalus appendiculatus* كما سبب الفطر هلاكات عالية بين أنواع ذبابة الفاكهة وفي مختلف أدوار حياتها (Ekesi *et al.*, 2002) ، وأضاف Castillo *et al.*, (2000) بأن الفطر المذكور أدى إلى نسبة هلاك بلغت ١٠٠٪ لذبابة *Ceratitis capitata*. كما وأشارت الدراسات إلى استخدام الفطر المذكور في مكافحة حلم *Varroa destructor* في مستعمرات نحل العسل حيث وصلت نسبة هلاك الحلم قمتها بعد ٣-٤ أيام من التعريض للأبوااغ (Lambert, 2003). وحلم الجرب في الماشية *Psoroptes ovis* (Brooks *et al.*, 2004) وأشارت دراسة أجراها Geng (2004) إلى أن الفطر قيد الدراسة أظهر تأثيراً قاتلاً لكل من قافزات النبات البنية *Nilaparvata lugens* وقافزات النبات البيضاء *Sogatella furcifera*. وأوضحت الدراسات المختبرية أن تعريض ذبابة القرن (*Haematobia irritans* (hornfly) لهذا الفطر أدى إلى هلاكات عالية في كل من البيوض والعذارى والبالغات (Angel-Sahagun *et al.*, 2005) كما أن تعريض سوسة النخيل الحمراء *Rhynchophorus ferrugineus* لهذا الفطر أدى إلى نسبة هلاك بلغت ١٠٠٪ خلال ٣-٤ أسابيع (Dayakar and Ergolis merione (Gindin *et al.*, 2006) واستعمل في السيطرة على *Ergolis merione* كما أُستعمل (Briggs *et al.*, 2006) (Kanaujia, 2006) الفطر قيد الدراسة في مكافحة قمل الماشية *Bovicola bovis* كما أظهرت بالغات البق الدقيقي *Maconellicoccus hirsutus* (Ujjan and Shahzad, 2007) محاصيل القطن حساسية عالية عند تعريضها للأبوااغ الفطر المذكور (Sitophilus granarius) كما حقق هذا الفطر نجاحاً ملحوظاً في مكافحة سوسة مخازن القمح *M. anisopliae* (Maketon *et al.*, 2008) وأن الفطر (Khashaveh *et al.*, 2008) وأوضحت دراسة أجراها (Amrasca biguttula) سبب نسبة هلاك وصلت إلى ٣٣٪ لقافزات أوراق القطن (Mahmoud, 2009) كما ذكر (Oryctes biguttula) ان الفطر سبب هلاك عالية لبالغات ذبابة فاكهة الزيتون *Bactrocera oleae* . كما أُستعمل الفطر في مكافحة خنفساء وحيد القرن *M. anisopliae* (Moslim *et al.*, 2009) *rhinoceros* كما عزلت ثلاثة عزلات من الفطر *Coptotermes heimi* (Ahmed *et al.*, 2009) وأُستعملت في مكافحتها كما اظهر الفطر

أمراضية عالية لحشرة الارضة التي تصيب نخيل الزيوت (Hoe et al., 2009) *Coptotermes curvignathus*

٦-٤-٢ تأثير بعض العوامل غير الحياتية في كفاءة الفطر *M. anisopliae* في المكافحة الجرثومية

تُعد درجة الحرارة والرطوبة والأكسجيني والملوحة من العوامل المهمة والمحددة لنمو وانتشار الفطريات الممرضة للحشرات فقد ذكر (1985) Entz إلى أن درجة الحرارة المثلث لنمو الخيوط الفطرية وإنما الأبواغ على وسط SDA كانت 27°C و 25°C على التوالي، وأوضح بان إنتاج الأبواغ سوف يقل مع زيادة درجة الحرارة فوق درجات الحرارة المثلث. وأشار Dimbi et al., (2004) إلى ان درجة الحرارة لا تؤثر على فسيولوجية الفطر والمضييف فحسب وإنما على قابلية الفطر في إصابة المضييف، لذلك يجب أن تؤخذ درجة الحرارة في الاعتبار في أي برنامج سيطرة حيوية. أما بالنسبة للأكسجيني فأن بعض الفطريات الممرضة للحشرات تنمو بشكل مثالى على مدى واسع من pH وأن فطر *M. anisopliae* ينمو على pH تتراوح من ٥ إلى ٨ (Brown, 1988) وأشار (1988) Bartlett and Jaronski أن قابلية الفطريات على النمو على درجة pH أقل من ٧ تكون مرغوبة لنمو والإنتاج الصناعي الفطري حيث أن هذه القيمة من pH تُثبط نمو الملوثات مثل البكتيريا. كما أظهرت الدراسات تأثير الملوحة على نمو الخيوط الفطرية وإنما الأبواغ للفطريات الممرضة للحشرات، فقد أشار (Lord et al., 1988) أن نمو الفطر *Leptolegnia chapmanii* يتتأثر سلبياً بزيادة تركيز NaCl في الوسط الزراعي. كما لاحظ (Pelizza et al., 2007) إلى أن إنتاج السبورات من قبل الفطر *L. chapmanii* تكون أقل تأثيراً بالتركيز العالى من NaCl مقارنةً بالنمو الخضري ومن العوامل غير الحياتية الأخرى التي تؤثر على نمو وتكاثر الفطر *M. anisopliae* هي استعمال المبيدات الكيميائية، اذ تختلف المبيدات الكيميائية في تأثيرها على الفطريات فقد أشار (1987) Mohamed et al., إلى أن المبيد الحشري Chlorpyrifos كان أكثر المبيدات الفوسفاتية العضوية سمية للنمو الفطري وتكون السبورات ومبيد الحشرات Malathion أكثر تثبيطاً لتكوين السبورات أما مبيد الحشرات Carabamates و Oxamyl وإنتاج السبورات. أما مبيد الفطريات Benomyl فيُسبب تثبيط كامل للفطر *M. anisopliae*. في حين لم تُظهر مثبّطات النمو الحشرية مثل Diflubenzuron أي تثبيط لنمو الفطر *M. anisopliae*.

٢-٤-٧-الفطريات الممرضة ليرقات البعوض

ثُساب يرقات البعوض بالعديد من الفطريات الممرضة للحشرات ، حيث يصيب الفطر *Beauveria* (Clark et *Anopheles albimanus* و *Culex pipiens* و *Culex tarsalis* و *bassiana*) *Ochlerotatus* أن بالغات Lowe and Kennel (1972) ، كما ذكر (1968, al.,) . كما ازدياداً في نسبة الهلاك خلال ٧ أيام من المعاملة. كما وجد (1973, McCray et al.,) أن الفطر *Conidiobolus coronatus* المعاملة بالفطر *Cx. quinquefasciatus* و *taeniorhynchus* *Lagenidium giganteum* يؤدي إلى هلاك ١٠٠٪ لكل من يرقات *Culex* و *Aedes* . كما استعمل جنس *Coelomomyces* في مكافحة يرقات البعوض، حيث يُصيب العديد من أنواع الحشرات المائية التي تعود إلى رتبة ثنائية الأجنحة وتشمل أنواعاً من عائلة البعوض *Culicidae* وعائلة الحرمص *Psychodidae* وعائلة البرغش غير الواخر *Chironomidae* وعائلة الذباب الأسود *Simuliidae* وعائلة ذباب الخيل *Tabanidae* (Chapman, 1974). أن كل من الفطر *Entomophthora* (Roberts, 1974) . *Cx. pipiens* و *E. destruens* و *E. conglomerata* في الطبيعة (Sweeny, 1974) كما أن الفطر *Culicinomyces clavisporus* يُسبب نسب هلاك عالية ليرقات البعوض (Soares, 1982) . كما أستعمل الفطر *Tolypocladium cylindrosporum* and Panter, 1977) من بعوض *Ochlerotatus sierrensis* في كاليفورنيا عام ١٩٧١ في مكافحة البعوض المبكرة لبعوض *Cx. quinquefasciatus* و *Ae. Simpsoni* و *Ae. africanus* و *Ae. aegypti* (Soares, 1982) . ذكر (1985) Nuakumnsana أن المعاملة بأنواع من الفطر *Pythium* للأطوار *Leptolegnia culicifacies* (An. *gambiae* و *Cx. tigripes* و *Ochlerotatus*) الذي غُزل من بعوض *Leptolegnia caudata* والفطر *An. chapmani* (Seymour, 1984; Bisht et al., 1996) من يرقات *triseriatus*

٣- المواد وطرائق العمل

١-٣ : إعداد المزرعة الدائمة لبعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

جمعت الأطوار المختلفة ليرقات النوع الأول من أحد أماكن تصريف المياه في محافظة الديوانية بواسطة مغرفة طويلة الذراع ووضعت في قناني بلاستيكية ذات غطاء ونقلت إلى المختبر ، ووضعت في أحواض بلاستيكية (٣٠×١٥) ملئت بماء خال من الكلور أضيفت له عليقية الفئران المطحونة المكونة من (الذرة الصفراء والحنطة والرز والبروتين) بنسبة (١:١:٢٥,٠,٢٥) بمقدار ٢ غرام لكل حوض

لتغذية اليرقات وغطيت الأحواض بقماش التول . ولغرض الحصول على مزرعة دائمة نقية نقلت العذارى الحديثة لبعوضة *Cx. quinquefasciatus* بوساطة قطارة عريضة الفوهه إلى أوان بلاستيكية أودعت في قفص مكعب الشكل طول ضلعه (٥٠)سم مغلف بقماش التول , وضعت بداخل الأقباچ أطباق بتري تحوي قطناً مشبعاً بمحلول سكري ١٠ % , وللحصول على قوارب البيض اتبعت طريقة Mehdi and Mohsen (1989) حيث غذيت إناث البعوض بعد ثلاثة أيام من بزوغها على دم حمامه انتزع ريشها من منطقة الصدر والبطن , بعدها وثق جناحها وربطت رجلاها وسجيت فوق قفص التربية طوال الليل كما وضع بداخل القفص أناء ماء صغير ليكون محللاً لوضع البيض . نقلت البيوض بوساطة فرشاة صغيرة إلى أوان ماء جديدة وحاوية على غذاء اليرقات وتم متابعتها حتى ظهور الكاملات وحذراً من حصول التعفن روبي تبديل الماء كل ثلاثة أيام ، هكذا كررت الطريقة حتى ظهور الجيل الثالث .

أما بالنسبة لبعوضة *An. stephensi* فقد جمعت البالغات من قرية العنکوشى في قضاء الشامية وبرفقة المالك الصحي في قسم الصحة العامة التابع لدائرة صحة الديوانية وذلك في الساعة السابعة صباحاً ، حيث تتواجد البالغات في أماكن تربية الحيوانات وتميز على أنها بالغات انوفليس من خلال وقوفها بصورة عمودية نوعاً ما على السطح وتلون حواف اجنحتها بالوان بيضاء وسوداء . جمعت إعداد كافية من البالغات بوساطة الشافطة Aspirator ووضعت في قناني واسعة الفوهه غطيت بقماش التول ونقلت إلى المختبر ، حيث أطلقت في قفص التربية الخاص بها وتم متابعة دورة حياتها حتى الجيل الثالث كما مر في طريقة تربية البعوض *Cx. quinquefasciatus* . تم إعداد شرائح لكلا النوعين لغرض التشخيص وبحسب الصفات التصنيفية الواردة في المفاتيح التصنيفية (Abu-alhab, 1968; عبد القادر، ٢٠٠٠) و تم الاستعانة بالأستاذ المساعد الدكتور غيداء عباس / كلية الطب البيطري / جامعة القادسية لغرض التشخيص وتأكد بأنهما *Anopheles stephensi* و *Culex quinquefasciatus* .

ولغرض تهيئة الأعداد الكافية من كل طور ودور العذراء والبالغات فقد عزلت اعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الأول اما الطور الثاني والثالث والرابع فقد هيأ كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبقه ووضعها في أنابيب التربية فرادى ومراقبتها لحين الانسلاخ ووصولها الطور المطلوب للتجربة ولكل النوعين على انفراد .

٣ - ٢ : الأوساط الزرعية

٣-٢-١ وسط أكار السابرويد المدعم بخلاصة الخميرة

Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract (SDAY)

(Goettel and Inglis, 1997)

يتتألف هذا الوسط من :

10 g Peptone

• بيتون

- دكستروز 40g Dextrose
- خلاصة الخميرة 2g Yeast extract
- أكار 15g Agar

أذيبت هذه المكونات بحسب الكميات الموصى بها في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعته ١٠٠٠ مل وعقم الوسط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة ١٢١°م وضغط ١٥ باوند/انج^٢ لمدة ١٥ دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد ثم أضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار ٢٥٠ ملغم/لتر ثم صب الوسط في الأطباق وترك ليتصلب، بعد ذلك لفحت الأطباق بالنمو الفطري بوساطة ناقل معقم وحضنته بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢°م لمدة ٧ أيام. كما استعمل وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB) لإكتار الفطر والمكون من مكونات وسط (SDAY) نفسه ولكن بدون إضافة الأكار (Goettel and Inglis, 1997).

٣-٢-٣ : الوسط الاختياري الخاص بالفطر Selective media for *M. anisopliae*

(Tajick Ghanbari et al;2009)

يتكون هذا الوسط من :

- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 0.5g KH₂PO₄
- فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين 0.5g K₂HPO₄
- بيتون 0.5g Peptone
- كبريتات المغنيسيوم 0.5g MgSO₄
- دكستروز 10g Dextrose
- خلاصة الخميرة 0.5g Yeast extract
- أكار 20g Agar

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة (١-٢-٣)

٣-٣ : خطوات عزل الفطر *M. anisopliae*

٣-٣-١ : جمع يرقات البعوض الميتة Cadaver

جمعت مختلف الأطوار البرقية ليرقات الكيوليكس من مياه الصرف الصحي من موقع مختلفة في المحافظة وبالطريقة المارة الذكر في الفقرة ٣-١. ثم فحصت العينات للنقصي عن اليرقات المصابة بالفطر وقد استدل على ذلك بتغير لون اليرقات إلى اللون البرتقالي المائل إلى اللون الأحمر. علاوة على مشاهدة خيوط الغزل الفطري على جسم اليرقة (Lacey and Brooks ; 2007)

أخذت اليرقات المصابة والميتة وعقمت بغمراها في كحول (ايثانول) ٧٠٪ لمنطقة ١٠ ثوان ثم نقلت إلى محلول هايبوكلورات الصوديوم (٥,٠٠٪) لمدة دقيقتين . ثم غسلت بماء مقطر معقم مرتين ووضعت على ورق ترشيح معقم ، ونقلت بوساطة ملقط معقم إلى أطباق بتري حاوية على الوسط الاختباري الخاص بعزل الفطر *M. anisopliae* وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ لمدة ٩ أيام . (Martignoni and Milstead, 1960)

٣-٣-٢ : تشخيص ووصف الفطر *M. anisopliae*

تم تشخيص الفطر الذي عزل من يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* وذلك بأخذ جزء صغير من مزرعة الفطر ووضعها على شريحة زجاجية مع وضع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر الضوئي تحت قوة تكبير $40\times$ ، وتمت الاستعانة بالأستاذ الدكتور مجید متعب دیوان / قسم وقاية النبات / كلية الزراعة/ جامعة الكوفة لتأكيد تشخيص الفطر. تم تشخيص الفطر لمستوى النوع اعتماداً على الصفات الواردة في المفتاح التصنيفي للفطريات الممرضة للحشرات (Humber, 1997) وشملت هذه الصفات :

١ - ظهور غزل فطري أخضر مصفر على جسم اليرقة الميتة (Cadaver) والتي تبدو وكأنها محنطة ذات جسم هش .

٢ - نمو الفطر على الوسط الزراعي SDAY : كان نمو الفطر على الوسط الزراعي على هيئة مستعمرة بيضاء مائلة إلى اللون الأخضر المصفر وغير لزجة عند رفعها من على الوسط الزراعي بوساطة الناقل المعقم . وعند الفحص المجاري للفطر لوحظ أن الخيط الفطري مقسم بحواجز والحوامل البوغية تكون متفرعة جداً ومتتشابكة بشكل كثيف . وتكون الأبوااغ اسطوانية ذات قطر $9\mu\text{m}$ ومحمولة على الخلايا المكونة للأبوااغ (Phialides) والتي تتميز بكونها اسطوانية قصيرة . وتتجمع هذه الأبوااغ مع بعضها مكونة سلسل على شكل أعمدة اسطوانية.

٣-٣-٣ : حفظ عزلة الفطر *M. anisopliae* في الزجاج Invitro

نقل جزء صغير من النمو الفطري بوساطة ناقل معقم إلى أنابيب سعة ١٥ مل حاوية على الوسط (SDAY) ووضع اللقاح داخل فسحة تم عملها في الطبقة السطحية للوسط الزراعي بوساطة ناقل معقم وكررت العملية باستخدام أنابيب أخرى . وضفت الأنابيب بصورة مائلة بدرجة حرارة $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ لمدة ٧ أيام ، ثم حفظت الأنابيب بعد ذلك في الثلاجة بدرجة حرارة 4°C (Silva et al, 1991; Cavalcanti, 1994).

٤-٣ : تحضير المعلق الفطري

حضر المعلق الفطري بتنمية الفطر على وسط (SDB) في دورق زجاجي سعته ٢٥٠ مل بمقدار ١٥٠ مل من الوسط المستعمل . حضنت المزرعة بدرجة حرارة ٢٥°C لمدة ٧ أيام وكانت ترجم يومياً لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بوساطة قطعة من الشاش ، اخذ ١ مل من الراسح ووضع على شريحة عد كريات الدم الحمر المحورة لعد الأبواغ Improved Neubauer Haemocytometer لتقدير عدد الأبواغ لكل وحدة حجم حيث حسب عدد الأبواغ في كل مربع من المربعات الأربع الكبيرة الموجودة في أركان الشريحة ، بعد ذلك قسم عددها الكلي على أربعة للحصول على معدل عدد الأبواغ في المربع الواحد ، ثم ضرب هذا الناتج في 10×1^4 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الأبواغ في ١ مل من المعلق الفطري . حيث تم الحصول على تركيز 2×10^4 (بوج/مل) (Goettel and Lacey, 1997) ولغرض الحصول على تركيز أقل من ذلك طبقت المعادلة الآتية :

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

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره ، فمثلاً للحصول على ١٠٠ مل من المعلق بتركيز 2×10^4 نطبق المعادلة .

$$\text{حجم (مل) المأخوذ من المعلق الرئيس} = \frac{5 \times 10^4 \times 2}{6 \times 10^4} = 100 \times 1 = 100 \text{ مل.}$$

وعليه يؤخذ ١٠ مل من المعلق الأصلي ويضاف إليه ٩٠ مل ماء مقطر معقم لإكماله إلى ١٠٠ مل للحصول على تركيز 2×10^4 بوج/مل ، ثم أضيفت بضع قطرات من Tween 80 كمادة نشرة وهكذا حُضرت التراكيز (2×10^4 ، 2×10^3 و 2×10^2).

٥-٣ : الاختبار الحيوي Bioassay

٥-٣-١ الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار

حياة بعوضتي *An. Stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

٥-٣-١-١ الاختبار الحيوي في البيوض

اخذ قارب البيوض بعمر ٤٨ ساعة بعد أن وضعته إناث *Cx. quinquefasciatus* المتغذية على الدم أو بيوض فرادى بعد ١٠٠ بيضة لكل مكرر لإناث النوع الثاني بوساطة فرشاة ناعمة ووضعت كلأ على حدة في أطباق بتري قطر ٩ سم فيها ماء مقطر معقم ، رشت البيوض بـ ٥ مل من كل تركيز من تراكيز المعلق الفطري بوساطة مرشة يدوية نظيفة من ارتفاع ١٥ سم تقريباً . كررت التجربة ثلاثة

مرات لكل تركيز ومعاملة السيطرة التي تحتوي على بيوض رشت بالماء المقطر المعقم . تم مراقبة البيض لحين الفقس ، وحسبت نسبة الهلاك (علي ٢٠٠٧) .

٣-٥-١-٢ الاختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربع

لدراسة التأثير الحيوي لمعلق الفطر في الأطوار اليرقية الأربع ولكل النوعين، أخذت ٤ يرقة من كل طور من الأطوار الأربع (التي هيئت عن طريق عزل يرقات الطور الذي سبقه في أنابيب التربية لحين الانسلاخ ووصولها الطور المطلوب كما تم الاعتماد على حجم رأس اليرقة الذي يزداد إلى الضعف مع تقدم عمر اليرقة إلى الطور الذي يليه) ولكل تركيز ولكل النوعين بصورة منفصلة (كلاً على حدة) وزوّدت على أربع أواني ثلاثة منها تحتوي على ١٠٠ مل من كل تركيز من تراكيز المعلق أما الرابعة فتحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) ولمدة دقيقتين . ثم نقلت اليرقات المعاملة فقط بوساطة فرشاة ناعمة إلى أواني زجاجية سعة ٢٥٠ مل تحوي ماءً مقطرًا معقماً فقط أضيف له غذاء يرقات معقم بمقدار ١٠ ملغم/سم^٣ ، حضنت الأواني الحاوية على اليرقات المعاملة في الحاضنة بدرجة ٢٥ ± ٢ م° و pH يساوي ٧ وفترة ضوئية (L/D) ١٤:١٠ . ثم حُسبت نسبة الهلاك خلال ٤ و ٧٢ و ١٢٠ ساعة من المعاملة (Nadeau and Boisvert, 1994; Skrobek *et al*, 2008) وصُحّحت القيم بحسب معادلة Orell and Shneider (١٩٩٣) (شعبان والملاح، ١٩٩٣)

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

٣-٥-٣ الاختبار الحيوي في دور العدراء

عزلت عذاري بعد انسلاخ عدد كاف من يرقات الطور الرابع لكل نوع على حدة وبعد مساوٍ لما استخدم في تجربة كل من الأطوار اليرقية كما طبقت طريقة الاختبار ذاتها في الفقرة ٣-٥-٢ باستثناء عدم إضافة العلقة ومراعاة تغطية أواني المعاملات بقماش التول تحسباً لظهور البالغات وحسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة ٣ أيام . وصُحّحت القيم كما في الفقرة ٣-٥-٣.

٣-٥-٤ الاختبار الحيوي في البالغات

أخذت إعداد كافية من عذاري كل نوع على حدة من المزرعة الدائمة ووضعت فرادى في أنابيب سعة ١٠ مل وأغلقت بقطعة من القطن ، حتى تحولها إلى بالغات . وزوّدت (١٠ باللغات) من الذكور والإناث ولكل النوعين وعلى انفراد في قناني بلاستيكية سعة ١ لتر مغطاة بقطعة من قماش التول ورش كل مكرر بمرشة يدوية من ارتفاع ١٥ سم تقرباً بعد عمل ثقب يسمح برش المعلق الفطري ومن

ثم يتم اغلاقة ثانيةً بعد انتهاء الرش فيما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم . نقلت البالغات المعاملة إلى قناني بلاستيكية سعة ١٠٠ ملتر داخل كل منها قطنة مشبعة بمحلول سكري ١٠٪ في طبق بتري بقطر ٩ سم ، كررت هذه التجربة ثلاثة مرات لكل تركيز ولكل النوعين ومثلها لمعاملة السيطرة . حضنت القناني في الظروف نفسها المارة الذكر في الفقرة (٣-١-٥) (Scholte *et al*,2003) . حُسبت نسبة ال�لاك يومياً ولمدة ٧ أيام . صُحّحت قيم ال�لاك كما في الفقرة سابقة الذكر.

٣-٥-٢ تحضير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae*

حضر وسط SDB وزع في دوراق سعة ٢٥٠ مل بمقدار ١٥٠ مل للدورق ولقح الوسط بأقراص قطرها ٥،٥ سم من مزرعة الفطر بعمر ٧ أيام . حضنت الدوارق بدرجة حرارة ٢٥ ± ٢ م° لمدة أسبوعين بعدها تم الترشيح باستخدام ورقة ترشيح (No.1) Whatman بقمع بخنر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء واعيد الترشيح باستخدام المرشح الدقيق ٠.٢٢ μ لتعقيم نواتج الأيض الثانوية من البكتيريا الملوثة وحضرت التخافيف (Singh and Prakash,2010) .

٣-٥-٣ تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في الأطوار اليرقية الاربعة

للبعوضتين *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

استخدمت التخافيف المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (٣-١-٥) حُسبت نسبة ال�لاك يومياً ولمدة ٣ أيام ، وصُحّحت قيم ال�لاك كما في الفقرة انفة الذكر.

٣-٥-٤ تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات بعوضتي

An. stephensi و *Cx. quinquefasciatus*

استعملت التخافيف المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (٣-١-٥) حُسبت نسبة ال�لاك يومياً ولمدة ثلاثة أيام ، وصُحّحت قيم الهلاك بالطريقة نفسها أيضاً.

٣-٦ تأثير بعض العوامل غير الحياتية في كفاءة الفطر *M. anisopliae* في حيواته يرقات

Cx. quinquefasciatus البعوضة

٣-٦-١ درجات الحرارة

وضعت ١٠ يرقات في إناء زجاجي سعة ٢٥٠ مل يحتوي على ١٠٠ مل من المعلق الفطري بتركيز 2×10^6 بوغ/مل لمدة دقيقتين بينما وضعت يرقات معاملة السيطرة في إناء زجاجي يحتوي على ماء مقطر معقم وغذاء فقط نقلت يرقات المعاملة إلى إناء زجاجي جديد يحتوي على ماء مقطر وغذاء اليرقات المعقم (عليقه الفهران) . حُضنت الاواني المعاملة في درجات حرارة (١٠، ١٥، ٢٠، ٣٠، ٣٥) م° وبواقع تلات مكررات لكل درجة حرارة فضلاً عن معاملة سيطرة لكل درجة

حرارة، حُسبت نسبة الهلاك بعد مرور خمسة أيام من الحضانة (Pelizza *et al.*, 2007) وصُحت قيم الـ الهلاك بحسب معادلة Orell (شعبان والملاح، ١٩٩٣).

٦-٢ الأس الهيدروجيني pH

نقلت اليرقات بعد معاملتها كما جرى في الفقرة (٦-٣) إلى أواني زجاجية تحتوي على ماء مقطر معقم وغذاء اليرقات، ونُضمت قيمة الأس الهيدروجيني pH بإضافة محليل NaOH و HCl اللازمة لإعطاء الحموضة المطلوبة وتم قياسها بجهاز pH meter حيث تم الحصول على القيم (١٠،٩،٦،٤) وحضرت الأواني الزجاجية في الحاضنة بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة خمسة أيام وبواقع ثلاث مكررات لكل درجة pH ومكرر لمعاملة السيطرة عند كل درجة pH (Pelizza *et al.*, 2007) حُسبت نسبة الـ الهلاك وصُحت قيم الـ الهلاك كما من سابقا.

٦-٣ الملوحة Salinity

نقلت اليرقات بعد معاملتها كما جرى في الفقرة (٦-٣) إلى أواني زجاجية تحتوي على تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl (ppt) (٠، ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦ ppt) وذلك بإضافة ١ ملغم من الملح المذكور لكل ١ مل ماء مقطر معقم للحصول على تركيز ١ ppt وهكذا لبقية التراكيز، حُضرت ثلاث مكررات لكل تراكيز مع معاملة السيطرة، حُضرت الأواني بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة خمسة أيام مكررات لكل تركيز مع معاملة السيطرة، بعدها حُسبت نسبة الـ الهلاك وصُحت قيم الـ الهلاك كما من سابقا. (Pelizza *et al.*, 2007)

٦-٤ بعض المبيدات الحشرية والفطرية

استعمل كل من المبيدات الحشرية Malathion و Chlorpyrifos والمبيد الفطري Carbendazim بحسب النسبة الموصى بها. حضر الوسط (SDAY) في أربعة دوراق سعة ٢٥٠ مل وعقمت في الموصلة بدرجة حرارة 121°C وضغط ١٥ باوند/انج^٢ وقبل التصلب تم إضافة ١٠ مل من التراكيز الموصى بها للمبيدات إلى الوسط كلاً على انفراد. وزع الوسط في أطباق بتري بقطر ٩ سم بمعدل ٢٠ مل للطبق، بعدها لُقت بآفراص قطر كل منها ٥،٥ سم من مستعمرة الفطر باستخدام ثاقب الفلين المعقم وبمعدل ثلاث مكررات لكل مبيد، حُضرت أطباق المعاملة والسيطرة التي تركت بدون إضافة المبيد في درجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة سبعة أيام (Li and Holdom, 1994) بعدها حُسبت النسبة المئوية للتثبيط بحسب المعادلة الآتية :

$$\% \text{ للتباطط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في السيطرة} - \text{معدل نمو الفطر في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في السيطرة}} \times 100$$

جدول (١-٣) بيانات أساسية عن المبيدات حسب ما هو مثبت على سطح العبوة

الشركة المصنعة	الجرعة الموصى بها	LD50 ملغم/كغم	الاسم الكيميائي	الاسم التجاري	المادة الفعالة
Anpon	١ مل/لتر	٢٠٠٠	Methyl-benzimidazol-2-ylarbamate	Goldazim	%٤٠ Carbendazim
Aimco	١,٢٥ غم/لتر	١٤٠٠	(dimethoxy phosphinothioyl Thio] butanedioate	Fidothion	%٥٠ Malathion
Cheminova	٢,٥ مل/لتر	٢٠٠٠	o,o -dithyl-o-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate	Cyren	%٥٠ Chlorpyrifos

٧-٣: التحليل الإحصائي :

تم تحليل البيانات وفق تصميم التجربة العاملية Completely Randomized Design(CRD) وصحت النسبة المئوية للهلاك على وفق معادلة Orell and Shneider (شعبان والملاح، ١٩٩٣) واستعمل اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) في تشخيص الفروق الإحصائية بين المعاملات (الراوي وخليف الله، ٢٠٠٠). حسب قيمة LC₅₀ وLC₉₀ باستعمال برنامج Probit analysis بحسب طريقة (Finney, 1971). تم قياس استعداد يرقات وبالغات كلا النوعين لمعقلات الفطر ونواتج الايض الثانوية الخام للفطر وذلك من خلال جمع نسب الهلاك للتراكيز المستخدمة عند مدة التعرض الأخيرة ثم يؤخذ المعدل الذي يمثل استعداد يرقات وبالغات كلا النوعين لمعقلات ونواتج الايض الثانوية الخام للفطر (الخفاجي، ٢٠١٠)

النتائج والمناقشة

٤-١ عزل وتشخيص ووصف الفطر *M. anisopliae*

لقد تم في البحث الحالي عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات بعض *Cx. quinquefasciatus* (Balarman *et al.*, 1979) لأول مرة في العراق. عُزل هذا الفطر سابقاً من يرقات *Cx. fatigans* (De Andrade, 1993) ويرقات *Cx. quinquefasciatus* (WHO, 1980) ومن رتبة متشابهة الاجنة Order: Homoptera Wilson *et al.*, (1990) وأشار (Daoust *et al.*, 1982) ومن يرقات *Cx. pipiens* أن مابين ٣٤% و ١٠٠% من بالغات *Ae. aegypti* المعرضة لأبوااغ هذا الفطر تضع بيوضاً ينتج منها يرقات مصابة بهذا الفطر . وعزل ايضاً من يرقات *Ae. triseriatus* (De Andrade, 1993).

٤-٢ الاختبار الحيواني لمختلف تراكيز معلق الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة بعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi*

٤-٢-١ الاختبار الحيواني في البيوض

يتبيّن من الجدول (٤-١) نتائج تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في نسب هلاك بيوض بعوضتي *An.stephensi* و *Cx.quinquefasciatus*, إذ بلغت أعلاها ٦٠,٣٣% و ٥٨,٦٦% عند التركيز 2×10^1 بوغ/مل لكلا النوعين على التوالي. بينما سُجلت أعلاها ٢٨% و ٢٦% عند التركيز 2×10^2 بوغ/مل وبالترتيب السابق نفسه . و يُشير إلى وجود علاقة طردية بين كل من التركيز ونسبة الهلاك . وكان تأثير جميع تراكيز المعلقات الفطرية متشابهاً في كلا النوعين . وهذا يتضح جلياً في قيم LC_{50} إذ كانت $2 \times 10^{4.3}$ و $2 \times 10^{4.6}$ للنوعين على التوالي. وهذا ما أكدته التحليلات الإحصائية . تقارب هذه النتائج مع ما وجده (Weibin and Mingyuang 2004) عند معاملته بيوض حلم العنكبوت *Paecilomyces cinnabarinus* بأبوااغ الفطرين *Tetranychus bassiana* و *B. bassiana* حيث أدى إلى هلاكها بنسبة $12,5 \pm 64,6\%$. وان تعريض بيوض *Cx.pipiens fumosoroms* لآبوااغ الفطر المذكور أعلاه أدى إلى هلاكها جمِيعاً (علي, ٢٠٠٧). كما اشار Santos *et al.* (٢٠٠٧) إلى أن نسبة فقس بيوض بعوضة *Aedes aegypti* المعرضة لأبوااغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز $2 \times 10^{2,8}$ بوغ /مل أدى إلى اختزال نسبة الفقس إلى ٥٠% عند درجة رطوبة ٩٨%. وأكد الأمارة (٢٠٠٩) إلى أن الفطر المشار إليه أدى إلى خفض نسبة فقس بيوض الخابرا *Trogoderma granarium* إلى ٦٧,٦٧% و ٤٨,٣٣% عند التركيزين 2×10^6 و 2×10^8 بوغ/مل . وهذا على خلاف مع ما أكد (Clark *et al.*, 1968) أن فقس بيوض *Cx. pipiens* لا يتتأثر عند تعريضها لأبوااغ الفطر *B. bassiana*.

جدول (٤-١) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* و *An. stephensi* في بيوض بعوضي *Cx. quinquefasciatus*

النسبة المئوية للهلاك		عدد البيوض المعاملة		التركيز (بوج / مل)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>An. stephensi</i>	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>An. stephensi</i>	
٢٦.٠٠	٢٨,٠٠	١١٦	١٠٠	٢١٠×٢
٣٦.٣٣	٤٠,٠٠	١٢٧	١٠٠	٣١٠×٢
٤٦.٠٠	٤٩,٦٦	١٣٠	١٠٠	٤١٠×٢
٥٨,٦٦	٦٠,٣٣	١٢٣	١٠٠	٥١٠×٢
٠٠,٠٠	٠٠,٠٠	١٣٠	١٠٠	Control

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية ٥٪، للتراكيز = N.S.

جدول (٤-٢) قيم التركيز اللازم لhalak نصف العدد (LC₅₀) لمعلقات الفطر ضد بيوض بعوضي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

Slope	LC ₅₀	النوع
٠,٢	٤,٣١٠×٢	<i>An. stephensi</i>
٠,٢	٤,٦١٠×٢	<i>Cx. quinquefasciatus</i>

الحيوي للأطوار

٤-٢-٢ الاختبار

اليرقية الاربعة

يتبيّن من الجدول (٣-٤) تأثير تراكيز مختلفة لمعلقات الفطر قيد البحث في يرقات بعوضي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* إذ كانت أعلى نسبة هلاك عند التركيز ٢٠×٢ بوغ/مل والتي بلغت ١٠٠٪ و ٩٣,٣٣٪ ليرقات الطور الأول ولكلتا النوعين على التوالي بينما سُجلت أوّلًا نسبة هلاك ٦٠٪ عند التركيز ٢×١٠^٢ بوغ/مل ولكلتا النوعين وعلى الترتيب نفسه ، بينما خلت معاملة السيطرة من الهلاكات . وبما يؤكّد وجود فروقات معنوية وعلى مستوى ٥٪ للتراكيز كافية، فضلًا على العلاقة الطردية بين التركيز ونسب الهلاك ومن جانب آخر فإن مثل هذه العلاقة بدا واضحةً بين كل من مدد التعريض ونسبة الهلاك أيضًا فمثلاً كانت نسبة الهلاك ٥٠٪ و ٤٦,٦٦٪ ليرقات الطور الأول ولكلتا النوعين وبحسب الترتيب عند التركيز ٢×١٠^٢ بوغ/مل بعد ٢٤ ساعة من المعاملة بينما ازدادت إلى ١٠٠٪ و ٩٣,٣٣٪ بعد ١٢٠ ساعة . كما تشير النتائج إلى اختلاف استعداد الأطوار اليرقية لمختلف تراكيز المعلق البوغي، إذ كان الطور الأول أشدّها استعداداً مقارنةً مع بقية الأطوار(شكل ٤-١). كما أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين النوعين . ولقياس ضراوة فطر المقاومة الجرثومية(virulence) حُسبت قيم LC₅₀ و LC₉₀ اللذان يمثلان القيمة الأساسية في طرائق الاختبار الحيوي (Papierok and Hajek, 1997). حيث يلاحظ الزيادة التدريجية في قيمها مع تقدّم عمر الطور ولكلتا النوعين واختلاف قيمها لكل من الأطوار باختلاف النوعين (جدول ٤-٤). ثقارب النتائج الحالية مع ما حصل عليه Roberts (1970) حيث حصل على نسبة هلاك ١٠٠٪ ليرقات *An. gambiae* عند تعريضها لأبوااغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.02 mg بعد مرور أربعة أيام .

و هلكت جميع يرقات الطور

الثاني لبعوض *An. albimanus* عند معاملتها بهذا الفطر (Ramoska *et al.*, 1981) , وان عزلات *M. anisopliae* الأكثر أمراضية ليرقات بعوض *Cx. pipiens pipiens* أدت إلى هلاكها بنسبة ١٠٠% خلال خمسة أيام(Daoust and Roberts, 1982) وأوضح DeAndrade(1993) أن تعریض يرقات الطور الثاني لبعوض *An.walkeri* لأبوااغ هذا الفطر , أدى إلى هلاك اليرقات جميعاً بعد مرور أربعة أيام , قد يعود السبب في هلاك اليرقات في عدة أيام هو نتيجة لاستنبات الأبوااغ واختراق الخيوط الفطرية من خلال الفتحات التنفسية والذي يُسبب اختناق اليرقات نتيجة لإغلاق الفتحات التنفسية بالإضافة لنمو الفطر في القناة الوسطى لليرقات واستنزاف المواد الغذائية لليرقات وبالتالي موت اليرقات في أيام . كما أن بعض اليرقات المعاملة تموت خلال الانسلاخ , إذ تفشل في انسلاخ السيفون وتبقى ملتصقة بالطبقات المنسلحة (Roberts, 1970; Ravallec *et al.*, 1989) وأضاف Lacey *et al.*, (1988) أن ابتلاع اليرقات للأبوااغ يتبعه إفراز سموم من الفطر والذي يؤدي إلى تسمم الدم ونتيجة لذلك يؤدي إلى موت اليرقات خلال ٢٤ ساعة .

تنقق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره كل من الجبوري (٢٠٠٧) والأمارة (٢٠٠٩) حيث وصفا العلاقة ما بين تركيز الأبوااغ ونسبة الهراء بأنها طردية حيث كلما ازداد تركيز العالق البوغي للفطر ارتفع معدل هلاك الحشرة , وقد يعود السبب في ذلك إلى زيادة عدد الأبوااغ (الوحدات الأساسية للإصابة الفطرية) فضلاً عن أن الجهاز المناعي لليرقات يستطيع الدفاع عن الجسم فقط عند التراكيز الواطنة وعند زيادة التركيز يفقد الجهاز المناعي كفاعته (Scholte *et al.*, 2003a) ان تعریض يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinquefasciatus* لأبوااغ الفطر *B. bassiana* أدى إلى هلاكها بنسبة ١٠٠% بتركيز 10^7 بوغ/مل بعد مرور خمسة أيام (Gayathri *et al.*, 2010) .

أما بخصوص حساسية الأطوار اليرقية فقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه Balaraman *et al.*, (1979) عندما وصف العلاقة بين الأطوار اليرقية لبعوض *An. stephensi* ونسبة الهراء حيث وجد أن نسبة الهراء تقل كلما تقدم عمر الطور , وأضاف أن نسبة هلاك يرقات الطور الأول بلغت ١٠٠% يليه الطور الثاني بنسبة ٨٩% والثالث بنسبة ٧٣% والرابع بنسبة ٧١% عند معاملتها بالعالق الفطري للفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.033 mg تتفق النتائج الحالية مع ما توصل إليه (Bukhari *et al.*, 2010) من ان يرقات الطور الأول والثاني للنوعين *An. gambiae* و *An. stephensi* تكون أكثر حساسية للأبوااغ الفطر *M. anisopliae* من يرقات الطور الثالث والرابع , ويُعلل هلاك يرقات الطور الأول و الثاني بسبب رقة الكيتوكل بعد الانسلاخ مما يجعلها أكثر عرضة للإصابة الفطرية بالمقارنة مع يرقات الطور الثالث والرابع التي تكون

ذات كيوبتوكل متاخن وبالتالي أقل عرضة للإصابة الفطرية (Sandhu *et al.*, 1993; Lord and Fukuda, 1990).

جدول (٤-٤) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* في يرقات بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

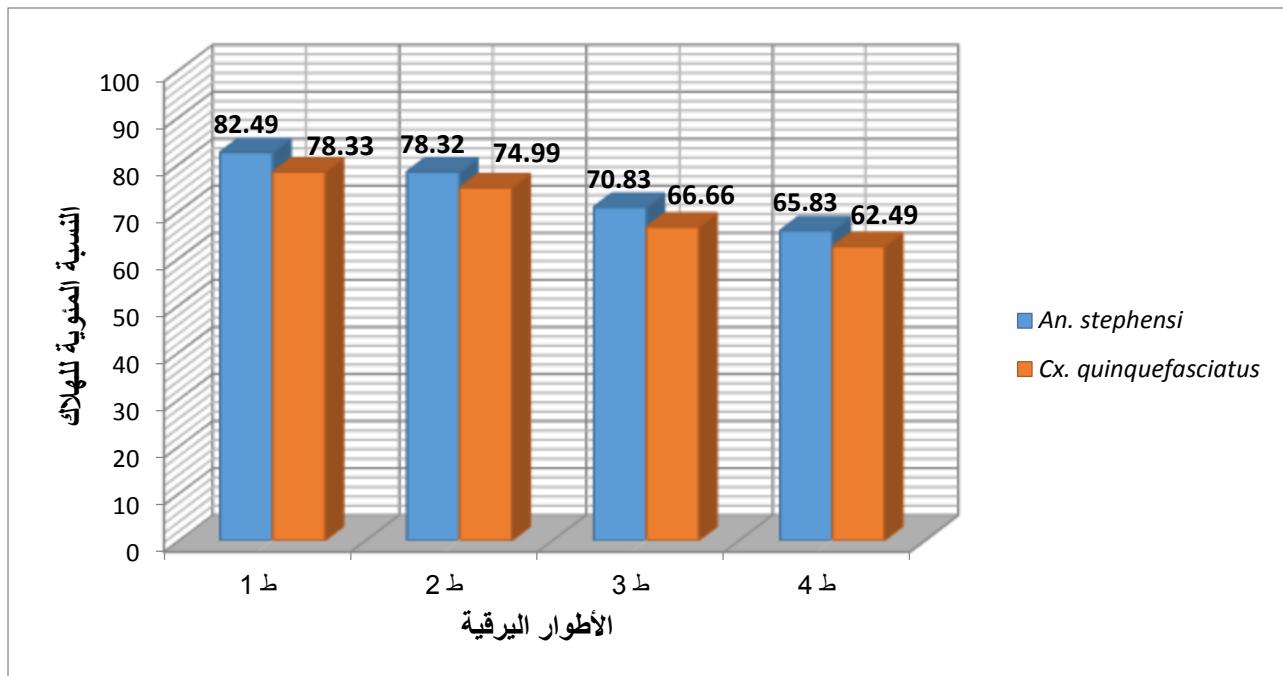
النسبة المئوية للهلاك بعد (ساعة)						التركيز (بوج/مل)	الطور
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			<i>An. stephensi</i>				
١٢٠	٧٢	٢٤	١٢٠	٧٢	٢٤		
٦٠,٠٠	٣٦,٦٦	١٦,٦٦	٦٠,٠٠	٣٦,٦٦	١٦,٦٦	٢١٠×٢	الأول
٧٣,٣٣	٤٣,٣٣	٢٣,٣٣	٧٦,٦٦	٤٦,٦٦	٢٠,٠٠	٣١٠×٢	
٨٦,٦٦	٥٦,٦٦	٣٣,٣٣	٩٣,٣٣	٥٦,٦٦	٣٦,٦٦	٤١٠×٢	
٩٣,٣٣	٦٦,٦٦	٤٦,٦٦	١٠٠,٠٠	٧٦,٦٦	٥٠,٠٠	٥١٠×٢	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٥٦,٦٦	٣٦,٦٦	١٣,٣٣	٥٦,٦٦	٣٣,٣٣	١٣,٣٣	٢١٠×٢	
٧٣,٣٣	٤٠,٠٠	٢٠,٠٠	٧٣,٣٣	٤٦,٦٦	٢٠,٠٠	٣١٠×٢	
٨٠,٠٠	٥٦,٦٦	٣٠,٠٠	٨٦,٦٦	٦٠,٠٠	٣٢,٣٣	٤١٠×٢	
٩٠,٠٠	٦٦,٦٦	٤٠,٠٠	٩٦,٦٦	٧٦,٦٦	٤٣,٣٣	٥١٠×٢	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٤٦,٦٦	٣٠,٠٠	١٠,٠٠	٥٠,٠٠	٣٠,٠٠	١٠,٠٠	٢١٠×٢	الثاني
٦٠,٠٠	٣٣,٣٣	٢٠,٠٠	٦٦,٦٦	٣٦,٦٦	١٦,٦٦	٣١٠×٢	
٧٣,٣٣	٤٦,٦٦	٣٠,٠٠	٧٦,٦٦	٥٣,٣٣	٣٠,٠٠	٤١٠×٢	
٨٦,٦٦	٥٦,٦٦	٣٦,٦٦	٩٠,٠٠	٦٦,٦٦	٤٠,٠٠	٥١٠×٢	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٤٣,٣٣	٣٠,٠٠	١٠,٠٠	٤٣,٣٣	٢٦,٦٦	١٠,٠٠	٢١٠×٢	
٥٦,٦٦	٣٣,٣٣	١٦,٦٦	٦٠,٠٠	٣٦,٣٣	١٣,٣٣	٣١٠×٢	
٧٠,٠٠	٤٦,٦٦	٣٠,٠٠	٧٣,٣٣	٥٠,٠٠	٣٠,٠٠	٤١٠×٢	
٨٠,٠٠	٥٣,٣٣	٣٣,٣٣	٨٦,٦٦	٦٣,٣٣	٣٦,٦٦	٥١٠×٢	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	

- قيمة L.S.D تحت مستوى معنوي ٠٠٥ ، لنوعين = ١,١٧ ، للأطوار = ١,٦٦ ، للتركيز = ١,٦٦ ، للزمن = ١,٧ -

جدول (٤-٤) قيم LC₅₀ و LC₉₀ لمعلق الفطر *M. anisopliae* ضد الأطوار اليرقية الأربع لبعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* بعد ١٢٠ ساعة من المعاملة

Slope	LC ₉₀	LC ₅₀	الطور اليرقي	النوع
٠,٦	٤,٧١٠×٢	١,٨١٠×٢	الأول	<i>An. stephensi</i>
٠,٤	٥,١١٠×٢	١,٩١٠×٢	الثاني	
٠,٤	٥,٢١٠×٢	٢,٣١٠×٢	الثالث	

٠,٤	$٥,٣١٠ \times ٢$	$٢,٧١٠ \times ٢$	الرابع	
٠,٤	$٥,١١٠ \times ٢$	$١,٩١٠ \times ٢$	الاول	
٠,٣	$٥,٢١٠ \times ٢$	٢١٠×٢	الثاني	
٠,٣	$٥,٣١٠ \times ٢$	$٢,٦١٠ \times ٢$	الثالث	
٠,٣	$٥,٤١٠ \times ٢$	$٢,٨١٠ \times ٢$	الرابع	<i>Cx. quinquefasciatus</i>



شكل(٤) استعداد الأطوار البرقية الأربع لعالق الفطر *M. anisopliae*
٤١ = الطور البرقي الاول , ٤٢ = الطور البرقي الثاني, ٤٣ = الطور البرقي الثالث, ٤٤ = الطور البرقي الرابع

٤-٣-٣ الاختبار الحيوي في دور العذراء

توضح النتائج في الجدول (٤-٥) إلى تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في عذاري كل من بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*. حيث سجلت أعلى نسبة هلاك عند الترکیز ٢×١٠^٥ بوغ/مل وبفارق معنوي بين النوعين والتي بلغت ٥٠% لعذاري الانوفيليس و ٤٦,٦٦% لعذاري الكيولكس بينما تساوت نسبة الهلاك لكلا النوعين في الترکیز ٢×١٠^٢ بوغ /مل والتي بلغت ٣٠%. وانعدمت الهلاكات في معاملة السيطرة ، ويسُتدل من هذه النتائج وجود علاقة طردية بين التراكيز ونسب الهلاك من جهة ومدد التعريض من جهة أخرى. إذ كانت نسبة الهلاك عند الترکیز ٢×١٠^٥ بوغ/مل ٣٣,٣٣% و ٣٠% بعد مرور ٤٢ ساعة من المعاملة لكلا النوعين على التوالي بينما ازدادت إلى ٥٠% و ٤٦,٦٦% بعد ٧٢ ساعة من المعاملة وبحسب الترتيب ذاته . يبيّن الجدول (٤-٦) قيم الترکیز اللازم لهلاك نصف العدد من عذاري كلا النوعين . دعمت هذه النتائج إحصائياً من خلال الفروقات المعنوية بين المعاملات . كما يبيّن التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين النوعين في ماعدا عند الترکیز

٢١٠×٢ حيث لم يظهر كلا النوعين فروق معنوية فيما بينهما. اتفقت النتائج الحالية مع ما توصل إليه *B. nigromaculilis* (Clark et al., 1968) عندما عرض عذارى بعوضة *An. nigromaculilis* لأبوااغ الفطر وأدى إلى هلاكها بنسبة ٤٠% ، في حين بلغت نسبة بزوج البالغات ٥٨% عند التركيز ٣.٥×١٠٩ بوغ/مل . وأشار (Angel-Sahagun et al., 2005) إلى أن تعريض عذارى ذبابة القرن *P. bassiana* إلى ثلاثة أنواع من الفطريات *Haematobia irritans* و *M. anisopliae* و *B. bassiana* سبب هلاكها بنسبة انحصرت بين (٥٠% - ٧١،٣%) وبلغت نسبة هلاك عذارى *fumosoroseus* بعوض *Cx. pipiens pipiens* ٣٠% عند تعريضها لأبوااغ الفطر *B. bassiana* بتركيز ١٠٤ بوغ /مل (علي, ٢٠٠٧) ، وحصل المشهدانى (٢٠١٠) على نسبة قتل لعذارى الذبابة المنزلية *Musca domestica* بلغت ٦٦،٦% عند تعريضها لأبوااغ الفطر *E. muscae* بتركيز ٥×١٠٥ بوغ /مل ، ويعود السبب الى تدني نسبة هلاك عذارى البعوض الى أنها تتطلب مدة اقصر لكي تتحول إلى بالغة أي تستطيع الإفلات من الفطر كما أن كيوتكل العذارى أكثر صلابة من الأطوار اليرقية الأربع . (Nuakumusana, 1985)

جدول (٤-٥) تأثير تراكيز مختلفة من العالق الفطري في دور العذراء لبعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

النسبة المئوية للهلاك بعد (ساعة)						التركيز (بوغ / مل)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			<i>An. stephensi</i>			
٧٢	٤٨	٢٤	٧٢	٤٨	٢٤	
٣٠,٠٠	٢٦,٦٦	١٦,٦٦	٣٠,٠٠	٢٦,٦٦	١٦,٦٦	٢١٠×٢
٤٠,٠٠	٣٣,٣٣	٢٣,٣٣	٤٣,٣٣	٣٦,٦٦	٢٦,٦٦	٢١٠×٢
٤٣,٣٣	٣٦,٦٦	٣٣,٣٣	٤٦,٦٦	٤٠,٠٠	٣٠,٠٠	٤١٠×٢
٤٦,٦٦	٤٠,٠٠	٣٠,٠٠	٥٠,٠٠	٤٦,٦٦	٣٣,٣٣	٥١٠×٢
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية ٠٠٥ للنوتين = ٢،٨ ، للتراكيز = ٢،٠ ، للزمن = ٢،٥

جدول (٤-٦) قيم LC₅₀ لعالق الفطر في عذارى بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

Slope	LC ₅₀	النوع
٠،١٦	٥،٠٢١٠×٢	<i>An. stephensi</i>
٠،١٣	٥،٧١٠×٢	<i>Cx. quinquefasciatus</i>

٤-٢-٤ الاختبار الحيوى فى البالغات

يشير الجدول (٤-٧) إلى تأثير تراكيز مختلفة من العالق الفطري في بالغات بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* حيث دلت النتائج أن أعلى نسبة هلاك سُجلت عند التركيز ٢×١٠٥ بوغ /مل لكل من الذكور والإناث ولكل النوعين ، فمثلاً كانت نسبة هلاك ذكور بعوض *An. stephensi*

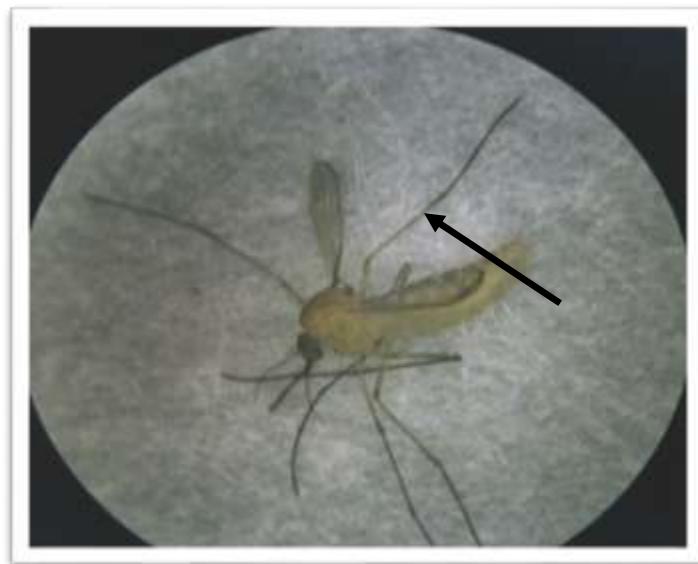
stephensi ١٠٠% وإناث ٩٦,٦٦% بعد مرور ١٦٨ ساعة , بينما بلغت نسبة هلاك ذكور بعوض النوع الثاني ٩٣.٣٣% وإناث ٩٠%

في المدة ذاتها , في حين كانت أوطأً نسبة هلاك عند التركيز 2×10^2 بوج / مل وعلى سبيل المثال كانت نسبة هلاك ذكور وإناث بعوض النوع الأول ٦٦,٦٦% و ٥٦,٦٦% على التوالي بالموازنة مع نسب هلاك ذكور

إناث بعوض النوع الثاني والتي بلغت ٥٦,٦٦% و ٥٠% في المدة نفسها ولم تُسجل هلاكات في معاملة السيطرة . وفضلاً عن ذلك يُستنتج من الجدول أعلاه أن العلاقة بين تراكيز المعلق الفطري وكل من نسب الهلاك

ومدة التعريض كانت طردية , حيث ازدادت الهلاكات ولجميع البالغات مع زيادة مدة التعريض . أما بخصوص حساسية جنس الحشرة ولكل نوع من البعوض ففيوضح الشكل (٤-٣) أن ذكور وإناث بعوض *An. stephensi* كانت أكثر حساسية للإصابة , إذ بلغت نسبة الهلاك (٩٠%, ٨٦,٦٦%) على التوالي بعد ١٦٨ ساعة وعند التركيز 2×10^4 بوج / مل بالمقارنة مع بعوض *Cx. quinquefasciatus* والتي سجلت نسبة هلاك (٨٠%, ٨٦,٦٦%) على الترتيب ذاته . وتعزز النتائج أعلاه قيم LC₅₀ و LC₉₀ لمعلق الفطر في جنس النوعين (جدول ٨-٤) . وأكدت هذه النتائج من خلال التحليلات الإحصائية للمعاملات تشابه النتائج الحالية لما وجده (Clark et al., 1968) عندما عرض بالغات *Cx. tarsalis* و *B. bassiana* لأنواع الفطر *An. albimanus* , *Oc. sierrensis* , *Ae. aegypti* و *Cx. pipiens* حيث أدى إلى هلاكها جميعاً خلال خمسة أيام . وأشار (Scholte et al., 2003b) ان قيمة LT₅₀ (الזמן اللازم لهلاك نصف العدد من الحشرات) تساوي ٣,٥ يوم عند تعريض بالغات *An. gambiae* لأنواع الفطر *B. bassiana* , وتساوي مثل تلك القيمة ٤,١ يوم لإناث بعوض *Ae. aegypti* عند تعريضها للفطر *M. anisopliae* M. anisopliae بتركيز $10^{10} \times 1.6$ بوج/مل (Scholte et al., 2007) في حين بلغت القيمة المذكورة وللبعوض نفسها ٤,٤ يوم عند تعريضها لأنواع الفطر المذكور (Leles et al., 2010) . وتنسجم النتائج الحالية في إطارها العام مع بعض الأبحاث حول تأثير أنواع أخرى من الفطريات في بالغات البعوض حيث ذكر (Soares 1982) أن تعريض بالغات بعوض *Oc. sierrensis* لعالق الفطر *T. cylindrosporum* بتركيز 5×10^6 بوج / مل يؤدي إلى هلاك ٥٠% من البالغات بعد خمسة أيام و ١٠٠% بعد تسعه أيام من المعاملة . وان استخدام الفطر *Fusarium pallidorosum* ضد إناث *Cx. quinquefasciatus* يؤدي إلى هلاكها جميعاً خلال أربعة أيام (Mohanty et al., 2008) . وفيما يتعلق بحساسية ذكور وإناث بالغات البعوض لأنواع الفطر ، فقد جاءت نتائج الدراسة مشابهة لما وجده (Scholte et al., 2003a) عندما استخدم الفطر قيد الدراسة بتركيز 1.6×10^8 بوج / مل ضد ذكور وإناث *An. gambiae* مما أدى إلى هلاكها جميعاً خلال سبعة أيام , كما أوضح أيضاً أن هلاك بالغات

بلغت ١٠٠% بعد مرور ستة أيام للذكور وسبعة أيام للإناث . أشار *Cx. quinquefasciatus* *An.* (2009) Mnyone *et al.* أن الفطر المذكور من سلالة IP46 يُصيب ذكور وإناث النوعين *An. arabiensis* و *An. gambiae* حيث وجد أن ذكور كلا النوعين تكون أكثر تأثيراً بالإصابة الفطرية من الإناث . وفيما يخص أنواعا أخرى من الحشرات الطبية، فقد وجد (1989) Kaaya ان ذكور ذبابة التسي تسبي *G. morsitans morsitans* و *M. anisopliae* أكثر حساسية للإصابة بالفطريين *B.bassiana* Maniania and Odulaja (1998) مع الذبابة المذكورة عند تعريضها لأبوااغ الفطر قيد الدراسة ، حيث أكد ان الإناث تكون أكثر حساسية للإصابة بالفطر من الذكور ، حيث كانت نسبة هلاكها ٩٨% للإناث و ٨٩,٦% للذكور .



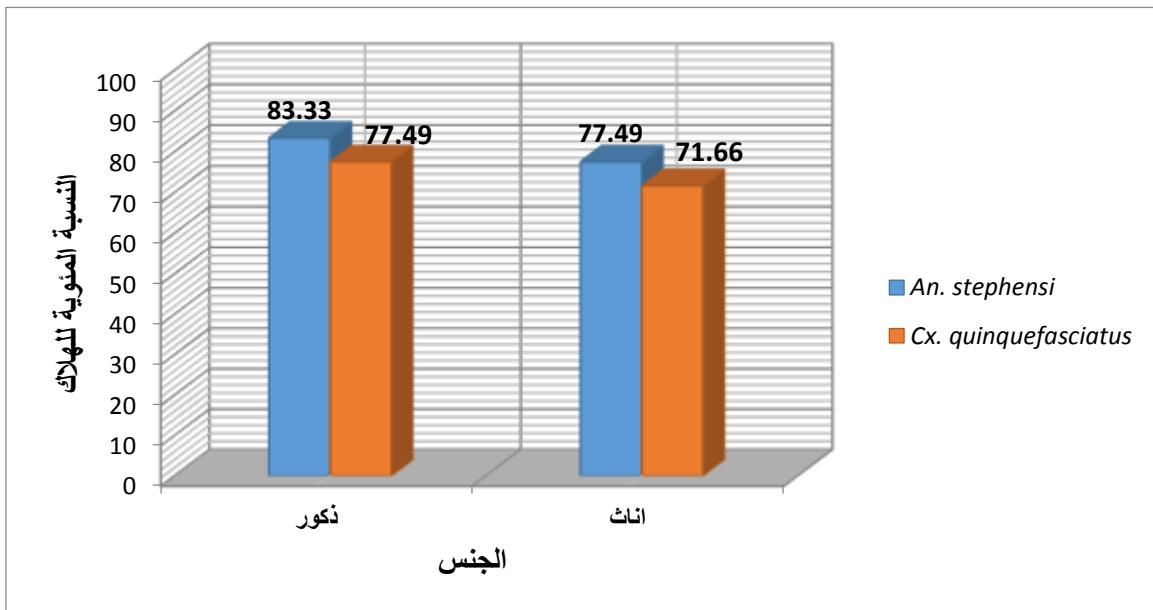
صورة (٤ - ٢)

المصابة بالفطر

Cx. بالغة
quinquefasciatus
M. anisopliae
جدول (٤-٤) قيم

و *An. stephensi* لمعق الفطر في ذكور وإناث بعوضتي LC_{90} و LC_{50} بعد ١٦٨ ساعة من المعاملة.

Slope	LC_{90}	LC_{50}	الجنس	النوع
٠,٥	$٤,٧١٠ \times ٢$	$١,٧١٠ \times ٢$	ذكور	<i>An. stephensi</i>
٠,٥	$\times ٢$ $٥,٠٦١٠$	$٢,١١٠ \times ٢$	إناث	
٠,٤	$\times ٢$ $٥,١٧١٠$	$١,٩١٠ \times ٢$	ذكور	<i>Cx. quinquefasciatus</i>
٠,٤	$\times ٢$ $٥,٢٧١٠$	$٢,٣١٠ \times ٢$	إناث	



شكل

(٣-٤) استعداد ذكور وإناث *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* لترابيز معلقات الفطر *M. anisopliae*

٤-٣-١ تأثير نواتج الايض الثانوية الخام للفطر *M.anisopliae* في الأطوار اليرقية الأربع للبعوضتين *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi*

يوضح الجدول (٤-٩) تأثير تخافيف مختلفة من نواتج الايض الثانوية في الأطوار اليرقية الأربع لكلا بعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* حيث سبب التخافيف ١٠٠٪ أقصى نسبة هلاك في يرقات الطور الأول والتي بلغت ١٠٠٪ ليرقات الانوفليس و ٩٦,٦٦٪ ليرقات الكيوليكس بعد ٧٢ ساعة , بينما سجل التخافيف ٢٥٪ أو طأنة نسبة هلاك بلغت ٦٦,٦٦٪ و ٦٠٪ ليرقات النوعين المذكورين وعلى الترتيب في المدة نفسها وانعدمت الهلاكات في معاملة السيطرة . وبما يوضح وجود علاقة طردية بين التخافيف ونسبة الهلاك . ويُشير التحليل الإحصائي إلى وجود فروقات معنوية بين مدد التعريض فمثلاً كانت نسبة هلاك يرقات الطور الأول للانوفليس ٧٦,٦٦٪ بعد ٢٤ ساعة من المعاملة وارتفعت إلى (٩٠٪ و ١٠٠٪) بعد ٤٨ و ٧٢ ساعة من المعاملة على التوالي . وتشير النتائج إلى اختلاف استعداد الأطوار اليرقية لتراكيز النواتج الايضية الثانوية الخام للفطر , إذ كان الطور الأول أكثرها استعداداً لجميع التراكيز ولكل النوعين بينما أبدى الطور الرابع مقاومة ملحوظة للتراكيز المستخدمة جميعاً (شكل ٤-٤) . وعززت النتائج المذكورة بقيم LC₅₀ و LC₉₀ لنواتج الايض الثانوية الخام للفطر في أطوار النوعين كافة (جدول ٤-١٠) .

تنقق النتائج الحالية مع ما توصل إليه Matha *et al.*, (1988) عندما استخدم المستخلص الخام لمركب (Tolypocladium niveum) المنتج من فطر *Tolypocladium niveum* بتركيز ١,٠ ملغم / مل ضد يرقات كل من *An. maculipennis* , *Ae. aegypti* و *Cx. pipiens* إذ أدى إلى هلاكها جميعاً . وفي اختبار فعالية نواتج الايض لـ ١٧ نوعاً من الفطريات ضد الطور الثالث ليرقات *An. stephensi* حددت قيمة LC₅₀ بين 7-83 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (Vijayan and Balaraman, 1991) . وأشار Priyanka and Prakash (2001) إلى ان يرقات الطور الأول لبعوض *An.stephensi* كانت أكثر حساسية عند معاملتها بنواتج الايض الثانوية للفطر *Chrysosporium tropicum* حيث بلغت قيمة LC₅₀ حوالي 38.9 $\mu\text{l}/\text{ml}$ بالمقارنة مع يرقات الطور الرابع 122 $\mu\text{l}/\text{ml}$.. وأكد Vyas *et al.* (2006) أن نواتج الايض الثانوية للفطر *L. giganteum* كانت أكثر تأثيراً على الأطوار اليرقية الثلاثة لبعوض *An. stephensi* في حين كانت أقل تأثيراً على يرقات الطور الرابع . وذكر Quesada-moraga *et al.*, (2006) أن خلط ١,٨ ملغم من المستخلص الخام للفطر *M. anisopliae* مع ١ غم من الغذاء يؤدي إلى هلاك يرقات الطور الثاني لحشرة *Spodoptera littoralis* بنسبة ٨٥,٥٪ بعد سبعة أيام من التغذية . وأشار Vyas *et al.* (2007) إلى أن استخدام نواتج الايض الثانوية لفطر *L. giganteum* على يرقات الطور الأول أدى إلى هلاكها جميعاً بعد ٢٤ ساعة وبالتركيز 2.17 ppm . وتعارض النتائج الحالية مع ما توصل إليه Mohanty and prakash

(2004) من أن يرقات *Cx. quinquefasciatus* تكون أكثر تأثيراً بنواتج الإيض الثانوية للفطر 25.474 $\mu\text{l/ml}$ من يرقات *An. stephensi*, بالاعتماد على قيمة LC_{50} كانت *Trichophyton ajelloi*

ليرقات الطور الأول للأنوفليس و $16.25 \mu\text{l/ml}$ للكيوليكس. بينما كانت قيمة LC_{50} في الدراسة الحالية هي $18,9 \text{ مل/}100 \text{ مل ماء مقطر ليرقات الطور الأول للأنوفليس و } 20,02 \text{ ليرقات الطور الأول للكيوليكس . وتقارب النتائج الحالية مع ما توصل إليه Mohanty et al.,(2008)}$ عندما وجد أن قيمة LC_{50} كانت $15.42 \mu\text{l/ml}$ ليرقات الطور الأول للـ *An. stephensi* مقارنةً مع $28.14 \mu\text{l/ml}$ ليرقات الطور الأول لبعوض *Cx. quinquefasciatus* عند معاملتها بنواتج الإيض الثانوية للفطر. *M. anisopliae* من سلالة ٣٢١٠ واستنتج من ذلك أن يرقات الأنوفليس تكون أكثر حساسية من يرقات الكيوليكس. وتبين أن يرقات *An. stephensi* كانت أكثر حساسية لنواتج الإيض الثانوية الخام للفطر *B. bassiana* من يرقات *Cx. quinquefasciatus* Singh and parkash (2010) ذكرت السلامي (٢٠١٠) أن معدلات نسب هلاك الطور اليرقي الأول والثاني والثالث والرابع لدعسوقة *Coccinella undecimpunctata* في أعلى مدة زمنية ٩٦ ساعة بلغت ٩٠,٠٠ و ٢٦,٢٣ و ٢٦,٥٦ و ٠٠,٠٠ % على التوالي في أعلى تركيز ١٠٠ %. ومن المعروف أن الكثير من الفطريات الممرضة للحشرات تمتلك مدى واسع من المضائق وتسبب الموت السريع لمضائقها ويعود ذلك لامتلاكها نواتج ثانوية حيوية تأخذ دوراً مهماً في أمراضية الفطريات للحشرات المستهدفة, إذ تميز النواتج الإيضية الثانوية بقابليتها على التداخل مع الجهاز المناعي وتغيرات في سلوك المضيف مثل اختزال النشاط و شلل الحشرة واحتزاز التغذية وتغيرات في تراكيب الأنسجة وبالتالي الموت السريع للمضيف (Charnley, 2003).

جدول (٤-٩) تأثير تخافيف مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في الاطوار اليرقية
الاربعة للبعوضتين *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi*

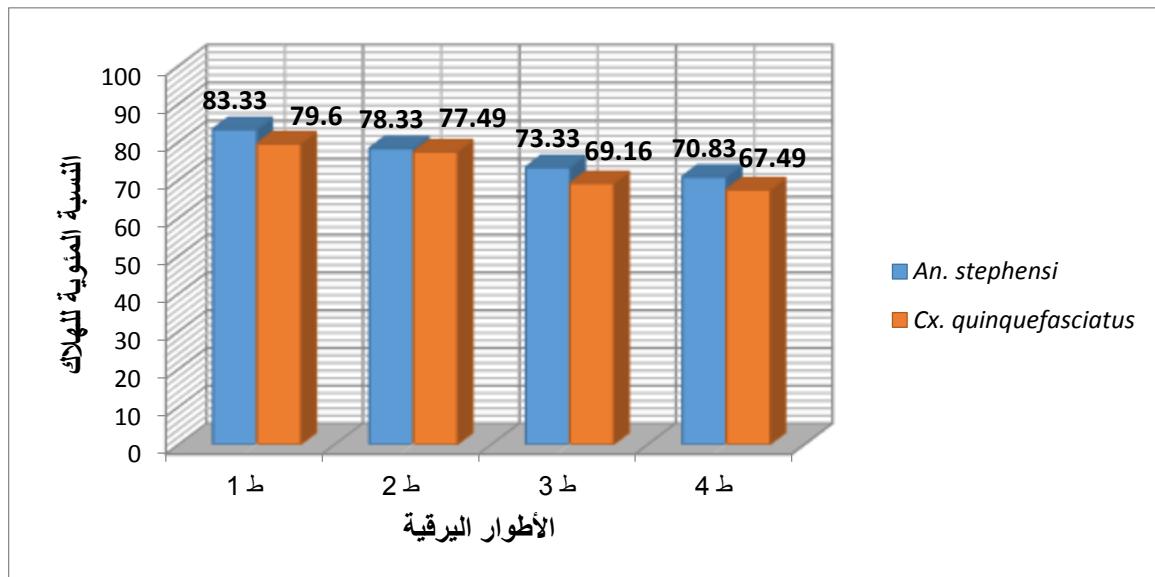
النسبة المئوية للهلاك بعد (ساعة)						الخافيف	الطور
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			<i>An. stephensi</i>				
٧٢	٤٨	٢٤	٧٢	٤٨	٢٤		
٦٠,٠٠	٤٦,٦٦	٣٠,٠٠	٦٦,٦٦	٥٠,٠٠	٢٦,٦٦	%٢٥	الأول
٧٦,٦٦	٥٦,٦٦	٤٠,٠٠	٧٦,٦٦	٥٦,٦٦	٤٠,٠٠	%٥٠	
٨٣,٣٣	٧٣,٣٣	٥٣,٣٣	٩٠,٠٠	٨٠,٠٠	٦٦,٦٦	%٧٥	
٩٦,٦٦	٨٣,٣٣	٦٣,٣٣	١٠٠,٠٠	٩٠,٠٠	٧٦,٦٦	%١٠٠	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٦٠,٠٠	٤٦,٦٦	٣٣,٣٣	٦٠,٠٠	٤٦,٦٦	٣٠,٠٠	%٢٥	
٧٣,٣٣	٥٦,٦٦	٤٦,٦٦	٧٦,٦٦	٦٠,٠٠	٤٦,٦٦	%٥٠	الثاني
٨٣,٣٣	٧٠,٠٠	٥٣,٣٣	٨٣,٣٣	٧٣,٣٣	٦٠,٠٠	%٧٥	
٩٣,٣٣	٨٠,٠٠	٥٦,٦٦	٩٦,٦٦	٨٣,٣٣	٦٦,٦٦	%١٠٠	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٥٠,٠٠	٣٦,٦٦	٢٦,٦٦	٥٦,٦٦	٤٣,٣٣	٣٠,٠٠	%٢٥	
٦٣,٣٣	٥٦,٦٦	٤٣,٣٣	٦٦,٦٦	٦٠,٠٠	٤٠,٠٠	%٥٠	الثالث
٧٦,٦٦	٦٦,٦٦	٥٠,٠٠	٨٠,٠٠	٧٠,٠٠	٦٠,٠٠	%٧٥	
٨٦,٦٦	٧٣,٣٣	٦٠,٠٠	٩٠,٠٠	٨٠,٠٠	٦٦,٦٦	%١٠٠	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	
٥٠,٠٠	٤٠,٠٠	٣٠,٠٠	٥٠,٠٠	٤٣,٣٣	٣٣,٣٣	%٢٥	
٦٠,٠٠	٤٣,٣٣	٣٦,٦٦	٦٦,٦٦	٥٣,٣٣	٤٠,٠٠	%٥٠	الرابع
٧٦,٦٦	٦٠,٠٠	٥٠,٠٠	٧٦,٦٦	٦٣,٣٣	٥٠,٠٠	%٧٥	
٨٣,٣٣	٧٠,٠٠	٥٦,٦٦	٩٠,٠٠	٨٠,٠٠	٦٣,٣٣	%١٠٠	
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control	

قيمة L.S.D تحت مستوى معنويّة .٠٥ للنوعين ١٤, ١١ ، للأطوار = ٦, ١ ، للتراكيز = ٦, ١ ، للزمن = ٣, ١

جدول (٤-١٠) قيم LC₅₀ و LC₉₀ لنواتج الايض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في الاطوار اليرقية الاربعة للبعوضتين *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* بعد ٧٢ ساعة من المعاملة.

Slope	LC ₉₀	LC ₅₀	الطور اليرقي	النوع
٢,٣	% ٦٥,٦٧	% ١٨,٩	الأول	<i>An. stephensi</i>
١,٩	% ٨٦,٤	% ٢٠,٦	الثاني	
١,٧	% ١٠٣,٤	% ٢٢,٩٠	الثالث	
١,٨	١٠٥,٠١ %	% ٢٧,٠١	الرابع	

١,٩	٨٥,١ %	% ٢٠,٠٢	الأول	<i>Cx. quinquefasciatus</i>
١,٧	٩٢,٢٧ %	% ٢١,٠١	الثاني	
١,٦	% ١١٤,٧	% ٢٧,٢٠	الثالث	
١,٥	% ١٢٣,٠٦	% ٢٧,٦٤	الرابع	



شكل (٤-٤) استعداد الاطوار اليرقية الاربعة لتخافيف نواتج الايض الثنوية

٤-٣-٢ تأثير نواتج الايض الثنوية الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات بعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi*

يوضح الجدول (٤-١١) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثنوية الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* ، اذ تفوق التخفييف %١٠٠ بفارق معنوي على باقي المعاملات بنسبة هلاك ١٠٠ % لنوع الاول و ٩٦,٦٦ % لنوع الثاني بعد ٧٢ ساعة، بينما سجل التخفييف ٢٥% او طأ نسبة هلاك بلغت ٧٠% و ٦٠% للنوعين وبحسب الترتيب وفي المدة نفسها . في حين لم تسجل معاملة السيطرة أية نسبة هلاك وبما يؤكد وجود علاقة طردية بين نسبة الهلاك وبين كل من مدة التعريض والتخفييف. كما يُستنتج من الجدول أعلىه وجود فروق معنوية بين بالغات كلا النوعين (شكل ٤-٥). ويبيّن الجدول (٤-١٢) قيم LC₅₀ و LC₉₀ لنواتج الايض الثنوية الخام في بالغات كلا النوعين، ودُعمت جميع النتائج من خلال الفروقات المعنوية بين المعاملات.

تنتفق النتائج الحالية مع ما توصلت إليه الجبوري (٢٠٠٣) عندما عاملت بالغات الذباب المنزلية *Musca domestica* براشح الفطر *Aspergillus niger* أدى إلى هلاكها بنسبة ٩٠% بعد مرور ٦ ساعه . وأشار Verma and Prakash (2010) ان معاملة خليط من بالغات *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus*

٩:١ بتركيز C. tropicum و Ae. aegypti بنواتج الايض الثانوية للفطر (Metabolite /Methanol) سبب

هلاك البالغات بنسبة ٥٨٪٧٠ بعد ٨ ساعات. وأن تعريض الذبابة المنزلية *Musca domestica* لرashح الفطر E. muscae أدى إلى هلاكها بنسبة ٩٩٪٩٩ بعد ٤٨ ساعة عند التركيز ١٠٠٪ (المشهداني، ٢٠١٠).

أن الأنزيمات والسموم الفطرية Mycotoxin تؤثر في الفعاليات الحيوية لأجسام الكائنات الحية فقد تعمل على تعطيل بعض الأنسجة أو قتلها أو قد تؤثر على نمو وتطور الحشرة (Lalor et al., 1976) وذكر Wright et al., (1982) أن تعريض بالغات Ae. aegypti لمركب Aflatoxin بتركيز ٦٪٠٠٠٠٦ يؤدي إلى خفض إنتاج البيض ويقلل من قابليته على الفقس.

جدول (٤-١١) تأثير تخافيف مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام في بالغات بعوضتي *An. stephensi*

و

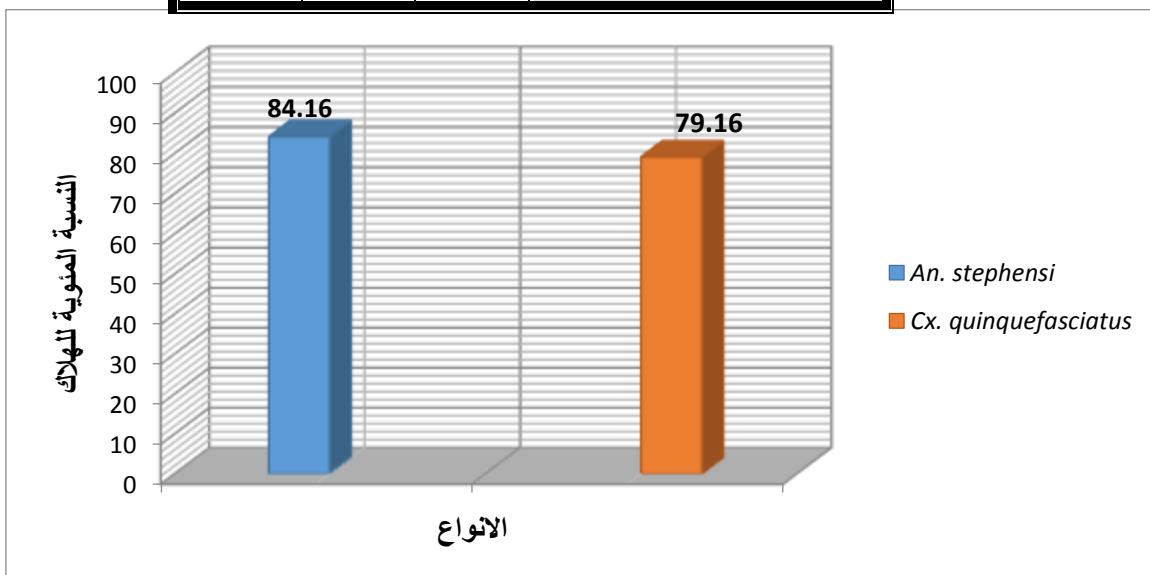
Cx. quinquefasciatus

النسبة المئوية للهلاك بعد (ساعة)						التحفيف
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			<i>An. stephensi</i>			
٧٢	٤٨	٢٤	٧٢	٤٨	٢٤	
٦٠,٠٠	٥٣,٣٣	٣٦,٦٦	٧٠,٠٠	٦٣,٣٣	٤٦,٦٦	%٢٥
٧٣,٣٣	٦٣,٣٣	٤٦,٦٦	٧٦,٦٦	٧٠,٠٠	٥٠,٠٠	%٥٠
٨٦,٦٦	٧٦,٦٦	٥٦,٦٦	٩٠,٠٠	٨٦,٦٦	٦٦,٦٦	%٧٥
٩٦,٦٦	٨٦,٦٦	٧٠,٠٠	١٠٠,٠٠	٩٠,٠٠	٧٣,٣٣	%١٠٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	Control

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية ٥٪٠ للنوعين = ١,٢٩٦ ، للتركيز = ٢,٩٦ ، للزمن = ٦.

جدول (٤-١٢) قيم LC₅₀ و LC₉₀ لنواتج الايض الثانوية الخام في بالغات بعوضتي *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* بعد ٧٢ ساعة من المعاملة.

Slope	LC ₉₀	LC ₅₀	النوع
٢,١٢	٦٥,١٤	١٦,٥٧	<i>An. stephensi</i>
٢,٠٩	٨٢,٥٦	٢٠,٨	<i>Cx. quinquefasciatus</i>



شكل (٤-٥) استعداد بالغات النوعين *Cx. quinquefasciatus* و *An. stephensi* لنواتج الايض الثانوية الخام للفطر

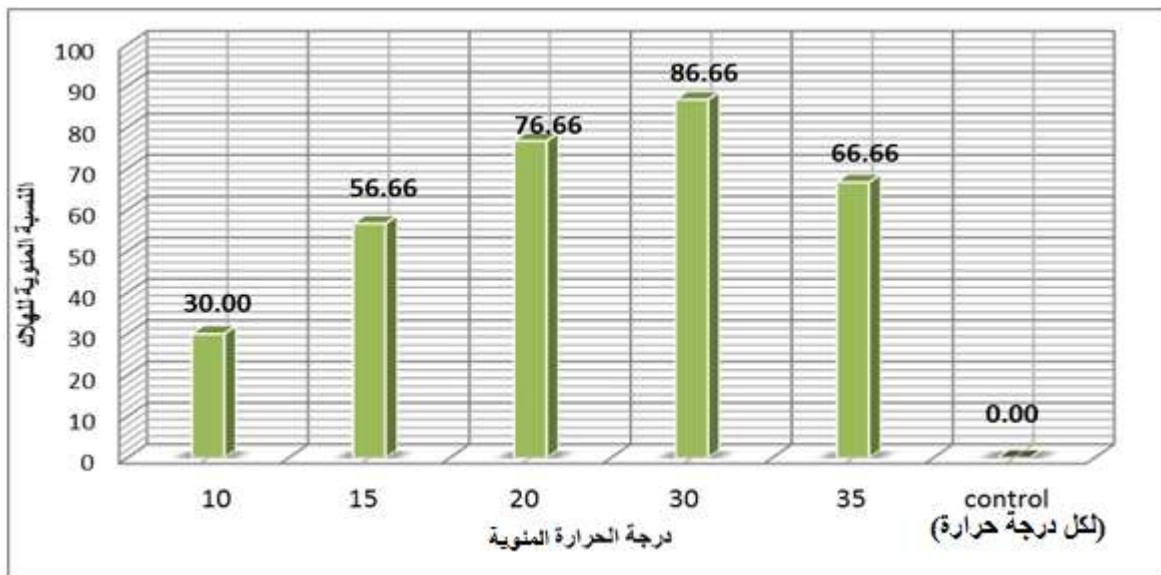
M. anisopliae

٤-٤ تأثير بعض العوامل غير الحياتية في كفاءة الفطر *M. anisopliae* في حياتية يرقات البعوضة *Cx. quinquefasciatus* ٤-٤-١ درجة الحرارة

تبين نتائج الشكل (٤-٦) ازدياد نسب هلاك يرقات الطور الثالث بزيادة درجة الحرارة من ١٠ إلى ٣٠ م° بصورة طردية وهذا ما أكدته الفروق الإحصائية ، الا أنها تعود لتنخفض إلى ٦٦,٦٦٪ عند الدرجة ٣٥ م°. بينما لم تُسجل أي نسبة هلاك في معاملة السيطرة وللدرجات الحرارية المختبرة جميعها . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (Jaronski and Axtell 1983) عندما حدد أعلى معدل إصابة ليرقات البعوض مع عزلتين من فطر *L. giganteum* كانت في المدى الحراري ٢٩-٢١ م° لكلا العزلتين وان معدل الإصابة يقل عند ارتفاع درجة الحرارة عن ٢٩ م° او انخفاضها عن ٢١ م° . وذكر Entz (1985) أن الهلاكات العالية للجراد غير المجنح *Phaulacridium vittatum* المعرض لأبوااغ الفطر *M. anisopliae* سُجلت في درجة الحرارة من ٢٠ إلى ٣٠ م°. ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *M. anisopliae* انحصرت بين ٢٨ - ٣٠ م° (Ignoffo, 1992) وبين (Mietkiewski et al., 1994) أن *M. anisopliae* أعلى نسبة هلاك لحشرة *Galleria melonella* المعاملة بالفطر قيد الدراسة كانت في درجة حرارة ٣٠ م°، وأضاف أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر وتكوين الأبوااغ على وسط (SDA) كانت في درجة حرارة ٢٧ و ٢٥ م° على التوالي وان قيمة الزمن اللازم لهلاك نصف العدد LT_{50} هي ٤,٨ يوم لحوريات الجراد المصابة بالعزلة البرازيلية من فطر *M. flavoviride* في مدى حراري من ٢٠ إلى ٣٠ م° بالمقارنة مع ٤,٥ يوم لتلك المحضونة في درجة حرارة ٢٥ م°.

وأشار (Ekesi et al., 1999) إلى أن درجة الحرارة المثلى لتكوين الأبوااغ ومعدل النمو وامراضية الفطريين *Mejalurothrips sjostedti* و *B. bassiana* ضد حشرة *M. anisopliae* تتحصر بين ٢٥ - ٣٠ م° بينما كانت واطنة لكلا الفطريين في درجة حرارة ١٥ م° . وذكر (Pelizza et al., 2007) أن ابوااغ الفطر *Leptolegnia chapmanii* تصيب يرقات *Cx. pipiens* في المدى الحراري من ١٠ - ٣٥ م° وان أفضل درجة حرارة لإصابة اليرقات هي درجة حرارة ٢٥ م° . كما استخدم Bugeme et al., (2008) تسعة عزلات من فطر *M. anisopliae* وعزلتين من فطر *B. bassiana* على إناث حلم ذو البقعتين *Tetranychus urticae* في درجات حرارية ٣٥، ٣٠، ٢٥، ٢٠ م° ، حيث لاحظ أن العزلات الفطرية كانت ممرضة لبالغات الحلم في كل درجات الحرارة المختبرة ولكن الهلاكات تختلف باختلاف

درجات الحرارة ، حيث كانت الأكثر أمراضية في درجات الحرارة الثلاث الأخيرة وأقلها في ٢٠ م° ، إلا أن هنالك بعض العزلات تكون ذات أمراضية عالية لإناث الحلم في المدى الحراري من ٣٥-٢٠ م° حيث تسبب هلاك أكثر من ٧٠٪ من الأفراد.

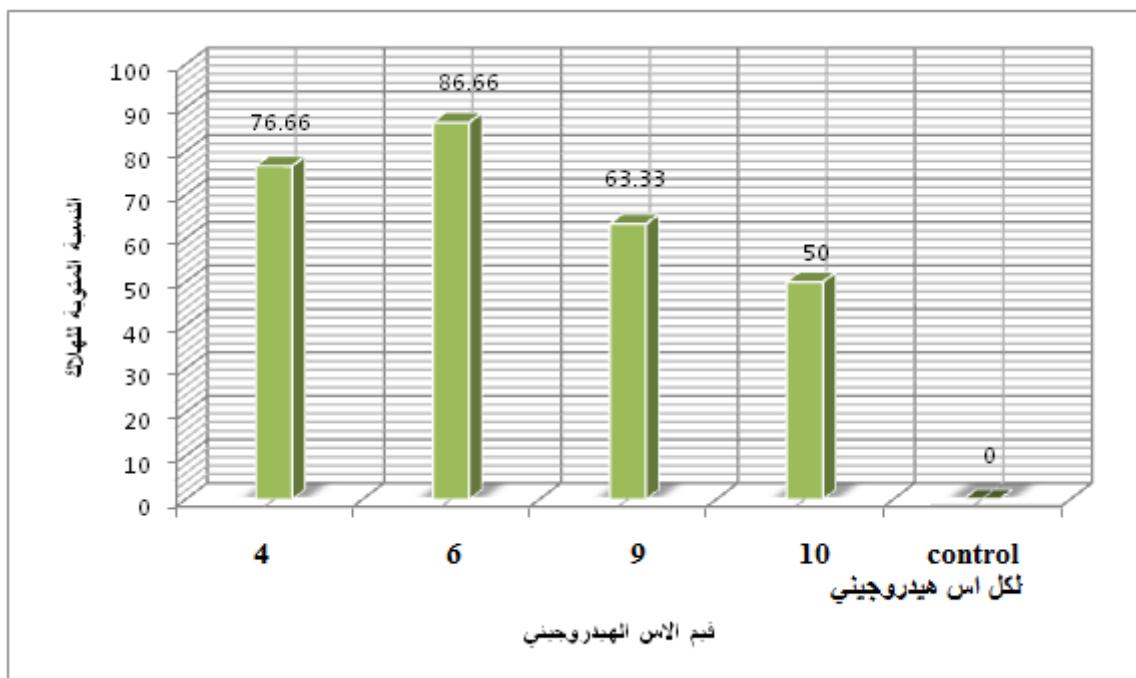


شكل (٤-٦) تأثير درجة الحرارة في فعالية الفطر *M. anisopliae* ضد يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinquefasciatus*
٩,٣ = L.S.D

٤-٤-٢. الأس الهيدروجيني

يسجل الشكل (٤-٧) تأثير مختلف قيم الأس الهيدروجيني في فعالية الفطر *M. anisopliae* ضد يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinquefasciatus* فقد وصلت نسبة الهلاك إلى أقصاها عند الأس الهيدروجيني ٦ بينما انخفضت تلك النسبة عند زيادة الأس إلى ١٠ أو نقصانها إلى ٤ . وانعدمت الهالكات في معاملة السيطرة . تشابه هذه النتائج مع ما توصل إليه MacGregor (1929) إذ حصل على معدل هلاك يزيد على ٦٠٪ من يرقات *Cx. pipiens* و *Ae. aegypti* المعرضة لأبواغ الفطر ضمن مدى pH (٤-١٠) ، والتي تُعد ضمن مدى الأس الهيدروجيني للعديد من بीئات يرقات البعوض . كما ذكر Lord and Roberts (1985) أن هنالك فروقات معنوية في إنتاج الأبواغ المتحركة لفطر *L. giganteum* عند تتميته على الأوساط الصناعية ذات pH تتحسر بين (٤-٤،٨) . وبين Sung et al., (1995) أن الفطر *Phytocordyceps nutans* و *Cordyceps ninchukiospore* تنمو بشكل جيد على pH ٧.

وأشار (Bae *et al.*, 2000) أن قيمة الأس الهيدروجيني المثلثى لنمو الغزل الفطري للفطريات الممرضة للحشرات على الأوساط السائلة ضمن مدى ٦-٧. تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما جاء به Pelizza *et al.*(2007) من أن معدل هلاك يرقات *Cx. pipiens* المعرضة لأبوااغ الفطر *L. chapmanii* تزداد من ٦٢٪ إلى ٩٩٪ عند زيادة pH من ٤ إلى ٧، وتنخفض إلى ٧١٪ عند ٨-٩. كما لوحظ أن قيمة pH المثلثى لنمو وتكوين الأبوااغ للفطر *B. bassiana* تتراوح من ٦-١٠=pH .((Karthikeyan *et al*, 2008)



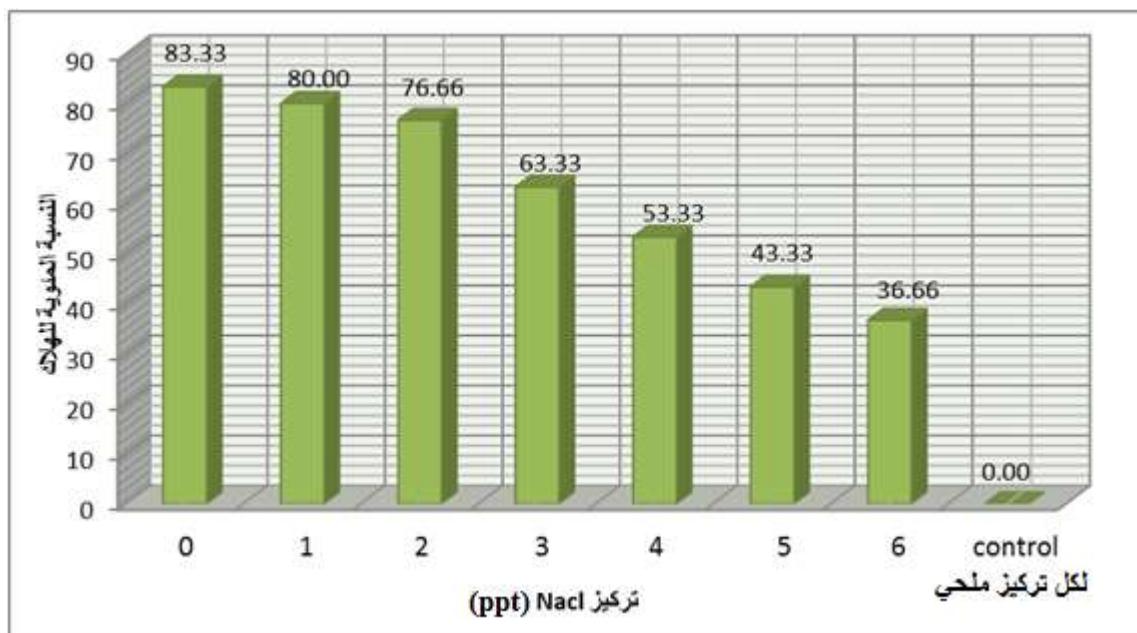
شكل (٤-٧) تأثير مختلف قيم الأس الهيدروجيني في فعالية الفطر *M. anisopliae* ضد يرقات الطور الثالث للـ *Cx. quinquefasciatus*

٤-٤-٣- الملوحة

يُظهر الشكل (٤-٨) تأثير تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl في فعالية الفطر *M. anisopliae* ضد يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinquefasciatus* اذ سُجلت أعلى نسبة هلاك ٣٦,٦٦٪ عند التركيز ٥ppt بينما سجل اوطا نسبة هلاك ٣٦٪ عند التركيز ٦ppt. ويُستنتج من ذلك إلى وجود علاقة عكسية بين تركيز الملح ونسبة الهلاك ، إذ تنخفض نسبة الهلاك مع زيادة الملوحة ، وهذا ما أكدته التحليلات الإحصائية ، فيما عدا المعاملات ٠,١,٢ ppt التي لم تجد فروقاً معنوية فيما بينها وكذلك المعاملتين ٥,٦ ppt وتقرب نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Petersen and Chapman

(1970) عندما أكدت إمكانية حصول الإصابة بالفطر *L. chapmanii* في مواطن البعوض عند تركيز أعلى من 20 ppt . في حين ذكر (1978) أن الملوحة العالية والتلوث العضوي يُثبط قابلية الفطر *Culicinomyces clavisporus* على إصابة البرقات . أن الفطر *L. giganteum* ذو قابلية تحمل واطئة للملوحة ، حيث لوحظ اختزال ٥٠٪ من معدل إصابة *Ae. taeniorhynchus* في الظروف الملحية (Merriam and Axtell, 1982) وذكر (Kerwin and Washino 1988) أن العوامل البيئية مثل الحرارة المتطرفة والملوحة العالية والمحتوى العضوي من العوامل المهمة في أعقاب نجاح الفطر *L. giganteum* في السيطرة على البعوض . وبين (Pelizza et al., 2007) أن

نسبة الهلاك تنخفض من ٩٦٪ في الماء المقطر إلى ٣١,٥٪ في الماء ذو التركيز 6 ppt من كلوريد الصوديوم عند تعریض بيرقات *Cx. pipiens* لأبوااغ الفطر *L. chapmanii* .



$$9,0,3=L.S.D$$

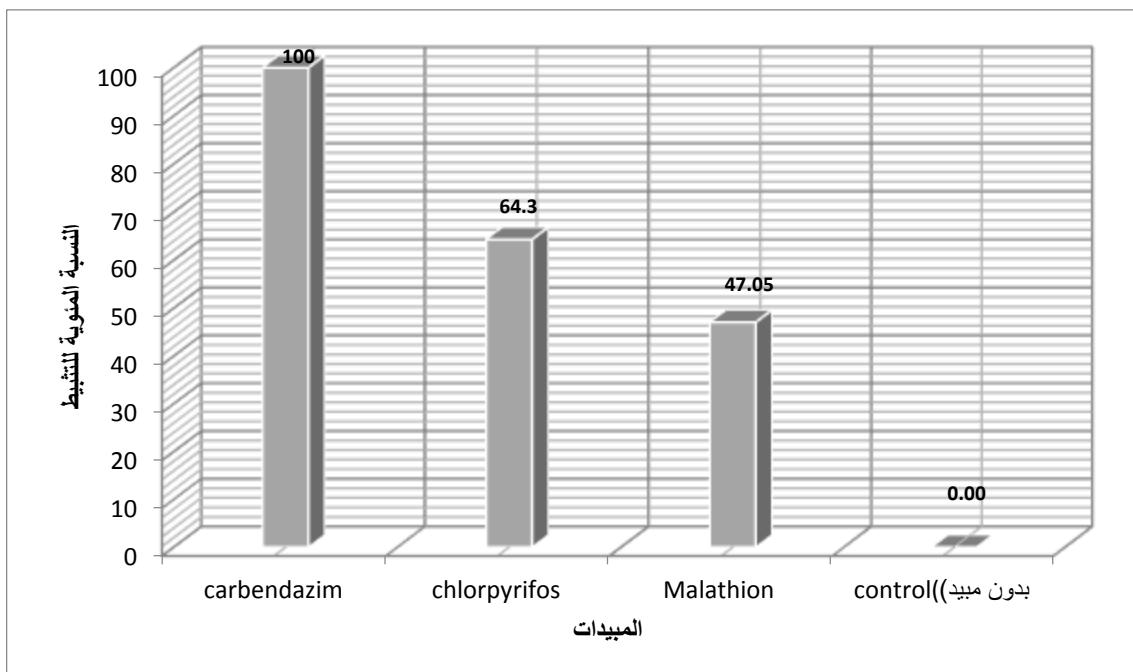
شكل (٤-٨) تأثير تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl في فعالية الفطر *M.anisopliae* ضد بيرقات الطور *Cx. quinquefasciatus* الثالث لبعوض

٤-٤-٤- المبيدات الحشرية والفطرية

توضح نتائج الشكل (٤-٩) تأثير المبيدات الحشرية Malathion و Chlorpyrifos في نمو الفطر على الوسط الزراعي (SDAY) اذ تبين أن المبيد Chlorpyrifos قد تقوّق على المبيد Malathion اذ بلغت النسبة المئوية للتنبيط (٤٧,٠٥٪ و ٦٤,٣٪) على التوالي وأيد التحليل الإحصائي وجود فرق

معنوي بين المعاملات والسيطرة . تتفق النتائج الحالية مع ماتوصل إليه Mohamed *et al.*, (1987) حيث ذكر أن بعض مبيدات الفسفة العضوية مثل Chlorpyrifos كانت أكثر سمية لنمو الغزل الفطري وتكوين الأبواغ للفطر *M. anisopliae* , أما مبيدات Leptophos و Temephos و Malathion وكانت أكثر تأثيراً على تكوين الأبواغ , وأضاف أن المبيدات البيريثرويدية مثل Pyrethrin و Methoprene و Diflubenzuron و Resemethrin و Permethrin كانت غير مثبطة لمختلف مراحل تطور الفطر . وأكد Li and Holdam (1994) أن مبيدات Malathion و Temephos و Chlorpyrifos ذات تأثير ضار جداً

على نمو الغزل الفطري وتكوين الأبواغ للفطر *M. anisopliae* . وأشار Rachappa *et al.*, (2007) ان المبيدات Malathion و Chlorpyrifos قد ثبّطا الفطر قيد الدراسة بنسبة (%) ٦٩,٢ على التوالي . ومن جانب آخر تبيّن النتائج تأثير المبيد الفطري Carbendazim اذ ثبّط نمو الفطر بنسبة ٥٨,١% وتنطبق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Li and Holdam (1994) اذ وجد تثبيطاً كاملاً لنمو الفطر *M. anisopliae* عند خلط كل من مبيدات Carbendazim و Flusilazole و Kulkarni (1999) ان هناك Propiconazole بالتراكيز الموصى بها مع الوسط الزراعي. كما ذكر (1999) Carbendazim سمية عالية لمبidi Nomuraea rileyi و Mancozeb على فطر Gopalkrishnan and Mohan (2000) من أن المبيدات الفطريين Carbendazim و Mancozeb لا يسبّبان أي تأثير سلبي على الفطر *N. rileyi* كما ذكر Rachappa *et al.*, (2007) عدم وجود نمو للفطر *M. anisopliae* عند خلط المبيدات الفطرية Chlorothalonil و Propiconazole و Carbendazim مع الوسط الزراعي .



$$2,4=L.S.D$$

شكل (٤-٩) تأثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية في نمو الفطر *M. anisopliae*
الاستنتاجات

١. أن الفطر *M.anisopliae* يصيب يرقات البعوض بصورة طبيعية في البيئات المائية.
٢. أثرت تراكيز المعلق الفطري ونواتج الايض الثانوية الخام تأثيراً واضحاً في مختلف ادوار حياة *Cx.quinquefasciatus* و *An.stephensi* ولكن بصورة متباعدة فقد أبدت البيوض والعداري مقاومة ملحوظة بينما هلكت اليرقات والبالغات بنسبة أكثر وكان الطوران اليরقيان الأول والثاني أكثر حساسية لمعلمات الفطر ونواتج الايض من الطورين الثالث والرابع.
٣. أن تراكيز المعلق البوغي ونواتج الايض الثانوية الخام كانت أكثر تأثيراً في ادوار حياة *Cx.quinquefasciatus* . *An.stephensi*
٤. عدت درجة الحرارة ٣٠ م° الأفضل من بين درجات الحرارة المستخدمة لتقدير فعالية الفطر.
٥. تتبادر أمراضية الفطر ليرقات البعوض بحسب قيم الأُس الهيدروجيني للوسط المائي الذي تعيش فيه اليرقات وعد الأُس الهيدروجيني PH 6 هو الأمثل عند استعماله في السيطرة الحيوية
٦. أن استعمال الفطر في بيئات ذات تركيز عال من كلوريد الصوديوم (6ppt) يقلل من كفاءة الفطر في مكافحة يرقات البعوض.
٧. يتعارض استخدام الرش بالمبيد الفطري مع استخدام الفطر للمكافحة في حين كان تأثير المبيدات الحشرية أقل.

التصنيفات

- ١- استعمال الفطر في مجال المكافحة الجرثومية للبعوض مع الأخذ بنظر الاعتبار درجة الحرارة والحموضة وملوحة الماء.
- ٢- إجراء تجارب حول استعمال الفطر في السيطرة على أنواع أخرى من الحشرات الطبية والاقتصادية ومفصليه الأرجل الأخرى فضلا عن تأثيره في الأعداء الحيويه.
- ٣- محاولة تصنيع مبيد حيوي للحشرات Bioinsecticide وعزل واستخلاص عوامل السيطرة الحيوية التي ينتجهها الفطر.
- ٤- استخدام الفطر بشكل معلق بوعي في مكافحة أماكن تواجد البعوض وتحديد التركيز اللازم للاستخدام.
- ٥- عزل أنواع أخرى من الفطريات الممرضة ليرقات البعوض المصابة طبيعيا وتنقييم أمراضيتها

المصادر العربية

- أبو الحب، جليل كريم . ١٩٧٩. الحشرات الطبية والبيطرية في العراق، (القسم النظري). كلية الزراعة / جامعة بغداد. ٤٥٠ صفحة.
- الامارة، محمد صبري جبر. ٢٠٠٩. تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية والكيميائية في بعض اوجه حياتية حشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) (*Trogoderma granarium*) (Everts) رسالة ماجستير. كلية الزراعة / جامعة البصرة. ١١٣ صفحة.
- الجبوري، ابراهيم جدوع . ٢٠٠٧. حصر وتشخيص العوامل الحيوية في بيئه نخلة التمر واعتمادها لوضع برنامج ادارة متكاملة لآفات النخيل في العراق . مجلة جامعة عدن للعلوم الطبيعية والتربوية . المجلد (١١) العدد ٣-٦٣ . ٧٠-٦٣ صفحة.
- الجبوري، دينا حسين هاتف . ٢٠٠٣. دراسات مختبرية حول استخدام روائح بعض الفطريات كطعوم سامة لمكافحة حشرة الذباب المنزلي *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) رسالة ماجستير. الكلية التقنية / المسبب. ١٢٠ صفحة.
- الجلبي، بديعة محمود . ١٩٩٨. تأثير مستخلصات نبات سرطان الثيل *Euphorbia granulate* في الاداء الحيائي لبعوضة *Culex pipiens* L. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم / جامعة بغداد. ٢١٦ صفحة.
- الخفاجي ، هبة عباس علي . ٢٠١٠ . تأثير مستخلصات أوراق نبات الخروع *Ricinus communis* L. في بعض جوانب حياتية لبعوضة الكيوليكس *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) رسالة ماجستير. كلية العلوم / جامعة القادسية. ٨٥ صفحة.
- خلف، جنان مالك و عبد الوهاب ، اياد عبد القادر وبنيان، ليلى عبد الرحيم . ٢٠٠٤. المكافحة الإحيائية والكيميائية ليرقات وبالغات البعوض *Culex quinquefasciatus* Say Diptera: () مختبريا. مجلة البصرة للعلوم (ب) . ٦٢-٤٦ (٢٢):

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبدالعزيز محمد. ٢٠٠٠. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. الطبعة الثانية.

٤٨٨ صفحة.

الربيعي، ثائر محمود طه. ١٩٩٧. استحداث العقم الموروث باستخدام اشعة كاما في حفار ساق الذرة *Sesamia cretica*(Lepidoptera:Noctuidae) اطروحة دكتوراه. كلية العلوم / جامعة بغداد. ١٧٠ صفحة.

الزبيدي، حمزة كاظم . ١٩٩٢. المقاومة الحيوية للافات. دار الكتب للطباعة والنشر / الموصل. العراق. ٤٤ صفحة.

السلامي، فاطمة هاشم . ٢٠١٠. تأثير الفطر *Beauveria bassiana*(Bals.)Vuill. في بعض الجوانب الحياتية للدعسوقة ذات النقاط الاحدى عشر *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). رسالة ماجستير . كلية العلوم للبنات / جامعة بابل. ٥٧ صفحة.

سيرفس، م.و. ١٩٨٤. المرشد إلى علم الحشرات الطبية . ترجمة علي محمد سليم ، زهير يونس الصفار ورياض احمد العراقي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. ٣٨٠ صفحة.

شعبان، عواد والملح ، نزار مصطفى . ١٩٩٣. المبيدات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. ٥٢٠ صفحة.

الطائي، امل علي محسن. ١٩٩٩ . تأثير مستخلصات نبات الكبر *Capparis spinosa* في بعض جوانب الاداء الحياني لبعوضة الكيولكس (*Culex pipiens*) رسالة Diptera:Culicidae رساله ماجستير، كلية العلوم. جامعة بابل. ٨٠ صفحة.

عبد القادر، أياد عبد الوهاب . ١٩٩٤. يرقات البعوض في البصرة ودور بعض الأسماك المفترسة في مكافحتها. رسالة ماجستير. كلية الزراعة- جامعة البصرة. ٩١ صفحة.

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 لأوراق وثمار نبات الدورانتا *Duranta repens* L. على الاداء الحياني *Beauveria bassiana*(Balsamo) وفطر (*Culex pipiens pipiens* L.) لبعوضة *Culex pipiens pipiens* L. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد. ١٣٧ صفحة.

الغزالى، مشتاق طالب كريم . ١٩٩٩ . الروز الحيوى لمستخلصات نباتيه مختلفة لأوراق فرشاة البطل *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels في بعض جوانب حياتية بعض الكيولكس (*Culex pipiens* L.). رسالة ماجستير. كلية العلوم / جامعة بابل. ١٢٠ صفحة.

المشهدانى، حسين رياض محمود . ٢٠١٠. المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) . رسالة .
Entomophthora muscae باستخدام الفطر المضاد L. ماجستير / كلية العلوم / جامعة القadesية . ٦٩ صفحة

المصادر باللغة الانكليزية

- Abul-hab, J. K.** 1968. Larval of culicine mosquitoes of Iraq with akey for their Identification .Bull.End –Dis.Baghdad.X(1-4):23.
- Agudelo-Silva, F and Wassink, H.** 1984. Infectivity of venezuelan strain of *Metarhizium anisopliae* to *Aedes aegypti* Larvae.J.Invert.pathol.43:430-435.
- Ahmed, S.; Ashraf, M.R. ; Hussian, A. and Riaz,M.A.**2009.Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* from Curjranwala (Pakistan) against *Coptotermes heimi* (Wasmanu) (Isoptera:Rhinotermitidae) . J. Agri. & Biol. 11: 707-777.
- Aldridge, D.C. and Turner, W.B.** 1969.structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae* . J. chemi. Socie. Sect. (organic chemistry)3: 923-928.
- Alves, S.B.; Alves, L.F.A.; Lopes, R.B.; Pereira, R.M and Vieira, S.A.** 2002.Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dip:Culicidae).J.Appl.Entomol.126:504-509.
- 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.
- Amiri-Besheli, B.; Khambay,B.; Cameron,S.; Deadman,M.L. and Butt, T.M.** 2000.Inter and intra-specific variation in destruxins production by insect pathogenic *Metarhizium spp.* and its significance to pathogenesis. Mycological Research .104:447-452.
- Angel-Sahagun,C.A.; Iezama-Gutierrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; Lopez-Edwards, M.; Rebolledo-Dominguez, O.; Cruz-Vazquez, C; Reyes-Velazquez, W.P; Skoda,S.R, and Foster,J.E.**2005.Susceptibility of biological stages of the hornfly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). J. insec. Sci..33:1-8
- Bae, J.T. ; Sinha, J. ; Park , J.P. ; Song , C.H. and Yun, J.W.** 2000. Optimization of submerged culture conidition for exo- biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. J.Microbiol.Biotechnol. 10:482-487.
- Bains, P.S. and Tewari, J.P.** 1987.Purification , chemical characterization and host specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*.Physiol. Molec. Plant Pathol. 30:259-271.
- Balaraman, K.; Bheemarao, N.S. and Rajagopalan ,P.K.** 1979. Isolates of *Metarhizium anisopliae* , *Beauveria tenella* and *Fusarium oxysporum* (Deuteromycetes) and their pathogenicity to *Culex fatigans* and *Anopheles stephensi*. Indian J.Med.70:718-722.

- Barson, G.; Renn, N. and Bywater, A.F.** 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly(*Musca domestica* L.) apest of intensive animal units. *J.Invert.Pathol.*64:107-113.
- Bartlett, M.C. and Jaronski, S.T.** 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects , In H.D.Burges(ed.), *Microbial control of pests and plant disease*. Academic Press.New York.380.
- Bateman, R.P.** 1997. The development of amycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook on Agriculture.* 26:13-18
- 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.
- Blaustein, L.** 1998. Influence of the predatory back swimmer, *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure . *Ecol. Entomol.*23:246-252.
- Boucias, D .G and Pendland , J.C.** 1998. Entomopathogenic fungi ; fungi Imperfect. *Princip. insec.pathol.* 10:321-359.
- Boucias, D.G. ; Pedland , J.C. and Latge , J.P.** 1988. Non specific factor involved in attachment of entomopathogenic (Deuteromycetes) to the host insect cuticle. *Appl.Environ. Microbiol.*54:1796 -1805.
- Briggs, L.L.; Colwell, D.D. and Wall, R.** 2006. Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* . *Veterinary Parasitol.*142:344-349.
- Brooks , A.J.; Aquinodemuro, M.; Burree, E.; Moore, D.; Taylor, M.A. and Wall, R.** 2004. Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite , *Psoroptes ovis* effect temperature and formulation . *pest sci.*60:1043 -1049.
- Brown, D.E.** 1988. The submerged culture of filamentous fungi , In D.R.Berry(ed.)*physiology of industrial fungi*. Black Well Scientific Publication Oxford. 219:248.
- Bugeme, D.M.; Knapp, M.; Boga, H.I.; Wanjoya , A.K. and Maniania, N.K.** 2008. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the Two – spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia.* 167:221 -227.
- Bukhari, T.; Middelman, A.; Koenraadt, C. J.M.; Takken, w. and Knols, B.G.** 2010. Factors affecting fungus induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal.*9:22.
- Castillo,M.A.; Moya, P.; Hernandez, E. and Primo-Yufera.**2000. Susceptibility of Ceratitis capitata Wiedemann(Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Contr.*19:274-282.
- Cavalcanti, M.A.D.**1991. Viability of Basidiomycotina cultures preserved in mineral oil. *Rev.Latinoam.Microbiol.* 32: 265-268.
- Chapman, H.C.** 1974. Biological control of mosquito larvae . *Annual Review of Entomol.*19: 33-59.

- Chapman, H.C.; Petersen, J.J. and Fukuda, T.** 1972. Predators and pathogens for mosquito control . The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.777-781.
- Charnley, A.K.** 2003. Fungal pathogens of insects : cuticle degrading enzymes and toxins. Advanced in Botanic. Res.40 : 242 -300.
- Chen ,H.C.; Yeh , S.F.; Ong , G.T.; Wu, S.H.; Sun, C.M. and Chon , C.K.**1995. The suppressive hepatitis –B virus surface antigen production in human hepatoma – cells. J.Natural Product – Liyodia 58:527-531.
- 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.
- Cloyd, R.A.** 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Midwest Biol.control News.5(7).
- Daoust, R.A. and Roberts, D.W.** 1982. Virulence of natural and insect passed strain of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J . Invert. Pathol.40:107-117.
- Daoust, R.A. and Roberts, D.W.** 1983a. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes . J.Invert. Pathol.41:143-150.
- Daoust, R.A. and Roberts, D.W.** 1983b. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia:Effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes . J . Invert. Pathol.41:161-170.
- Daoust, R.A.; Ward , M.G. and Roberts, D.W.** 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. J.Invert. Pathol.40:228-236.
- Dayakar, S. and Kanaujia, K.R.** 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to different development stages of castor spiny caterpillar , *Ergolis merione* L. J. Oil Seeds Res.
- De Andrade, C.F.** 1993. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. : potential to recycle in mosquito larvae. Boyce Thompson Institute at Cornell University.
- Dillon, R.J. and Charnley, A.K.** 1990. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus , *Metarhizium anisopliae* . Mycological Res.. 94:299-304.
- Dimbi, S.; Maniania, N.K.; Lux, S.A and Mneke, J.M.** 2004. Effect of constant temperatures on germination , radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. Biocontrol. 49:83-94.
- Driver, F.; Milner, R.J. and Trueman, W.H.A.** 2000.A taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. Mycological Res. 104:135-151.

- Dumas, C.; Ravallec, M.; Matha, V. and Vey, A.** 1996. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. *J. Invert. Pathol.* 67:137-146.
- Ekesi, S.; Maniania, N.K. and Ampong-Nyarko, K.** 1999. Effect of temperature on Germination ,Radial growth and Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci. and Technol.* 9(2):177-185.
- Ekesi, S.; Maniania, N.K. and Lux, S.A.** 2002. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* .*Biocontrol Sci. Technol.* 12:7-17.
- Engstrom, G.; Delance, J.; Richard, A.L. and Baetz, J.** 1975. Purification and characterization of roseotoxin B , atoxic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* . *J. of Agri. and food chemi.* 23:244-253.
- Entz, S.C.** 1985. Molecular methods and isolation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada. Athesis master.University of Lethbridge. 127.
- Finney, D.J.** 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 333pp.
- Freimoser, F.M.; Screen, S.; Bagga, S.; Hu, G. and St.leger, R.J.** 2003. EST analysis of two sub species of *Metarhizium anisopliae* reveales aplethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts . *Microbiology* . 149(1): 239-247.
- Gayathri, G.; Balasubramanian, C.; Moorthi, P.V. and Kubendran, T.** 2010. Larvicidal potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Paecilomyces fumosoroseus*(Wize) Brown and smith on *Culex quinquefasciatus* (Say). *J.Biopesti.* 3(1):147-151.
- Geng, B. and Zhang, R.** 2004. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* to the developmental stage of Brown planthopper *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera*. *Insect Sci.* 11:89-97.
- Ghosh, A.; Mandal, S.; Bhatta , C.I. and Chandra, G.** 2005. Biological control of vector mosquitoes by some exotic fish predators. *Turk Journal Biology.* 17: 167-171.
- Gindin, G.; Levski, S.; Glazer, I. and Soroker, V.** 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi , *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica* 34(4): 370-379.
- Gindin, G.M.; Samish, M.; Zangi, G.; Meshoutchenko, A. and Glazer, I.** 2002. The susceptibility of different species and stage of ticks to entomopathogenic fungi .*Exp.Appl. Acarol.* 28 : 283-288.

- Goettel, M.S. and Inglis, D.**1997. Fungi: Hyphomycetes. In. : Lacey, L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego.409 pp.
- Gopalkrishnan, C. and Mohan , S.** 2000. Effect of certain insecticide and fungicides on the conidial germination of *Nomuraea rileyi* (farlow) Samson. Entomon.25:217-223.
- Gupta, S.; Krasnoff, S.B.; Renwick, J.A.A.; Roberts, D.W.; Steiner, J.R. and Clardy, J.** 1993. Viridoxin-A and viridoxin B-Novel toxins from the fungus *Metarhizium flavoviride*. J. of organic chem.. 58: 1062-1067.
- Gupta, S.; Roberts, D.W. and Renwick, J.A.A.** 1989. Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high- performance liquid – chromatography. Journal of Liquid Chromatography.12 :383-395.
- Hajek, A.E. and St.leger, R.J.** 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts . Ann. Rev. Entomol.39 : 293-322.
- Hoe, P.K.; Bong, C.F.; Jugah, K. and Rajan, A.** 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae var anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae) . Am. J. of Agricul. And Biol. Sci. 4 (4) : 289-297.
- Holley, R.W.** 2009. *Metarhizium* and *Metarhiziopsis* fully indexed . Center for Agriculture and Health. Ithaca, Newyork.1-91.
- Humber, R.A.** 1997. Fungi : Identification. In Manual of Techniques in Insect Pathology (L.A.Lacey,ed.) , pp. 153-185. Academic Press : London.
- Ibrahim, L.; Butt, T.M.; Beckett, A. and Clark, S.J.** 1999. The germination of oil formulated conidia of the insect pathogen , *Metarhizium anisopliae* . Mycological Research.103:901-907.
- Ignoffo, C.M.** 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens.Florida Entomologist.75:516-525.
- James, P.J.; Kershaw, M.J.; Reynolds , S.E. and Charnley, A.K.** 1993. Inhibition of desert locust (*Schistocerca gregaria*) malpighian tubule fluid secretion by destruxins , cyclic peptide toxins from the insecticide pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. insec. physiol.39:797-804.
- Jaronski, S.T. and Axtell, R.C.** 1983. Effects of temperature on infection , growth and zoosporogenesis of *Lagendium giganteum* , a fungal pathogen of mosquito larvae. Mosq.News. 43:42-45.
- Jeffries, M.** 1988. Individual vulnerability to predation : the effect of alternative prey types. Fresh water Biology.19:49-56.
- Jegorov, A.; Matha, V.; Sedmera, P. and Roberts, D.W.** 1989. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* . In proceeding of the International conference on Biopesticides , Theory and practice(Ed. By A.Jegorov and V.Matha). 64-70 pp.

- Jegorov, A.; Sedmera, P.; Havlicek, V. and Matha, V.** 1998. Destruxins Ed(1) acyclopeptide from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* . 49:1815-1817.
- Kaaya, G.P.** 1989. *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi . *Acta tropica*. 46: 107-114.
- Kaaya, G.P. and Hassan, S.** 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for teck control . *Exp. Appl. Acarol.* 24:913-926.
- Kaaya, G.P.; Seshu-Reddy, K.V.; Kokwaro, E.D. and Munyinyi, D.M.** 1993. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* , *Metarhizium anisopliae* and *Serratia marcescens* to the banana weevil *Cosmopolites sordidus* . *Internati. centre of insect physiol. and ecol.* 3:177-187.
- Karthikeyan, A.; Shanthi, V. and Nagasathya, A.** 2008. Effect of different media and ph on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. *J. Agri.& Biol.Sci.* 4(2):117-119.
- Kawazu, K.; Murakami, T.; Ono, Y.; Kanzaki, H.; Kobayashi, A.; Mikawa, T. and Yoshikawa , N.** 1993. Isolation and characterization of 2 novel nematocidal depsipeptides from an imperfect fungus , strain D1084. *Biosci. Biotechn. and Biochemi* . 57:98-101.
- Kerwin, J.L. and Washino, R.K.** 1988. Field evaluation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) and description of anatural epizootic involving anew isolate of the fungus. *J.Med.Entomol.* 25:452-460.
- Khashaveh, A.; Safaralizade, M.H. and Ghosta, Y.** 2008. Pathogenicity of three Iranian isolates of the fungus , *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against Granary weevil , *Sitophilus granarius*L. (Coleoptera:curculionidae) . *J. Biol. Sci.* 8:804-808.
- Khetan, S.K.** 2001. Microbial pest control ,1st edition.Marcel Dekker.
- Knight, K.L.** 1978. Supplement to acatalog of the mosquitoes of the world. Thomas Say Foundation.6:1-107.
- Knight, K.L. and Stone, A.** 1977. Acatalog of the mosquitoe of the world (Diptera: Culicidae) . Thomas Say Foundation.6:1-611.
- Kodaria, Y.** 1961.Biochemical studies on the muscardine fungi in the silk worms, *Bombyx mori* L. *Journal of faculty Textile Technology* . Sinshu University.5:1-68.
- Krasnoff, S.B.; Gibson, D.M.; Belofsky, G.N.; Gloer, K.B. and Cloer, J.B.** 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Journal of Natural Products*.59:485-489.
- Kucera, M.**1980. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae . *J. Invert. Pathol.*35: 304-310.
- Kucera, M.**1981. The production of toxic protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture . *J. Invert. Pathol.*38:33-38.

- Kulkarni, N.S.** 1999. Utilization of fungal pathogen *Nomuraea rileyi*(Farlow Samson on the management of lepidopterous pests. Ph.D.thesis, University of Agricultural Sciences.Dharwad,178pp.
- Lacey, L.A.** 1997. Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques) . Academic Press. Sadiego.London.Boston.408pp.
- Lacey, L.A. and Brooks, W.M.** 2007. Initial handling and diagnosis of diseased insects . Academic Press.1-15.
- Lacey, C.M.; Lacey, L.A. and Roberts , D.W.** 1988. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus* .J.Invert.Pathol.52:108-118.
- Lalor, J.H.; Chinuici, J.P. and Llewellyn, G.C.** 1976. Effect of fungal metabolite , alfatoxin B1 on larval viability and gross morphology in *Drosophila melanogaster* in press. J. Microbiol. 17: 210-215.
- Lambert, K.** 2003. Field trials using the fungal pathogen , *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) in honey bee colonies. J. Econ.Entomol.96(4):1091-1099.
- Landis, J.N. and Olsen, L.G.** 1989. Mosquito control: amanual for commercial pesticide applicators. Michigan State. University Extension Bull. 2180.
- Langewald, J.; Onambama, Z.; Mamadou, A.; Peveling, R.; Stolz, I.; Bateman, R.; Attrignon, S.; Blaufords, S.; Arthur, S. and Lower , C.** 1999. Comparision of an organophosphate insecticides with amycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis*(Orthoptera: Acrididae) and other sahelian grasshoppers atan operational scale. Biocontrol Sci. and Technol..9:199-214.
- Latch, G.C.M. and Falloon, R.E.** 1976. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*.Entomophaga,21(1):39-48.
- Leles, R.N.; Sousa, N.; Rocha, L.F.; Santos, A.H.; Silva, H.H.G. and Luz, C.** 2010. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera:culicidae) Parasitol.Res.107:1271-1274.
- Li, D.P. and Holdom, D.G.** 1994. Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) J.Invert.Pathol. 63:209-211.
- Loc, N.T. and Chi, V.T.B.** 2005. Efficacy of some new isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against rice earhead bug , *Leptocoris acuta*. Omonrice.13:69-75.
- Lord, J.C. and Fukuda, T.** 1990. Aleptolegnia (Saprolegniales) pathogenic for mosquito larvae. J. Invert. Pathol.55:130-132.
- Lord, J.C. and Roberts, D.W.** 1985. Solute effects on zoospore motility and bioassay reproducibility. J. Invert.Pathol.46:160-165.
- Lord, J.C.; Fukuda,T. and Daniels, E.** 1988. Salinity tolerance of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) , a fungal pathogen of mosquito larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc.4:370-371.

- Lowe, R.E. and Kennel, E.W.** 1972. Pathogenicity of the fungus *Entomophthora coronata* in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes taeniorhynchus*. Mosq. News. 32: 614-620.
- MacGregor, M.E.** 1929. The significance of the PH in the development of mosquito larvae. Parasitol. 21:132-157.
- Mackay, K.T.** 1995. A comparative study of the ability of fish to catch mosquito larvae. Internat. Develop. Res. Center. 38:5-313.
- Mahmoud, M.F.** 2009. Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi ,*Beauveria bassiana* ,*Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of olive fly , *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the laboratory . Plant Protect. Sci. 45(3):98-102.
- Maniania, N.K. and Odulaja, A.** 1998. Effect of species ,age and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae* . Biocontrol. 43:311-323.
- Martignoni, M.E. and Milstead.** 1960. Quaternary ammonium compounds for the surface sterilization of insects . J. Insect Pathol. 2: 124-133.
- Matha, V.; Weiser, J. and Olejnicek, J.** 1988. The effect of tolypin on *Tolypocladium niveum* crude extract against mosquito and black fly larvae in the laboratory. Folia Parasitol. 35:379-381.
- Mc Cray, E.M.; Umphlett, C.J.; Fay, R.W.** 1973. Laboratory studies on anew fungal pathogen of mosquitoes . Mosq. News. 33: 54-60.
- Medlock, J.M. and Snow, K.R.** 2008. Natural predators and parasites of British mosquito—areview. J. of the Europ. Mosq. Contr. Assoc. 25:1-11.
- Mehdi, N.S. and Mohsen, Z.H.** 1989. Effect of insect growth inhibitor Isystin on *Culex quinquefasciatus* Say.(Diptera: culicidae) . Insect Appl. 10(1):29-33.
- Mer, G.** 1931. Notes on the bionomics of *Anopheles elutus*,Edw. (Diptera:culicidae) .Bull. Entomol. Res. 22:137-145.
- Merriam, T.L. and Axtell, R.C.** 1982. Evaluation of the entomogenous fungi *Culicinomyces clavisporus* and *Coelomomyces giganteum* for control of the salt marsh mosquito,*Aedes taeniorhynchus*. Mosq. News. 42:594-602.
- Metchnikoff, E.A.** 1880. Zur lehre über insektenkrankheiten. Zool. Anz. 3:44-47.
- Mietkiewski, R.; Tkaczuk, C.; Zurek, M.; Geest, L.P.S. and Van, D.** 1994. Temperature requirement of four entomopathogenic fungi. Acta Mycolgica. 29:109-120.
- Mnyone, L.L.; Russell,T.L.; Lyimo, I.N.; Lwetoijera, D.W.; Kirby, M.J. and Luzm, C.** 2009. First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* S.S and *An. Arabiensis*(Diptera: culicidae) . Parasites and Vectors. 1-4.

- Mohamed, A.K.A.; Pratt, J.P. and Nelson , F.R.S.** 1987. Compatability of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* with chemical pesticides . Mycopathologia . 99(20) : 99-105.
- Mohanty, S.S. ; Raghavendra, K.; Rai, U and Dash, A.P.** 2008. Efficacy of female *Culex quinquefasciatus* with entomopathogenic fungus *Fusarium pallidoroseum*. Parasitol. Res.103:171-174.
- Mohanty, S.S. and Prakash, S.** 2004. Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae . Curr. Sci. 86:323-325.
- Mohanty, S.S.; Raghavendra, K.K; Mittal, P.K. and Dash, A.P.** 2008. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.35: 1199-1202.
- Moorhouse, E.R.; Gillespie, A.T. and Charnley , A.K.** 1994. The influence of temperature of susceptibility of vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricins) (Coeloptera: curculionidae) , larvae to *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) . Appl. Biol.124:185-193.
- Moslim, R.; Kamarudin, N. and Wahid, B.** 2009. Pathogenicity of granule formulation of *Metarhizium anisopliae* against the larvae of the oil palm Rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (L.). J. of Oil Palm Res.21:602-612.
- Mulla, M.S.** 1991. Insect growth regulators for the control of mosquito pests and disease vectors. Chinese J. Entomol.6:81-91.
- Nadeau, M.P. and Boisvert, J.L.** 1994. Larvicidal activity of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the mosquito *Aedes triseriatus* and the black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) . J. Am. Mosq.Control Assoc.10: 487-491.
- Nuakumusana, 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 conidial infections in larval stages . Curr. Sci.5:1221-1228.
- Onyeka, J.O.A.** 1983. Studies on the natural predators of *Culex pipiens* L. and *Cx. torrentium* Martini(Diptera: culicidae) in England. Bull. Entomol. Res.73: 185-194.
- Pais, M.; Das, B.C. and Ferron , P.** 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae* . Phytochemistry. 20:715-723.
- Papierok, B. and Hajek, A.** 1997. Fungi : Entomophthorales. In: Lacey,L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego. 188-212.
- Pelizza, S.A.; Lopezlastra, C.C.; Becnel, J.J.; Bisaro, V. and Garcia, J.J.** 2007. Effects of Temperature , PH and salinity on the infection of

- Leptolegnia chapmanii* Seymour(Peronosporomycetes) in mosquito larvae . J. Invert. Pathol. 96:133-137.
- Petch, T.** 1935. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycologi. Socie.19: 161-164.
- Petersen, J.J. and Chapman, H.G.** 1970. Chemical characteristic of habitats producing larvae of *Aedes sollicitans* , *Aedes taeniorhynchus*, and *Psorophora confinnis* in Louisiana. Mosq. News.30;156-161.
- Petersen, J.J. and Chapman , H.G.** 1979. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis culicivorax* . J. Med. Entomol.15:468-471.
- Poinar, G.O.** 1975. Entomogenous nematodes leiden. En.J. Brill.
- Poinar, G.O.** 1979. Nematodes for Biological control of insects. Boca Raton, Florida.CRC Press.420pp.
- Priyanka, A and Prakash ,S.** 2001. *Chrysosporium tropicum* efficacy against *Anopheles stephensi* larvae in the laboratory . J. Am. Mosq. Control Assoc.17: 127-130.
- Quesada-Moraga, E.; Carrasco-Diaz, J.A. and Santiago-Alvarez, C.** 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep; Noctuidae) . J. Appl. Entomol.130: 442-452.
- Quiot, J.M.; Vey, A. and Vago, C.** 1985. Effects of mycotoxins on invertebrate cells invitro . Advan. in cell Res.4:203-212.
- Rachappa, V.; Lingappa, S. and Patil, R.K.** 2007. Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Karnataka J. Agric.Sci.20(2): 410-413.
- Ramoska, W.A.** 1982. An examination of the long – term epizootic potential of various artificially introduced mosquito larvae pathogens . Mosq. News. 42: 603-607.
- Ramoska, W.A. and Watts, H.A.** 1981. Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species . Mosq. News.41: 725-728.
- Rath, A.C.** 1992. *Metarhizium anisopliae* for control of the tasmanian pasture scarab *Adoryphorus couloni*. In: Jackson, T.A.; Glare, T.R(eds.) use of pathogens in scarab pest management. 217-228.
- Ravallec, M.; Riba, G. and Vey, A.** 1989. Sensibilite d'*Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) a l'hyphomycete entomopathogen *Metarhizium anisopliae* . Entomophaga.34:209-217.
- Renn, N.; Bywater, A.F. and Barson, G.** 1999. Abait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. J. Appl.Entomol.123(5): 309-314.
- Roberts, D.W.** 1966a. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* I production in submerged and surface cultures , and in inorganic and organic nitrogen media. J. Invert. Pathol.8: 212-221.

- Roberts, D.W.** 1966b. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* II. symptoms and detection in moribund hosts. J.Invert. Pathol.8: 222-227.
- Roberts, D.W.** 1967. Some effects of *Metarhizium anisopliae* and it's toxins on mosquito larvae . Insect Pathology and Microbial Control. Amsterdam. 43:243-246.
- Roberts, D.W.** 1970. *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. Miscellaneous publications of the Entomological Society of America.7:140-155.
- Roberts, D.W.** 1974. Fungal infections of mosquitoes . Mosq Contr.143-193.
- Samson, A.R.; Evans, H.C. and Latge, J.P.** 1988. Atlas of entomopathogenic fungi . Spring- Verlager.Berlin.187pp.
- Samuels, R.I.** 1998. A sensitive bioassay for destruxins , cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.Anais da Sociedade Entomologica do Brasil . 27:229-235.
- Samuels, R.I.; Charnley, A.K. and Reynolds, S.E.** 1988. Application of reversed – phase hplc in separation and detection of the cyclodepsipeptide toxins produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . J.Chromatogra. Sci.23:15-19.
- Sandhu, S.S.; Rajak, R.C. and Sharma, M.** 1993. Bioactivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as pathogens of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes aegypti* : Effect of instar, dosages and time. Indian Journal of microbiol.33:191-19V.
- 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.
- Scholte, E.J.; Knols, B.G.J.; Samson, R.A. and Takken , W.** 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control : areview.J. of Insect Sci.4:24pp.
- Scholte, E.J.; Njiru, B.N.; Smaliegange, R.C.; Takken, W. and Knols, B.G.J.** 2003a. Infection of malaria(*Anopheles gambiae* S.S) and filariasis(*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Malaria Journal.2:1-10.
- Scholte, E.J.; Takken, W. and Knols, B.G.J.** 2003b. Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae* S.S (Diptera: Culicidae) mosquitoes.Netherlands Entomological Society.14:25-29.
- Scholte, E.J.; Takken, W. and Knols, B.G.J.** 2007. Infection of adults *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Acta Trop.102:151-158.
- Service, M.W.** 1967. *Tachydromia spp.*(Diptera: Empididae) as predators of adult anopheline mosquitoes. Entomologists Monthly Magazine.104: 250-251.

- Service, M.W.** 1993. Mosquitoes (culicidae) . IN: Lane, R.P. and Crosskey, R.W.(eds) Medical Insects and Archnids. Chapman and Hall, London. 120-240.
- Seymour, R.L.** 1984. *Leptolegnia chapmanii* , an Oomycete pathogen of mosquito larvae. Mycologia.76:670-674.
- Silva, A.M.M.; Borbia, C.M. and Oliveira, P.C.** 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time . Mycoses.37: 165-169.
- 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.
- Skrobek, A.; Shah, F.A. and Butt, T.M.** 2008. Destruxins production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation . Biocontrol.53: 361-373.
- Sloman, I.S. and Reynolds , S.E.** 1993. Inhibition of ecdysteroid secretion from Manduca prothoracic glands in vitro by destruxins – cyclic depsipeptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Insect Biochem and Molecu. Biol.23:43-46.
- Soares, Jr.G.G.** 1982.Pathogenesis of infection by the hyphomycetous fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Diptera: culicidae) . Entomophaga.27: 283-300.
- Springer, J.P.; Cole, R.J.; Dorner, J.W.; Cox, R.H.; Richard, J.L.; Barnes, C.L. and Vander Helm, D.** 1984. Stucture and conformation of roseiotoxin . J. Am. Chemi.Soci.106:2388-2392.
- St.leger, R.J.; Goettel, M.S.; Roberts , D.W. and Staples, R.C.** 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae* . J. Invert.Pathol.58: 168-179.
- Subra, R.** 1983. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: culicidae) with special reference to Africa Insect . Sci. Appli.1: 314-338.
- Sung, G.H.; Hywel-Joues, N.L.; Sung, J.M.; Luangsa-ard, J.J.; Stresh tha, B. and Spatafora, J.W.** 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and Clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology.57:5-59.
- Sung, J.M.; Lee, H.K.; Yoo, Y.J.; Choi, Y.S.; Kim, S.H.; Kim, Y.O. and Sung, G.H.** 1995. Classification of *Cordyceps* sp. by morphological characteristics and protein binding pattern. Korean J. Mycol.23:92-104.
- Suzuki, A. and Tamura, S.** 1972. Isolation and structure of protodestruxin from *Metarhizium anisopliae* . Agri. and Biol.Chemi.36:896-898.
- Suzuki, A.; Kawakami, K. and Tamura, S.** 1971. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarhizium anisopliae* . Agri. and Biol. Chemi..35: 1641-1643.
- Suzuki, A.; Taguchi, H. and Tamura, S.** 1970. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxin C

- and D and desmethyldestruxin B produced by *Metarhizium anisopliae* . Agri.and Biol. Chemi.. 34: 813-816.
- Sweeney, A.W.** 1978.The effects of salinity on the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces* . Austral. J. of Zool.26:47-53.
- Sweeney, A.W. and Panter, C.** 1977. The pathogenicity of the fungus *Culicinomyces* for mosquito larvae in a natural field habitat . J. of Medic. Entomol.4: 495-496.
- Tajick Ghanbari, M.A.; Asgharzadeh, A.; Hadizadeh, A.R. and Mohammadi Sharif, M.** 2009. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils . Am. J. Agric.& Biol. Sci. 4(2): 152-155.
- Tedders, W.L.; Weaver, D.J.; Wehunt, E.J. and Gentry, C.R.** 1982. Bioassay of *Metarhizium anisopliae* , *Beauveria bassiana* and *Neoaplectana carpopcapsae* against the larvae of the plum curculio, *Conotrachelus uenuphar*(Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) . Environ.Entomol.11: 901-904.
- Ujjan, A.A. and Shahzad, S.** 2007. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae var acridium* strains on pink hibiscus mealy bug (*Maconellicoccus hirsutus*) affecting cotton crop. Pak. J. Biol.39(3): 967-973.
- Venkatsubbaiah, P.; Tisserat, N.A. and Chilton , W.S.** 1994. Metabolites of *Ophiophaerella herpotricha*. Mycopathologia.128: 155-159.
- Verma, P. and Prakash, S.** 2010. Efficacy of *Chrysosporium tropicum* metabolite against mixed population of adult mosquito (*Culex quinquefasciatus* , *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*) after purification with flash chromatography. Springer-Verlag.107: 163-166.
- Vijayan, V. and Balaraman, K.** 1991. Metabolites of fungi and actinomycetes active against mosquito larvae. Indian J. Med. Res.93:115-117.
- Vilcinskas, A.; Matha, V. and Gotz, P.** 1997a. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. of Insec. Physiol. 43: 1149-1159.
- Vilcinskas, A.; Matha, V. and Gotz, P.** 1997b. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. J.of Insec. Physiol.43: 475-483.
- Vyas, N.; Dua, K.K. and Prakash, S.** 2006. Laboratory efficacy of metabolites of *Lagenidium giganteum* (Couch) on *Anopheles stephensi* (Liston) after filtration by column chromatography . J. Commun Dis.38: 176-180.
- Vyas, N.; Dua, K.K. and Prakash, S.** 2007. Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to non target organisms . Parasitol. Res.101:385-390.

- Wahlman, M. and Davidson, B.S.** 1993. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. of Natural Products.56: 643-647.
- Weibin, S.H.I. and Mingguang, F.E.** 2004. Ovicidal activity of two fungal pathogens(Hyphomycetes) against *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina: Tetranychidae) . Chinese Sci. Bull.49(3): 263-267.
- WHO.** 1975. Technical report services No.561
- WHO.** 1980. Data sheet on the biological control agent(1). *Metarhizium anisopliae*.
- WHO.** 1989. Geographical distribution of arthropod – borne diseases and their principal vectors.
- WHO.** 2007. Global plan to combat neglected tropical disease.
- Wilson, M.L.; Agudelo-silva, F and Spielman, A.** 1990. Increased abundance , size, and longevity of food – deprived mosquito populations exposed to a fungal larvicide. Am.J. Trop. Med. Hyg.43:551-556.
- Wright, V.F.; Vesonder, R.F. and Ciegler, A.** 1982. Mycotoxins and other fungal metabolites as insecticide. In: Kurstak, E. (ed.) microbial and viral pesticides . Marcel Dekker.580pp.
- Yadav, J.S.** 2009. Centre for bioinformatics vector control. Environmental information system.India.1-5.
- Yeh, S.F.; Pan, W.; Ong, G.T.; Chiou, A.J.; Chuang, C.C.; Chiou, S.H. and Wu, S.H.** 1996. Study of structure-activity correlation in destruxins , a class of cyclodepsipeptide possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells .Biochem and Biophys. Res. Communica.229: 65-72.
- Zacharuk, R.Y.** 1971. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae(Coleoptera) .IV. Development within the host . Canadian J. of Microbiol . 17: 525-529.

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University Of AL-Qadisiya

College of Science



**Evaluation of efficacy of the fungus *Metarhizium anisopliae*
(Metsch.) Sorok. on the control of two species of mosquitoes
(Diptera:Culicidae) in AL-Diwaniya province**

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

Ahmed Khanm Norri AL mhna

Supervision by

Assit. Prof. Dr. Mohammed R, Annon

1432

2011