وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae) باستخدام الفطر المضاد *Entomophthora muscae*(Cohn)

رسالة تقدم بها حسين رياض محمود المشهداني

الى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

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

بإشراف

أ.م.د محمد رضا عنون

١٤٣١ هـ **٢٠١٠ م**

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ (**المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية *Musca domestica* L.(Diptera : Muscidae) باستخدام الفطر المضاد *Entomophthora muscae*(Cohn)**) قد أعدها حسين رياض محمود المشهداني

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

التوقيع:
الأسم : الدكتور محمد رضا عنون
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسيه
التاريخ : / / ٢٠١٠

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشاره إلى التوصيه ألمقدمه من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الدراسة إلى المقومين اللغوي والعلمي لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الأسم : د. عبد الأمير سمير سعدون
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسيه
التاريخ : / / ٢٠١٠

إقرار المقوم اللغوي

أشهد إنه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالب حسين رياض محمود المشهداني الموسومة بـ(**المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية : *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae) باستخدام الفطر المضاد *Entomophthora muscae*(Cohn)**).

التوقيع:
الأسم: د.
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية التربية / جامعة القادسية
التاريخ: / /٢٠١٠

المحتويـــات

العنـــــــوان	الصفحـة
١ – المقدمة 1ntroduction	1
٢ – استعراض المراجع Literatures Review	٣
٢–١ الذبابة المنزلية *Musca domestica L.*	٣
٢–٢ الأهمية الطبية والبيطرية	٣
٢–٢–١ نقل المسببات المرضية	٤
٢–٢–٢ الذبابة المنزلية كمسبب للأمراض	٥
٢–٣ طرق المكافحة	٥
٢–٣–١ المكافحة البيئية	٥
٢–٣–٢ المكافحة الكيميائية	٥
٢–٣–٣ المكافحة الوراثية	٦
٢–٣–٤ المكافحة باستخدام منظمات النمو الحشرية	٦
٢–٣–٥ المكافحة الحيوية	٦
٢–٤ الفطريات الممرضة للحشرات	٧
٢–٤–١ الرتبة *Entomophthorales*	7
٢–٤–٢ نبذة مختصرة عن الفطر *Entomophthora muscae*	١٠
٢–٤–٣ تصنيف الفطر *E.muscae*	١٠
٢–٤–٤ أعراض الإصابة بالفطر *E.muscae*	١١
٢–٤–٥ آلية الإصابة بالفطر *E.muscae*	11

٢-٤-٦ دور الفطر *E.muscae* في السيطرة الحيوية	١٢
٢-٥ تأثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر *E.muscae* في المكافحة الحيوية.	١٣
٢-٥-١ درجات الحرارة والرطوبة	13
٢-٥-٢ بعض المبيدات الحشرية والفطرية	١٤
٣- المواد وطرائق العمل Materials and Methods	١٥
العنـــــــوان	**الصفحـة**
٣-١ الأجهزة والأدوات والمواد	15
٣-١-١ الأجهزة	١٥
٣-١-٢ المواد	١٥
٣-١-٣ الأدوات	١٦
٣-٢ إعداد مزرعة الذبابة المنزلية	١٧
٣-٣ الأوساط الزرعية	17
٣-٤ خطوات عزل الفطر *E.muscae*	١٩
٣-٤-١ جمع الحشرات المصابة	١٩
٣-٤-٢ عزل الفطر *E.muscae* خارج الجسم الحي In vitro	١٩
٣-٤-٣ تشخيص ووصف الفطر *E.muscae*	٢١
٣-٤-٤ حفظ عزلة الفطر *E.muscae* خارج الجسم الحي In vitro	٢١
٣-٥ عزل وحفظ الفطر *E.muscae* في الجسم الحي In vivo	٢١
٣-٦ الطرائق المتبعة لدراسة تأثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر *E.muscae* في المكافحة الحيوية	٢٢
٣-٦-١ تأثير درجات الحرارة والرطوبة	22
٣-٦-٢ تاثيربعض المبيدات الحشرية والفطرية	23
٣-٧ اختبار قدرة الفطر *E.muscae* على إنتاج بعض إنزيمات التحلل بوساطة كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC.	24
٣-٨ تحضير معلق البوغي	26
٣-٩ الاختبار الحيويBioassy	٢٦
٣-٩-١ الاختبار الحيوي للفطر *E.muscae* في مختلف ادوار حياة الذبابة	٢٧

المنزلية	
٣-٩-١-١ البالغة	٢٧
٣-٩-١-٢ البيضة	٢٧
٣-٩-١-٣ الأطوار اليرقية	٢٨
٣-٩-١-٤ العذراء	٢٨

العنـــــــوان	الصفحــة
٣-٩-١-٥ عمر وجنس البالغة	٢٨
٣-٩-٢ تحضير راشح الفطر *E.muscae*	٢٨
٣-٩-٢-١ تأثير راشح الفطر *E.muscae* في بالغات الذبابة المنزلية	٢٩
٣-١٠ التحليل الإحصائي	٢٩
٤- النتائج والمناقشة Results and Discussion	٣٠
٤-١ الأوساط الزرعية	30
٤-١-١ عزل ووصف وتشخيص الفطر *E.muscae*	٣١
٤-١-٢ عزل الفطر *E.muscae* في الجسم الحي In vivo	32
٤-٢تاثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر *E.muscae* في المكافحة الحيوية	٣٣
٤-٢-١ تأثير درجات الحرارة والرطوبة	33
٤-٢-٢ تأثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية	36
٤-٣ اختبار قدرة الفطر *E.muscae* على إنتاج بعض إنزيمات التحلل بوساطة كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC	٣٨
٤-٤ الاختبار الحيويBioassay للفطر *E.muscae* في مختلف ادوار حياة الذبابة المنزلية *Musca domestica*	41
٤-٤-١ البالغة	41
٤-٤-٢ البيضة والأطوار اليرقية والعذراء	44
٤-٤-٣ جنس وعمر البالغة	٤٥
٤-٤-٤ تأثير راشح الفطر *E.muscae* في بالغات الذبابة المنزلية	٤٧
الاستنتاجات	٤٩
التوصيات	٥٠
المراجع العربية	٥١
المراجع باللغة الانكليزية	٥٣

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنــوان	الصفحـة
جدول (٢-١)	بعــض أنــواع الجــنس *Entomophthora* ومضائفها	٩
جدول (٣-١)	بيانات أساسية عن المبيدات المستخدمة	٢٤
جدول (٤-١)	تـأثير درجـات الحـرارة والرطوبـة فـي النمـو الشعاعي للفطر *E.muscae*	٣٤
جدول (٤-٢)	تأثير معلقات الفطر *E.muscae* في بالغات الذبابة المنزلية	٤٣
جدول(٤-٣)	تأثير معلق الفطر $5x10^5$ بوغ / مل *E.muscae* في عمر وجنس الذبابة المنزلية	٤٦
جدول(٤-٤)	تـأثير راشـح الفطـر *E.muscae* فـي بالغـات الذبابة المنزلية	٤٨

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنــوان	**الصفحــة**
(٢-١)	عائلات وأجناس الرتبة *Entomophthorales*	٨
(٢-٢)	ذبابة مصابة بالفطر *E.muscae*.	١١
(٢-٣)	دورة حياة الفطر *E.muscae*	١٢
(3-1)	عزل الفطر *E.muscae* بطريقة الابواغ النازلة	٢٠
(3-2)	عــزل الفطــر *E.muscae* بطريقــة الابــواغ الصاعدة	٢١
رقم الشكل	العنــوان	**الصفحة**

(٣-٣)	عزل الفطر *E.muscae* في الحي	٢٢
(٣-٤)	مجفف وبداخله جهاز قياس الرطوبة النسبية watch hygrometer	٢٣
(٣-٥)	جهاز كرومتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي HPLC	٢٥
(٤-١)	مستعمرة الفطر *E.muscae* على الوسط الزرعي (ECM)بعمر خمسة أيام	٣٢
(٤-٢)	مستعمرة الفطر *E.muscae* على الوسط الزرعي (ECM) بعمر شهر واحد	٣٢
(٤-٣)	صورة مجهرية للفطر *E.muscae* تحت قوة تكبير 400X	٣٢
(٤-٤)	تأثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية في نمو الفطر *E. Muscae*	٣٨
(٤-٥)	تراكيز إنزيمات التحلل الرئيسة التي يفرزها الفطر *E. Muscae*	٤٠
(٤-٦)	بيانات كروموتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC	٤٠
(٤-٧)	الزمن اللازم لهلاك نصف العدد من بالغات الذبابة المنزلية(LT50)	٤٣
(٤-٨)	التركيز اللازم لهلاك نصف العدد من بالغات الذبابة المنزلية (LC50)	٤٤
(٤-٩)	تأثير معلق $1x10^5$ بوغ/مل الفطر *E. muscae* في الأدوار غير البالغة للذبابة المنزلية	٤٥

المراجع العربية

أبو الحب ، جليل كريم. ١٩٧٩. الحشرات الطبية والبيطرية في العراق (الجزء النظري). كلية الزراعة / جامعة بغداد. ٤٥٠ صفحة.

الجبوري , دينا حسين هاتف . ٢٠٠٣ . دراسات مختبرية حول استخدام رواشح بعض الفطريات كطعوم سامة لمكافحة حشرة الذباب المنزلي *Musca domestica L.* (Dipetra:Muscidae).رسالة ماجستير- كلية الزراعة/ جامعة الكوفة .

الحسيني ، مع الله تركي علوان. ٢٠٠٣. تأثير مستخلصات نبات الحرمل *Pegnum harmala* في بعض جوانب الأداء الحياتي للذبابة المنزلية *Musca domestica*. رسالة ماجستير - كلية العلوم / جامعة الكوفة.

العارضي ، جبار عبادي محمد. ٢٠٠٥. تأثير مستخلصات أوراق نبات الياسمين الزفر *Clerodendrum inerme* في بعض جوانب الأداء الحياتي للذبابة المنزلية *Musca domestica*. رسالة ماجستير - كلية العلوم / جامعة الكوفة.

العيسي , رافد عباس علي.١٩٩٩ .تاثير منظمي النمو Methoprin وMatch على حياتية بعوض *Culex molestus* و*Culex quinquefasciatus* . رسالة ماجستير- كلية الزراعة/جامعة بغداد.

العادل ، خالد محمد وعبد ، مولود كامل. ١٩٧٩. المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات. كلية الزراعة / جامعة بغداد – دار الكتب للطباعة والنشر. ٣١٣ صفحة.

الزبيدي ، حمزة كاظم. ١٩٩٢. المقاومة الحيوية للآفات. دار الكتب للطباعة والنشر / الموصل. العراق. ٤٤٠ صفحة.

الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز. ٢٠٠٠. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. الطبعة الثانية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.٤٨٨ صفحة.

الربيعي ، هادي مزعل. ١٩٩٩. تأثير مستخلصات نبات الداتورة *Datura inoxia* في بعض جوانب الأداء الحياتي للذبابة المنزلية *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). أطروحة دكتوراه – كلية العلوم / جامعة بابل.

ألناشي , ليلى جاسم شعيبث . ٢٠١٠ . دراسة تأثير بعض مبيدات الادغال على الفعالية التضادية للفطر *Trichoderma harzianum* اتجاه بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة و الرز في محافظة القادسية. رسالة ماجستير - كلية العلوم/جامعة القادسية .

تويج , نبيل سليم سعيد.٢٠٠٢ انتاج مبيد حيوي من لقاح الفطر Beauveria bassiana لمكافحة حشرة من الخوخ الاخضرMyzus persicae . رسالة ماجستير- كلية العلوم/ جامعة الكوفة

خلف ، جنان مالك. ١٩٩٥. المقاومة الحيوية للذبابة المنزلية .*Musca domestica* L) Diptera: Muscidae) باستخدام الفطريات. رسالة ماجستير – كلية الزراعة / جامعة البصرة.

خلف,جنان مالك ومجيد متعب وسمير خلف عبد الله.١٩٩٧ .استخدام بعض العزلات الفطرية في السيطرة على يرقات الذبابة المنزلية.*Musca domestica* L مختبرياً.مجلة البصرة للعلوم الزراعية.١٠(٢):٢٩-٣٠ .

سليط ,علي محمد ,زهير يونس الصفار ورياض احمد العراقي.١٩٨٤ .المرشد إلى علم الحشرات الطبية.مترجم .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.جامعة الموصل.

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

عبد الفتاح ، نهاد مصطفى. ١٩٨٩. تأثير درجات الحرارة الثابتة والمتبادلة والرطوبة النسبية في نمو وبقاء وتكاثر الذبابة المنزلية .*Musca domestica* L. رسالة ماجستير- كلية العلوم / جامعة بغداد.

عبد الأمير ، كوكب. ١٩٨١. التحري عن بعض النباتات العراقية الحاوية على مواد سامة أو جاذبة أو طاردة للحشرات. رسالة ماجستير – كلية الزراعة / جامعة بغداد.

هرمز ، فريال بهجت. ٢٠٠٣. تطور المقاومة في بعض سلالات الذبابة المنزلية *Musca domestica L.(Diptera :Muscidae)* لمبيدي permethrine , azamethiphos في منطقة بغداد رسالة ماجستير , كلية الزراعة / جامعة بغداد.

١ – المقدمة Introduction

عدت الذبابة المنزلية .*Musca domestica L* من الحشرة المنزلية والصحية المهمة واكتسبت اسمها الشائع هذا بسبب ملازمتها للإنسان , وتكاد لا تخلو منها جميع البيئات النظيفة والقذرة على حد السواء وفي كل إرجاء المعمورة · تقاسمت مع البعوض موقع العدو الأول للإنسان فهي ناقل ميكانيكي لما يزيد عن مائة مسبب ممرض منها ما يسبب الأوبئة مثل الكوليرا والتيفوئيد (Olsen & Hammack,2000) , كما إن وجودها بأعداد كبيرة قرب حقول الدواجن يؤدي إلى انخفاض إنتاجية تلك الحقول من اللحم والبيض بسبب الإزعاج الذي تسببه هذه الحشرة للدواجن ومما زاد الأمر سوءاً قصر دورة حياتها وخصوبتها العالية (Ogg , 2007).

لقد بات معروفاً بان أغلب طرائق المكافحة قد استخدمت ضد هذه الآفة ولكنها كانت محدودة في تأثيرها وعلى الرغم من إن المبيدات الكيميائية الحشرية تعطي نتائج سريعة إلا إن الاستعمال المفرط وعدم إتباع الأسلوب العلمي قد أدى إلى خلق مشاكل هددت البيئة بكاملها ناهيك عن ظهور المقاومة في

الحشرة (Georghiou , 1990) , مما دفع الباحثين لإيجاد بدائل أخرى إحداها استخدام الأحياء المجهرية الممرضة للحشرات Entomopathogenic micro-organisms , إذ تميزت أغلب هذه الأحياء بأنها مساوية لتأثير المبيدات الكيميائية في القضاء على الحشرة وأمينة من الناحية البيئية علاوة على بقائها لفترة 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 نجاحاً ملحوضاً في مجال المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية مثل الفطر *Beauveria bassiana*(Bals.) و(Bas.) *B.tenella* (Alliey,1966) في النرويج والدنمارك و*Metarrhizium anisopliae*(Metch.) في الاتحاد السوفيتي (Barson *et al*., 1994).

عد الفطر *Entomophthora muscae* (Cohn) من الفطرياتالاجبارية obligate parasite على الذباب المنزلي لذلك فقد حظي باهتمام واسع فضلاً عن إصابته لعدد كبير من الحشرات التي تعود إلى رتبة ثنائية الأجنحة (Macleod *et al* ., 1976)

أنصبت الدراسات السابقة في العراق بخصوص مكافحة هذه الحشرة على استخدام التشعيع (Kaddou,1966) وتأثير بعض المبيدات الكيميائية (هرمز,٢٠٠٣) ونال تأثير المستخلصات النباتية على هذه الحشرة الاهتمام الأكبر (عبد الأمير, ١٩٨١; الربيعي , ١٩٩٩؛ الزبيدي ,٢٠٠٠ ؛ الحسيني , ٢٠٠٣ ؛ العارضي , ٢٠٠٥) واتضح بأن الأبحاث في مجال المكافحة الجرثومية لهذه الحشرة نادرة جداً وخاصة فيما يتعلق بعزل المسببات الممرضة للحشرة واستخدامها عاملا حيوياً لمكافحتها (خلف وآخرون, ١٩٩٥) ولعل ذلك يرجع إلى صعوبة عزل هذه الممرضات وخاصة الفطر *E.muscae* , إذ تبين إن عزله يتطلب استخدام أوساط زرعية معقدة Complex media لذلك فهذه هي الدراسة الأولى من نوعها في العراق التي هدفت إلى :

١- تحديد الوسط الملائم لعزل وحفظ الفطر *E. muscae* في الانابيب Invitro.

٢- عزل وحفظ الفطر في الجسم الحي Invivo .

٤- تأثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر في المكافحة الجرثومية مثل درجة الحرارة والرطوبة و بعض المبيدات الحشرية والفطرية .

٣- استخدام تقنية HPLC للتحري عن الإنزيمات الفعالة في راشح الفطر .

٥- الاختبار الحيويBioassay وشمل

A- تاثيرتراكيز مختلفة لمعلقات الفطر في مختلف أدوار حياة الذبابة المنزلية(البيضة- اليرقة- العذراء- البالغة) وتحديد قيمة LC_{50} و LT_{50}.

B- الاختبار الحيوي لمعلق الفطر في جنس وعمر البالغات.

C- تأثير تراكيز مختلفة من راشح الفطر في بالغات الحشرة.

٢ – استعراض المراجع Literatures Review

٢-١ الذبابة المنزلية *Musca domestica L.*

انفردت هذه الحشرة بانتشار واسع اذ ماقورنت بأنواع الذباب الأخرى من رتبة ثنائية الأجنحة (Order : Diptera) . تنتمي هذه الحشرة إلى عائلة Muscidae وهي إحدى العائلات الرئيسة في سلسلة الذباب المقنع Schizophora من مجموعة الذباب المقنع ذو الاغلفة الجناحية Calyptera في رتيبة قصيرة اللوامس الارستية Cyclorrhapha (أبو الحب ،١٩٧٩).

تعد الذبابة المنزلية من الحشرات ذات التحول الكامل Holometabolus . تضع الأنثى بيضها ذا الشكل الاسطواني أو البيضوي في أكوام القمامة والسماد الحيواني . يتراوح عدد البيض ١٢٠-١٥٠ بيضة في كل مرة , و تفقس عن يرقات دودية الشكلvermiform متحركة وعديمة الأقدام Apodous مزودة بزوج من الفكوك يعملان بصورة عمودية وتمر بثلاثة أطوار لتتحول إلى عذراء غير متحركة مستورة داخل الجلد اليرقي الأخير puparium (Sanchez -Arryo,1998) , أما البالغة فهي رمادية اللون تمتلك زوجاً واحداً من الأجنحة, أما الزوج الثاني فهو متحور إلى عضو التوازن Halters ويكون العرق الطولي الرابع في الجناح الأمامي منحنياً للأعلى, وهذه الصفة يعتمد عليها في تميز الذبابة المنزلية عن الأنواع الأخرى من الذباب (Hewitt , 1910) . يمكن التميز بين الجنسين من خلال المسافة بين العيون المركبة إذ تكون عريضة Dicoptic في الأنثى ومتلاصقة في الذكر Holoptic فضلاً عن كبر حجم الأنثى (Sanchez-Arryo ,2007) . تنضج الأنثى جنسياً بعد يومين أو ثلاثة أيام من خروجها من العذراء وتلقح مرة واحدة , أما الذكر فيتزاوج مع عدة إناث و أفضل أوقات تكاثرها من شهر نيسان إلى النصف من تشرين الأول (Kelling , 2001).

تمتص البالغات غذائها بوساطة أجزاء فمها الأسفنجية من السوائل النظيفة أو القذرة كافة ، إذ لا تميز بينها ومن عاداتها التقيؤ ولا يعرف سبب ذلك وربما لمزج الغذاء الأمر الذي جعلها عاملاً مهماً في نقل الأوبئة و المسببات الممرضة (Donald , 2001) .

٢ - ٢ الأهمية الطبية والبيطرية

تساهم الذبابة المنزلية بدور كبير في وبائية بعض الأمراض وخاصة الجرثومية منها لأنها تساعد على نقلها ونشرها وان كانت تلك الأمراض تنتقل بطرائق أخرى مثل الماء والغذاء والملامسة وتنقل هذه الحشرة الأمراض ميكانيكياً بالأرجل وأجزاء الفم والشعيرات الكثيفة على الجسم إثناء ارتياد هذه الحشرة

لمختلف المواطن الموبؤة بتلك المسببات ولعل أبرزها فضلات وغوائط الإنسان والحيوان ، وتنحصر الأهمية الطبية و البيطرية لهذه الحشرة في محورين :

٢-٢-١ نقل المسببات المرضية الآتية:

أ) مسببات الأمراض البكتيرية مثل: *Vibrio cholerae* و *Shigella sp* و *Staphylococcus aureus* و *Bacillus anthracis* و *Salmonella typhi* و *Helicobacter pylori* و *Morganella morganii* و *Yersinia pseudotuberculosis* و *E.coli 157H* و *Streptococcus faecalis* و *S.pyogens* و *Pseudmonas auriginosa* والمسؤولة عن تسبيب أمراض الكوليرا والزحار العصوي والتسمم الغذائي العنقودي والجمرة الخبيثة وحمى التيفؤيد والقرحة والالتهابات بعد العمليات الجراحية وإصابات الدواجن بالإضافة إلى الإصابات البشرية وإصابات الأبقار والتهاب المجاري البولية والحمى القرمزية والإصابات الانتهازية بالتعاقب (Gangrosa & Beisel, 1960; Greenberg, 1971;Greenberg,1973; Grubel *et al*., 1997 ;Gebhart-Muller et al.,1998; Aleksic & Bokemmuhi , 1999 ; Saski *et al*., 2000 ; Banjo *et al.* , 2005)

ب) مسببات الأمراض الفطرية مثل *Microsporum gypseum* و *Trichophyton mentagrophytes* اللذان يسببان أمراض جلدية للإنسان (Zarrin *et al* ., 2006).

ج) مسببات الأمراض الفيروسية مثل فيروس شلل الأطفال poliomyelitis وفيروس التهاب الكبد Hepatitis A+ B وفيروس التهاب ملتحمة العين Conjunctivitis والتراخوما Trichoma وفيروس التهاب الضرع عند الأبقار Bovine mastitis (Gough & Jongerson , 1983).

د) أكياس بعض الطفيليات الابتدائية Protozoa مثل *Entaemoeba coli* و *E. histolytica* و *Giardia lamblia* و *G. intestinalis* وأكياس بعض الديدان المعوية مثل الديدان المسطحة (*Ascaris*) والديدان الشريطية (*Taenia* و*Dipylidium*) والديدان الدبوسية (*Enterobius*) (Dipeolu ,1977).

هـ) الريكتسيا مثل *Coxinella brunette* التي تسبب حمى كيو Q fever في الحيوانات البرية والدا جنة (Hucko , 1984) .

٢-٢-٢ الذبابة المنزلية كمسبب للأمراض

تسبب يرقات هذه الحشرة حالات التدويد العرضي Myiasis بشكل عرضي وتسبب البالغات الإزعاج والمضايقة للإنسان والحيوان وخاصةً في حقول الدواجن مما يسبب خسائر اقتصادية كبيرة من جراء انخفاض إنتاجية تلك الحقول من اللحم والبيض (Keiding ,1986; Axtell&Arends, 1990) .

2 - 3 طرق المكافحة

يمكن تلخيص طرائق مكافحة نواقل الأمراض ومنها الذباب حسب ما تضمنه التقرير الحادي والعشرون الذي أعدته لجنة خبراء منظمة الصحة العالمية للمبيدات الكيميائية (WHO , 1975) بما يأتي:

٢-٣-١ المكافحة البيئية

إن تحسين البيئة في المناطق الحضرية والريفية على السواء هو الأساس في القضاء على نواقل الأمراض وقد يؤدي إلى مكافحة دائمة لها وفي هذا الإطار تعد عمليات القضاء على أماكن التوالد من الإجراءات الكفيلة بتقليل الاتصال بين الإنسان ونواقل الأمراض وان انجح طرائق مكافحة الذباب هو إتباع الشروط الصحية والوقائية لمنع تكاثر الذباب منها النظافة وانجاز وتعميم استخدام دورات المياه الصحية في الريف والمدينة (WHO , 1975) .

٢-٣-٢ المكافحة الكيميائية

منذ اكتشاف DDT عام ١٩٣٩ أصبح الاعتماد كاملاً على المبيدات الكيميائية في برامج المكافحة , إذ أدى النجاح الكبير الذي حققته هذه المبيدات إلى تطوير صناعة مبيدات أخرى مثل الكلوردين Chloridane واللندين lindane ومبيدات الفسفور العضوية كمبيد trichorfon و Dimethoat و idioferphos و bromophos و Azamethiphos (keiding&Skovoman,1983) ومبيدات الكارباميت مثل propoxur و dioxacard و methomyl و dimetholion و Mancozeb (Rupes *et al.*, 1983) و المبيدات البيروثرودية مثل bioresmethrinوpermethrin و deltamethrine (Keiding , 1978) والتي مالبث ان ظهرت المقاومة تجاهها كما في DDT , إذ تم تسجيل ١٠٨ نوعاً من المفصليات ذات الأهمية الطبية ومنها الذبابة المنزلية مقاوماً بشكل عال للعديد من المبيدات فضلاً عمّا تسببه هذه المبيدات من أضرار صحية وبيئية للكائنات الحية (Keiding,1986).

٢-٣-٣ المكافحة الوراثية

تتضمن هذه الطريقة أحد الأسلوبين الأول يتضمن مكافحة سكان الحشرة وخفضها والقضاء عليها عن طريق إطلاق حشرات عقيمة بإعداد كافية للتغلب على قدرة الإخصاب في المجتمع الطبيعي للحشرة أما الاسلوب الثاني فيتضمن إطلاق حشرات تمتلك مناعة قوية للإصابة بمسببات الأمراض في البيئة على أمل أن تتنافس بنجاح مع المجتمع الطبيعي للحشرة وتحل محلها تدريجيا (Anantiko *et al.*,١٩٨٢).

٢-٣-٤ المكافحة باستخدام منظمات النمو الحشرية

يعد استخدام منظمات النمو الحشرية من الوسائل الحديثة في مكافحة الذبابة المنزلية وأطلق عليها مبيدات الجيل الثالث (العيسى ، ١٩٩٩) ،وتقسم إلى ثلاثة أقسام اعتماداً على آلية العمل هي هرمونات الصبا Juvenile hormones ومثبط تخليق الكايتين Diflobenzeuron وهرمون cryomazin ، حيث تمتلك مواد تعيق أو توقف نمو الحشرة وتكون ذات سمية نوعية عالية, اذ تشابه في تركيبها الكيمائي بعض المركبات الطبيعية المهمة في جسم الحشرة ولكن أبدت الذبابة المنزلية مقاومة في المناطق التي استخدمت فيها (Shen & Palp , 1990) .

٢-٣-٥ المكافحة الحيوية

تتضمن هذه الطريقة استخدام الأعداء الحيوية من مفترسات ومتطفلات وديدان وأحياء مجهرية لمكافحة الذبابة المنزلية :

أ. المفترسات predators

يعد حلم *Machrocheles muscadomesticae* و *M. glabor*) Acari : Machrochilidae) وخنافس *Pumolio carcinops* و*Gnathorncus nanus* (Coleoptera : Histeridae) ويرقات *Ophyra capensis* و *Hyarotaea anescens* (Diptera : Muscidae) مفترسات فعالة ضد بيوض ويرقات هذه الحشرة (Axtell , 1970 ; Statford & Bay , 1994) .

ب. المتطفلات Parasitoids

أدى أطلاق أعداد كبيرة من الزنابير الطفيلية مثل *Spalangia nigro* و *S. cameroni* و *Mucidifurx raptor* و *Nosonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae) إلى خفض أعداد الذبابة المنزلية جراء تطفلها على عذارى هذه الحشرة (King , 1997 ; Greene *et al* ., 1989)

ج. الديدان الممرضة للحشرات Entomopathogenic nematode

حققت بعض الأنواع من هذه المجموعة مثل *Paraiotonchium muscadomesticae* (Nematoda : Itonchilidae)) و *Steinernema feltiae* و (Nematoda : Steinernematidae) و *Heterohabditis megidis* (Nematoda : Heterohabditidae) نجاحاً في مكافحة يرقات الذبابة المنزلية (Geden,1997; Renn , 1998)

د. الأحياء المجهرية الممرضة للحشرات Entomopathogenic micro-organisms

تتعرض الذبابة المنزلية كباقي الحشرات للعدوى بمختلف الأمراض والتي تسببها الأحياء المجهرية ومن الطبيعي ان تكون الأحياء الأكثر شيوعاً للاستخدام في مجال المكافحة الجرثومية هي تلك التي تسبب الأوبئة Epizootics والتي تظهر قدرة عالية عند استخدامها ولعل أشهر الأمثلة على ذلك استخدام بكتريا *Bacillus thuringensis* لمكافحة هذه الحشرة (Jongerson keiding,1990 &) وعند التقصي في شبكة المعلومات العالمية حول استخدام الفيروسات والريكتيسيا لمكافحة الحشرة فلم نجد مايشير إلى ذلك وأظهرت نتائج التجارب التي أجريت في دول مختلفة من العالم كفاءة بعض الفطريات الممرضة للحشرات في مكافحة الذبابة المنزلية بكفاءة عالية .

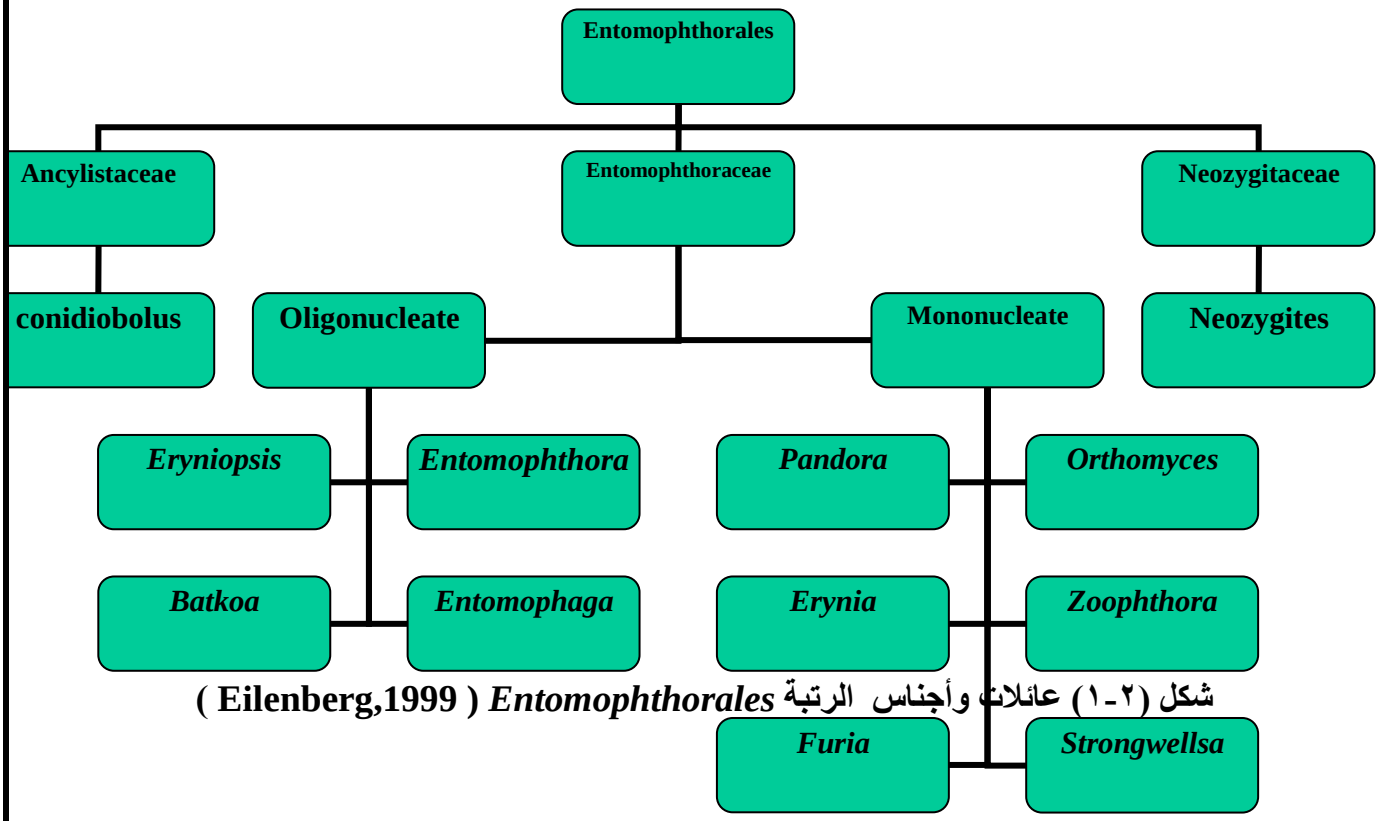
2 – 4 الفطريات الممرضة للحشرات Entomopathogenic fungi

تعد الفطريات من المسببات الممرضة للحشراتً ، اذ يهلك عدد كبير من الآفات بالأمراض الفطرية سنوياً ولم يعد استخدام هذه الفطريات في طور التجريب والاختبار بل ان كثيراً من هذه الفطريات متوفر بشكل مستحضرات تجارية في الأسواق , كما أن كثيراً منها مازال في مرحلة التطوير. تتوزع الفطريات الممرضة للحشرات على خمس شعب ضمن المملكة الفطرية هي شعبة الفطريات البازيدية Basidomycota والفطريات الكيسيةAscomycota وشعبة الفطريات المائية ذات الابواغ السابحة Mastigomycota وشعبة الفطريات اللاقحية Zygomycota وشعبة الفطريات الناقصة Deteuromycota (Samson *et al*.,1988).

٢-٤-١ الرتبة *Entomophthorales*

تعد هذه الرتبة من بين أكبر رتب الفطريات الممرضة للحشرات التي تعود إلى شعبة الفطريات الاقحية وتضم هذه الرتبة أجناساً معظمها يتطفل على الحشرات شكل (٢-١) , وتعود المضائف الحشرية لإفراد هذه الرتبة لأكثر من 32 عائلة تعود لسبع رتب حشرية هي نصفية الأجنحة Hemiptera ومتشابهة الأجنحة Homoptera وثنائية الأجنحة Diptera وحرشفية الأجنحة Lepidoptera وغمديه الأجنحة Coleoptera وغشائية الأجنحة Hymenoptera و مستقيمة الأجنحة Orthoptera (Macleod & Muller-Keller,1973) . يعد جنس *Entomophthora* العائد لهذه الرتبة من اكبر

الأجناس,حيث يضم عدداً كبيراً من الأنواع التي يصل عددها إلى المائة نوع جدول(2-1) يتطفل معظمها على الحشرات، وهي واسعة الانتشار في العالم وتلعب دورا هاماً في مكافحة العديد مـــــن الآفـــات الاقتصاديـــة و الطبيـــة ومنهـــا *E.muscae* (Macleod,1963).



شكل (٢-١) عائلات وأجناس الرتبة *Entomophthorales* (Eilenberg,1999)

جدول(٢-١) بعض أنواع الجنس*Entomophthora* ومضائفها

species	Host	Reference
E. muscae	House flies	Cohn(1855)&Keller *et al.*,(1999)
E.weberi	Sugi spider mite	Lakon(1939)
E. obscura	Spotted alpha alpha aphid	Hall&Dun(1957)
E. erupta	Black grass bug	Hamm(1980)
E. creatonatus	Larva of tiger moth	Yen(1962)

E.sphaerosperma	**Brown plant hopper**	**Kelsey(1965)**
E. floridana	**Citrus mite**	**Weiser(1966)**
E. planchoniana	**Aphid peacan**	**Dean &Wilding(1973)**
E. vomitoria	**Cluster fly**	**Newman&Carney(1975)**
E. virulenta	**Red spider mite**	**Tsintsadze (1976)**
E. thripidium	**Onion thrips**	**Samson et al.,(1979)**
E. culicis	**Mosquitoes**	**Kramer(1982)**
E.brivinculata	**Bud worm larvae**	**Keller&wilding(1985)**
E.chromoaphid	**aphid**	**Fenget al.,(1990)**
E. egressa	**Seed corn fly**	**Dunphy &Nalon(1992)**
E.schizophora	**White fly**	**Villacarlos&Wilding(1994)**

٢-٤-٢ نبذة مختصرة عن الفطر *E. muscae*

يتطفل هذا الفطر بصورة مجبرة obligate parasite على الذباب لذلك يسمى بفطر الذبابfly fungus , اذ يصيب هذا الفطر الذباب منذ زمن بعيد , حيث لوحظ تعلق الذباب المصاب على جدران وسقوف المنازل . وصف هذا الفطر لأول مرة من قبل Cohn (1855) وكان يسمى سابقاً *Empusca muscae* على الذبابة المنزلية , كما سجل مؤخراً تطفله على أنواع لعائلات مختلفة من رتبة ثنائية الأجنحة مثل العائلة Fannidae وPsilidae و Muscidaeو Anthomyiidae و Culicidae (Mullens,1985; Six & Mullens, 1996,Eilenberg *et al*., 1987) ولان معظم أنواع هذه العائلات آفات خطيرة لذلك يعد هذا الفطر مرشحاً جيداً لمكافحتها حيوياً والصفة المميزة لهذا الفطر هي انطلاق الأبواغ بقوة , ويعد هذا النوع متعدد السلالات لأنه يضم عدداً من السلالات المختلفة (Eilenberg, 1988) .

٢-٤-٣ تصنيف فطر *E. muscae*

التصنيف الحديث للفطر على وفق ما جاء به (Hibbett *et al.* , 2007)

Domain: ***Eukaryota***

Kingdom : ***Fungi***

Phylum: ***Zygomycota***

Class : ***Zygomycetes***

Order : ***Entomophthorales***

Family : ***Entomophthoraceae***

Genus : ***Entomophthora***

Species : ***muscae***

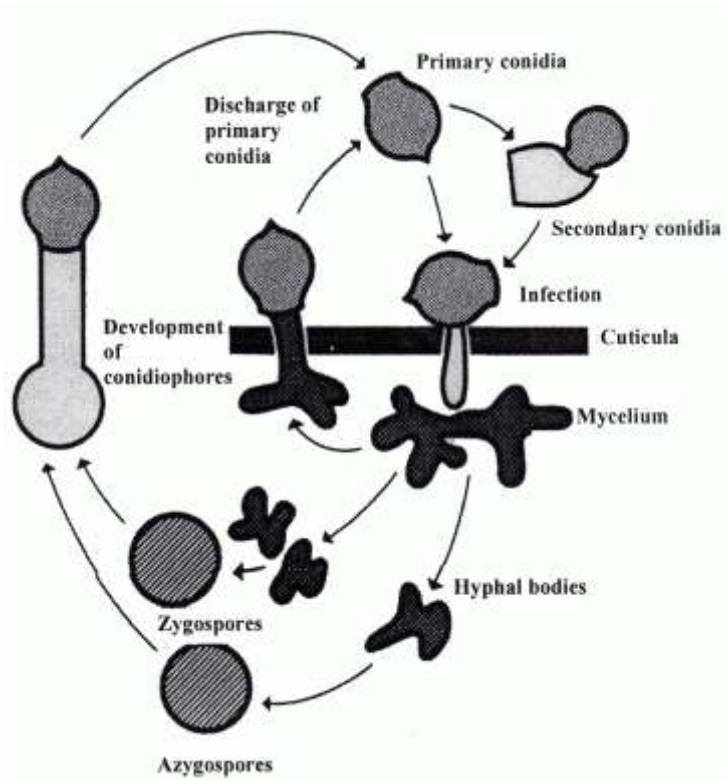
٢-٤-٤ أعراض الإصابة بالفطر *E. muscae*

يمكن مشاهدة الذباب المصاب بهذا الفطر خلال فصلي الربيع والخريف , إذ تظهر على الذبابة أعراض الإصابة Symptoms حيث يشاهد الذباب الميت ملتصقاً على الجدران وزجاج النوافذ محاطاً بهالة بيضاء كثيفة عبارة عن ابواغ انفصلت من الفطر , أما في الحقل فيكون الذباب المصاب ملتصقاً على أغصان الأشجار والأسوار الحديدية وتظهر بطن الذبابة منتفخة ذات أشرطة بيضاء من الحوامل البوغية التي تخرج من بين حلقات جدار الجسم و ارتفاع الأجنحة فوق البطن شكل (٢-٢) وتلون العيون باللون الأحمر (Mullens *et al* ., 1987 ; Kransoff, 1995)

شكل (٢-٢) ذبابة مصابة بالفطر *E. muscae* (Watson,2008)

٢-٤-٥ آلية الإصابة بالفطر *E. muscae*

تحدث الإصابة بهذا الفطر عن طريق أنبات الابواغ وتكون الأنبوب الجرثومي وعادة في المناطق بين الحلقات ذات الكيوتكل الرقيق شكل(٢-٣) أو خلال القصبات الهوائية أو الجروح (Glare *et al* . , 1985)يتم اختراق الكيوتكل بالوسائل الميكانيكية بإفراز الإنزيمات الهاضمة مثل الإنزيمات المحللة للدهون Lipases والإنزيمات المحللة للبروتين Proteases و الإنزيمات المحللة للكايتين Chitinases التي تهضم مكونات الكيوتكل (Urbanzy kw *et al* . , 1990 ; 1992).بعد عملية الاختراق يبدأ الفطربالنموو التكاثر بالانقسام داخل جسم الحشرة في التجويف الدموي Hemocoel وتنمو الخيوط الفطرية باتجاه الأنسجة و تتغذى على المواد الدهنية ويعتبر الانهيار الفسيولوجي هو السبب في موت الحشرة الذي يحصل عقب 8-5 أيام ولا يبقى سوى الهيكل الخارجي محيطاً بها (*et al*., Wraight 1990) , عند توفر الظروف الملائمة تبدأ الحوامل البوغية بالاندفاع خارج جسم الحشرة وتحيط بكل بوغ طبقة هلامية من السيتوبلازم تحفظها من الجفاف (Samson et al.,1988). تسمى عندئذ بالأبواغ الأولية primary conidia فاذا سقطت على مضيف فإنها تلتصق به وتصيبه وإذا فشلت فإنها تعطي أبواغ ثانوية secondary conidia وقد تنبت بتكوين أنبوبة إنبات جرثومي أو تعطي ابواغ ثالثيةtertiary conidia وهكذا تستمر العملية حتى يصادف البوغ مضيف آخر.



شكل(٢-٣) دورة حياة الفطر *E. muscae* (Eilenberg,1999)

٢-٤-٦ دور الفطر *E. muscae* في السيطرة الحيوية

يلعب هذا الفطر دوراً هاماً في السيطرة الحيوية على الذباب في معظم أنحاء العالم مثل الدنمارك والولايات المتحدة الاميركية ,حيث أمكن استخدام هذا الفطر كمبيد حيوي Biopesticide ضد الذباب لما له من خصوصية عالية مقارنة بالمبيدات الكيميائية (Watson, 2008).

يعد الفطر *E.muscae* من أشهر الأنواع العائدة إلى جنس *Entomophthora* استخداماً في المكافحة الجرثومية للذباب المنزلي(Macleod *et al.*, 1976) , إذ استخدم Kramer& Steinkraus (1981) الفطر المذكور لمكافحه ستة أنواع من الذباب هي الذبابة المنزلية و ذبابة البصل *Hylema antique* وذبابة الذرة *H. platura* وذبابة الإسطبل *Stomoxys calicitrans* وذبابة الوجه *Musca automnalis* والذباب الأزرق الأسود *Phormia regina* في الولايات المتحدة الاميركية وكانت الذبابة المنزلية أكثرها تأثراً بالفطر مقارنة بالأنواع الأخرى , كما يهاجم هذا الفطر ذبابة الجزر *Psila rosae* في الحقل في الدنمارك ويسبب هلاكات عالية بينها و يبيد مايقارب 80% من ذباب جذور اللهانة و 77% من الذباب المنزلي في الإسطبلات (Eilenberg *et al.*, 1987) , واختبر(Kramer&Stinkraus (1987 في الولايات المتحدة الاميركية تأثير الفطر *E. muscae* في 16نوع من رتبة ثنائية الأجنحة مختبرياً منها الذبابة المنزلية وذبابة الإسطبل والذباب الأزرق وبعوض الانوفلس ولاحظ إن هذا الفطر قد حقق أعلى نسبة هلاك في بالغات الذبابة المنزلية .

أشار Watson & Peterson (1993) إن هذا الفطر كان ناجحاً في السيطرة الحيوية للذبابة المنزلية في الدنمارك ، إذ انخفض التذبذب السكاني لهذه الحشرة وتدهورت الفعالية الجنسية للذكور عندما أصيبت بهذا الفطر واستخدم Kuramata&Shimazu (1992) هذا الفطر لمكافحة الذباب المنزلية حقلياً في أماكن صغيرة مغلقة قليلة النوافذ صممت داخل حقول لتربية الأبقار في اليابان.

٢-٥ تأثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر*E.muscae* في المكافحة الجرثومية

٢-٥-١ درجات الحرارة والرطوبة

تعد درجة الحرارة والرطوبة من العوامل البيئية المهمة والمحددة لنجاح المسببات الممرضة للحشرات فقد وجد Kramer (1980) إن تجرثم الفطر*E.muscae* وانتشار المرض الذي يسببه يمكن إن يحدث في رطوبة واطئة جداً RH (6%) في الولايات المتحدة الاميركية, وأيد ماتم ذكره من قبل Carruthers & Haynes (1986) الذين وجدو تجرثم ملحوظ لهذا الفطر في اميركا في رطوبة نسبية 20% مقارنة بالفطريات العائدة لنفس الرتبة والتي يتطلب تجرثمها رطوبة مقاربة 100% .

درس Eilenberg *et al.*, (1986) تأثير درجات حرارية مختلفة في الزمن اللازم لهلاك ذباب الجزر المعامل بالفطر المذكور وانطلاق الابواغ الأولية ،ولاحظ ان انطلاق الابواغ الأولية يعتمد على درجة

الحرارة إذ تراوح عدد الابواغ المنطلقة لكل ذبابة في رطوبة نسبية 100% بين 1.2×10^4 و 9.6×10^5 . درس Maderia (1998) تأثير العمر والرطوبة ودرجة الحرارة في الفطر *E. muscae* عند ثلاث درجات حرارية(17 و 21 و27) ورطوبة (100% , 60) وأربع فترات للفطر (96, 154, 72,12 ساعة, وأشارت النتائج إن الفطر تمكن من إصابة الحشرة عند درجة حرارة 21 ورطوبة 100% وفترة72ساعة في حين لم تتحقق الإصابة في درجات الحرارة الواطئة.

٢-٥-٢ بعض المبيدات الحشرية والفطرية

إن استعمال المبيدات الكيمياوية لايكون دائماً في حالة توافق مع عوامل السيطرة الحيوية إذ تم دراسة التأثيرات الجانبية للمبيدات الكيمياوية في الأعداء الطبيعية Natural enemies بشكل مكثف ولوحظ إن الاستعمال غير الانتقائي لهذه المبيدات يؤدي إلى انتشار الآفة مرة أخرى والى تفشي أفات ثانوية والتي سبق وان تم مكافحتها باستخدام الأعداء الطبيعية ويؤثر في التوازن الطبيعي للمسببات الممرضة للحشرات ويزيل المصادر الغذائية للأعداء الحيوية مؤقتاً (Horn, 1983; Brogmeister& Poehting; 1989). أظهرت المبيدات الكيماوية تأثيراً ضاراً في بعض أنواع الفطريات العائدة لرتبة *Entomphbhorales* وبضمنها الفطر *E. muscae* , إذ تم اختبار تأثير هذه المبيدات في انبات الابواغ والخيوط الفطرية على الأوساط الزرعية مثل مبيد thiram و ethirimol وcaptofol و ainocapو captan sulfur (Wilding , 1972 ; Brobyn& Wilding , 1977)

قام Carruthers *et al.*, (1985) بأول دراسة في الولايات المتحدة الاميركية حول تأثيرات المبيدات الكيمياوية في الأعداء الحيوية لذبابة البصل في كل من *E. muscae* و *pallipes* *Aphaerata* و *Coenosia tigrina* باستخدام اربعة مبيدات عشبية هي chloro-IPC و nitro fen و chloro-IPC و CDAA وثلاثة مبيدات فطرية هي Maneb وchlorothalonil و copper sulfate ومبيد حشري واحد هو malathion في رطوبة نسبية100% اذ ثبط المبيد الحشري نمو الفطر *E. muscae* بنسبة بلغت 93.33 % في حين كان تأثير المبيدات الأخرى واطئاً في تثبيط نمو الفطر المذكور, بينما اختبر(1986) Mullens & Rodriguez في الدنمارك تأثير خمسة أنواع من المبيدات الحشرية في الفطر *E. muscae* تم عزله من الذبابة المنزلية هي مبيدmalathion و permethrin و Dimethoate و carbaryl و Tetrachlorovinphos/dichlorvos ووجد إن المبيدين permethrinو malathion كانا الاكثرتاثيراً في خفض إنبات ابواغ الفطر.

٣- المواد و طرائق العمل Materials and Methods

٣-١ الأجهزة و الأدوات والمواد

٣-١-١ الأجهزة

ت	أسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	المؤصدة Autoclave	Memmert
2	ميزان حساس Sensitive Electric Balance	Gallankamp
3	جهاز تقطير Distillation apparateus	Memmert
4	حاضنة Incubator	Memmert
5	مجهر مركب Compound Microscope	Olympus
6	فرن كهربائي Oven	Memmert
7	جهاز قياس الحموضة PH-meter	Lobcco
8	ثلاجة Refrigerator	Chiller
9	خلاط كهربائي Blander	توشيبا العربي
10	ومحرك مغناطيسي Magnetic Stirrer	Lobcco
11	حمام مائي Water Bath	Memmert
12	جهاز تفريغ هوائي Vacuum pump	Burchi
١٣	كابينة العزل المجهري Hood	Philips
14	جهاز قياس الرطوبة Hygrometer	Lobcco

٣-١-٢ المواد

ت	أسم المادة	الشركة المصنعة
1	أيثانول C_2H_5OH	Fluka
2	كلوروفورم Chloroform	Fluka
٣	كبريتات الزنك المائية $ZnSO_4.7H_2O$	Fluka
4	أكار Agar	Himedia

5	هايبوكلورات الصوديوم	NaOCl	تجاري
6	خلاصة الخميرة	Yeast Extract	Difco
ت	**أسم المادة**		**الشركة المصنعة**
7	خلاصة اللحم	Peptone	Difco
8	سكر المالتوز	Maltose	Difco
9	سابرويد دكستروز اكار	Sabouraud dextrose agar	Difco
10	حامض الكبريتيك	H_2SO_4	Fluka
11	هيدروكسيد البوتاسيم	KOH	Fluka
12	مبيد الملاثيون	Malathion	vapco
13	مبيد البيرمثرين	Permethrine	vapco
14	مبيد المانيب	Maneb	vapco
15	سلفات النحاس	Copper sulfate	Vapco

٣-١-٣ الأدوات

الأداة		الشركة المصنعة
مرشحات دقيقة حجم 0.45 µ و 0.22µ	Millipore filters	Difco
أوراق الترشيح	Filter papers	Grenier
ماصة دقيقة	Micro pipette	Oxford
أطباق بتري بلاستيكية مختلفة الاحجام	Disposable Petri dishes	Grenier
دوارق حجمية مختلفة	Volumetric flasks	Jlassco
أنابيب اختبار	Test tubes	Pytex

Griffin	Bukhner,s funnel	قمع بخنر
Universal tube	Secrew cap Bottles	قناني محكمة الغلق
Leatz	Slides	شرائح زجاجية
Hirshman	Cover slide	غطاء سلايد
Boeco	Neubauer haemocytometer	شريحة عد الابواغ
Grinier	Dissicator	مجففات

٣-٢ إعداد مزرعة الذبابة المنزلية

أعدت مزرعة دائمية للحشرة في المختبر, اذ جمعت أعدادا من البالغات ووضعت في أقفاص تربية صممت على شكل متوازي مستطيلات(٤٠×٣٥×٤٠)سم قاعدته خشبية وغطيت أوجهه كافة بقماش التول عدا سطحه العلوي غطي بالزجاج . غذيت البالغات باستعمال القطن المبلل بالماء ومسحوق الحليب في أطباق بتري وبمعدل طبقين لكل قفص . جمعت البيوض ونقلت إلى أواني زجاجية حاوية على وسط صناعي لتربية اليرقات مكون من٦٠غم سماد حيواني و١٠غم سكر شعير و٥غم خميرة (عبد الفتاح ، ١٩٨٩) . أودعت في أقفاص تربية أخرى وتم متابعتها وصولاً إلى الدور الكامل وهكذا نقيت المزرعة لثلاثة أجيال قبل إجراء التجارب عليها .

3-3 الأوساط الزرعية

استخدمت أكثرا الأوساط الزرعية ملائمةً لتنمية أنواع الفطريات العائدة الى رتبة *Entomophthorales* في عزل الفطر *E.muscae* وشملت ماياتي:

١- وسط أكار السابر ويد دكستروز المدعم بمح البيض والحليب

Sabouraud dextrose agar Supplemented with egg yolk & milk

يتألف هذا الوسط من المواد الآتية:

أكار سابرو يد دكستروز 80% sabouraud dextrose agar(SDA)

خليط مح البيض والحليب 20% egg yolk (40%) and milk (60%)

أجريت الطريقة في كابينة العزل المجهري , حيث حضر هذا الوسط كماياتي :

. أذيب (SDA)بحسب النسبة الموصى بها في دورق زجاجي سعة 500 مل في ماء مقطر وعقم الدورق بدرجة حرارة 120 م لمدة 30 دقيقة.

. تحضير الحليب : عقم الحليب الطازج في فرن بدرجة حرارة 100 م لمدة 30 دقيقة وترك في ظروف المختبر.

. تحضير مح البيض: حضر بتعقيم البيض سطحياً بغمره في محلول يتألف من كحول (ايثانول) 90% (200مل) وهيبوكلورات الصوديوم 2% (800 مل) , ثم كسرت البيضة بوساطة ملقط معقم وفصل المح عن بياض البيض برفق تام ووضع في اسطوانة مدرجة , بعد ذلك أضيف إليه الحليب ومزج بعصا زجاجية حتى أصبح الخليط متجانساً.

. أضيف هذا الخليط (مح البيض والحليب) الى الدورق الحاوي على (SDA) ورج جيداً من أجل تجانس الوسط , ثم وزع الوسط في الأطباق وترك ليتصلب. لقحت الأطباق بالابواغ المعزولة وحضنت بدرجة حرارة 23 م لمدة خمسة أيام (Papierok,1978).

٢- وسط الحليب ومح البيض المتخثر Coagulated egg yolk & whole milk

يتألف هذا الوسط من المواد الآتية:

مح البيض 60% egg yolk

الحليب الطازج 40 % whole milk

حضر هذا الوسط بمزج مح البيض الذي تم تحضيره كما ذكر سابقاً مع الحليب الطازج ووزع الوسط في أنابيب صغيرة غلقت فوهتها بسداد قطني وعقمت في الفرن بدرجة حرارة ١٠٠مْ لمدة ٣٠ دقيقة. ترك الوسط في درجة حرارة الغرفة مدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك لقحت الأنابيب بالابواغ .حضنت بدرجة حرارة ٢٣م ولمدة خمسة أيام(Papierok&Charpentie , 1982)).

٣- وسط أكار السابر ويد مالتوزالمدعم بمح البيض

Egg yolk/ Sabouraud maltose agar

يتألف هذا الوسط من الموادالاتية:

سكر المالتوز Maltose

خلاصة اللحم Peptone

خلاصة الخميرة Yeast extract

أكار Agar

اذيبت هذه المواد بحسب الكميات الموصى بها في ماء مقطر في دورق زجاجي سعته ٥٠٠ مل وعقم الوسط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة ١٢٠م وضغط ١٥ باوند\انج٢ لمدة ١٥ دقيقة وقبل تصلب الوسط أضيف إليه مح البيض والذي تم تحضيره كما ذكر سابقاً، وبمعدل مح بيضتين لكل ١٠٠مل من الوسط

ثم وزع الوسط في الأطباق ثم لقحت الأطباق بالابواغ وحضنت بنفس الظروف السابقة Soper et al., (1975).

٤- الوسط Entomophthora Complete Medium (ECM)

حضر الوسط الزرعي الخاص(**ECM**) لعزل الفطر *Entomophthora muscae* وفقاً لطريقة (Ben Ze,ev,1980 & Keller,1987) , إذ يتألف هذا الوسط من مصدر للكاربون (Maltose) وخلاصة الخميرة Yeast extract و Casien hydrolysate و النشا Starch واكار agar ومن محلول يتألف من ١٢ ملح و محلول يتألف من ٩ فيتامينات بالإضافة إلى محلول المضادات الحيوية . أجريت بعض التحويرات وذلك باستخدام مواد متوفرة في المختبرات ورخيصة الثمن, إذ يمكن الحصول عليها بسهولة وشملت هذه التحويرات استبدال محلول المضادات الحيوية بالمضاد الحيوي Chloramphenicol وحذف بعض الفيتامينات من محلول الفيتامينات كما حذفت بعض الأملاح من المحلول الملحي المذكور واستبدل الأخر بمواد أخرى .

4-3 خطوات عزل الفطر *E. muscae*

1-4-3 جمع الحشرات الميتة Cadaver

جمعت البالغات الميتة المصابة بالفطر التي بدت عليها أعراض الإصابة Symptoms ولعل أشهرها وجود هالة بيضاء تحيط بجسم الحشرة , إذ رفعت بوساطة ملقط معقم من على جدران وزجاج الشبابيك من بعض البيوت ووضعت في أنابيب زجاجية سبق تعقيمها وغطيت فوهتها بقطعة من الشاش منعاً من ازدياد الرطوبة ونقلت إلى المختبر بداخل قنينة زجاجية (Huber&Hughes ,1984).

2-4-3 عزل الفطر *E.muscae* خارج الجسم الحي Invitro

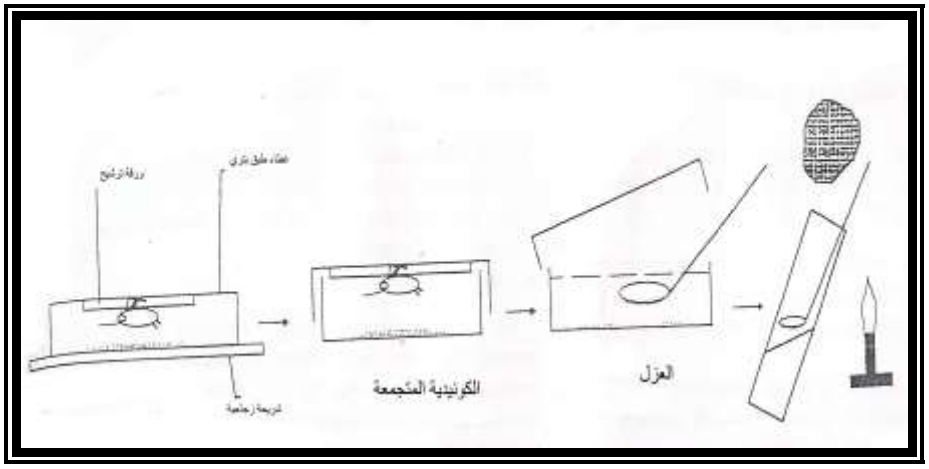
عزلت ابواغ الفطر *E.muscae* بطريقتين:

أولا: طريقة الرش (الابواغ النازلة)

The showering method (the descending conidia)

تم العزل في كابينة العزل المجهري، إذ عقم الذباب المصاب سطحياً بغمره في كحول (ايثانول) ٧٠% لمدة ١٠ ثوان، ثم نقلت الى محلول هيبوكلورات الصوديوم لمدة دقيقتين بعد ذلك غسلت بماء مقطر معقم مرتين لمدة دقيقتين. وضع الذباب بعد تعقيمه على ورقة ترشيح رطبة ومعقمة لصقت داخل أغطية أطباق بتري (١٠×٣٥) ملم ثم قلبت الأغطية على مجموعتين من قواعد الأطباق المعقمة, الأولى

منها حاوية على الوسط (x) والأخرى خالية وتركت لبضع ساعات لإتاحة الوقت اللازم لتكوين الابواغ وهذا يعتمد على تكون الحوامل الابواغ (Conidiophores) . أزيلت الأغطية الحاوية على نماذج الحشرات الميتة من على الأطباق الحاوية على الوسط (X) وأبدلت باخرى جديدة معقمة، أما الأطباق الخالية من الوسط والتي تجمعت الابواغ في قعرها فقد جمعت الابواغ منها باستخدام ناقل معقم وذلك بإمراره عبر الابواغ , ثم لقحت به أنابيب حاوية على الوسط (X) شكل (٣-١). غلقت الأنابيب بإحكام باستخدام سداد قطني وحضنت الأطباق والأنابيب في درجة حرارة ٢٣مْ لمدة خمسة أيام (Papierok, 1989).

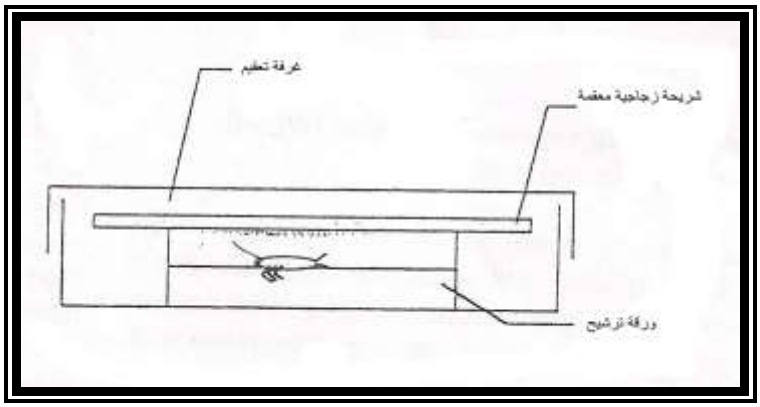


شكل (3-1) عزل الفطر *E.muscae* بطريقة الابواغ النازلة (Papierok,1989)

ثانياً: طريقة الرش (الابواغ الصاعدة)

The showering method (ascendnding conidia)

عقم الذباب المصاب كما ذكر سابقاً، ووضع في قواعد أطباق بتري حاوية على ورق ترشيح مرطب، ثم وضعت شريحة زجاجية معقمة فوق الطبق لجمع الابواغ المنطلقة، ووضعا كليهما (الطبق والشريحة) في داخل طبق معقم آخر اكبر حجماً (شكل٣-٢). تركت مدة زمنية كافية لجمع عدد كاف من الابواغ التي أزيلت لاحقاً بوساطة ناقل معقم ولقحت بها الأطباق الحاوية على الوسط (X) بالطريقة المارة الذكر وحفظت بالظروف السابقة نفسها (keller,1994).



شكل(٣-٢) عزل الفطر *E.muscae* بطريقة الابواغ الصاعدة (Keller,1994)

3-4-3تشخيص ووصف الفطر *E.muscae*

اخذ جزء صغير من النمو الفطري بوساطة ناقل معقم من مزرعة الفطر ووضع على ورقة ترشيح معقمة لصقت داخل غطاء طبق بتري، ثم قلب الغطاء على شريحة زجاجية لجمع الابواغ بعدها وضع غطاء الشريحة ودرست صفات المستعمرة تحت المجهر الضوئي وتم تشخيص الفطر اعتمادا على المفتاح التصنيفي (Humber,1997,Keller&Petrini ,2005) , كما تمت الاستعانة بالمختص الأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان / قسم وقاية النبات / كلية الزراعة /جامعة الكوفة لتأكيد تشخيص الفطر.

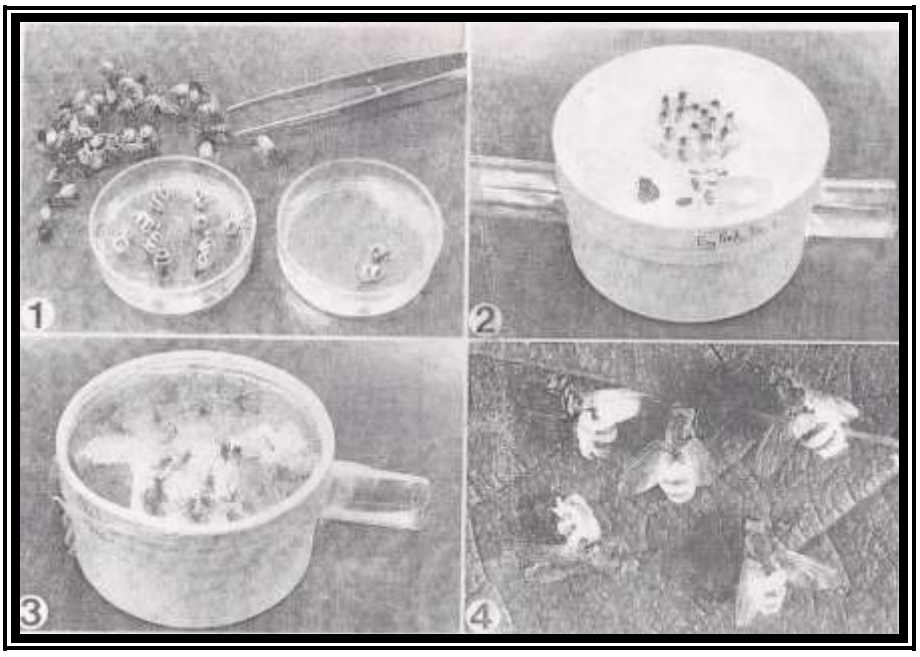
4-4-3 حفظ عزلة الفطر *E.muscae* خارج الجسم الحي Invitro

نقل جزء صغير من النمو الفطري بوساطة ناقل معقم الى أنابيب سعة ١٥ مل حاوية على الوسط (X) ووضع اللقاح داخل فسحة تم عملها في الطبقة السطحية للوسط ألزرعي بوساطة ناقل معقم وكررت العملية باستخدام أنابيب أخرى. وضعت الأنابيب بصورة مائلة بدرجة حرارة ٢٠-١٨ م لمدة أسبوعين، ثم حفظت الأنابيب بعد ذلك بدرجة حرارة ٨م في الثلاجة (Gustaffsson, 1965).

٣-٥ عزل وحفظ الفطر *E. muscae* في الجسم الحي Invivo isolation

لغرض الحصول على عدد كبير من الذباب المصاب بالفطر وللمحا فظة على الفطر لفترة طويلة في الحشرة اتبعت طريقة (Kramer & Steinkraus (1981 ,إذ غمرراس وصدر الذباب المصاب بالفطر *E. muscae* في طبق بتري يحتوي على 1% أكار مائي , ثم قلب هذا الطبق على حاوية بلاستيكية غطيت فوهتها بقماش التول nylon mesh (شكل ٣-3) حاوية على ذباب سليم من المزرعة الدائمية للحشرة , وضع داخل الحاوية قطن مبلل بالماء لتوفير ماء شرب للذباب (يتيح هذا الترتيب انطلاق الابواغ من جسم الذباب المصاب خلال شبكة النايلون لإصابة الذباب السليم الموجود داخل الحاوية). أزيل الطبق بعد 48 ساعة , ثم مسح التول بقطن مبلل بخليط من خلاصة الخميرة ومسحوق

الحليب والسكر يومياً لمدة ثمانية أيام وبذلك يصاب معظم الذباب الذباب السليم .استخدم الذباب المصاب الجديد لتكرار الطريقة أجريت التجربة بدرجة حرارة 3±16 في الحاضنة ورطوبة 70% (Solomon,1975).



شكل(٣-٣) عزل الفطر*E.muscae* في الحي(Kramer& Steinkraus,1981)

٣-٦الطرائق المتبعة لدراسة بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر*E.muscae* في المكافحة الحيوية

٣-٦-١ تاثيردرجات الحرارة والرطوبة

لقد درس في هذا الجانب تأثير درجات الحرارة مع كل من الرطوبات النسبية . إذ هيأت الحاضنات بغية الحصول على درجات حرارة ثابتة (10 و ١٥ و٢٠ و٢٥ و ٣٠ و ٣٥) م وحضرت المحاليل المشبعة من H_2SO_4و$ZnSO_4.7H_2O$ و KOH للحصول على الرطوبات النسبية (35 و50 و70)% , بينما استخدم الماء المقطر لوحده لتوفير رطوبة٩٥% (Solomon , 1957) . وضعت المحاليل في مجففات للسيطرة على الرطوبة النسبية ، أحكمت أغطيتها بدهان الفازلين. تركت المحاليل لمدة أسبوع لغرض الاستقرار وللتأكد من ذلك فقد استعمل جهاز مقياس الرطوبة الرقمي Digital hygrometer (شكل ٣-٤) . حضر الوسط الزرعي (x) كما ذكر سابقاً ووزع في أطباق بلاستيكية وبمعدل ثلاثة مكررات لكل رطوبة نسبية / درجة حرارية. لقحت الأطباق بأقراص قطر 0.5 سم من مستعمرة الفطر بوساطة ثاقب الفلين وحضنت الأطباق بدرجة حرارة٢٥م لمدة خمسة أيام بعدها تم حساب معدل النمو الشعاعي للفطر.

شكل (٣-٤) مجفف وبداخله جهاز قياس الرطوبة النسبية watch hygrometer

٣-٦-٢ تاثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية

استخدمت المبيدات الكيميائية (Coppersulfate وPermethrine وMalathionوManeb) حسب النسب الموصى بها جدول(٣-١) ، حضر الوسط(X) في خمسة دوارق سعة ٢٥٠ مل عقمت في الموصدة في درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ /انج^2 لمدة ٢٠ دقيقة وقبل التصلب تم إضافة المبيدات إلى الوسط كلاً على انفراد . رجت الدوارق جيداً لضمان تجانس المبيدات مع الوسط . وزع الوسط في أطباق بتري بقطر (9) سم بمعدل ٢٠ مل للطبق بعدها لقحت بأقراص قطركل منهما 0.5 سم من مستعمرة الفطر باستخدام ثاقب الفلين وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مبيد حضنت أطباق المعاملة و المقارنة التي تركت بدون معاملة في درجة حرارة ٢٣ ± ٢ لمدة ٥ أيام (Kim *etal.*,2001). بعدها حسبت النسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة الآتية:

$$\%\ \text{للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في المقارنة} - \text{معدل نمو الفطر في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في المقارنة}} \times ١٠٠$$

جدول (٣-١) بيانات أساسية عن المبيدات المستخدمة

الشركة المنتجة	الجرعة الموصى بها	LD_{50} ملغم/كغم	الاسم الكيمائي	الاسم التجاري	المبيد
Syngenta	5 مل/لتر	١٤٠٠	(dimethoxy phosphinothioyl) thio]butane dioic acid	Cythion , [26]Carbophos	Malathion ملاثيون
Syngenta	5 مل/لتر		(3-phenoxy phenyl) methyl-3-(2,2-dichlorovinyl)2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate	Ambush , Atroban	Permethrine برمثرين
Syngenta	٥٠غم/لتر	٣٠٠	Copper Sulfate	CP Basic Sulfate blue stone, blue copperas, Roman Vitriol, blue vitriol	Copper Sulfate كبريتات النحاس
Syngenta	2.5 مل/لتر	٦٧٠٠	Manganese Ethylene bisdithio carbamate	Dithane M-22 Manex, Manesan Nereb, Manzate	Maneb مانيب

٣-٧ اختبار قدرة الفطر *E. muscae* على إنتاج بعض إنزيمات التحلل بواسطة فحص كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC

١- تحضير المسحوق الجاف للفطر *E. muscae*

حضر المسحوق الجاف للفطر بنبذ مكونات الراشح المحضر مسبقاً مركزياً بسرعة 6000xg لمدة ١٠ دقائق,ثم سحن الراسب مع الأسيتون المبرد بدرجة ٢٠- م في جفنه خزفية وترك ليجف في الفرن بدرجة ١٠٥م لمدة ٢٤ ساعة للحصول على مسحوق الفطر الجاف.

٢-عملية التقطير المائي (إضافة الماء إلى مسحوق الفطر) بنسبة ١/١٠من وزن الفطر وسخن الدورق لمدة أربع ساعات للحصول على اكبر كمية من الأنزيم.

٣- اخذ ٣٠مللتر من العينة في قمع فصل وأضيف له ٣٠ مللترمن المذيب (الهكسان) ثم رج المزيج لمدة ٥ دقائق بعدها ترك ليتم فصل الطبقتين ثم أخذت الطبقة السفلى وتم تكرار إضافة المذيب ثلاث مرات.

٤-جمع المستخلص (الهكسان مع الأنزيم) وأضيف له (٣-٥)غم من كبريتات الكالسيوم و ذلك للتخلص من الماء الموجود في المستخلص, بعدها أخذ المستخلص ووضع في حمام مائي بدرجة ٣٧°م للتخلص من المذيب ووضع الإنزيم المستخلص من العملية في قنينة معتمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

٥- حقن الجهاز بالنموذج القياسي من مادة الإنزيم (Protease , Lipase , Chitinase) وتم حساب المساحة النسبية و كذلك ارتفاع الحزمة , بعدها حقن نموذج الفطر بنفس ظروف العينة القياسية و تم

حساب زمن الاحتجاز و مساحة الحزمة و ارتفاع الحزمة وتم قراءة النتائج على شكل مخططات بيانية . وتم الحصول على تراكيز الإنزيمات من مخطط المساحة النسبية والتركيز.

شكل (٣-٥) جهاز كرومتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي HPLC

٣-٨ تحضير المعلق البوغي

حضر المعلق البوغي حسب طريقة (Lacey , 1997) بتنمية الفطر في الوسط (X) خال من الاكار في دورق زجاجي سعة ٢٥٠ مل بمقدار ١٥٠ مل من الوسط المستخدم . حضن الدورق في درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٧ أيام اخذين بنظر الاعتبار رج الدوارق يوميا لتوزيع النمو الفطري , ثم رشحت المزرعة بوساطة قطعة من الشاش واخذ ١ مل من الراشح ووضع على شريحة عد الابواغ Neubaur Haemocytometer حيث تم الحصول على التركيز $1x10^6$ بوغ/مل ولغرض الحصول على التركيز المطلوب طبقت المعادلة الآتية:

$$\text{كمية (مل) المأخوذة من المعلق الاصلي} = \frac{\text{التركيز المطلوب}}{\text{تركيز المعلق الرئيسي}}$$

ثم ضرب الناتج بكمية المعلق الذي نرغب في الحصول عليه . فمثلاً للحصول على ٢٠ مل من المعلق بتركيز $1x10^5$ بوغ/مل وكما يأتي:

$$\text{كمية (مل) المأخوذة من المعلق الأصلي} = \frac{1x10^5}{1x10^6}$$

0.1 x ٢٠ = ٢ مل

وعليه يؤخذ ٢ مل من المعلق الأصلي ويضاف إليه ١٨ مل ماء مقطر لإكماله إلى ٢٠ مل للحصول على تركيز $1x10^5$ بوغ/مل وهكذا لبقية التراكيز ($2x10^5$ و$3x10^5$ و$4x10^5$ و$5x10^5$) بوغ/مل.

٣-٩ الاختبار الحيوي Bioassay

لدراسة أي ممرض يجرى إصابة حشرات سليمة بالممرض نفسه , وكذلك إن هذه التجربة تفسح المجال لدراسة آلية عمل الممرض ومعرفة أمراضيته, ومن الناحية التطبيقية تفيد في تحديد قدرة الممرض في المكافحة الحيوية.إن أساس الاختبار هو تعريض الحشرات السليمة الابواغ (الوحدات الفعالة Infective units) وجعلها بتلامس مع كيوتكل الحشرة وهي القاعدة الأساسية التي بنيت طريقة إصابة الحشرات بفطريات الرتبة*Entomophtherales* (Humber,1984) . صممت تجارب الاختبار الحيوي في الدراسة الحالية لهذا الفطر على أساس منهجية الإصابة بطريقة استخدام المعلقات الفطرية ولغرض الحصول على التركيز والزمن اللازم لهلاك 50% من الأفراد المختبرة فقد تم تطبيق طريقة المربعات الصغرى واستخرج منها معامل الانحدار باستخدام أوراق بيانية خاصة تسمى Log probit papers وتم إيجاد الزمن اللازم لهلاك نصف الأفراد المختبرةLT50 وكذلك التركيز اللازم لهلاك نصف الأفراد المختبرةLC50 وتم أيضا تحديد الارتباط باستخدام التحليل الإحصائي الارتدادي regression analysis (Finney,1971) .

٣-٩-١ الاختبار الحيوي لمعلقات الفطر*E.muscae* في مختلف ادوار حياة الذبابة المنزلية

لقد درس في هذا الجانب تأثير الفطر في البيضة والطور اليرقي الأول والثاني والثالث ودوري العذراء والبالغة.

٣-٩-١-١ البالغة

وضعت ٥ أزواج من البالغات في قناني زجاجية معقمة سعة ٥٠٠مل وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز ورشت بوساطة مرشة يدوية من ارتفاع ١٥ سم تقريبا فيما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر.نقلت الحشرات المعاملة والمقارنة مباشرة الى أقفاص التربية وتم تغذيتها كما في الفقرة (3-2) . حسبت الهلاكات بعد ١٢٠ و ١٤٤ و ١٦٨ ساعة من المعاملة وصححت القيم حسب معادلة Orell &shneider(شعبان والملاح، ١٩٩٣).

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

٣-٩-١-٢ البيضة

هيأت بيوض بعمر ٢٤ساعة من إناث المزرعة الدائمية في المختبر ووضعت ١٠٠ بيضة في كل طبق بتري وعوملت البيوض بـ ٥مل من تركيز المعلق الفطري $5x10^5$ بوغ/مل بالطريقة ذاتها المذكورة أعلاه ، أما معاملة المقارنة فقد رشت بالماء المقطر. كررت التجربة ثلاث مرات ومثلها لمعاملة المقارنة وتمت مراقبة فقس البيض يومياً وحسبت نسبة فقس البيض.

٣-٩-١-٣ الأطوار اليرقية

لدراسة التأثير الحيوي للفطر في الأطوار اليرقية الثلاثة , فقد أخذت يرقات الطور الأول ضمن عمر ٢٤ ساعة بعد فقس عدد كاف من البيوض، أما يرقات الطور الثاني والثالث فقد هيأت من أعداد كافية من الطور الذي سبقه، إذ وضعت فرادى في أنابيب زجاجية حاوية على كفاية من غذاء اليرقة المعقم وتم مراقبتها يومياً لحين الانسلاخ. وضعت ١٠ يرقات من كل طور من الأطوار الثلاثة في إناء زجاجي معقم سعة ٢٥٠ مل وعوملت مكررات الاختبار الحيوي بتركيز المعلق الفطري $5x10^5$ بوغ/مل ومعاملة السيطرة بالطريقة المشار اليها في الفقرة **(٣-٩-١-٢)**. حسبت الهلاكات يوميا ولمدة أسبوع .

٣-٩-١-٤ العذراء

أخذت ٥٠ عذراء بعد انسلاخ عدد كافي من يرقات الطور اليرقي الثالث. وزعت على خمسة أواني زجاجية معقمة بسعة ٢٥٠ مل وتم معاملتها بتركيز المعلق المذكورسابقاً وكذلك معاملة السيطرة كما ورد في الفقرة **(٣-٩-١-٣)**ونقلت إلى أواني جديدة ولكن بدون غذاء وحسبت الهلاكات يومياً ولمدة خمسة أيام.

٣-٩-١-٥ عمر وجنس البالغة

جمعت أعدادً كافية من عذارى الذبابة المنزلية ووزعت فرادى في أنابيب زجاجية وغطيت فوهتها بالشاش وروقبت لحين الوصول إلى الدور الكامل وحينها ميزت على أساس الجنس (kelling,2001) وبذلك تم الحصول على إناث وذكور أبكار (virgin) وكذلك عزلت الذكور عن الإناث بحسب العمر لكل منهما (١و٣و٧و١٥) يوم وعوملت بالتركيز $5x10^5$بوغ/مل داخل أواني زجاجية سعة ٥٠٠مل ونقلت إلى صناديق التربية المذكورة سابقاً. حسبت نسبة الهلاك وصححت القيم حسب المعادلة المذكورةسابقاً.

٣-٩-٢ تحضير راشح الفطر*E.muscae*

حضر الوسط (x) خال من الأكار ووزع في دوارق سعة 250 مل وبمقدار150 مل للدورق ولقح الوسط بأقراص قطرها 0.5 سم بثاقب الفلين من مزرعة الفطر بعمر خمسة أيام. حضنت الدوارق بدرجة حرارة 23 لمدة أسبوعين بعدها تم الترشيح باستخدام ورقة ترشيح (No.1)Whatman بقمع بخنر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء وأعيد الترشيح باستخدام المرشح الدقيق. 0.22µ وحضرت التراكيز ٢٥% و٥٠% و٧٥% و١٠٠% مل وذلك عن طريق التخفيف بالماء المقطر(Huber&Hughes ,1984).

٣-٩-٢-١ تأثير راشح الفطر*E.muscae* في البالغة

استخدمت تراكيز راشح الفطر المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (٣-٩-١-٤).

٣-١٠ التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات وفق تصميم التجربة العاملية Randomized complete analysis(RCD) واستخدم اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) في تشخيص الفروق الإحصائية بين المعاملات(الراوي وخلف,1980).

٤- النتائج والمناقشة Results and Discussion

٤-١ الأوساط الزرعية

بينت نتائج الدراسة الحالية إن الأوساط الزرعية التي احتوت على مح البيض مثل الحليب ومح البيض المتخثر واكار السابروبد دكستروز المدعم بمح البيض والحليب واكار السابروبد مالتوز المدعم بمح البيض كانت غير ملائمة لعزل الفطر قيد الدراسة, بالرغم من أن هذه الأوساط قد استخدمت وبتنوع كبير لعزل أجناس مختلفة من الرتبة *Entomophthorales* لكن كلاً حسب طريقة التحضير الخاصة به مع بعض التغيير في المكونات الرئيسية, فقد استخدم وسط مح البيض المخثر لعزل أجناس *Entomophaga* و *Entomophthora* (Gustaffsson, 1965), بينما عزل الفطر . *Massospora sp* المتطفل على عائلة السيكادا *Cicadidae* على وسط أكار السابروبد مالتوز المدعم بمح البيض (Soper, 1981), ونجح Milner & Soper (1981) في عزل الفطر الذي يصيب حشرة من ألجت *Therioaphis trifollii* , كما استخدم هذا الوسط بدون الحليب لعزل أجناس *Entomophaga* و *Conidiobolus* و *Entomophthora* (Keller,1987) والأجناس *Erynia* و *Eryniopsis* و

Neozygites (Keller, 1991). تجدر الإشارة إلى انه بالرغم من إجراء الكثير من التغييرات والتحويرات للمكونات الرئيسة لهذه الأوساط أملا في عزل الفطر *E. muscae* إلا إنها لم تنجح.

من المعروف إن الأوساط الزرعية التقليدية مثل وسط مستخلص البطاطا والدكستروز (PDA) واكار السابرويد دكستروز (SDA) واكار خلاصة الشعير Malt extract agar غير ملائمة لعزل الغالبية العظمى من فطريات الرتبة *Entomophthorales* (Lacey, 1997) وبالرغم من نجاح عزل أجناس معينة على الأوساط الغنية بمح البيض إلا إن ذلك لاينفع مع بعض الأنواع من فطريات هذه الرتبة بل إن البعض من أجناس هذه الرتبة يحتاج إلى أوساط غذائية ذات متطلبات معقدة ودقيقة تتضمن إضافة مواد ومركبات مغذية مثل الفيتامينات والأملاح والأحماض الامينية والدهون وغيرها, في حين لا ينمو البعض الاخر إلا على أوساط تحتوي على أنسجة الحشرات فقط (Papierok, 1989), ولعل هذا ما يفسر عدم نجاح المحاولات والجهود السابقة لعزل الفطر *E. muscae* في العراق.

إن الوسط (ECM) كان الوسط الأمثل لعزل الفطر المذكور بعد أن استبدلت بعض المكونات والاستغناء عن البعض الأخر وعليه استخدم في عزل وحفظ الفطر في الزجاج, وقد كان نمو الفطر على هذا الوسط كثيفاً ولم يظهر أي تلوث (نمو بكتيري أو فطري), وعليه يمكن الاستنتاج بان بعض الأنواع في رتبة *Entomophthorales* مثل الفطر *E. muscae* ذات متطلبات غذائية محددة ولا تتشابه مع متطلبات أنواع أخرى.

٤-١-١ عزل وتشخيص ووصف الفطر *E. muscae*

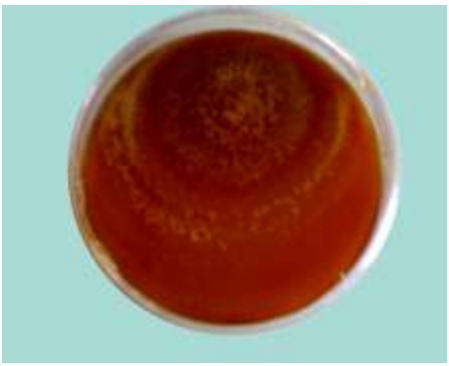
لقد تم في البحث الحالي عزل الفطر*E. muscae* من بالغات الذبابة المنزلية *Musca domestica* وتنميته على وسط يستخدم لاول مرة في العراق و اعتمد في تشخيص الفطر لمستوى الجنس على الصفات الواردة في المفتاح التصنيفي لأجناس الرتبة *Entomophthorales* (Humber,1997) وشملت هذه الصفات:

١. كان جسم الحشرة مغطى كلياً بطبقة بيضاء كثيفة جداً وذات مظهر صوفي وتمتد هذه الطبقة لتنتشر حتى على السطح Substratum الذي وجدت عليه الحشرة ولم يلاحظ نمو فطري داخل جسم الحشرة, حيث لم يتبق منها سوى الهيكل الخارجي Exoskeleton.
٢. طريقة انطلاق الابواغ Discharging : كانت طريقة انطلاق الابواغ شبيهة بانطلاق قذيفة المدفع Cannon – like ووجود هالة بيضاء كثيفة تحيط بالحشرة الميتة , أما نمو الفطر في الوسط الزرعي (ECM) فقد ظهر على هيئة مستعمرة ليمونية الشكل غير قطنية ولزجة عند رفعها من على الوسط ألزرعي بواسطة الناقل المعقم شكل(٤-١) ثم تحولت إلى مستعمرة ذات لون احمر (قرمزي) بعد شهر واحد من الحفظ شكل (٤-٢) . ولتشخيص الفطر المذكور الى مستوى النوع تم الاعتماد على ابرز الصفات الواردة في المفتاح التصنيفي Keller

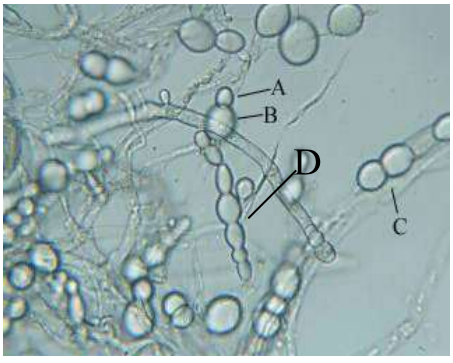
(&Petrini,2005) , إذ كانت الابواغ كمثرية إلى بيضوية الشكل ذات بروز قمي أو حلمة مسطحة flat papillaومحاطة بطبقة شفافة وكثيفة من المواد الخلوية (السايتوبلازم) halo-like droplet of cytoplasm وتميزت الخيوط الفطرية بكونها غير مقسمة شكل (٤-٣).

ذكر(1997) Papierok&Hajek ان الأنواع الرئيسة مثل *E. culicis* الذي يصيب البعوض والذباب الأسود و *E. planchiana* الذي يصيب المن والفطر *E. muscae* الذي يصيب الذباب يتم تشخيصها اعتماداً على العائل الذي توجد عليه هذه الممرضات الحشرية وأشار(1997) Lacey انه ولحسن الحظ تمكن معظم الباحثين من المختصين في علم الفطريات من تشخيص الفطريات الممرضة للحشرات بسهوله حتى إلى مستوى النوع ولكن يتطلب تشخيص بعض الأنواع من هذه الفطريات تأكيداً لتصنيفها.

شكل(٤-١) مستعمرة الفطر *E.muscae* على الوسط الزرعي(ECM) بعمر خمسة ايام



شكل(٤-٢) مستعمرة الفطر *E.muscae* على الوسط الزرعي(ECM) بعمر شهر واحد



شكل (٤-٣)صورة مجهرية للفطر*E. muscae* تحت قوة تكبير400X

A- حليمة مسطحة B- ابواغ بيضيوية الشكل C - مادة خلوية D – الخيط الفطري

٤-١-٢ عزل وحفظ الفطر في الجسم الحي In vivo

تعد هذه الطريقة بمثابة مزرعة دائمية لحفظ الفطر*E. muscae* على بالغات الحشرة, إذ أمكن حفظ الفطر بهذه الطريقة لأكثر من سنة داخل المختبر تلافياً لفقدان الفطر بسبب الظروف البيئية أو أي عوامل أخرى غير متوقعة , وتعد هذه الطريقة طريقة كفؤة وناجحة وسهلة العمل, إذ تم من خلالها الحصول على أعداد كثيرة من الذباب المصاب بالفطر المذكور (Kramaer, 1981), بدت أعراض الإصابة بالفطر على بعض الذباب السليم بعد تعريضه إلى الذباب الميت المصاب في اليوم الرابع ومنها عدم انتظام الحركة وامتداد الأرجل وتدحرج الحشرة أثناء المشي , ثم ظهرت أهم الأعراض في اليوم السادس والتي تميز الإصابة بالفطر المذكور وهي تشبث الذباب بقماش ألتول وظهور نمو كثيف ابيض اللون يغطي بطن الحشرة بالكامل وفي اليوم السابع يكاد جميع الذباب قد أصيب تماماً وأكدت نتائج عزل الفطر من الحشرات المصابة حديثاً بان المسبب هو الفطر*E. muscae* .

٤-٢تاثير بعض العوامل غير الحياتية في استخدام الفطر*E. muscae* في المكافحة الجرثومية

٤-٢-١ تاثير درجات الحرارة والرطوبة

تبين نتائج الجدول (٤-١) إن نمو الفطر قد حصل في المدى الحراري١٠-٣٥مْ وفي جميع درجات الرطوبة المستخدمة لكن بمعدلات متفاوتة . إذ ازداد النمو ألشعاعي للفطر بزيادة درجة الحرارة من ١٥ م ولغاية ٢٥ م متسماً بعلاقة طردية أكدتها الفروق الإحصائية ,أما في درجة الحرارة ٣٠م و ٣٥م فقد قل النمو , إذ سجلت درجة الحرارة ٣٥م اوطا معدلات النمو ألشعاعي إذ بلغ(1.5±١١,٨و1.6±١٨,١ و2.1±٢٢,٣ و2.2±٢٩,١) ملم في الرطوبات النسبية (٣٥ و ٥٠ و٧٠ و ٩٥)% بالترتيب. فضلا عما سبق يلاحظ من الجدول نفسه تأثير الرطوبات النسبية ضمن المدى الحراري الواسع الذي حصل فيه النمو , إذ ازداد النمو ألشعاعي بزيادة الرطوبة النسبية ضمن كل درجة حرارة في المدى المذكورواضحت العلاقة طردية بينهما وهذا ماكدته التحليلات الإحصائية , إذ حصل اوطا معدل للنمو ألشعاعي في رطوبة نسبية ٣٥% ضمن كل درجة حرارية , حيث بلغ (1.5±١٥,٦ و1.1±٢٨,٥ و0.9± ٤٠,٥ و1.2±٥١,٥ و1.3± ٢٤,٣ و1.5±١١,٨)ملم في درجات الحرارة(١٠ و ١٥ و ٢٠ و٢٥ و٣٠ و٣٥)م على التوالي وعليه تكون الرطوبة النسبية ٩٥% هي الأفضل ضمن كل درجة حرارية , إذ كان معدل النمو ألشعاعي (1.7±٣٦,١ و2±٥١,٥ و2.1±٧٠ و1.9±٨٧,١ و2.3±٥٠,٥ و2.2±٢٩,١)ملم

في درجات الحرارة المذكورة بالترتيب .اتسمت درجة الحرارة ٢٥ م بكونها الأفضل ضمن المدى الحراري المستخدم , إذ حقق الفطر فيها أعلى معدلات للنمو ألشعاعي (1.2±٥١,٥ و1.1±٦٢,٦ و2.1±٧٤,٦ و1.9±٨٧,١)ملم في الرطوبات النسبية المذكورة على التوالي.

جدول (٤-١) تأثير درجات الحرارة والرطوبة النسبية في النمو ألشعاعي للفطر*E.muscae*

الرطوبة النسبية / درجة الحرارة(م)	٣٥%	٥٠%	٧٠%	٩٥%
١٠	١٥,٦±1.5	٢٤±1.2	٢٩,٥±1.5	٣٦,١±1.7
١٥	٢٨,٥±1.1	٣٦,٣±1.3	٤٢,٥±1.9	٥١,٥±2
٢٠	٤٠,٥±0.9	٥٠,١±1.5	٦٠±2.2	٧٠±2.1
٢٥	٥١,٥±1.2	٦٢,٦±1.1	٧٤,٦±2.1	٨٧,١±1.9
٣٠	٢٤,٣±1.3	٣٠,١±1.4	٤٢,١±1.9	٥٠,٥±2.3
٣٥	١١,٨±1.5	١٨,١±1.6	٢٢,٣±2.1	٢٩,١±2.2

LSDللحرارة = O.897 LSD للرطوبة النسبية =O.64 LSD للتداخل=1.69

جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصل إليه كل من Yendol (1968)و Mitsuaki (1977) بان الدرجات الحرارية المثلى لنمو الفطريات *E. gammae* و *E. apiculata* و *E. virulenta* و *E. coronata* هي ٢٥م, إلا إن هذه الفطريات لا تنمو إلا في رطوبة نسبية تتراوح ما بين ٩٥-١٠٠%, وذكر Kramer (1980) إن تجرثم الفطر *E. muscae* يحدث في رطوبة واطئة جداً تصل إلى (٦%), واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ماذكره Kramer&Steinkraus (1981) بان الدرجة الحرارية المثلى لإنبات الفطر *E. muscae* هي ٣±٢١م ورطوبة نسبية تتراوح بين١٠٠-٠% , كما أشار Grbic (1984) إلى أن نمو الفطر الممرض للحشرات *B. bassiana* توقف وفقد الفطر قابليته على إنتاج الابواغ عند درجة حرارة ٤ م وبلوغ الحد الأعلى لعدد الأجسام الثمرية عند درجة حرارة ٢٥م , و أكد تويج (٢٠٠٠) إن الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر *B. bassiana* هي ٢٥ م والمدى الحراري للفطر أعلى من ٥م واقل من ٤٥ م.

سجل Carruthers & Haynes (1986) أعلى تجرثم للفطر *E. muscae* عند درجة حرارة ٢٦,٧م في حين كانت الدرجة الحرارية المثلى لتجرثم الفطر هي ٢١م, كما تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع Watson & Peterson (1993) بان درجة الحرارة ٢٥مْ هي الدرجة الحرارية المثلى لنمو وتجرثم الفطر *E. muscae*, وذكر Yoon *et al.* (2000) أن الفطر الممرض للحشرات *Verticillium lecani* يبلغ أعلى معدل للتجرثم عند مدى حراري بين٢٠مْ و ٢٥م . في حين أوضح Nielsen *et al.* (1999) إن الفطر *Pandora neoaphidis* يقتل حشرة من النجيليات بعد أربعة أيام من الإصابة عند ٢٥- ٣٥ مْ , و ذكر Stacey *et al.*,(2003) إن الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر الممرض للحشرات *Zoophthora radicans* في الزجاج هي ٢٥م , بينما تتراوح الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر *Pandora neoaphidis*والأنواع التابعة لنفس الجنس بين ٢٥-٢٠م . وجد Ariel (2007) إن الدرجة الحرارية المثلى للفطرين *P. blunki* و *Z. radicanc* اللذان يصيبان العث ذو الضهر الماسي Diamond back moth هي ٢٠م و ٢٥م على التوالي , إلا إن الرطوبة النسبية الملائمة لهذه الفطريات والتي يحصل عندها الإنبات تتراوح ما بين ١٠٠-٩٥% مقارنة بالفطر المستخدم في الدراسة الحالية.

تؤثر العوامل غير الحياتية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية والإشعاع الشمسي تأثيرا هاماً في المكافحة الجرثومية للحشرات, إذ تحدد متى يمكن أن تحدث إصابة الحشرات بالفطريات لان عمليات المكافحة تحدث في الحقل, ولا يكون تأثير هذه العوامل مستقلاً بعضها عن البعض الأخر بل هي عوامل متداخلة لذلك فان اختبار تأثير العوامل البيئية بانفراد على وبائية الممرض دائما تكون غير ناجحة , وتعد درجة الحرارة والرطوبة من أكثر العوامل تأثيراً في إنبات ابواغ الفطر وتكوين الأنبوب الجرثومي مما يساعد الفطر في اختراق طبقة الكيوتكل (Benz, 1987). إن درجة الحرارة المثلى للنمو مهمة في انتخاب الفطريات الممرضة للحشرات في المكافحة الجرثومية, إذ يجب أن تكون قادرة على الإنبات والنمو في مدى حراري واسع, كذلك يجب توفر الرطوبة النسبية لإحداث الإصابة وفي الحقيقة إن ابواغ الفطريات تختلف في قابلية الإنبات عند درجات الرطوبة الواطئة إذ إن الاختراق يحدث بين مختلف أنواع الفطريات باختلاف قابليتة أبواغها للإنبات في الرطوبة المنخفضة (Moorhouse *et al.*, 1994).

إن اختبار تأثير درجات الحرارة والرطوبة النسبية في النمو ألشعاعي والإنبات والتجرثم للفطريات الممرضة للحشرات يعد أمراً هاماً في اختيار الأنواع المتطفلة والظروف البيئية المناسبة عند استخدامها في المكافحة الجرثومية , خاصة تلك الظروف البيئية للممرض الحشري التي تتزامن مع انتشار وزيادة سكان الحشرة(outbreak) مما يضمن نجاح المكافحة تحت الظروف المناخية الملائمة (Tanada & Kaya, 1993). هذا ينطبق تماماً على الفطر *E. muscae* , إذ أوضح Mullens *et al.*, (1987) إن هذا الفطر يبلغ فعاليته القصوى في الإصابة والانتشار تزامناً مع تكاثر وانتشار الذباب المنزلي.

٤-٢-٢ تأثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية

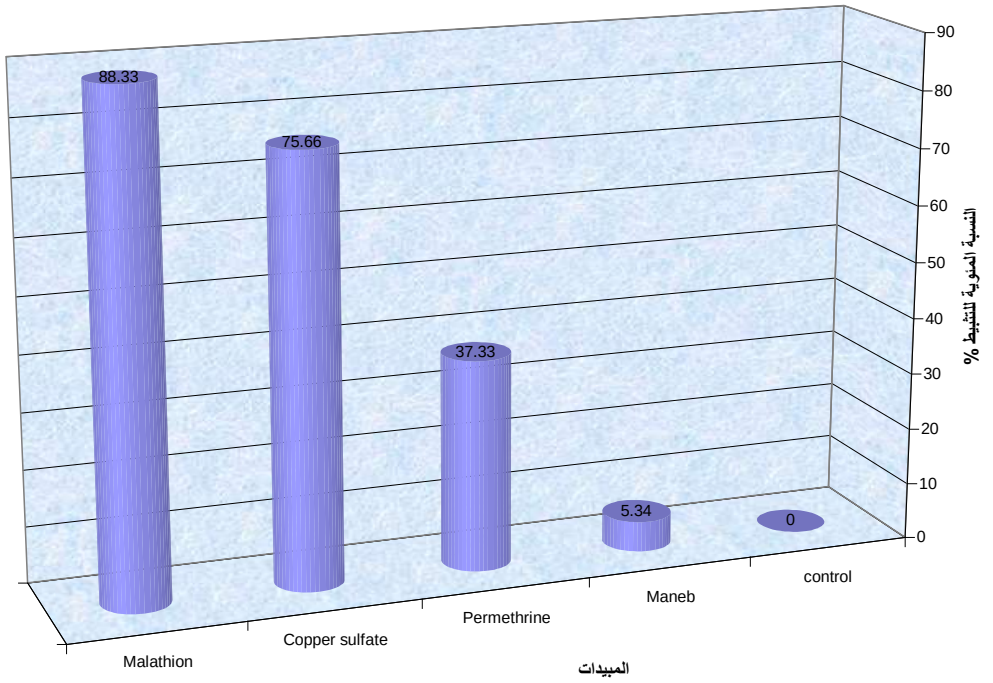
لقد عد الفطر *E. muscae* عامل المقاومة الإحيائية الرئيسي للذباب في حقول تربية الأبقار والدواجن في أوقات معينة من السنة وتعد الذبابة المنزلية واحدة من أكثر هذه الأنواع انتشاراً وضرراً. لذلك فهي هدف المكافحة المتمثلة بالمعاملات الكيميائية .وتفترض فلسفة الإدارة الراهنة للآفات بان استخدام المبيدات الكيميائية في البيئة يجب أن يكون بتوافق مع الأعداء الطبيعية , أي من المهم جداً انتخاب المبيد الكيميائي الذي لا يسبب تثبيط للفطريات التي تهاجم الحشرات أملاً في استخدام هذه المبيدات مع الممرضات الحشرية في إدارة المكافحة المتكاملة للآفات Integrated Pest Management (Soper *etal*., 1974).

توضح نتائج الشكل (٤-٤) تأثير المبيدين الحشريين Malathion وPermethrine في نمو الفطر على الوسط الزرعي (ECM)، إذ تبين إن مبيدMalathion قد تفوق على Permethrine ,إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط (٨٨,٣٣ و٣٧,٣٣)% على التوالي وأيد التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي في نسبة تثبيط نمو الفطر مقارنة بمعاملة السيطرة ويعود هذا التأثير إلى قابلية هذه المبيدات على خفض نشاط الإنزيمات وقدرتها في إيقاف نمو الخيوط الفطرية والابواغ (Mullens & Rodriguez, 1985)

تتعارض نتائج الدراسة الحالية ما ذكره Yendol (1968) ، الذي لم يلاحظ تثبيط للتجرثم البوغي عندما اختبر تأثير المبيدين الحشريين Malathion و Diazinon في الفطر *E. apiculata* في حين اتفقت النتائج الحالية مع ماذكره Olmert & Kenneth (1974) أن بعض مبيدات الفسفور العضوية ومبيد Malathion المخلوطة مع الوسط ألزرعي ثبطت نمو وإنبات ابواغ الفطر *E.virulenta*,كما اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع ماوجده Carruthers *etal*. (1985)بأنه لم يكن للمبيد Malathion أي تأثير في إنبات ابواغ الفطر *E.muscae* عندما اختبر تأثير هذا المبيد في إنبات ابواغ الفطر المذكور على شريحة زجاجية في رطوبة نسبية ١٠٠%، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما ذكره Mullens & Rodriguez (1986) بان مبيد الملاثيون ومبيد Dimethoate ثبطا إنبات ابواغ الفطر *E.muscae* عندما استخداما طريقة مشابهة للطريقة أعلاه بنسبة تثبيط بلغت (% ٩٤-٨٧) لكن في رطوبة نسبية قليلة. قد يرجع هذا الاختلاف في تأثير المبيدات المذكورة إلى الاختلاف بين السلالات أو الاختلاف في تركيبة المبيد أو سوء طريقة التخزين أو خطا في طريقة استخدامه.

تؤكد النتائج في(الشكل٤-٤) آنفا أيضا تأثير المبيدين الفطريين copper sulfate وmaneb , إذ ثبطا نمو الفطر بنسبة بلغت(75.66 % و5.34) على التوالي . وهي على خلاف مع ماوجده Latteur & Oger (1991) عندما عامل حشرة من الحنطة بفطريات تعود إلى الرتبة *Entomophthorales* بمخلوط من مبيدات Benomyl وmaneb و الكبريت , إذ خفضت هذه المبيدات من النسبة المئوية لهلاك المن المعامل بهذه الفطريات , في حين تطابقت نتائج هذه الدراسة مع Wilding(1972) , الذي لم

يلاحظ أي تأثير ملحوظ للمبيد Maneb في الفطريات التي تصيب من البازلاء, كذلك جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة إلى ماتوصل إليه(1986) Mullens & Rodriguez اللذان لم يجدا تأثير للمبيد الفطري maneb في إنبات وتجرثم الفطر*E. muscae* , و ذكر Lagnaoui & Radcliffe (1998) بان المبيدات الفطرية captofol و maneb و methalaxyl ثبطت من قابلية الفطريات العائدة إلى الرتبة *Entomophthorales* في إصابة حشرة المن على محصول البطاطا مما شجع تفش وانتشار هذه الحشرة في الحقل، وكذلك وجد Latter & Jonsen (2002) إن بعض المبيدات الفطرية من ضمنها مبيد maneb قد ثبطت قدرة الفطر الممرض للحشرات*Erynia neoaphidis* في إصابة المن عندما اختبر تأثير قرابة عشرين مبيد فطري في ابواغ الفطر المذكور وبين(2007) Klingene&Westrrum إن وجود بعض المبيدات الفطرية كمبيد Tolylfluanid و Fenhexamid قد قللا من بقاء و كفاءة الفطر *Neozygites floridana* (*Entomophthorales:Neozygitaceae*) من خلال تأثير هذه المبيدات في إنبات الابواغ وإحداث الإصابة. يعود تأثير المبيد copper sulfate إلى إن هذا المبيد يسبب انتفاخ الابواغ وتشويه الأنبوب الجرثومي وتكون ألشبكه الاندوبلازميه والنوى غير الطبيعية وذلك بتحوله إلى مركب سام يتفاعل مع المركبات والإنزيمات ألداخله في التفاعلات الحيوية للخلية الفطرية.اذ يكون الكبريت حامض الكبريتيك الذي يرسب البروتين ويقتل الفطر, كما تنفذ مركبات النحاس مباشرة أو عن طريق تكوين معقدات نحاسيه ذائبة عبر الغشاء البروتوبلازمي إلى داخل ألخليه ثم تتحلل لتعطي ايونات النحاس الحرة التي تقوم بربط جزيئتين من الحوامض الامينيه فتقلل من كفاءة صناعه البروتين وتثبيط نشاط الإنزيمات , أما سبب مقاومة بعض الفطريات للمبيدات هو قابليتها على تحويل المركبات السامة إلى مركبات غير سامة بفعل انظمة أنزيمية فعالة أو عدم تحويل المبيد إلى مادة أكثر فعالية في سميتها , إذ إن معظم المبيدات تحتاج إلى تنشيط داخل أنسجة الكائن الحي عن طريق الايض التنشيطي Activative metabolism وفي حالة عدم قيام النظام الأيضي بهذه العملية فإن الفطر يقاوم ذلك المركب(العادل,١٩٧٩).



شكل(٤-٤) تأثير بعض المبيدات الحشرية والفطرية في تثبيط نمو الفطر*E.muscae*

(5.34 =LSD)

٤-٣ اختبار قدرة الفطر *E. muscae* على إنتاج بعض إنزيمات التحلل بوساطة فحص كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC

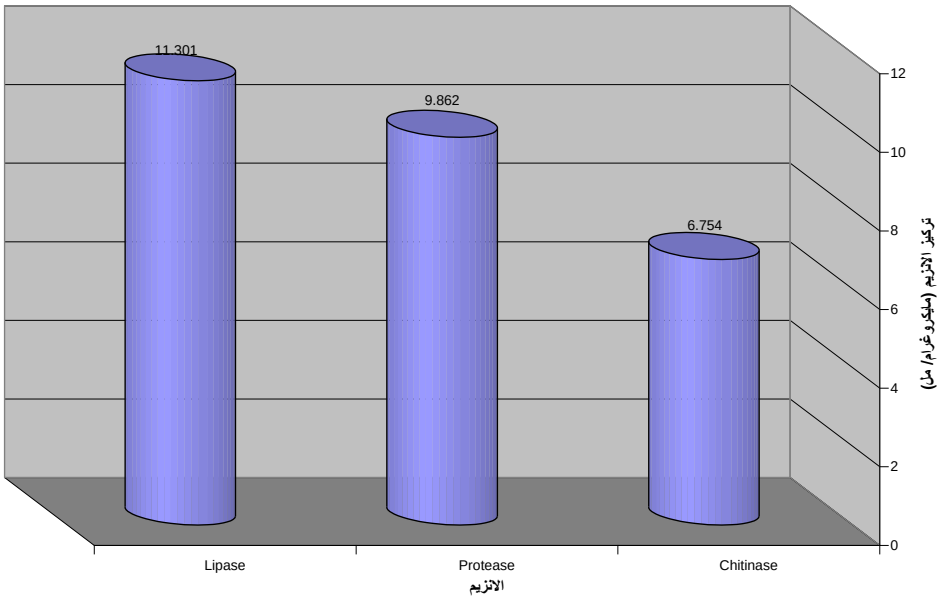
تشير نتائج الشكل (٤-٥) إلى إن الفطر *E. muscae* يفرز إنزيمات التحلل الرئيسية في الوسط الزرعي(ECM) مثل الإنزيمات المحللة للدهون والإنزيمات المحللة للبروتين والإنزيمات المحللة للكايتين , إذ بلغت قيمها(11.301 و9.862 و6.754) مايكرو غرام/مل على التوالي. اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ماوجده Jonsson (1967) عندما اختبر قابلية عشرة أنواع من الجنس *Entomophthora* في إنتاج أنزيم protease منها *E.sphaerosperma* و *E.cornica* و *E.curvispora* و *E.coronata* و *E.virulenta* أن قابلية الفطرين الأخيرين على إفراز الأنزيم المذكور كانت أعلى من بقية الأنواع إذ بلغ ٥ و 1.7 وحدة إنزيم /لترللفطرين المذكورين على التوالي واختبرت الناشئ (٢٠١٠) قدرة فطر المقاومة الحيوية *Trichoderma harizianum* المعامل بمبيدي التو بك و الانتور مختبرياً على إنتاج أنزيمات التحلل chitinase و protease وamylase بوساطة تقنية HPLC ,إذ بلغ أعلى تركيز لهذه الأنزيمات (5.1 و 4.1 و5.6) مايكرو غرام/مل على التوالي.

تعود قابلية الفطر في إنتاج أنزيمات التحلل في الزجا إلى نوع وكمية مكونات الوسط الزرعي الذي ينمو عليه الفطر , كما إنها تتأثر بالعديد من العوامل الموجودة في بيئة الفطر مثل درجة الحموضة PH و كمية المادة العضوية ودرجة الحرارة والرطوبة, وتفرز الفطريات الممرضة للحشرات العائدة إلى

جنس *Entomophthora* الإنزيمات القادرة على هضم المكونات الرئيسة للكيوتكل وخصوصاً إنزيمات التحلل الرئيسة Lipase و Protease و Chitinase (Dion , 1950), وهذا ما أكده Gabriel (1968) مع الأنواع الفطرية *E. virulonta* و *E. apiculata* و *E. thaxteriana* وأربع سلالات من الفطر *E. coronata* بإفرازها إنزيمات التحلل الرئيسة التي تمكنها من دخول جسم الحشرة ومهاجمة الأجهزة والأعضاء الداخلية, لذلك تعد هذه الإنزيمات خطوة مهمة جداً تتوقف عليها دورة حياة الممرض الحشري وتهاجم الفطريات الممرضة للحشرات مضائفها بصورة رئيسية خلال جدار الجسم إذ تهيئ هذه الأنزيمات عملية إنبات الابواغ وبذلك تساعد الفطر من اختراق طبقة الكيوتكل والدخول إلى جسم الحشرة الذي يعد بمثابة وسطاً ملائما لنمو وتكاثر هذه الفطريات وتكون هذه الطريقة مشابهة للطريقة التي تهاجم فيها الفطريات الممرضة للنبات مضائفهاويعتقد أنها تتم عن طريق التحلل الإنزيمي (Charnley, 1984).

لاحظ AL-Aidroos&Seifert (1979) أن الفطر الممرض للحشرات *M.anisopliae* ينتج أنزيمات N-acetylglucosaminase و estrase أثناء عملية اختراق الفطر جدار جسم الحشرة , إذ تحلل هذه الإنزيمات السكريات المتعددة والبروتينات الموجودة في طبقة الكيوتكل فيما قاس Coudron et al.,(1984) مستويات نشاط الأنزيمات المحللة للكايتين خلال نمو الفطر *M.anisopliae* والفطرين *B.bassiana* و *Nomurea relyie* ووجد أن نشاط الأنزيمين chitinase و exochitinase تكون واطئة أثناء إنبات الابواغ وتزداد تراكيز هذه الأنزيمات خلال اختراق الكيوتكل ونمو الخيوط الفطرية ووصل أقصى نشاط للأنزيم عند تكون الابواغ وخروج الحوامل البوغية على سطح المضيف .

اثبت (Dean *et al*., (1977 باستخدام تقنية HPLC إن الأنزيمات المحللة للكايتين في راشح فطر المقاومة الحيوية *Trichoderma harizianum* هي أنزيمات Eexochitinases واضاف Dix&Webester(1995) إن لإنزيم الكايتينيزالذي هو عبارة عن (B-1,4-N-acetyl-D-glucosamine) Endoglucanse متشابهات متعددة منها Endochitinase الذي لم يحدد دوره في عملية الإصابة وإنزيم Exochitinase الذي يلعب دورا هاما في بزوغ الفطر من جسم الحشرة المصابة لإعادة دورة الحياة.



شكل(٤-٥) تراكيز إنزيمات التحلل الرئيسية التي يفرزها الفطر *E.muscae* (0.0314 = LSD)

شكل (٤-٦)بيانات كروموتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي (HPLC)

٤-٤ الاختبار الحيوي للفطر *E. muscae* في مختلف ادوار حياة الذبابة المنزلية

٤-٤-١ البالغة

تعد طريقة رش الكونيدية (conidial showering) الأكثر شيوعا في طرائق الاختبار الحيوي لمنهجية الإصابة ويعبر عنها بوحدات الملم٢ و الملتر وهذه الطريقة هي المسار الطبيعي لإصابة الآفات بالفطريات الممرضة للحشرات(Eileinberg,1999).

يسجل الجدول (٤-٢) نسب هلاكات بالغات الحشرة بعد إجراء عدوى Infection بمعلقات الفطر المحضرة مسبقاً, إذ سبب التركيز ٥×١٠° بوغ/مل أعلى نسبة هلاك بلغت ٤٣,٣٣% بعد ١٢٠ساعة من المعاملة وارتفعت إلى56.33% بعد ١٤٤ساعة من المعاملة, بينما كانت أقصى نسبة هلاك للدور المذكور(٤٩,٩٩ و ٦٩,٩٩ و ٨٩,٩٩)% بعد تعريضها للتراكيز ٢×١٠° و ٣×١٠° و ٤×١٠° بوغ/مل بالتوالي ولكن بعد ١٦٨ ساعة من المعاملة , في حين كانت أوطأ نسبة هلاك (6.66 %) وارتفعت الى (23.33)% في التركيز١×١٠° في المدة المذكورة نفسها , واتضح وجود علاقة طردية بين كل من التركيز ونسبة هلاك ودعمت هذه النتائج إحصائيا من خلال الفرو قات المعنوية بين المعاملات المذكورة.

تعرف أمراضية أي ممرض حشري بأنها قدرة الممرض على تسبيب المرض في الحشرة ويعد إثبات الامراضية الخطوة الأولى باتجاه الدراسات حول ضراوة أي ممرض ويتطلب تقويم هذه الضراوة دراسات كمية حول العلاقة بين الجرعة واستجابة الحشرة dose-response-relationship (Lacey,1997) , ولدراسة هذه العلاقة عدت LC_{50}(الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحشرات المختبرة) و LT_{50} (المدة الزمنية اللازمة لهلاك نصف العدد من الحشرات المختبرة) القيمتان الأساسيتان في طرائق الاختبار الحيوي لرتبة فطريات *Entomophthorales* ومقياساً لضراوة فطر المكافحة الجرثومية المستخدم , إذ كلما كانت قيمتها واطئة فان ذلك يشير إلى ضراوة عالية (Papierok & Hajek ,1997) , ومن المعروف إن ضراوة الفطريات الممرضة للحشرات تتغاير حتى بين سلالات النوع الواحد (Papierok, 1986).

بناءً على ماتقدم يوضح الشكل (٤-٦) قيمةLT_{50} والتي بلغت160 ساعة , بينما بلغ التركيز اللازم لهلاك نصف أعدادٍ بالغات الذبابة المنزلية(LC_{50} 2×10^5 بوغ/مل (شكل ٤-٧),وبالاستناد إلى قيمة معامل الارتباط التي تساوي (o.99) يتضح وجود ارتباط حقيقي بين الزمن والتركيز والهلاك إذ كلما كانت قيمة عامل الارتباط واطئة فان ذلك يبين ارتباط حقيقي بين التركيز ونسبة الهلاك والفترة الزمنية (Finney,1971).

جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما وجده Kramer & Steinkraus (1981) عندما عرض أعداد مختلفة من حشرة الذبابة المنزلية لابواغ هذا الفطر, إذ تراوحت النسبة المئوية للهلاك بين ١٠٠-٩٥% بعد مرور سبعة أيام من المعاملة, وكذلك سجل الباحثان المذكوران (١٩٨٧) نسبة هلاك بلغت ١٠٠% عندما استخدما الفطر *E. muscae* لمكافحة ١٦ نوعاً من رتبة ثنائية الأجنحة مختبرياً من

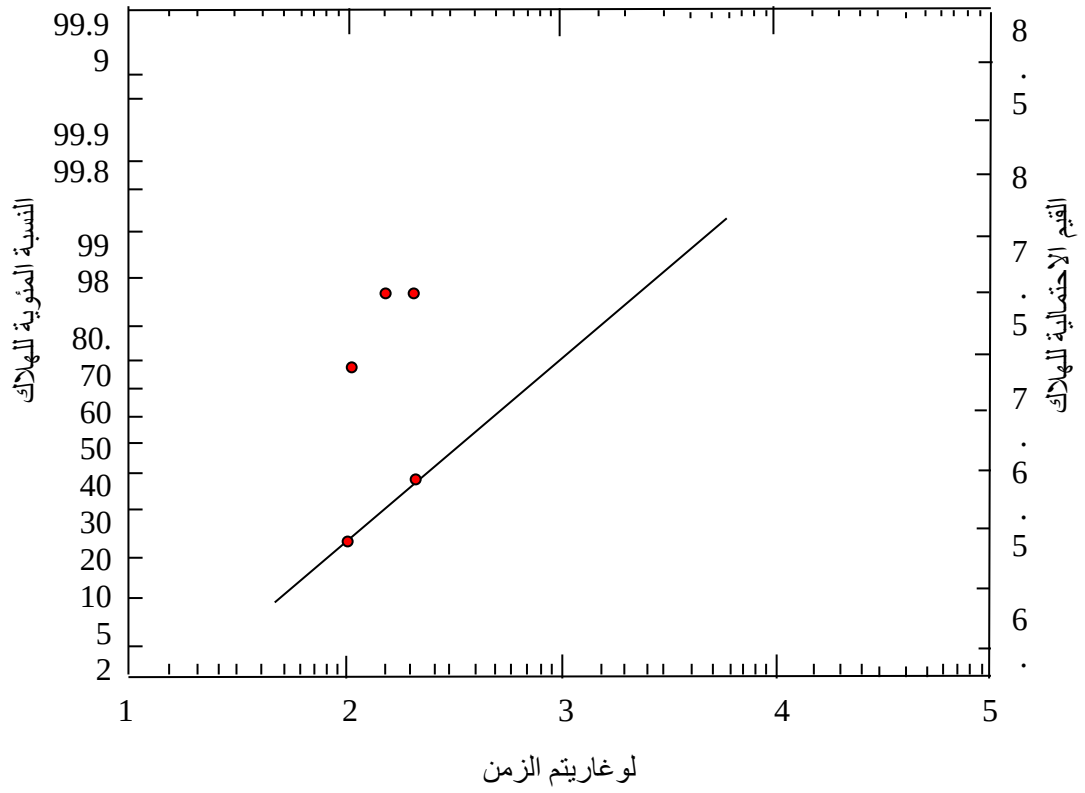
ضمنها الذبابة المنزلية وحددا قيمة LC_{50} للفطر *E.muscae* إذ بلغت 67 بوغ أولي/ملم٢ وكانت قيمة LC_{50} للابواغ الثانوية أكثر فعالية إذ بلغت 0.34 بوغ ثانوي/ملم٢ ووجد Feng *et al.* (1991) ان LC_{50} للفطريات الممرضة للحشرات *Conidiobolus coronatus* و *C.thromboides* و *P.neoaphidis* و *Z.radicans* كانت (2.2-4 و 2.3-13.2 و 1.4-8.1 و 25.1-46.8) بوغ / ملم^{٢} عندما اختبر تأثير هذه الفطريات مختبرياً في حشرتي من الحبوب *Metopolophium dirhodum* و *Diruphis noxia* وبين Kuramato & Shimozu (1992) ان تركيز المعلق ١×١٠^{٧} بوغ/مل للفطريات *Paecilomyces fumosoroseus* و *B. bassiana* و *M. anisopliae* حققت نسبة هلاك بلغت (١٠٠ و ٨٦ و ٩٣,٥)% على التوالي, وإن قيم الجرعة القاتلة والزمن اللازم لهلاك نصف العدد من الحشرات اختلفت بين عزلات الفطريات المذكورة المستخدمة لمكافحة كاملات الذبابة المنزلية , إذ بلغت LC_{50}(6.3 x 10^{5} بوغ/مل) , في حين كانت Lt_{50} (5.1) يوم كما جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة لما ذكره Barson *et al.*, (1994) عندما استخدم معلقات فطرية تعود إلى ستة أنواع من الفطريات الممرضة للحشرات لمكافحة الذبابة المنزلية وكان تركيز المعلق ١×١٠^{٨} بوغ/مل للفطرين *M.anisopliae* و *Tolypodadium cylindrosporum* أكثر معلقات تلك الفطريات تأثيرا إذ بلغت نسبة الهلاك ١٠٠% بعد مرور ستة أيام من المعاملة, واستخدم Jun-Huan &Feng (1998) ثمان جرعات من كل من الفطرين *P.delphasis* و *P.neoaphidis* لمكافحة من الخوخ الأخضر *Myzus persicae* مختبريا, إذ بلغت قيم الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحشرات المذكورة(0.9-18.1 و 17- 0.04) بوغ/ملم^{٢} بالتعاقب

اختبر Desenna *etal.* (2002) تأثير معلقات عزلتين من الفطرين *Aspergillus flavus* و *Penicillium coryliphilua* ولاحظ إن كلا الفطرين قد حققا نسبة هلاك بلغت ١٠٠% ولكن الفترة الزمنية اللازمة لهلاك الذبابة المعاملة بالفطر *A. flavus* كانت اقصر من الفترة الزمنية اللازمة لهلاك الذباب المعامل بالفطر الثاني .

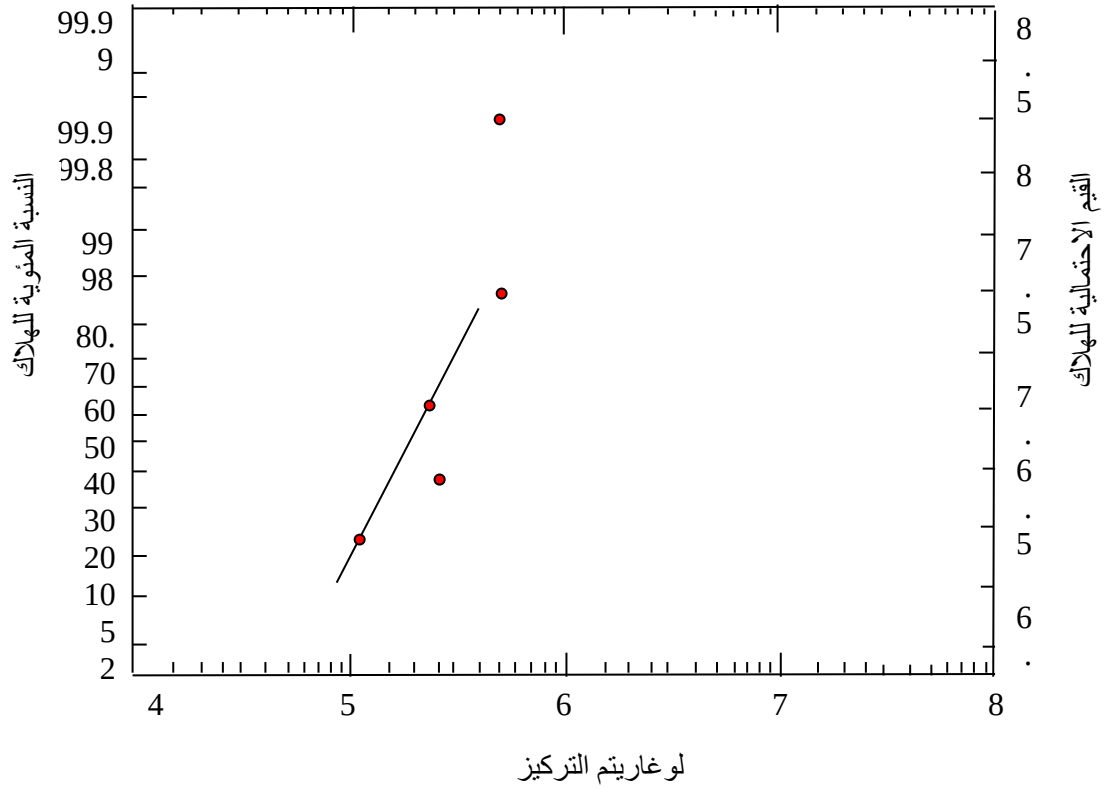
جدول (٤-٢) تأثير معلقات الفطر*E.muscae*في بالغات الذبابة المنزلية *M.domestica*

تركيز معلق الفطر (بوغ/مل)	النسبة المؤية للهلاك (%) في		
	١٢٠ساعة	١٤٤ ساعة	١٦٨ ساعة
١٠^٥×١	—	٦,٦٦	٢٣,٣٣
١٠^٥×٢	٣,٣٣	١٣,٣٣	٣٣,٣٣
١٠^٥×٣	١٣,٣٣	٢٣,٣٣	٣٣,٣٣
١٠^٥×٤	٢٣,٣٣	٤٣,٣٣	٢٣,٣٣
١٠^٥×٥	٤٣,٣٣	٥٦,٣٣	—
Control	—	—	—

LSD بين التراكيز = ٥,١٨ LSD للزمن = ٤,٠١ LSD للتداخل = ٨,٩



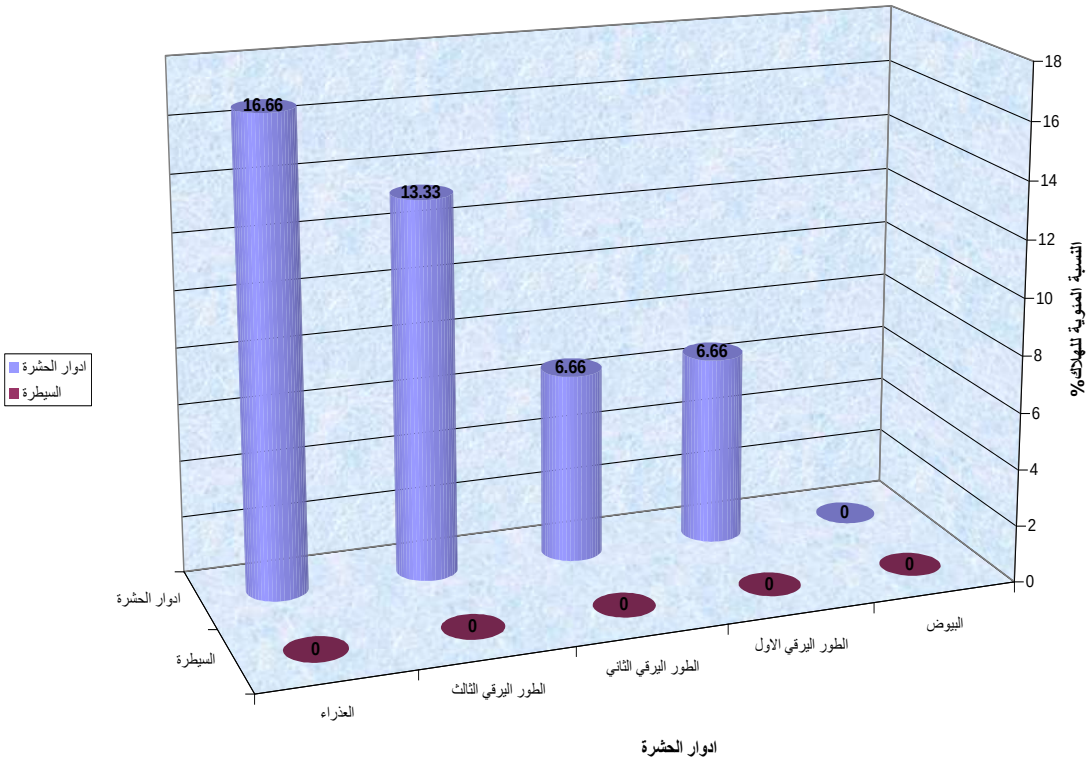
شكل(٤-٧) الزمن اللازم لهلاك نصف العدد من بالغات الذبابة المنزلية (LT 50) (Finney,1971)



شكل(٤-٨) التركيز اللازم لهلاك نصف العدد من بالغات الذبابة المنزلية (LC 50)

٤-٤-٢ البيضة والأطوار اليرقية والعذراء

انتخب تركيز العالق الفطري ٥×١٠^٥بوغ/مل الذي حقق أعلى نسبة هلاك عند اختبار تأثيره في البالغات لاختبار تأثيره في البيوض والأطوار اليرقية ودور العذراء واتضح بأنه لم يكن هنالك تأثيراً واضحاً للفطر في الأطوار المذكورة ودور العذراء ,ويتضح من الشكل (٤-٨) عدم وجود تأثير للفطر في فقس البيض,إذ تساوت نسبة الهلاك مع معاملة السيطرة, في حين كان تأثير الفطر طفيفاً في يرقات الطور الأول والثاني, إذ بلغت نسبة الهلاك 6.66 % مقارنة مع معاملة السيطرة, بينما كانت نسبة هلاك للطور اليرقي الثالث 13.33% و 16.66 %ويرجع السبب في ذلك إلى تخصص هذا الفطر في إصابة الكاملات دون غيرها من الأطوار وتتطابق هذه النتائج مع ما ذكره (Keller *et al.*, 1999) عن هذا الفطر بأنه يصيب عدة حشرات من رتبة ثنائية الأجنحة ويكون أكثر تخصصاً على الذباب المنزلي وعلى البالغات دون غيرها من الأطوار الأخرى.



شكل(٤-٩) تاثيرمعلق الفطر $1x10^5$ بوغ/مل **في الأدوار غير البالغة للذبابة المنزلية**

٤-٤-٣ جنس وعمر البالغة

على الرغم من الانتشار الواسع وتخصص الفطر *E. muscae* في الإصابة إلا انه تتوفر تفاصيل قليلة جداً عن علاقة الممرض بالعائل الذي يصيبه Host-Pathogen interaction, ولم يتم البحث عن العلاقة بين الأدوار المحتملة لعوامل الجنس والعمر للحشرة أو مستوى التعرض للمرض بين الذبابة المنزلية والفطر *E. muscae* على الرغم من أن هذه المعلومات مفيدة جداً في فهم وبائية Epizootics المرض الذي يسببه الفطر في الطبيعة (Mullens,1985).

أظهرت النتائج في الجدول(٤-٣) عدم وجود اختلاف معنوي في نسبة الهلاك لكلا الجنسين في كل فئة عمرية , في حين كان هنالك اختلاف معنوي بين نسبة الهلاك والعمر إذ لوحظ انخفاض نسبة الهلاك بزيادة العمر , إذ بلغت أعلى نسبة هلاك 46.66 % بعد ١٢٠ ساعة وارتفعت إلى 53.33 % بعد ١٤٤ساعة للذكور والإناث بعمر يوم واحد , وكانت أقصى نسبة هلاك 96.99 % و89.99 % لكلا الجنسين بعمر ٣ و ٧ يوم على التوالي بعد ١٦٨ ساعة من المعاملة . في حين بلغت اوطا نسبة هلاك86.65 % بعد ١٤ يوم للذكور والإناث في المدة المذكورة نفسها.

جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما وجده Mullens (1985) عندما عامل أربع انواع من الذباب ذات أعمار مختلفة بالفطر *E.muscae* ولاحظ عدم ظهور أعراض ما بعد الموت في الحشرات الأكبر

عمراً مقارنة بالحشرات الأقل عمراً التي ظهرت عليها أعراض الإصابة كاملة مع إنتاج الابواغ الأولية وعدم وجود اختلاف معنوي في نسبة الهلاك الكلية لكلا الجنسين.

ذكر Uebel *et al*., (1978) إن عدد البيض الذي تضعه الإناث قد انخفض إلى حد كبير عندما تزاوجت هذه الإناث مع ذكور سبق وان عرضت إلى سبورات الفطر *E. muscae* مقارنة بإناث تزاوجت مع ذكور سليمة كما تعرض البعض من هذه الإناث إلى الإصابة بالفطر المذكور بسبب انتقال سبورات هذا الفطر من الذكر إلى الأنثى ميكانيكياً أثناء عملية السفاد. لاحظ Zurek *etal*., (2002) انجذاب ذكور الذبابة المنزلية للتزاوج مع الإناث المصابة بالفطر المذكور التي تتميز بامتلاكها بطن منتفخة مقارنة بالإناث السليمة الأمر الذي يؤدي إلى انتقال المرض ميكانيكياً إلى الذكور. وفسر ذلك على إن كلا انتفاخ البطن وافرازفرمون Z-tricosone هي المسئولة بصورة رئيسية عن هذا الانجذاب.

جدول(٤-٣) تأثير معلق الفطر *E.muscae* ($5x10^5$ بوغ / مل) في جنس وعمر بالغات الذبابة المنزلية

الجنس	العمر (يوم)	النسبة المئوية للهلاك (%)		
		١٢٠ ساعة	١٤٤ ساعة	١٦٨ ساعة
ذكور	١	٤٦,٦٦	٥٣,٣٣	–
إناث		٤٦,٦٦	٥٣,٣٣	–
ذكور	٣	٤٣,٣٣	٥٠	3.33
إناث		٤٠	53.33	3.33
ذكور	٧	٣٦,٦٦	46.66	6.66
إناث		36 .3 ٦	٤٣,٣٣	١٠
ذكور	١٤	٣٠	٣٦,٦٦	١٣,٣٣
إناث		٣٠	٣٦,٦٦	١٣,٣٣
ذكور	السيطرة	–	–	–
إناث		–	–	–

LSD للجنس = 4.12 LSD للعمر= 3.15 LSD للزمن = 6.12

٤-٤-٤ تأثير راشح للفطر*E. muscae* في بالغات الذبابة المنزلية

تجرى العديد من التجارب المختبرية على الفطر الممرض للحشرات قبل استخدامه كمبيد حيوي Biopesticide ضد الحشرات أهمها كفاءة الفطر في النمو على الوسط ألزرعي وطريقة إطلاقه في الحقل والفترة الزمنية اللازمة للهلاك فكلما كانت هذه الفترة قصيرة كان ذلك أفضل(Lacey, 1997).

يوضح الجدول (٤-٤) تأثير تراكيز مختلفة من راشح الفطر المذكور في بالغات الحشرة, إذ تفوق التركيز ١٠٠% بفرق معنوي على باقي المعاملات بنسبة هلاك بلغت (٨٦,٦٦%) بعد ٢٤ساعة من المعاملة .في حين كانت نسبة الهلاك ٥٠,٦٦ % وارتفعت إلى ٩٣,٩٩% في التركيز ٧٥ % تلاه التركيز ٥٠ % بنسبة هلاك 50.66% في المدة المذكورة نفسها, بينما بلغت اوطا نسبة هلاك (٢٦,٦٦%)عند التركيز ٢٥% في نفس الفترة الزمنية المذكورة أعلاه. مما يشير إلى وجود علاقة طردية بين التركيز ونسبة الهلاك , إذ إن زيادة التركيز تزيد من تراكم المواد السامة في خلايا جسم الحشرة الأمر الذي يؤدي إلى انفجار هذه الخلايا مما يزيد من معدلات نسبة الهلاك وكذلك إلى قابلية الفطر الممرض للحشرة على إفراز بعض الأنزيمات المحللة مثل الأنزيمات المحللة للدهون والأنزيمات المحللة للبروتين والأنزيمات المحللة للكايتين و أنواع مختلفة من السموم الفطرية Mycotoxin (Wattanalai *etal*.,2004).

وجدت خلف (١٩٩٥) إن راشح الفطر *A. niger* حقق نسبة هلاك ٩٠% بعد مرور ستة أيام من المعاملة عند استخدامه في مكافحة بالغات الذبابة المنزلية, في حين سجلت الجبوري (٢٠٠٣) أعلى نسبة هلاك سجلها راشح الفطر *A. niger* بلغت ٩٠% بعد مرور أربعة أيام من المعاملة وهذا يتعارض مع ماتوصلت إليه نتائج الدراسة الحالية.

جدول (٤-٤) تأثير راشح الفطر*E.muscae* في بالغات الذبابة المنزلية *M.domestica*

تركيز راشح الفطر (مل)	النسبة المؤية للهلاك(%) في	
	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة
%٢٥	٢٦,٦٦	٥٣,٣٣
%٥٠	٤٣,٣٣	٤٦,٦٦
%٧٥	٥٠,٦٦	٤٣,٣٣
%١٠٠	٨٦,٦٦	١٣,٣٣
Control	–	–

LSD بين التراكيز =7.27 LSD للزمن =4.59 LSD للتداخل =10.28

الاستنتاجات

١- إن الوسط الزرعي (**ECM**) كان الوسط الأمثل في عزل وحفظ الفطر*E.muscae* مقارنة بالأوساط الأخرى والتي لم ينمو عليها الفطر المذكور.

٢- أثرت درجات الحرارة والرطوبة بشكل واضح في معدل النمو ألشعاعي للفطراذ سجلت درجة الحرارة ٢٥ م والرطوبة ٩٥ % أعلى معدل لنمو وتجرثم الفطر.

٣- سجل المبيد الحشري Malathion و المبيد الفطري Copper sulfate أعلى نسبة مئوية لتثبيط نمو الفطر في حين كان تاثيرالمبيد الحشري Permethrine و المبيد الفطري Maneb منخفضاً.

٤- أثبتت نتائج فحص HPLC إن للفطر القدرة على إنتاج بعض إنزيمات التحلل الرئيسية مثل Lipases و Proteases وChitinases .

٥- أثبتت معلقات الفطر قدرتها في قتل بالغات الحشرة في حين كان تأثير معلق الفطر $5x10^5$ بوغ/مل واطئ في قتل الأطوار المختلفة للحشرة ودور العذراء نظراً لتخصص الفطر المذكور على البالغات.

٦- بزيادة عمر الحشرة تقل النسبة المئوية للهلاك ولم يكن هنالك اختلاف في نسبة الهلاك الكلية بين الذكور والإناث.

٧- أثبتت جميع تراكيزراشح الفطر قدرتها العالية في قتل بالغات الذبابة المنزلية.

التوصيات

١- إجراء دراسة تصنيفية للفطر *E.muscae* لتحديد السلالات العراقية المنتشرة .

٢- إجراء تجارب حول المدى العائلي Host range للفطر عن طريق اختبار تأثير الفطر على أنواع أخرى من رتبة ثنائية الأجنحة.

٣- دراسة إمكانية تصنيع مبيد حيوي Bioinsecticide من الفطر المذكور عوضاً عن المبيدات الكيماوية.

٤- إجراء دراسة حقلية باستخدام طريقة الرش لمعلقات وراشح الفطر المؤثرة على الحشرة للتقليل من أعدادها.

٥- يوصى باستعمال تراكيز واطئة من المبيدين Permethrine و Maneb مع الفطر المذكور لإدخاله ضمن برامج المكافحة المتكاملة (IPM).

المراجع باللغة الأجنبية

AL-Aidroos,K.and Seifert,A.M.1979.Polysaccharide and protein degradation and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungi *Metarrhizium anisopliae***.**J.Invert.Pathol.36:35-40.

ALeksic,S.and Bockemmuhi,J.1999.*Yersinia* and other enterobacteria, Manual of clinical microbiology.ASM press.Washington.D.C.408 pp.

Aliey, L.B. 1966. Insect pathology and Microbial control. Rothamsted station, Harpenden, England.330pp.

Anantiko, L.; Banditsing, C. and Ketavan, C. 1982**.** Studies on the life cycle and the effect of gamma radiation on the house fly *Musca domestica* L. M.Sc. Thesis. Office of atomic energy for peaca. Bankok. (Thailand)(abstract seen only).

Ariel, W.2007.Effect of temperature on the invitro growth of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunkii* ,two co-occuring fungal pathogens of diamondback moth *Plutella xylostella* .J.Ecol.53:501-516.

Axtell, R.C. 1970**.** Integrate fly control program for caged-poultry houses. J. Econ. Entomol. 63: 400-405.

Axtell, R.C. and Arends, J.J. 1990**.** Ecology and management of Arthropod pest of poultry. Ann. Rev. Entomol. 35: 101 - 126.

Banjo, A.D.; Lawal, O.A. and Adeduji, O.O. 2005**.** Bacteria and fungi isolated from house fly *Musca domestica* L. larvae. Afr. J. Biotechnol. 4(8): 780-784.

Barson,G.; Renn,N. and Bywater, A.F. 1994.Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the housefly *Musca domestica* L..J.Invert.Pathol.64:107-113.

Benz, G. 1987. Epizootiology of Insect Diseases. John Wiley & Sons, New York.214pp.

Borgemeister, C. and Poehling, H-M. 1989. The impact of insecticide treatments on the population dynamics of cereal aphids and their parasitoids. IOBC/WPRS Bulletin.12(1): 122-132.

Brobyn, P. and Wilding, N. 1977. Invasive and developmental processes of *Entomophthora* species infecting aphids. Trans. Br.Mycol. 69: 349-366.

Carruthers, R.I. and Haynes, D.L. 1986. Temperature, moisture, and habitat effects on *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidial germination and survival in the onion agrosystem. Environ. Entomol. 15: 1154-1 160.

Carruthers,R.I.; Whitefield,G.H. and Hynes, D.L.1985.Pesticide-induced mortality of natural enemies of the onion maggot , *Delia antique* (Dip: Anthomyiidae).Entomophaga.30(2):151-162.

Charnley,A.K.1984.Physiological aspects of destructive pathogens in insects by fungi.ASM press.Washington.D.C.496PP.

Coudron,T.A; Kroha, M.J.; Ignoffa,C.M.1984.Levels of chitinilytic activity during development of three entomopathogenic fungi.Biochem.Molec.Biol.79:339-343.

Cohn,F.B.1855.*Entomophthora muscae* as a pathogene of house fly *Musca domestica* L.J.Entomol.2:13-17.

Dean, G. J. and Wilding, N. 1973. Infection of cereal aphids by the fungus *Entomophthora*. Ann. Appl. Biol. 74: 133-138.

Dean,E.E.;John,M.W.;James,M.L.andPeperdy,J.F.1977.The purification and characterization of *Trichoderma harizianum* exochitinases .J.Enzymol.1383(1):101-150.

Dipeolu ,O.O 1977. Field and laboratory investigation in to the role of the Musca species in The transmission of intestinal parasitic cysts and eggs in Nigeria . J. Epidem.microbiol. 21: 209 – 214

Desenna-Nunes, M.; Da Costa, G.L.; Bittencourt, V.R.E.P. and Souza, E.J. 2002.Invitro evalution of the fungus *Aspergillus flavus* and *Penicillium corylophilum* in adult of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae).J. Parasitol. 57(1-2): 9-14.

Dion , W. M . 1950**.** The proteolytic enzymes of micro- organisms 11.factors affecting the production of proteases in submerged culture. Can.J.Research . 28:586-599.

Dix, N.J. and Webster, J. 1995. Fungal Ecology. Chapman and Hall. London. 290 p.

Donald, A.R. 2001**.** House fly *Musca domestica* L. description, Domestic animals effect damage caused, Adult habitat, Feeding, Methods of dispersal and seasonality.J.Entomol. 45: 491-498.

Dunphy, G. B.and Nolan. 1992. Effects of physical factors on protoplasts of *Entomophthora egressa.* Mycol. 71: 589 – 602.

Eilenberg, J. 1988. The culture of *Entomophthora muscae*.in carrot flies*Psila rosae.* and the effect of temperature on the pathology of the fungus. Entomophaga.21:56-60.

Eilenberg, J. 1999**.**Entomophthorales on Diptera.Entomophaga.12:121-220.

Eilenberg, J.; Brcsclanl, J. and Latgd, J.P. 1986**.** Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora.* J. Invert. Pathol. 48: 318-324.

Eilenberg, J.; Bresciani, J. and Martin, J. 1987.*Emomophthora* species with *E.muscae* like primariy spores on two new insect orders, Coleoptera and Hymenoptera. Nordic J. of Bot.7: 577-584.

Feng, M. G.; Johnson J. B. and Kish, L. P. 1990. Survey of naturally infecting cereal aphids (Hymenoptera: Aphididae) Environ.Ento mol. 19: 1535-1542.

Feng, M. G.; Johnson J. B. and Kish, L. P. 1991.Bioassay of four entomophthoralean fungi (Entomophthorales) against *Diuraphis noxia* and *Metopolophium dirhodum* (Homoptra:aphididae) .Environ.Entomol.20(8):338-345.

Finney , D . J . 1971. Probit analysis , 3rd ed . Cambridge University press,Cambriddge , 333 pp.

Gabriel , B. P. 1968 . Enzymatic activities of some entomopathogenic fungi . J . Invert. Pathol. 11(1) : 70-81.

Galaini-Wraight, S.G.; Wraight, S.P.; Carruthers, R.T. and Roberts, D.W. 1992. Temperature-dependent germination and host penetration of thc entomophthoralean fungus *Zoophthora radicans* on the leafhopper. Mycol. Res. 96: 38-48.

Gangarosa, E.J.and Beisel, W.R. 1966. The Nature of the Gastrointestinal lesion in Asiatie cholera and its relation to pathogensis: A biopsy study,J.Med.Entomol.35: 125-135.

Gebhart-Muller,Y.; Muller,P. and Nixton,B.1998.Unusual case of postoperative infection caused by *Morganella morganii* . J.foot ankle surg.37:145-147.

Geden, C.J. 1997. Evolution of *Paraiotonchium Muscadomesticae*(Nema toda:Iotonchidae).a potential biological control agent of the house fly(Diptera:Muscidae).J.Invert.Pathol.10:42-47.

Georgehiou,G.P.1990.Overview of insecticide resistanse of house fly *Musca domestica* L.J.Entomol. 43: 18-14.

Glare, T.R.; Chilvers, G.A. and Milner, R.J. 1985. Capilloconidia as infective spores in *Zoophthora radicans* (Entomophthorales). Trans. Br.Mycol. Soc. 85: 463-470.

Gough, P.M. and Jorgenson, R.D. 1983**.** Identification of porcine transmissible gastroenteritis virus in house flies (*Musca domestica* L.) Am. J. Vet. Res. 44: 2078-2082.

Grbic, M. 1984**.** Effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) on the mortalitly of some pests and fungal conditions and pesticides applied. Zbornik. zaprirodne-nauke (Yugoslavia). 67: 111-123.

Greenberg , B. 1971**.** Flies and Disease. Vol. 1, Ecology, Classification . Princton university press.princton,NJ.55pp.

Greenberg , B . 1973**.** Flies and Disease . Vol . 2, Biology and disease transmission . Princton university press. Princton,NJ.605pp.

Greene, G.L.; Hogsette, J.A. and Patterson, R.S. 1989**.** Parasites that attack stable fly and house fly (Diptera: Muscidae) puparia during the winter on dairies in North western Florida. J. Econ. Entomol. 82: 412-415.

Grubel, P.; Hoffman, J.S.; Chong, F.K.; Burstein, N.A. ; Mepani C. and Cave, D.R . 1997.Vector potential of house flies *Musca domestica* for *Helicobacter pylori* .J.Clin.microbiol..35 : 1300-3.

Gustafson, M.1965.One species of the genus Entomophthora Fres.in Sweden.cultivation and physiology .Lantbrukshogskolans Analer.31:405-457.

Hall, I.M. and Dann, P.H. 1957**.** Entomophthorous fungi parasitic on the spotted alfalfa aphid. Hilgardia, 27, 159-181. (cited in Steinhaus, E.A. 1963. Insect pathology. Vol. 2. Academic Press. New York and London.

Hamm, J.J.1980**.** Epizootics of the *Entomophthora erupta* as pathogene of *Iribsia* spp . J. Invert.Pathol. 36: 60-63.

Hewitt,C.G. 1910**.** The house fly . a study of its structure , development , bionomics, and economy . Edited by sherrat and Hughes , university press,Manchester.400pp.

Hibbett D.S; Binder M.and Bischoff, J.F. 2007. "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi". Mycol. Res. **111** (5): 509–47.

Horn, D.J. 1983**.** Selective mortality of parasitoids and predators of *Myzus persicae* on collards treated with malathion,Carbar yl, or *Bacillus thuringiensis*. Ent. Exp. Appl. 34: 208-211.

Huber , J. and Hughes , P.R.1984 . Quantitative bioassay in insect pathology . Bull . Entomol . Soc . Am . 30: 31-34.

Hucko , M. 1984**.** The role of house fly *Musca domestica* L. in the transmission of *Coxiella Burnettii* . Folia parasitologica (prata) , 31: 177 – 181

Humber, K. A. 1997**.** Fungi Identification. Manual of Techniques in Insect Pathology (L. Lacey, Ed.), pp. 153-187. Academic Press.1150pp.

Jesperson, J.B. and Keiding, J. 1990**.** The effect of *Bacillus thuringiensis* on *Musca domestica* L. larvae resistance to insecticides. p.p. 215-229. In Rutz, D.A. and R.S. Patterson (Eds.) Biocontrol of arthropods affecting livestock and poultry. U.S.A. West view Press.430pp.

Jonsson, A.G.M.1967.Pilot-plant production of protease by *Alternaria tenuissima*.Appl.Microbiol.15:319-324.

Jun-Huan,X.and Feng,M.G.2000.The time-dose mortality modeling and virulence induces for two entomophthoralean species, *Pandora delphacis* and *P.neoaphidis* against the green peach aphid ,*Myzus persicae*.university of Zhejiang.Dep.Biol.Academic press.7:29-34.

Kaddou,I.K.1966.Effect of x-irradition of *Musca domestica*L. pupae on adult emergence and longivity.Bull.Biol.Res.centre.Baghdad.2:56

Keiding,J.1978.insecticide resistance in housefly. Danish pest infestation Laboratory Annual Report 20:43-55.

Keiding, J. 1986**.** The house fly: biology and control. WHO vector No. 63.

Keiding,J. and Skovmand, O. 1983**.** Insecticide resistance in housefly. Danish pest infestation Laboratory Annual Report 23:55-58.

Keller, S. 1987**.** Arthropod pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. Sydowia. 40: 122-167.

Keller, S. 1991**.** Arthropod-pathogenic Entomophthomles of Switzerland 11. *Erynia, Eryniopsis, Neozygites, Zoopphthora* and *Tarichium*. Sydowia. 43: 39-122.

Keller, S.1994**.**Working with arthropod-pathogenic *Entomophthorales*. IOBC/WPRES. Bull.17:287-299.

Keller, **S**. **and Wilding**, **N.** 1985. *Entomophthora brevinucleata* sp. nov. (Zygomycetes,. Entomophthoraceae) a pathogen of gall midges(Dip., Cecidomyiidae)**.**Entomophaga.30(1):55-63.

Keller S.; Kalsbeek, V., and Eilenberg, E. 1999**.** Redescription of *Enotmophthora muscae*. Sydowia**.** 51: 197-209.

Keller , S . and Petrini, O . 2005 . Key to the identification of Arthro pod pathogenic genera of the families Entomophthoraceae and Neozygitaceae (Zygomycetes) with description of three new subfamilies and a new genus . Sydowia. 43: 39-122.

Kelling, F.J. 2001**.** Olfaction in the house fly morphology electrophysiology. Ph.D. thesis. University of Groningen.266PP.

Kelsey, J. M. 1965**.** *Entomophthora sphaerosperma* (Fres.) and *Plutella maculipennis* (Curtis) ,control. N. Z. Entomol. 36: 47-49.

Kim,J.J.; Lee, M.H.; Yoon,C.S.; Kim,H.Y. and Kyuchinkim,P.2001**.** Control of the cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen .http://www.ffte.agent.org/library/ article/.

King, B.H. 1997**.** Effect of age and burial of house fly (Diptera: Muscidae) pupae on parasitism by *Spalangia cameroni* and *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). Environ. Entomol. 26: 410-415.

Klingen, I. and Westrum, K. 2007**.** The effect of pesticide used in strawberries phytophagus mite *Tetranychus urticae* (Acari*:* Tetranychidae) and its fungal natural enemy *Neozygites floridana* (Zygomycetes : Entomophthorales). Biocont.43: 222-230.

Kramer, J. P. 1980. The house-fly mycosis caused by *Entomophthora muscae:* Influence of relative humidity on infectivity and conidial germination. N. Y. Ent. Soc.32: 236-240 .

Kramer,**J.P**.1982.*Entomophthora culicis* (Zygomycetes: Entomophtho ceae) pathogene of adult *Aedes aegypti i*(Diptera:Culicidae). J.Invert.Pathol.91:177-182.

Kramer, J. P. and Steinkraus, D. C. 1981**.** Culture of *Entomophthora muscae* in vivo and its infectivity for six species of muscoid flies. J.Pathol .76: 139-143**.**

Krasonoff, S.B. 1995**.**Behavioral effects of entomopathogenic fungus *Entomophthora muscae* on its host *Musca domestica*:postural changes in dying hosts and gated pattern of mortality ..J.insect. physio. l 41 (10): 895 – 903.

Kuramoto, H. and Shimazu, M.1992.Pathogenicity of some entomopat-hogenic fungi of the adult housefly (Diptera:Muscidae).J.Appl Entomol.Zool.36 : 202-203.

Lacey, L.A. 1997**.** Manual of techniques in Insect pathology (Biological techniques). Academic press. Sadiego. London. Boston. 408pp.

Lagnaoui,A. and Radcliffe,E.B.1998.Potato fungicides interfere with entomopathogenic fungi impacting population dynamics of green peach aphid .American potato Journal.75:19-25.

Lakon,G.1939.Entomophthoraceen-studienV-VI.Z.angew.Entomol.23: 125-130.

Latteur,G.and Oger,R.1991.Winter wheat aphid in Belgium.prognosis and dynamics of their populations.IOBS/WPRS.Bull.14(4):13-34.

Latteur, G. and Jansen, J.P. 2002.Effects of 20 fungicides on the infectivity of conidia of the aphid entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis*.Biocont. 47:435-444.

Lecuon, R.E.; Turica, M.; Tarocco, F. and Cresp, D.C. 2004**.** Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. J. Med. Entomol. 42(3): 332-336.

Macleod, D. M. 1963.Entomophthora infection and Insect pathology .Academic press, New york.450pp.

MacLeod, **D. M., Tyrrell, D., and Carl, K. P. 1976.** *Entomophthora parvispora* sp. nov., a pathogen of *Thrips tabaci*. Entomophaga. 21:307-12.

MacLeod, D. M.; Muller-Kogler, E. and **Wilding, N.** 1976. *Entomophthora* species with *E. muscae* like conidia.J. Mycol. 67: 1-29.

Madeira, N.G. 1998**.** Persistence of conidia of *Emtomophthora muscae* in relation to age, temperature and humidity. J. Bio. Con. 43(1): 87-95.

Milner,R.J.and Soper,R.S.1981.Bioassay of Entomophthora against the spotted alphaalpha aphid *Therioaphis trifolii*.J.Invert.Pathol.37 :223-250.

Mitsuaki,S.1977.Factors affecting conidial germination of *Entomophthra delphacis*(Entomophthorales:Entomophthoraceae).App.Entomol.Zool.12(3):260-264.

Moorhouse, E.R.; Gillespie, A.T. and Charnley, A.K. 1994**.** The influence of temperature of susceptibility of vine weevil, *Otiorhynchus sulcats* (Fabricius) (Coeloptera: Curculionidae), larvae to *Metarrhizium anisopliae* (Deutromycotina: Hyphomycetes). An. Appl. Biol. 124: 185-193.

Mullens, B. A. 1985. Host age, sex, and pathogen exposure level as factors in the susceptibility of *Musca domestica* to *Entomophthora muscae.* Entomol. Exp. Appl**.** 37, 33-39.

Mullens, B. A . and Rodriguez, J.L. 1985. Dynamics of *Entomophthora muscae* (Zygomycetes : Entomophthorales) conidial discharge from *Musca domestica*(Diptera: Muscidae) cadaver.Environ. Entomol . 14:317 – 322.

Mullens, B.A. and Rodriguze , J.L.1986 . Insecticides effects on *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthorales) Entomophaga.31(4):377-383.

Mullens, B. A.; Rodriguez, J. L. and Meyer, J. A. 1987**.** An epizootiolegical study of *Entomophthora muscae* in muscoid fly populations on Southern California poultry facilities, with emphasis on *Musca domestics.* Hilgardia. 55: 1-41.

Newman, G. G. and **Carney, G. R.** 1975. An *Entomophthora* infection of the adult cluster fly *Pollenia rudis*. J. Georgia Ent. Soc. 10: 315-326.

Nilsen,C.;Eilenberg,J.;Harding,S.;Odesdomiter,E.andHolldorsen,G. 1999**.**Entomophthoralean fungi infecting green spruce aphid (*Elatobium abietinum*) in north western–Europe.IOBC Bull. 80:171-176.

Ogg, B. 2007**.** Flies in the house. University of Nebraska, Licoln, Academic press. NE .441pp.

Olmert,**I**.& **Kenneth**, **R.G.** 1974.Sensitivity of entomopathogenic fungi,*Beauveria bassiana*,and *Verticillum* Sp.to fungicide and insecticides . Environ.Entomol.3:33-38.

Olsen, A.R. and Hammack, T.S. 2000**.** Isolation of *Salmonella* spp. from the house fly *Musca domestica* L. and the dump fly *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae) at caged layer houses. J. Food Prot. 63: 958-960.

Papierok, B. 1978. Obtension in vivo des zygospores d, *Entomophthora thaxteriana* Petch.Champignon pathogene de pucerons (Homoptera:Aphididae).J.Biocont.56:1503-1506.

Papierok, B.1986.Some noteworthy biological problems within the genus *Conidiobolus* .In: fundamental and applied aspects of Invertbrate pathology.pp.197-204.

Papierok, B. 1989**.** On the occurance of *Entomophthorales* in finland. I . species attacking aphid (*Homoptera: Aphididae*) . Ann.Entomol .Finnici. 55:63-69.

Papierok, B. and Charpentie, M.J.1982**.**Les champignon se development en cote-d Ivoire sur la fourmi paltothyreus tarsatus F. Relation entre I,Hyphomycetes *Tilachildiopsis catenulata sp*.nov. et I, Ascomycetes *Cordyceps myrmecophila* Cesati 1486. Mycotoxan .14: 351-368.

Papierok, B.and Hajek, **A**. 1997. Fungi: Entomophthorales. In.: Lacey, L. (ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. San Diego. 409 pp.

Renn, N. 1998**.** the efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling house fly infestations of intensive pig units. Med. Vet. Entomol. 12: 46-51.

Ripper, W.E. 1956**.** Effect of pesticides on balance of Arthropod populations. Annu. Rev. Ent. 1: 403-438.

Rupes, V.; Pinterova, J.; Ledvinka, J.; Chmela, J.; Plachy, J.; Homolac, J., and Pospisil, V. 1983**.** insecticide resistance in housefly *Musca domestica* (L.) . Czechoslovakia International pest control.25:106-108.

Samson, A.R.; Evans, H.C. and Latge, J.P. 1988**.** Atlas of entomopathogenic fungi Spring-Verlager. Berlin. 187 pp.

Samson, R. A.; Ramakers, P. M. J. and Oswald, T. 1979. *Entomophthora thripidum, a* new fungal pathogen of *Thrips tabaci.* Can. J. Bot. 57:

1317-1323.

Sanchez – Arroyo, H. 1998**.** House fly *Musca domestica* L. Distribution, importance, life cycle, description and management. University of Florida.

Sanchez – Arroy, H. ,and Capinera, L. 2007**.** House fly *Musca domestica* L. Distribution, importance, life cycle, description. University of Florida.J.Med.Entomol.39:840-881.

Saski, T.; Kobayashi, M. and Agui, N. 2000**.** Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* 0157: H 7 to food. J. Med. Entomol. 37: 945-949.

Shen, J. and Plapp. E.Jr.1990**.**Cryomozine resistance in the housefly genetic and cross-resistance to diflubenzuron. J. Econ. Entomol. 83:1689 – 1697.

Six, D.L. and Mullens, B.A. 1996**.** Seasonal prevalence of *Entomophthora muscae* and introduction of *Entomophthora schizophorae* (Zygomycotina: Entomophthorales) in *Musca domestica* (Diptera: Muscida) populations of Southern California dairies. Bio. Cont. 6: 315-323.

Skaife, S. H. 1925**.** The locust fungus *Empusa gryli*, and its effects on its host. S. African J. Sci. 22: 298-308.

Solomon, M.E.1951**.**Control of humidity with potassium hydroxide, sulfuric acid or other solutions .Bull.Ent.Res.42:543-535.

Soper,R.S. 1981**.**New cicada pathogen : *Massospora cicadettae* from Australia and *Massospora phariae* from Afghanistan . Mycotoxon. 13:50-58.

Soper, R.S. and Bryan, T.A. .1974**.** Mammalian safety of the aphid attacking fungus *Entomophthora nr. thaxteriana.* Environ. Entomol. 3: 346-347.

Soper,R.S.; HolIbrook,F.R. and Cordon,C.C.1974.Comparative pesticides

effects on *Entomophthora* and phytopathogen *Alternaria solani* .Environ . Entomol .3(3):560-562.

Soper,R.S.; Hollbrook, F.R.; Majchrowicz, I. and Gordon, C.C.1975.Production of *Entomophthora* resting spores for biological control.Main Life Sci.Agric.Exp.Sta.Tech.Bull. 76,15 pp.

Stacey,D.A.; Thomas,M.B.; Blanford,S.; Pell,J.K.; Pugf,C. and Fellowes,M.D.2003.Genotype and temperature influence on pea aphid resistance to fungal entomopathogen .Physiol. Entomol. 28:75-81.

Stafford, K.C. and Bay, D.E.1994.Dispersion statistics sample size estimates for house fly (Diptera: Muscidae) larvae and *Macrocheles muscaedomesticae*(Acari:Macrochelidae) in poultry manure.J.Med.Entomol.31(5) :732-737.

Stiekraus, D.C. and Kramer, J.P.1987.Susceptibility of sixteen species of Diptera to the fungal pathogen *Entomophthora muscae*(Zygomycetes:Entomophthoraceae).Mycopathologia.100:55-63.

Tanada,Y. and Kaya ,H.K.1993.Insect pathology.Academic,CA,USA. 500pp.

Tomiyama, H. and Aoki, J. 1982. lnfeciioin'of *Erynia blunckii* Rem. and Henn. (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the diamond-back moth, *Plutella xylostella L.* (*Lepidoptera: Yponomeutidae*). Appl. Ent. Zool. 17: 375-384.

Tsintsadze,K.V.1976.Anew fungus *Entomophthora adjarica* Sp.n.(Ento mophthorales:Entomophthoraceae) sp.n.(Phycomycetes:Entomoph thoracea).affecting *Tetranychus urticae* .J.Invert.Pathol.34:221-228.

Uebel , E.C.; Schwartz, M.; Lusby, B.R.; Miller, R.W. and Sonnet, P.E. 1978. Cuticular non – hydrocarbons of the female housefly and their evolution as mating stimulants. Sydowia. 41: 63-67.

Urbanczyk, J.A.I.; Soloducho, J. and Zabza, A. 1990. Hydrolytic

properties of lipase produced by entomopathogenic fungus *Zoophthora (Erynia) ovispora*. Biotechnol. Lett. 12: 831-834.

Urbanczyk, M.J.; Zabza, A.; Balazy, S. and Peczynska-Czoch, W. 1992. Laboratory culture media and enzyme activity of some entomopathogenic fungi of *Zoophthora* (Zygomycetes: Entomophthoraceac). J. Invert. Pathol. 59: 250-257

Villacarlos, L.T. and Wilding, N. 1994. Four new species of *Entomophthorales* infecting the *leucaena psyllid Heteropsylla cuhana* in the Philippines. Mycol. Res. 98: 153-164.

W.H.O. 1979.22th Report by the expert committee on Insecticide.77pp.

Watson,D.2008.Aguide to natural enemies in North America.ASM Press Washington.D.C.150pp.

Watson,D.W.andPeterson,J.J. 1993a. Seasonal activity of *Entomophthora muscae* (Zygomycetes:Entomophthorales) in *Musca domestica* L with reference to temperature and relative humidity .Biol.cont . 3:133-138.

Watson, D.W. and Patterson, J.J. 1993b**.** Sexual activity of male *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) infected with *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae). Biol. Control. 3(1): 22-26.

Wattanalai, R.; Wiwat, C.; Boucias, D.G.a Tartar, A. 2004. Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, Nomaraea rileyi. J. Invert. Path. 85: 54-57.

Weiser, j. and Muma, M.R. 1966**.** *Entomophthora, floridana* n. sp.(Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of the Texas citrus mite, *Eutetranychus banksi.* Fla Entomol49:155-1.59.

Wilding, N. 1970**.** The effect of temperature on the infectivity and incubation periods of tht fungi *Entomophthora aphidis* and *E. thaveriana* for the pea aphid .*Cyrthosiphon pisum*. in: Proceedings of the 4th international Colloquium of insect Pathology, Maryland, USA, 84-88.

Wilding, N., 1972**.** The effects of systemic fungicides on the aphid pathogen,

Cephalosporium aphidicola. *Plant Pathology* 21: 137-139.

Wilding, N. 1973**.** The survival of *Entomophthora spp*. in mummified aphids at different temperatures and humidities. J. Invert. Pathol. 21: 309-311.

Wraight, S.P.; Butt, T.M.; Galaini-Wraight, S.; Allec, I. Soper, R.S. and Roberts, D.W. 1990**.** Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empusca jabae*. J. Invert.Pahol. 56: 157-174

Yen, D.F. 1962**.** *Entomophthora* infection in the larva of the tiger moth, *Creatonotus gangis* L. J. Insect. Pathol. 4: 88-94.

Yendol, W.G., 1968. Factors affecting germination of *Entomophthora* conidia. Invert. Pathol. 10: 116-121.

Yoon, C.S.; Kim, J.J. and Lee, M.H.2000.Current development in the use of entomopathogenic fungi for the control of insect pests in Korea.Paper presented of the international symposium on Biological control for crop protection .135-153.

Zarrin, M.; Vazarianzadaeh, B.; Solary, S.S.; Mahmoudabadi, A.Z. and Rahdar, M.2007.Isolation of fungi from house fly (*Musca domestica*) in Ahwaz,Iran.J.Med.Sci.23 : 917-919.

Zurek,L.;Watson,D.W.;Kransoff,S.B.and Schal,C.2002.Effct of entom Pathogenic fungus *Entomophthora muscae* (Zygomycetes:Entom Phthorales).on sex pheromones and other cuticular hydrocarbons Ofhouse fly *Musca domestica*.J.Invert.Pathol.80:171-176.

Abstract

The current study aimed to isolate the fungus *Entomophtora muscae* from the adult house fly *Musca domestica* L. dead Cadaver due to the infection with this fungus and culture it Invitro and Invivo in order to use as biological control agent against house fly where the search results showed the following:

1 -The fungus *E.muscae* has been isolated of the adult house fly in two methods, The showering method (ascendnding conidia) and The showering method (the descending conidia) for the first time in Iraq and developing successfully in the cultural medium (ECM) which was the most optimum medium to isolate and preserve the fungus Invitro of all the other tested media (SDA ,PDA ,Coagulated egg yolk and whole milk medium,Sabouraud dextrose agar supplemented with egg yolk and milk and Egg yolk Sabouraud maltose agar) In addition, it has been successfully preserved Invivo in an efficient method and the fungus diagnosis was confirmed by the scientific references.

2 - The results showed that the temperatures and relative humidities have a significant influence on the use of this fungus in microbial control because of the effect of these factors in the growth of the fungus, where the temperature 25C was the optimum thermal degree, as the fungal growth was (51.5 , 62.6 ,74.6 and 87.1) mm, which shows a trade-off between growth and temperature .The increasing of relative humidity of 93-95% has significant influence on the growth of the fungus, indicating the possibility of using the fungus in control within a wide range of temperatures and relative humidities in the microbial control.

3 - The results indicated that the insecticide Malathion and fungicide

Copper sulfate have obvious effect in the inhibition of fungal growth rate (88.33 and 75.66%), respectively, while the impact of their corresponding Permethrine and Maneb a was obvious with a significant difference, where their inhibition percentage were (37.33 and5.34%),respectively.

4- the results of HPLC that the fungus filterate contains the lipolytic enzymes (Lipases) , Proteolytic enzymes (Proteases) and chitinolytic (Chitinases) in the (ECM) medium and by concentrations 11.301, 9.862 and 6.754) micro g / ml.

5 - all the concentrations of the fungus suspensions affected in the mortality of adult, the concentration 5 x 10^5 spores / ml achieved the highest mortality percentage amounted to 99.66% during the 144 hours of treatment and the percentage (29.99 and 49.99 and 69.99 and 89.99)% in the concentrations (1x10^5 and 2 × 10^5, 3 × 10^5 and 4x10^5) spores / ml, respectively during the 168 hour. The required time for the mortality of half the number of insects (LT_{50}) with 160 hours and the necessary concentration for the mortality of half the number of insects (LC_{50}) 2 X 10^5 spores/ ml. The effect5 x 10^5 spores / ml of was slightly in the egg ,larval stages, and the pupae and confirms the High specificity of the fungus.

.6 - The results of these tests showed the existence of an inverse relationship between the percentage of mortality of adult age, with the highest rate for males and females (99.99%) after 144 day-old, while the lowest level of mortality (86.65%) for males and females aged 14 days in the mentioned period and there no effect on the sex of the insect.

7 - The results showed a high efficiency of the fungus filterate concentrations in the killing of adult house fly, where the percentages of mortality amounted to (99.99 and 93.99 and 89.99 and 79.99)% with the

concentrations (100, 75, 50 and 25)%, respectively after 48hours from treatment.