جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

مكافحة بعوضة Culex باستخدام بعض انواع الفطريات

بحث مقدم من قبل الطالب

احمد ماجد كاظم

إلى مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية وهي جزء من

متطلبات نيل شهادة البكالوريوس

بأشراف

أ.م.د. محمد رضا عنون الحسناوي

١٤٣٩هـ ٢٠١٨ م

بسم الله الرحمن الرحيم

يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ ۚ وَمَنْ يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا
كَثِيرًا ۗ وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ.

صدق الله العلي العظيم

(سورة البقرة – أية ٢٦٩)

الإهداء

إلى من جرع الكأس فارغاً يسقيني قطره حب

إلى من كلت أنامله ليقدم لنا لحظة سعادة

إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم

القلب الكبير (والدي العزيز)

إلى من أرضعتني الحب والحنان

إلى رمز الحب وبلسم الشفاء

إلى القلب الناصع بالبياض (والدتي الحبيبة)

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة

إلى رياحين حياتي (أخوتي)

شكر وتقدير

الحمد الله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد وآله الطيبين الطاهرين ..

وبعد الانتهاء من انجاز البحث بحول الله تعالى وقوته أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى المدرس المشرف

(محمد رضا عنون الحسناوي)

لما قدمه من أراء وأفكار قيمة وتوجيهات سديدة فضلاً عن تواصله الدائم في أثناء مسيرة الكتابة مما أضفى عليه أسس الرصانة العلمية متمنياً له دوام الصحة والعافية والتوفيق

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية عزل فطر (*Metarhizium anisopliae* (*Metschnikoff* من يرقات البعوض وتنميته في المختبر invitro من اجل استعماله كعاملا حيويا في مكافحة بعوضة *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) اذ توصل البحث الى النتائج الاتية :-

1- تم عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات البعوضة *Cx. quinquefasciatus* و لأول مره في العراق وتنمية بنجاح على الوسط الزرعي Sabouraud dextrose agar supplement with yeast extract

2- اثرت تراكيز المعلق البوغي في ادرار حياة بعوضة *Cx. quinquefasciatus* فقد بلغت نسبة هلاك البيوض 26% عن التركيز 10^{2}x2 بوغ/مل وارتفعت الى 58.66% عند التركيز 10^{5}x2 بوغ/مل ، وكانت قيم التركيز اللازم لهلاك نصف العدد من البيوض (LC_{50}) $10^{4.6}$X2 . اما بالنسبة لليرقات فقد سجلت اعلى نسبة هلاك 93.33% عند معاملة يرقات الطور الاول بالتركيز 10^{5}X2 بوغ/مل ، في حين كانت اوطأ نسبة هلاك 60% عند التركيز 10^{2X2} بوغ/مل ، فضلا عن وجود علاقة طردية بين عمر الطور اليرقي وقيمة LC_{50} ، اذ بلغت قيم (LC_{50}) $10^{1.8}$X 2 و $10^{1.9}$X 2 و $10^{2.3}$X 2 و$10^{2.7}$X 2 بوغ/مل للاطوار اليرقية الاول والثاني و الثالث و الرابع على التوالي للنوع *An. Stephensi* . اما بخصوص العذارى فقد هلكت بنسبة 46.66% عند التركيز 10^{5}X2 واخذت العلاقة بين تراكيز المعلق الفطري و نسبة هلاك البالغات منحى مشابها لما حصل مع ادوار الحياة السابقة ، فقد سببت المعاملة بالتركيز الاعلى اقصى نسب هلاك (96.66%) لذكور واناث النوع الاول خلال 168 ساعة . بينما كانت ادنى نسبة هلاك (66.66%) ، (56.66%) لذكور واناث النوع الاول عند معاملتها بالتركيز 10^{2}X2بوغ/مل و بالمدة ذاتها .

المقدمة

Introduction

يعود البعوض إلى العائلة Family: Culicidae من شعبة ثنائية الجناح .Order :Diptera Order للبعوض توزيع عالمي ، فهو يوجد في جميع المناطق الاستوائية والمعتدلة ويمتد مداه ناحية الشمال في داخل الدائرة القطبية الشمالية والمنطقة الوحيدة التي يغيب عنها هي القاره القطبية الجنوبية ، يوجد على ارتفاعات 5500 م فوق سطح البحر وفي المناجم على اعماق 1250 م تحت مستوى سطح البحر (سيرفس،1948)

(Filariasis) التي ينقلها بعوض *Culex quinquefasciatus* حيث سجلت أكثر من 120 مليون اصابه وان 103 مليار شخص في أكثر من 80 بلد يواجهون خطر العدوى (WHO,2007)فضلا عن الامراض الفيروسية مثل الحمى الصفراء وحمى الضنك التي ينقلها بعوض Aedes aegypti (Verma and Prakash, 2010) .

إن الاعتماد على المكافحة الكيماوية للبعوض بصوره رئيسية أدى إلى ظهور مشاكل عديدة مثل المقاومة للمبيدات الكيمياوية والتأثيرات السامة في الاعداء الحيوية للآفات وتأثير بقايا السموم في محاصيل النباتات والتأثير التراكمي للمبيدات على صحة الانسان وتلويث البيئة بالإضافة الى زيادة تكاليف الانتاج (Loc and Chi,2005) مما دفع الباحثين ومنذ مدة ليست بقصيرة لإيجاد بدائل اخرى ومنها المكافحة الحيوية التي تمتاز بالتخصص في مواجهة افه معينة والزيادة والانتشار طبيعيا وعدم قدرة الافة في اطهار مقاومة ضد الاعداء الحيوية مقارنتا بالمبيدات الكيمائية فضلا عن انها لا تسبب ضررا بالنظام البيئي ولا تخل بالتوازن الطبيعي للبيئات ولعل استعمال الاحياء المجهرية اشهر الوسائل في تلك المكافحة اذ تميز اكثر هذه الاحياء بانها مساوية لتأثير المبيدات الكيمائية في السيطرة على الحشرة المستهدفة وامينة من الناحية البيئية علاوة على بقائها لمدة طويلة بعد اطلاقها في المحيط البيئي وانسجامها مع طرائق المكافحة الاخرى مما يحقق النجاح المنشود (الزبيدي ، 1992)

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

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

عد الفطر *Metarhizium anisopliae* (*Metschnikoff*) *Sorokin* من الفطريات المتطفلة اختياريا Facultative parasite وذو مدى واسع من المضائف تشمل اكثر من 200 نوعا من مختلف رتب الحشرات ومفصلية الارجل(*Boucias and Pendland ,1998*) وقد حقق نجاحا ملحوظا في مكافحة يرقات البعوض (*Roberts,1967;1970;1974; Ramoska,1982; Daoust and Roberts ,1983; Agudelo silva and Wassink, 1984; Ravallec et al,1989; Sandhu et al, 1993; Alves et al.,2002)*

لقد تناولت الابحاث السابقة في العراق خاصة مكافحة هذه الحشرة استعمال المبيدات الكيميائية (خلف،2004) والاسماك المفترسة (عبد القادر،1994) ونال تأثير المستخلصات النباتية في مختلف انواع البعوض في العراق الاهتمام الاكثر (الجلبي،1998 : الغزالي ،1999 : الطائي ،1999 : الخفاجي، 2010) وفي مجال المكافحة الحيوية استخدمت بعض الفطريات في مكافحة بعض انواع البعوض (خلف واخرون ، 2004 : علي ،2007)

ونظرا لندرة الابحاث حول عزل المسببات المرضية للبعوض بصورة عامة والفطريات بصورة خاصة واستعمالها في المكافحة الجرثومية . كما ان عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات البعوض المصابة طبيعيا لم يجري سابقا في العراق

وعد *Cx.quinquifasciatus* الناقل الرئيسي لداء الفلاريا في انحاء مختلفة من العالم . استهدفت الدراسة عزل الفطر من يرقات البعوض وتنميته واستخدامه في مكافحة البعوض ولتتحقق هذا الهدف تضمنت الدراسة المحاور الاتية :-

1- عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات بعوضة *Cx.quinquifasciatus* بعد تهيئة الوسط الملائم للعزل في المختبر وتنمية واكثار الفطر على الاوساط الزرعية

2- الاختبار الحيوي Bioassay لمعلقات الفطر في ادوار الحياة (البيضة – اليرقة – العذراء – البالغة (ذكور وناث))

3- الاختبار الحيوي لتراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام للفطر في دوري (اليرقة-البالغة) لبعوضة *Cx.quinquifasciatus*

2- استعراض المراجع

1-2 البعوض

ينتمي البعوض الى العائلة Family: Culicidae عويلة Subfamily: Culicinae التي تضم الجنس Culex . يضم جنس الانوفلس ما يزيد عن 400 نوعا اما جنس الكيولكس فيضم اكثر من 769 نوعا (Knight and Stone ,1977) ، وقد وضع Knight (1978) قائمة باكثر من 3000 نوعا في عائلة البعوض ، بينما اشار Service (1993) الى حوالي 3450 نوعا و نويع . ويضم جنس الانوفلس 16 نوعا اما الجنس *Culex* فيضم 18 نوعا في العراق (ابو الحب،1979) . وصفت دورة حياة البعوض بانها كاملة Holometabola . انثى *Culex* فتضع البيوض على شكل قوارب يتكون كل واحد منها 30-300 بيضة ، تفقس البيوض عن يرقات تمر باربعة اطوار تتحول الى عذراء نشطة غير متغذية تنسلخ بعدها الى بالغة ، الذكور منها تتغذى على المواد السكرية في حين تتغذى الاناث على الدم من مختلف المضائف الفقرية (سيرفس،1984) يطلق على الانواع التي تعض الانسان عادة بالمحبة للانسان Anthropophilic ، بينما يطلق على تلك التي تتغذى بالدرجة الاولى على الحيوانات بالمحبة للحيوان Zoophilic . وتختلف اماكن تغذية البعوض اذ تدخل انواع قليلة من البعوض المنازل غالبا ويطلق عليها متغذة داخلية Endophagic ، بينما يطلق على تلك التي تتغذى على مضائفها في الخلاء متغذية خلائية Exophagic (سيرفس،1984) . معظم انواع البعوض ذات نشاط ليلي وان بزوغ الكاملات وعملية التزاوج والتغذية على الدم ووضع البيض تحدث خلال المساء او في الصباح الباكر قبل موعد شروق الشمس (ابو الحب،1979)

2-2 الاهمية الطبية للبعوض Medical importance of Mosquitoes

عدت عائلة البعوض اكثر الحشرات اهمية للإنسان من الناحية الطبية كما يتضح من الاتي

1- عضة البعوض

يسبب البعوض الازعاج والضرر من جراء خسارة الدم والحكة والحساسية (ابو الحب،1979)

2- نقل الامراض

ينقل البعوض العديد من الامراض كما هو موضح في الجدول (2-1)

اسم المرض	المسبب الممرض	الناقل	الاعراض	الاصابات السنوية
داء الفلاريا	Wuchereria Bancrofti Brugia malayi	Anopheles, Culex,Aedes Anopheles, Mansonia	تضخم الاجزاء البارزة من الجسم مثل الايدي والارجل والثدي وكيس الصفن	يصيب حوالي 120 مليون شخص
الحمى الصفراء	فايروس من جنس Flavivirus	Ae. aegypti	ارتفاع درجات الحرارة المفاجيء ثم اصفرار شديد زظهور الزلال بالبول وبكثرة يعقب ذلك غالبا الوفاة	يصيب حوالي 200000شخص ويؤدي الى وفاة 30000شخص
حمى الضنك	فايروس من جنس Flavivirus	Ae. Aegypti Ae. Albopictus Ae. sampsoni	مرض حاد يتميز بصداع وحمى واعياء والم العضلات وانتفاخ الغدد وطفح	يصيب حوالي 50مليون شخص وموت 24000 شخص
التهاب الدماغ الخيلي الشرقي	فايروس من جنس Alphavirus	Culiseta melanura Mansonia perturbans	حمى والم عضلي والم المفاصل	12-17 اصابة سنويا اما الوفيات
التهاب الدماغ الخيلي الغربي	فيروس من جنس Alphavirus	Cx. tarsalis	حمى ، صداع ، غثيان،تقيا وفقدان الشهية وتذمر	نسبة الاصابة 1:1000في البالغين و 1:58 في الاطفال من عمر 1 الى 4 سنوات في حين تبلغنسبة الوفيات 3-4%من هذه الاصابات
التهاب الدماغ الكالفورني	فيروس من جنس Alphavirus	A. melonimon	صداع،رؤية مشوشة،اعراض تشبة الانفلونزا	30-60 اصابة كل سنة في امريكا
التهاب الدماغ الياباني	فايروس من جس Flavivirus	C. tritaeniorhynchus	صداع،حمى،غيبوبة،شلل عام،وفقدان التوازن	يصيب حوالي 30000-40000 والوفيات تصل الى 10000

مرض سانت لويس	فايروس من جس Flavivirus	Cx. tarsalis	يتميز هذا المرض بتذمر عام وحمى وصداع وخمول،فقدان الشهية،غثيان،الم عضلي والتهاب الحنجرة	في عام 1975 سجلت حوالي1815 اصابه بهذا المرض

3-2 طرائق مكافحة البعوض

ويمكن تلخيص طرائق مكافحة البعوض بما ياتي :-

1-3-2 المكافحة الكيميائية :-

منذ اكتشاف DDT في عام 1939 اصبح الاعتماد كاملا تقريبا على مبيدات الآفات الكيميائية في برامج المكافحة حيث استخدمت انواع عديدة من المبيدات الكيميائية في مكافحة البعوض اذ قسمت المبيدات المستخدمة في مكافحة البعوض الى قسمين الاول يستخدم في مكافحة اليرقات ويطلق عليه Larvicidal مثل malathion، Temephos ، Chlorpyrifos والتي تكون كفوءة واكثر فعالية وتعتبر العمود الاساسي لاي برنامج مكافحة كيميائية اما القسم الثاني فيستخدم في مكافحة البالغات ويطلق عليها adulticidal مثلPyrethrum،resmethrin وnaled (Landis and Olsen ,1989) .

ان الاستخدام الامثل والعقلاني لمختلف المبيدات كان من الممكن ان يؤدي الى مكافحة الكثير من الامراض التي تنقلها انواع عديدة من الحشرات ولكن ذلك لم يحدث بل ظهرت مشكلات عديدة بدات تتزايد حدتها باضطراد ومنها مقاومة الحشرات للمبيدات الكيميائية فضلا عن تلويث النظام البيئي وتزايد تكاليف انتاج المبيدات

2-3-2 المكافحة الوراثية :-

تعد السيطرة على الحشرات بالطرائق الوراثية واحدة من السبل التي تميزت بوضع الحلول الاكثر تأثيرا في استراتيجيات مكافحة الآفات وتشمل برامج المقاومة الوراثية في الوقت الحاضر استخدام الحشرات العقيمة Sterile insects عن طريق التشعيع بالمواد الكيميائية المشعة او المعقمات الكيميائية . وكذلك استخدام اشعة كاما في استحداث العقم المورث في الحشرات (الربيعي,1997) او استخدام هجائن عقيمة Sterile hybrids بوساطة تضريب سلالتين او اكثر لنوع واحد من الافة بهدف الحصول على ذرية عقيمة او عن طريق تضريب سلالتين تابعة للنوع نفسه او لانواع تابعة للجنس نفسه فان الناتج اما ان يكون ذرية عقيمة او افرادا خصبة وعقيمة معا او ذكورا عقيمة (الزبيدي،1992)

3-3-2 المكافحة باستخدام منضمات النمو الحشرية Insect growth regulators

تعرف بانها مبيدات حشرية من الجيل الثالث وهي مواد فعالة للسيطرة على مختلف الآفات الحشرية و نواقل الامراض، كما تظهر فعالية عالية تجاه البعوض (Amalraj et al .,1988) . يوجد هناك نوعين من منضمات النمو الحشرية هي نضير هرمون الصبا Juvenile hormone analogs الذي يتداخل مع عملية الانسلاخ والتي تؤدي الى انسلاخ مبكر وكذلك يسبب تشوهات في الاجنحة والاجزاء التكاثرية كما ان البيوض المنتجة تكون غير مخصبة مثل Fenoxycarb و Methoprene والنوع الاخر هو مثبطات تصنيع الكايتين Chitin synthesis inhibitors الذي يمنع تخليق الكايتين كما انه يمنع عملية وضع البيض مثل diflubenzuron (Dimilin) و AC- 291898 (Mulla , 1991) .

4-3-2 المكافحة الحيوية : وتشمل

1- المفترسات Predators

أ- الاسماك

استخدمت الاسماك المفترسة التي تتغذى على يرقات البعوض في مجال المكافحة الحيوية مثل الانواع الاتية Gambusia affinis , Cyprinus carpio , Ctenopharyngodou idella reticulata , Oreochromis niloticus niloticus , Clarias gariepinus , Poecilia وبعض Cyprinids (carps and minnows) (Chapman et al.,1972: Ghosh et al.,2005)

وفي العراق استخدمت اسماك Gambusia affinis في مكافحة يرقات البعوض (عبد القادر،1994)

ب- الحشرات

توجد انواع عديد من الحشرات المفترسة للبعوض وتشمل يرقات البعوض Toxorhynchites الذي يعود لعويلة (Subfamily: Toxorhynchitinae) الذي يتغذى على الانواع الاخرى من يرقات البعوض (Chapman et al.,1972) . كما ان حوريات الرعشات من رتيبة (Sub order: Anisoptera) مثل Sympetrum striolatum و Libellula depressa و رتيبة (Sub order: Zygoptera) مثل Coenagrion puella و Ischnura elegans و Enallagma cyathigerum تكون ذات قابلية افتراسية عالية ليرقات البعوض (Onyeka,1983; Jeffries,1988) ان بالغات ويرقات خنافس Agabus bipustulatus و Dytiscus marginalis و Hydroporus sp (Family: Dytiscidae) و يرقة Peltodytes sp. (Family: Haliplidae) مفترسة ليرقات البعوض (Onyeka,1983) وتعتبر حشرة Notonecta undulate (Order: Hemiptera) من المفترسات المهمة ليرقات الطور الثاني من البعوض (Blaustein,1998) . كما ان هنالك بعض

الحشرات المائية التي تفترس بالغات البعوض التي تتواجد في اماكن توالد يرقات البعوض لغرض وضع البيض مثل البق المفترس Emesopsi streiti (Family: Reduviidae) وحشرتي Microvelia cavicola و Paravelia myersi (Family: Vellidae) كما تفترس حشرة Tachydromia (Family: Empididae) من رتبة ثنائية الاجنحة بالغات بعوضة An. Plumbeus (Service,1967)

ج- الطيور

هنالك دراسات قليلة حول تأثير تغذية الطيور على بالغات البعوض حيث لوحظ افتراس بالغات البعوض بوساطة Apus apus وطير السنونو Hirundo rustica (Medlock and Snow, 2008)

2- الديدان الثعبانية الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematode

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

3- الاحياء المجهرية الممرضة للحشرات Entomopathogenic micro- organism

تسبب مختلف الاحياء المجهرية امراض مختلفة للحشرات ، وان الاكثر شيوعا في مجال المكافحة الجرثومية هي تلك التي نظهر قدرة عالية عند استعمالها ولعل اشهرها بكتريا Bacillus thuringensis و Bacillus sphaericus لمكافحة يرقات البعوض ، اما الفايروسات التي تعود الى Iridoviruses وAdenonucleovirusis وNucleopolyhedrosis و viruses Cytoplasmic polyhedrosis وviruses Entomopox فقد استعملت في مكافحة يرقات وبالغات البعوض (Yadav,2009)

4-2 شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota

تضم شعبة الفطريات الكيسية عدة اصناف ومن اهمها صنف Class: Sordariomycetes الذي كان يعرف سابقا بالفطريات القارورية Pyrenomycetes الا انه شوهدت بعض التغيرات المهمة بين اجناسها تمثلت بانتاج السبورات الكيسية داخل اجسام ثمرية (perithecia) دورقية الشكل تقريبا ومن اهم الرتب التي تعود الى هذا الصنف هي رتبة Order: Hypocreales التي تضم اجناسا عديدة من الفطريات الممرضة للحشرات . يسمى الطور الجنسي بالـ Anamorph والطور الجنسي يطلق عليه بالـ Telomorph (جدول 2-2)

جدول(2-2) العائلات والاجناس المهمة في رتبة Hypocreales (Sung et al.,2007)

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

1-4-2 الفطر *Metarhizium anisopliae*

1-1-4-2 التصنيف

ان اول من صنف الفطر *M. anisopliae* هو العالم الروسي Metschnikoff عام 1879 والذي اسماه *Entomophthora anisopliae* وفي العام 1883 اسماه العالم Sorokin بـ *M. anisopliae* وقد جاءت تسمية الفطر بـ *M. anisopliae* لانه عزل اصلا من خنفساء *Anisopliae austriaca* (*Cloyd , 1999*) .

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

Kingdom: Fungi

Subkingdom: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Clavicipitaceae

Genus: *Metarhizium*

Species: *anisopliae* (Metschn.) Sorokin

وقد وصف petch (1935) انواعا اخرى من الجنس *Metarhizium* هي *M. album* و M. *brunneum* كما اشار Holley (2009) الى انواع الجنس *Metarhizium* و مضائفها

2-1-4-2 صفات الفطر *M. anisopliae*

يعد الفطر *M. anisopliae* من فطريات التربة ويسبب امراضا لمختلف الحشرت بسبب تطفله عليها (Driver *et* al 2000) وتدعى الامراض التي يسببها Green muscardine disease لكون السبورات التي ينتجها ذات لون اخضر

(Freimoser et al.,2003) يصيب هذا الفطر اكثر من 200 نوعا من الآفات الحشرية (Cloyd,1999) يتميز هذا الفطر بخصائص عدة تجعله عامل مقاومة حيوية مهم اذ يسبب هلاكات عالية في مجتمعات الآفات الحشرية كما يتميز بنموه الواسع على الاوساط الزرعيه الصناعية وحفظه بسهولة (Roberts,1970) كما يمتاز بالانتشار الجيد والبقاء طويلا تحت الظروف غير الملائمة حتى في غياب المضائف حيث بإمكانه البقاء في التربة لأكثر من سنة واحدة (Latch and Falloon1976; Rath,1992) وبإمكانية انتاجه تجاريا (Khetan,2001)

3-1-4-2 الية صابة الفطر

تحدث الاصابة بالفطر *M. anisopliae* بوساطة ابواغ فطرية لا جنسية وحيدة النواة تتكون خارجيا (Humber,1997) وتشمل الاصابة المراحل الاتية

2-4-1-3-1 التصاق البوغ بالمضيف Spore attachment to host

ان المرحلة الاساسية للاصابة هي ملامسة البوغ للمضيف وبذلك يجب ان يلتصق بكيوتكل الحشرة لغرض انباته ، وان عملية الالتصاق تتاثر بالمكونات الكيمياوية للطبقات الخارجية لكل من البوغ وكيوتكل الحشرة

2-4-1-3-2 الانبات واختراق الكيوتكل Germination and Penetration of cuticle

في هذه المرحلة يحدث انبات للبوغ وتكوين الانبوب الجرثومي Germ tube والذي يتكون في نهايته عضو الالتصاق (Appresorium) الذي يخترق كويتكل الحشرة بمساعدة الضغط الميكانيكي والانزيمات المحطمة للكيوتكل والتي تشمل Protease , chitinase, lipase, phosphatase, esterase, (Freimoser et al .,2003) هذه المرحلة تحدث خلال ساعات قليلة وربما تحدث بعوامل عدة تتضمن عوامل حيوية وربما غير حيوية مثل درجات الحرارة المثلى ، اذ يجب ان تكون الأبواغ قادرة على الانبات والنمو في درجات حررية واسعة واينما يظهر مجتمع الافة ، كذلك يجب توفر الرطوبة النسبية لاحداث الاصابة الفطرية (Moorhouse *et al*.,1994)

2-4-1-3-3 النمو والتكاثر داخل المضيف Growth and proliferation within host

بعد نجاح البوغ في الانبات ثم اختراق كيوتكل الحشرة ، يدخل الى المجرى الدموي ويبدا بالنمو ويعتمد النمو على قابلية الفطر في التغلب على الانطمة المناعية للمضيف (Entz,1985) ويتبع نمو الفطر داخل تجويف جسم الحشرة استنزاف المواد الغذائية للحشرة يليه موتها نتيجة تكاثر الفطر دخل التجويف ولنقص الحاد للغذاء او نتيجة افراز السموم الفطرية من قبل الأبواغ المتبرعمة (blastospores) التي تقتل العائل بسرعة اكبر (Zacharuk,1971) وذكر (Vilcinskas et al .,1997) ان فطر *M. anisopliae* ينتج مركب destruxins الذي له القابلية على التكيف مع الانظمة المناعية للمضيف . كما اشار (James et al.,1993) ان هذا المركب يؤدي الى اضطراب الايض الخلوي للمضيف

2-4-1-3-4 اعادة نشوء الأبواغ من المضيف Re-emergence from the host and conidiation

تحت الضروف البيئية الملائمة يستانف نمو الغزل الفطري وتنمو الخيوط الفطرية بعد موت المضيف الى مستعمرات على سطح الحشرة الميته . كما ان الفطريات الممرضه للحشرات تمتلك الية فعاله في قذف الأبواغ لتنتشر بشكل واسع بوساطة الرياح او الامطار او بالتماس المباشر بين الحشرة المصابة والسليمة وعند تماس الأبواغ بالمضيف المناسب تبدا مباشرة بالانبات وتعيد دورة حياتها (Hajek and st. leger, 1994)

4-1-4-2 السموم التي ينتجها الفطر *M. anisopliae*

ينتج هذا الفطر العديد من النواتج الايضية الثانوية السامة والتي تؤدي دورا مهما في مجال المكافحة الجرثومية وتشمل مركب viridoxins حيث تم الحصول عليه من المستخلص الكحولي للغزل الفطري للفطر المذكور وهو مركب مشابه لعمل المركبين colletotrichin و colletochin المنتجة من قبل الفطر الممرض للنبات Colletotrichum nicotianae (Gupta et al.,1993) ويستخدم viridoxins كمبيد لخنفساء كولرادو Leptinotarsa decemlineata . ان Turner and Aldridge (1969) هما اول من عزل مركب cytochalasins (سموم فطرية) من الفطر المذكور ومع ذلك فان هنالك العديد من الفطريات الي تعرف الان بانتاجها لهذا المركب وان للمركب المذكور دورا في منع تكوين خيوط الاكتين ويختزل عملية البلعمة الخلوية وانتشار خلايا الدم للحشرات (Vilcinskas et al.,1997a,b) وان لهذه المركبات دورا واضحا في التداخل مع عملية الاستجابة المناعية للمضيف وعملية الاصابة الفطرية . كما يفرز الفطر *M. anisopliae* مركب Swainsonine الذي يثبط تكوين α- mannosidase (Charnley,2003) . ومن اهم المركبات السامة التي يفرزها الفطر المذكور هو مركب destruxins الذي يعود الى عائلة الببتيدات الحلقية cyclic peptide حيث يتكون من خمس احماض امينية و hydroxyl acid

Kodaria, 1961 ; Suzuki et al ., 1970 ; Suzuki and Tamura ,1972 ; .

Pais et al.,1981; Gupta et al .,1989; Wahlman and Davidson , 1993; Chen et al.,1995 ; Yeh et al.,1996; Jegorov.1998)

ينتج الدستركسين ثنائي النمو الفطري النشيط (Amiri- Besheli et al .,2000) كما انه عزل ايضا من الفطر الممرض للحشرات Achersonia sp. (Krasnoff et al .,1996) وان نوعين من هذا المركب تنتج بوساطة ثلاث فطريات هي Alternaria brassicae (Bains and Tewari.,1987) و Trichothecium roseum (Springer et al .,1984) و Ophiosphaerella herpotricha (Venkatsubbaiah et al.,1994) وهنالك العديد من النظائر الطبيعية للدكسترين تشمل Roseotoxin (Engstrom et al .,1975) و Bursephalocids (Kawazu et al .,1993) ان حقن الدستركسين في يرقات حرشفية الاجنحة وبالغات ثنائية الاجنحة تسبب فورا شللا عضليا والجرع العالية من الدستركسين تكون قاتله (Kodaira,1961; Roberts, 1966b ; Samuels et al .,1988) كما ان الدستركسين يسبب تأثيرات اخرى حيث يثط افراز سائل انابيب مالبيجي في جرادة Schistocerca gregaria (James et al .,1993)

5-1-4-2 دور الفطر في المكافحة الجرثومية

استعمل الفطر *M. anisopliae* منذ زمن بعيد في مكافحة الآفات الحشرية حيث اشار Metchnikoff (1980) الى ان هذا الفطر ادى الى هلاكات عالية بين افراد خنفساء شمندر السكر Cleonus punctiventris وكذلك في السيطرة على خنفساء فاكهة الخوخ Conotrachelus nenuphar (Tedders et al .,1982) كما استعمل الفطر في مكافحة سوسة الموز Cosmopolites sordidus (Kaaya et al .,1993) كما اظهرت يرقات وبالغات الذبابه المنزلة Musca domestica L. حساسية عالية عند تعريضها لأبواغ هذا لفطر (Barson et al.,1994 Renn et al .,1999) وفي افريقيا استعمل الفطر للسيطرة على الجراد (Bateman ,1997) . واضاف Castillo et al .,(2000) بان الفطر المذكور ادى الى نسبة هلاكات بلغت 100 % لذبابة Ceratitis capitata . كما اشارت الدراسات الى استخدام الفطر المذكور في مكافحة حلم Varroa destructor في مستعمرات نحل العسل حيث وصلت نسبة هلاك الحلم قمتها بعد 3-4 ايام من التعريض للأبواغ (Lambert,2003) . وحلم الجرب في الماشية Psoroptes ovis (Brooks et al.,2004) واشارة دراسة اجراها (Geng et al .,2004) الى ان الفطر قيد الدراسة اظهر تأثيرا قاتلا من قافزات النبات البنية Nilaparvata lugens و قافزات النبات البيضاء Sogatella furcifera و اوضحت الدراسات المختبرية ان تعريض ذبابة القرن (hornfly) Haematobia irritans لهذا الفطر ادت الى هلاكات عالية في كل من البيوض والعذارى والبالغات (Angel-Sahagun et al .,2005) كما ان تعريض سوسة النخيل الحمراء Rhynchophorus ferrugineus لهذا الفطر ادى الى نسبة هلاك بلغت 100% خلال 2-3 اسابيع (Gindin et al .,2006) واستعمل في السيطرة على Ergolis merione (Dayakar and Kanaujia,2006)

7-1-4-2 الفطريات الممرضة ليرقات البعوض

تصاب يرقات البعوض بالعديد من الفطريات الممرضة للحشرات ، حيث يصيب الفطر *Beauveria bassiana* بعوض *Culex tarsalis* و *Culex pipiens* كما ذكر (Lowe and Kennel .,1972) ان بالغات Ochlerotatus taeniorhynchus و *Cx. Quinquefasciatus* المعاملة بالفطر Conidiobolus coronatus تعاني ازدياد في نسبة الهلاكات خلال 7 ايام من المعاملة . كما وجد (McCray et al .,1973) ان الفطر *Lagenidium giganteum* يؤدي الى هلاكات 100% من يرقات Culex كما استعمل جنس *Coelomomyces* في مكافحة يرقات البعوض ، حيث يصيب العديد من انواع الحشرات المائية التي تعود الى رتبة ثنائية الاجنحة وتشمل انواعا من عائلة البعوض *Culicidae* وعائلة الحرمس *Psychodidae* و عائلة البرغش غير الواخز *Chironomidae* وعائلة الذباب الاسود *Simuliidae* وعائلة ذباب الخيل *Tabanidae* (Chapman,1974) . ان كل من الفطر *Entomophthora conglomerate* و *E. destruens* تصيب بعوض *Cx. Pipiens* في الطبيعة (Roberts,1974) كما ان الفطر *Culicinomyces clavisporus* يسبب نسب هلاك عالية

ليرقات البعوض (Sweeny and Panter,1977) كما استعمل الفطر *Tolypocladium cylindrosporum* الذي عزل لاول مرة من بعوض *Ochlerotatus sierrensis* في كاليفورنيا عام 1971 في مكافحة البعوض (Soares,1982) وذكر (Nuakumnsana,1985) ان المعاملة بأنواع الفطر *Pythium* للأطوار المبكرة لبعوض *Cx. Quinquefasciatus* و *Cx. Tigripes* ادى الى نسبة هلاك تراوحت من 50-100% .

3- المواد وطرائق العمل

1-3 اعداد المزرعة الدائمية لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

جمعت الاطوار المختلفة ليرقات *Cx. quinquefasciatus* من احد اماكن تصريف المياه في محافظة الديوانية بوساطة مغرفة طويلة الذراع و وضعت في قناني بلاستيكية ذات غطاء ونقلت الى المختبر ، و وضعت في احواض بلاستيكية (15x30) ملئت بماء خال من الكلور اضيفت له عليقة الفئران المطحونة المكونة من (الذرة الصفراء و الحنطة والرز و البروتين) بنسبة (0.25:1:1:1) بمقدار 2 غرام لكل حوض لتغذية اليرقات وغطيت الاحواض بقماش التول . ولغرض الحصول على مزرعة دائمية نقية نقلت العذارى الحديثة لبعوضة *Cx. Quinquefasciatus* بوساطة قطارة عريضة الفوهة الى اوان بلاستيكية اودعت في قفص مكعب الشكل طول ضلعه (50) سم مغلف بقماش التول ، وضعت بداخل الاقفاص اطباق بتري تحوي قطنا مشبعا بمحلول سكري 10% ، وللحصول على قوارب البيض اتبعت طريقة Mehdi and Mohsen (1989) حيث غذيت اناث البعوض بعد ثلاث ايام من بزوغها على دم حمامه انتزع ريشها من منطقة الصدر والبطن ، بعدها وثق جناحها وربطت رجلاها وسجيت فوق قفص التربية طوال الليل كما وضع بداخل القفص اناء ماء صغير ليكون محلا لوضع البيض . نقلت البيوض بوساطة فرشاة صغيرة الى اوان ماء جديدة وحاوية على غذاء اليرقات وتم متابعتها حتى ظهور الكاملات وحذرا من حصول التعفن روعي تبديل الماء كل ثلاثة ايام ، هكذا كررت الطريقة حتى ظهور الجيل الثالث.

2-3 الاوساط الزرعيه

1-2-3 وسط اكار السابرويد المدعم بخلاصة الخميرة

Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract (SDAY)

(Goettel and Inglis,1997)

يتألف هذا الوسط من :

- ببتون 10 g Peptone

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

اذيبت هذه المكونات بحسب الكميات الموصى بها في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعته 1000 مل وعقم الوسط بجهاز الموصد بدرجة حرارة 121 م° و ضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد ثم اضيف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250ملغم/لتر ثم صب الوسط في الاطباق وترك ليتصلب ، بعد ذلك لقحت الاطباق بالنمو الفطري بوساطة ناقل معقم وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 م° لمدة 7ايام . كما استعمل وسط Sabouraud Dextrose (SDB) Broth لإكثار الفطر المكون من مكونات وسط (SDAY) نفسه ولكن بدون اضافة الاكار (Goettel and Inglis, 1997)

3-2-3 الوسط الاختياري الخاص بالفطر *M. anisopliae* Selective media for

((Tajick Ghanbary et al.,2009)

يتكون هذا الوسط من :

- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 0.5g KH2PO4
- فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين 0.5g K2HPO4
- ببتون 0.5g Peptone
- كبريتات المغنيسيوم 0.5g MgSO4
- دكستروز 10g Dextrose
- خلاصة الخميرة 0.5g Yeast extract
- اكار 20g Agar

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة (3-2-1)

3-3 خطوات عزل الفطر *M. anisopliae*

3-3-1 جمع يرقات البعوض الميته Cadaver

جمعت مختلف الاطوار اليرقية ليرقات الكيولكس من مياه الصرف الصحي من مواقع مختلفه في المحافظة وبالطريقة المارة الذكر في الفقرة (3-1) ثم فحصت العينات للتقصي عن اليرقات الصابة بالفطر وقد استدل على ذلك بتغير لون اليرقات الى اللون البرتقالي المائل الى اللون الاحمر ، علاوة على مشاهدة خيوط الغزل الفطري على جسم اليرقة (Lacey and Brooks ;2007)

اخذت اليرقات المصابة والميتة وعقمت بغمرها في كحول (ايثانول) 70% لمدة 10 ثوان ثم نقلت الى محلول هايبوكلورات الصوديوم (0.05) لمدة دقيقتين . ثم غسلت بماء مقطر معقم مرتين و وضعت على ورق ترشيح معقم ، ونقلت بوساطة ملقط معقم الى اطباق بتري حاوية على الوسط الاختياري الخاص بعزل الفطر ***M. anisopliae*** وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م° لمدة 9 ايام (Martignoni and Milstead, 1960)) .

2-3-3 تشخيص و وصف الفطر *M. anisopliae*

تم تشخيص الفطر الذي عزل من يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* وذلك بأخذ جزء صغير من مزرعة الفطر و وضعها على شريحة زجاجية مع وضع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر الضوئي تحت قوة تكبير 400 x ، وتمت الاستعانة بالأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان / قسم وقاية النبات /كلية الزراعة/جامعة الكوفة لتأكيد تشخيص الفطر .

تم تشخيص الفطر لمستوى النوع اعتمادا على الصفات الواردة في المفتاح التصنيفي للفطريات الممرضة للحشرات (Humber,1997) وشملت هذه الصفات :-

1- ظهور غزل فطري اخضر مصفر على جسم اليرقة الميتة (Cadaver) والتي تبدو وكأنها حنطة وذات جسم هش .

2- نمو الفطر على الوسط الزرعي SDAY : كان نمو الفطر على الوسط الزرعي على هيئة مستعمرة بيضاء مائلة الى اللون الاخضر المصفر وغير لزجة عند رفعها من على الوسط الزرعي بوساطة الناقل المعقم . وعند الفحص المجهري للفطر لوحظ ان الخيط الفطري مقسم بحواجز والحوامل البوغية تكون متفرعة جدا ومتشابكة بشكل كثيف . وتكون الأبواغ اسطوانية ذات قطر 9µm ومحمولة على الخلايا المكونة للأبواغ (Phialides) والتي تتميز بكونها اسطوانية قصيرة . وتتجمع هذه الأبواغ مع بعضها مكونة سلاسل على شكل اعمدة اسطوانية .

4-3 تحضير المعلق الفطري

حضر المعلق الفطري بتنمية الفطر على وسط (SDB) في دورق زجاجي سعته 250 مل بمقدار 150 مل من الوسط المستعمل . حضنت المزرعة بدرجة حرارة 25 م° لمدة 7 ايام وكانت ترج يوميا لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بواسطة قطعة من القماش ، اخذ 1 مل من الراشح و وضع على شريحة عد كريات الدم الاحمر المحورة لعد الأبواغ Improved Neubauer Haemocytometer لتقدير عدد الأبواغ لكل وحدة حجم حيث حسب عدد الأبواغ في كل مربع من المربعات الاربعة الكبيرة الموجودة في اركان الشريحة ، بعد ذلك قسم عددها الكلي على اربعة

للحصول على معدل عدد الأبواغ في المربع الواحد ، ثم ضرب هذا الناتج في 10^4x1 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الأبواغ في 1 مل من المعلق الفطري . حيث تم الحصول على تركيز 10^6x2 (بوغ/مل) (Goettel and Inglis ,1997) ولغرض الحصول على تركيز اقل من ذلك طبقت المعادلة الاتية (Lacey,1997)

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

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره ، فمثلا للحصول على 100مل من المعلق بتركيز 10^5x2 نطبق المعادلة .

الحجم(مل) المأخوذ من المعلق الرئيسي = $\frac{510x\ 2}{610\ \text{x}\ 2}$ = 0.1 x 100 =10 مل .

وعلية يؤخذ 10 مل من المعلق الاصلي ويضاف اليه 90 مل ماء مقطر معقم لإكماله الى 100 مل للحصول على تركيز 10^5x2 بوغ/مل ، ثم اضيفت بضع قطرات من Tween 80 كمادة ناشرة وهكذا حضرت التراكيز (10^2x2 ، 10^3x2 و 10^4x2)

5-3 الاختبار الحيوي Bioassay

1-5-3 الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة Cx. quinquefasciatus

1-1-5-3 الاختبار الحيوي في البيوض

اخذ قارب البيض بعمر 48 ساعه بعد ان وضعته اناث *Cx. quinquefasciatus* المتغذية على الدم او بيوض فرادى بعدد 100 بيضة لكل مكرر لاناث النوع الثاني بوساطة فرشاة ناعمة ووضعت كلا على حده في اطباق بتري قطر 9 سم فيها ماء مقطر معقم، رشت البيوض ب 5مل من كل تركيز من تراكيز المعلق الفطري بوساطة مرشة يدوية نظيفة من ارتفاع 15سم تقريبا . كررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ومعاملة السيطرة التي تحتوي على بيوض رشت بالماء المقطر المعقم . تم مراقبة البيض لحين الفقس ، وحسبت نسبة الهلاك (علي،2007) .

2-1-5-3 الاختبار الحيوي في الاطوار اليرقية الاربعة

لدراسة التأثير الحيوي لمعلق الفطر في الاطوار اليرقية الاربعة ولكلا النوعين ، اخذت 40 يرقة من كل طور من الاطوار الاربعة (التي هيئت عن طريق عزل يرقات الطور الذي سبقه في انابيب التربية لحين الانسلاخ ووصولها الطور المطلوب كما تم الاعتماد على حجم راس اليرقة الذي يزداد الى الضعف مع تقدم عمر اليرقة الى الطور الذي يليه) ولكل تركيز ولكلا النوعين بصورة منفصله (كل على حدة) و وزعت على اربع اوان ثلاث منها تحتوي على 100 مل من كل تركيز من تراكيز المعلق اما الرابعة فتحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) ولمدة دقيقتين. ثم نقلت اليرقات العاملة فقط بوساطة فرشاة ناعمة الى اواني زجاجية سعة 250 مل تحتوي ماء مقطرا معقما فقط اضيف له غذاء يرقات معقم بمقدار 10 ملغم/سم^3 ، حضنت الاواني الحاوية على اليرقات المعاملة في الحاضنة بدرجة 25 ± 2م° وph يساوي 7 وفترة ضوئية(L/D) 14:10 . ثم حسبت نسبة الهلاك خلال 24و 72 و120 ساعة من المعادلة (Nadeau and Boisvert,1994; Skrobek et al2008) وصححت القيم بحسب معادلةOrell and Shneider (شعبان و الملاح،1993)

$$\text{\% الهلاك المصححة} = \frac{\text{نسبة الهلاك في المعاملة} - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}}{100 - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}} \times 1000$$

3-1-5-3 الاختبار الحيوي في دور العذراء

عزلت عذارى بعد انسلاخ عدد كاف من يرقات الطور الرابع لكل نوع على حدة وبعدد مساو لما استخدم في تجربة كل من الاطوار اليرقية كما طبقت طريقة الاختبار ذاتها في الفقرة 3-5-1-2 باستثناء عدم اضافة العليقة ومراعاة تغطية اواني المعاملات بقماش التول تحسبا لظهور البالغات وحسبت نسبة الهلاك يوميا ولمدة 3 ايام . وصححت القيم كما في الفقرة 3-5-1-2 .

4-1-5-3 الاختبار الحيوي في البالغات

اخذت اعداد كافية من عذارى كل نوع على حدة من المزرعة الدائمية ووضعت فرادى في انابيب سعة 10 مل واغلقت بقطعة من القطن ، حتى تحويلها الى بالغات. وزرعت (10 بالغات) من الذكور والاناث ولكلا النوعين وعلى انفراد في قناني بلاستيكية سعة 1 لتر مغطاة بقطعة من قماش التول ورش كل مكرر بمرشة يدوية من ارتفاع 15سم تقريبا بعد عمل ثقب يسمح برش المعلق الفطري ومن ثم يتم اغلاقه ثانيتا بعد انتهاء الرش فيما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم . نقلت البالغات المعاملة الى قناني بلاستيكية سعة 1 لتر داخل كل منها قطنة مشبعة بمحلول سكري 10 % في طبق بتري بقطر 9سم ، كررت هذه التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ولكلا

النوعين ومثلها المعاملة السيطرة . حضنت القناني في الظروف نفسها المارة الذكر في الفقرة (2-1-5-3) (Scholte et al .,2003) . حسبت نسبة الهلاك يوميا ولمدة 7 ايام. صححت قيم الهلاك كما في الفقرة سابقة الذكر .

7-3 التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات وفق تصميم التجربة العالمية Completely Randomized Design (CRD) وصححت النسبة المئوية للهلاك على وفق معادلة Orell and Shneider (شعبان والملاح ،١٩٩٣) واستعمل اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) في تشخيص الفروق الاحصائية بين المعاملات (الراوي وخلف الله،2000). حسبت قيمة LC_{50} و LC_{90} باستعمال برنامج Probit analysis بحسب طريقة (Finney,1971) تم قياس استعداد يرقات وبالغات كلا النوعين لمعلقات الفطر ونواتج الايض الثانوية الخام للفطر وذلك من خلال جمع نسب الهلاك للتراكيز المستخدمة عند مدة التعرض الاخيرة ثم يؤخذ المعدل الذي يمثل استعداد يرقات وبالغات كلا النوعين لمعلقات ونواتج الايض الثانوية الخام للفطر (الخفاجي،2010)

النتائج والمناقشة

1-4عزل وتشخيص ووصف الفطر *M. anisopliae*

لقد تم في البحث الحالي عزل الفطر *M. anisopliae* من يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* لاول مرة في العراق . عزل هذا الفطر سابقا من يرقات Cx. fatigans (Balarman et al .,1979) ويرقات *Cx. quinquefasciatus* (WHO,1980) ومن رتبة متشابهة الاجنحة Order: Homoptera ومن يرقات *Cx. pipiens* (Daoust et al .,1982) واشار Wilson et al .,(1990) ان ما بين 45.3% و 100% من بالغات *Ae. Aegypti* المعرضة لأبواغ هذا الفطر تضع بيوضا ينتج نها يرقات مصابة بهذا الفطر. وعزل ايضا من يرقات *Ae. Triseriatus* (De. Andrade,1993)

2-4 الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة بعوضة *Cx. quinquefasciatus*

1-2-4 الاختبار الحيوي في البيوض

يتبين من الجدول (4-1) نتائج تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في نسب هلاك بيوض بعوضة *Cx. quinquefasciatus* ، اذ بلغت اعلاها 58.66% عند التركيز 10^5x2 بوغ/مل بينما سجلت اوطأها 26% عند التركيز 10^2x2 بوغ/مل . وهذا ما اكدته التحليلات الاحصائية . تقارب هذه النتائج مع ما وجده Weibin and Mingyuang (2004) عند معاملته بيوض حلم العنكبوت القرمزي *Tetranychus cinnabarinus* بابواغ الفطرين *B. bassiana* و *Paecilomyces fumosoroms* حيث ادى الى هلاكها بنسبة 12.5 ± 64.6% . وان تعريض بويض L *pipiens* Cx. pipiens لأبواغ الفطر المذكور اعلاه ادى الى هلاكها جميعا (علي و2007) كما اشار Santos et al .;(2009) الى ان نسبة فقس بيوض بعوضة *Aedes aegypti* المعرضة لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 10^2X2.8 بوغ/مل ادى الى اختزال نسبة الفقس 50% عند درجة رطوبة 98% . واكد الامارة (2009) الى ان الفطر المشار اليه ادى الى خفض نسبة فقس بيوض الخابرا *Trogoderma granarium* الى 56.67% و 48.33% عند التركيزين 10^6X2 و 10^8X2 بوغ/مل . وهذا خلاف مع ما اكده Clark et al.,(1968) من ان فقس بيوض *Cx. pipiens* لا يتأثر عند تعريضها لأبواغ الفطر *B. bassiana* .

جدول (4-1) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* في بيوض *Cx. quinquefasciatus*

التركيز (بوغ/مل)	عدد البيوض المعاملة	النسبة المئوية للهلاك
10^2x2	116	26.00
10^3x2	127	36.33
10^4x2	130	46.00
10^5x2	123	58.66
control	130	00.00

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للنوعين = N.S ، للتراكيز = 6.08

4-2-2 الاختبار الحيوي للأطوار اليرقية الاربعة

يتبين من الجدول (4-3) تأثير تراكيز مختلفة لمعلقات الفطر قيد البحث في يرقات بعوضة

Cx. quinquefasciatus اذا كانت اعلى نسبة هلاك عند التركيز 10^5X2 بوغ/مل والتي بلغت 100% و 93.33% ليرقات الطور الاول بينما سجلت اوطأ نسبة هلاك 60% عند التركيز 10^2X2 بوغ/مل ، بينما خلت معاملة السيطرة من الهلاكات . وبما يؤكد وجود فروقات معنوية وعلى مستوى 0.05 للتراكيز كافة ، فضلا على العلاقة الطردية بين التركيز ونسب الهلاك ومن جانب اخر فأن مثل هذه العلاقة بدا واضحا بين كل من مدد التعريض ونسبة الهلاك ايضا فمثلا كانت نسبة الهلاك 46.66% ليرقات الطور الاول وبحسب الترتيب عند التركيز 10^5X2 بوغ/مل بعد 42 ساعة من المعاملة بينما ازدادت 93.33% بعد 120 ساعة . كما تشير النتائج الى اختلاف استعداد الاطوار اليرقية لمختلف تراكيز المعلق البوغي ، اذ كان الطور الاول اشدها استعدادا مقارنة مع بقية الاطوار شكل(4-1) . ولقياس ضراوة فطر المقاومة الجرثومية (virulence) حسب قيم LC_{90} الذي يمثل القيمة الاساسية في طرائق الاختبار الحيوي (Papierok and Hajek ,1997) . حيث يلاحظ الزيادة التدريجة في قيمها مع تقدم عمر الطور واختلاف فيمها لكل من الاطوار باختلاف النوع . تقارب النتائج الحالية مع محاصيل علية Roberts (1970) ، وان عزلات *M. anisopliae* الاكثر امراضية ليرقات بعوض *Cx. pipiens pipiens* ادت الى هلاكها بنسبة 100% خلال خمسة ايام (Daoust and Roberts,1982) واوضح DeAndrade (1993) ان تعريض يرقات الطور الثاني لبعوض An. Walker لأبواغ هذا الفطر ، ادى الى هلاك اليرقات جميعا بعد مرور اربعة ايام ، قد يعود السبب في هلاك اليرقات في عدة ايام هو نتيجة لاستنبات الأبواغ واختراق الخيوط الفطرية من خلال الفتحات التنفسية والذي يسبب اختناق اليرقات نتيجة لأغلاق الفتحات التنفسية بالإضافة لنمو الفطر في القناة الوسطى لليرقات واستنزاف المواد الغذائية لليرقات وبالتالي موت اليرقات في ايام . كما ان بعض اليرقات العاملة تموت خلال

الانسلاخ ، اذ تفشل في انسلاخ السيفون وتبقى ملتصقة بالطبقات المنسلخة (Roberts,1970; Ravallec et al.,1989) واضاف Lacey et al.,(1988) ان ابتلاع اليرقات للأبواغ يتبعه افراز سموم من الفطر والذي يؤدي الى تسمم الدم ونتيجة لذلك يؤدي الى موت اليرقات خلال 24 ساعة .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره كل من الجبوري (2007) والامارة (2009) حيث وصفا العلاقة ما بين تركيز الأبواغ ونسب الهلاك بأنها طردية حيث كلما ازداد تركيز العالق البوغي للفطر ارتفع معدل هلاك الحشرة ، وقد يعود السبب في ذلك الى زيادة عدد الأبواغ (لوحدات الاساسية للأصابة الفطرية) فضلا عن ان الجهاز المناعي لليرقات يستطيع الدفاع عن الجسم فقط عند التراكيز الواطئة وعند زيادة التركيز يفقد الجهاز المناعي كفاءته (Scholte et al.,2003) ان تعريض يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinqufasciatus* لأبواغ الفطر *B. bassiana* ادى الى هلاكها بنسبة 100% بتركيز 10^8X1 بوغ/مل خلال يومين وبنسبة هلاك بلغت 97.11% بتركيز 10^7X1 بوغ/مل بعد مرور خمسة يام (Gayathri et al.,2010)

جدول (3-4) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الفطر *M. anisopliae* في يرقات بعوضة *Cx. quinqufasciatus*

الطور	**التراكيز (بوغ/مل)**	**النسبة المئوية للهلاك بعد ساعة *Cx. quinqufasciatus***		
		24	72	120
الاول	10^2x2	16.66	36.66	60.00
	10^3x2	23.33	43.33	73.33
	10^4x2	33.33	56.66	86.66
	10^5x2	46.66	66.66	93.33
	control	0	0	0
الثاني	10^2x2	13.33	36.66	56.66
	10^3x2	20.00	40.00	73.33
	10^4x2	30.00	56.66	80.00
	10^5x2	40.00	66.66	90.00
	control	0	0	0
الثالث	10^2x2	10.00	30.00	46.66
	10^3x2	20.00	33.33	60.00
	10^4x2	30.00	46.66	73.33
	10^5x2	36.66	56.66	86.66
	control	0	0	0
الرابع	10^2x2	10.00	30.00	43.33
	10^3x2	16.66	33.33	56.66
	10^4x2	30.00	46.66	70.00
	10^5x2	33.33	53.33	80.00
	control	0	0	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للنوعين 1.17 ، للأطوار=1.7 ،للتراكيز1.66،للزمن=1.7

3-2-4 الاختبار الحيوي في دور العذراء

توضح النتائج من الجدول (4-5) الى تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في عذارى

Cx. quinqufasciatus حيث سجلت اعلى نسبة هلاك عند التركيز 10^5x2 بوغ/مل والتي بلغت 46.66% لعذارى الكيولكس . يبين الجدول (4-6) قيم التركيز الازم لهلاك نصف العدد من عذارى الكيولكس . دعمت هذه النتائج احصائيا من خلال الفروقات المعنوية بين المعاملات . كما بين التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين النوعين في ما عدا عند التركيز 10^2x2 حيث لم يظهر كلا النوعين فروق معنوية فيما بينهما . اتفقت النتائج الحالية مع ما توصل اليه Clark et al.,(1968) عندما عرض عذارى بعوضة *An. nigromaculis* لأبواغ الفطر *B. bassiana* وادى الى هلاكها بنسبة 40% ،في حين بلغت نسبة بزوغ البالغات 58% عند التركيز 10^9x3.5 بوغ/مل . واشار Angel- Sahagun et al.,(2005) الى ان تعريض عذارى ذبابة القرن *Haematobia irritans*

جدول (4-7) تأثير تراكيز مختلفة من المعلق الفطري في ذكور واناث *Cx. quinqufasciatus*

التراكيز (بوغ/مل)	**النسبة المئوية للهلاك في (ساعة) *Cx. quinqufasciatus***							
	24		72		120		168	
	ذكور	اناث	ذكور	اناث	ذكور	اناث	ذكور	اناث
10^2x2	6.66	6.66	36.66	30.00	50.00	46.66	56.66	50.00
10^3x2	16.66	10.00	40.00	40.00	63.33	60.00	73.33	66.66
10^4x2	20.00	16.66	46.66	43.33	73.33	66.66	86.66	80.00
10^5x2	23.33	26.66	50.00	50.00	86.66	80.00	93.33	90.00
Control	0	0	0	0	0	0	0	0

صورة (2-4) بالغة *Cx. quinqufasciatus* المصابة بالفطر *Cx. quinqufasciatus*

الاستنتاجات

1- ان الفطر *M. anisopliae* يصيب يرقات البعوض بصورة طبيعية في البيئات المائية .

2- اثرت تراكيز المعلق الفطري تأثيرا واضحا في مختلف ادوار حياة *Cx. quinquefasciatus* ولكن بصورة متباينة فقد ابدت البيوض و العذارى مقاومة ملحوظة بينما هلكت اليرقات و البالغات بنسبة اكثر وكان الطوران اليرقيان الاول والثاني اكثر حساسية لمعلقات الفطر

التوصيات

1- استعمال الفطر في مجال المكافحة الجرثومية للبعوض

2- اجراء تجارب حول استعمال الفطر في السيطرة على انواع اخرى من الحشرات الطبية و الاقتصادية و مفصلية الارجل الاخرى فضلا عن تأثيره في الاعداء الحيوية .

3- محاولة تصنيع مبيد حيوي للحشرات Bioinsecticide وعزل واستخلاص عوامل السيطرة الحيوية التي ينتجها الفطر .

4- استخدام الفطر بشكل معلق بوغي في مكافحة اماكن تواجد البعوض وتحديد التركيز اللازم للاستخدام .

5- عزل انواع اخرى من الفطريات الممرضة ليرقات البعوض المصابة طبيعيا وتقويم إمراضيها .

المصادر العربية

ابو الحب ،جليل كريم.1979. الحشرات الطبية والبيطرية في العـــــراق،(القسم النظري). كليـــــة الزراعة/جامعة بغداد.450 صفحة

الاماره ، محمد صبري جبر .2009 . تاثير بعض عوامل المكافحة الحـيومية والكيميائية في بعض اوجة حياتية حشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) (Everts) Trogoderma granarium (Coleoptera: Dermestidae) رسالة ماجستير . كلية الزراعة / جامـــعة البصرة . 113 صفحة

الجبروي ، ابراهيم جدوع .2007. حصر وتشخيص العوامل الحيوية في بيئة نخلة التمر واعتمادها لوضع برنامج ادارة متكاملة لأفات النخيل في العراق . مجلة جامعة عدن للعلوم الطبيعـية و التطبيقية . المجلد (11) العدد 3 .63-70 .

الجبوري ، دينا حسين هاتف .2003. دراسات مختبرية حول استخدام رواشح بعض الفـــــطريات كطعوم سامة لمكافحة حشرة الذباب المنزلي .Musca domestica L (Diptera : Muscidae) . رسالة ماجستير . الكلية التقنية /المسيب 120صفحة

الجلبي ، بديعة محمود.1998 . تأثـــير مستـــخلصات نبات سرطان الثيل Euphorbia granulate في الاداء الحياتي لعوضة .Culex Culex L اطروحة دكتوراه . كلية العلوم/جامعة بغداد . .216 صفحة .

الخفاجي ، هبة عباس علي .2010 . تأثير مستخلصات اوراق نبات الخروع .Culex Culex L في بعض جوانب حياتية لبعوضة الكيولكس Culex Culex (Culex : Culex) رسالة ماجســتير ماجستير . كلية العلوم / جامعة القادسية .85 صفحة .

خلف ، جنان مالك وعبد الوهاب ، اياد عبد القادر وبنيان ، ليلى عبد الرحيم . 2004. المـــكافحة

الاحيائية والكيميائية ليرقات وبالغات البعوض Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) مختبريا . مجلة البصرة للعلوم (ب). 22(1) : 46-62.

الراوي، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز محمد .2000. تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطـباعة والنـــشر . جامعـــة الموصـل. الطبعةالثانية 488 صفحة .

الربيعي ، ثائر محمود طه .1997 . استحداث العقم المورث باستخدام اشعة كاما في حفـــار ساق الذرة Sesamia cretica (Lepidoptera : Noctuidae) اطروحة دكـــتوراه كلية العلوم /جامعة بغداد .170 صفحة.

الزبيدي ، حمزة كاظم.1992. المقاومة الحيوية للأفات . دار الكتب للطباعة والنشر/المصل العراق 440 صفحة .

السلامي ، فاطمة هاشم .2010. تأثير الفطر Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. في بعـض الجوانب الحياتية للدعسوقة ذات النقاط الاحدى عشر Coccinella undecimpunctata (Coleoptera: Coccinellidae) .رسالة ماجستير .كلية العلوم للبنات/جامعة بابل.57 صفحة .

سيرفس ،م.و 1984. المرشد الى علم الحشرات الطبية . ترجمة على محمد سليط ، زهير يونس الصفار ورياض احمد العراقي .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصـــل . 380 . صفحة

شعبان ،عواد والملاح ،نزار مصطفى .1993. المبيدات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .520 صفحة .

الطائي ، امل علي محيسن.1999 تأثير مستخلصات نبات الكبر Capparis spinosa في بعـض جوانب الاداء الحياتي لبعوضة الكيولكس Culex pipiens (Diptera: Culicidae) رسالة

ماجستير ، كلية العلوم . جامعة بابل 80 صفحة .

عبد القادر، اياد عبد الوهاب.1994 . يرقات البعوض في البصرة ودور بعض الاسماك المفترسة في مكافحتها . رسالة ماجستير . كلية الزراعة- جامعة البصرة.91 صفحة .

عبد القادر، اياد عبد الوهاب .2000 . دراسة تصنيفية لعائلة البعوض (Diptera: Culicidae) في محافظة البصرة . اطروحة دكتوراة .علوم حياة .جامعة البصرة .230 صفحة .

علي ، هالة هيثم محمد .2007 . دراسة تاثير المستـــخلص الايثانولي لاوراق وثمار نبات الدورانتا Duranta repens L. وفطر Beauveria bassiana (Balsamo) على الاداء الحـــياتي لبعوضة Culex pipiens pipiens L. رسالة ماجستير . كلية العـلوم للبنات/جامعة بغـــداد .137. صفحة

الغزالي، مشتاق طالب كريم . 1999 .الروز الحيوي لمستخلصات نباتية مخـــتلفة لاوراق فرشاة البطل Callistemon citrinus (Curtis) Skeels في بعض جوانب حياتية بعوض الكيولكس Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae) رسالة ماجستير.كلية العلوم/جامعة بابل.120 صفحة .

المصادر باللغة الانكليزية

Abul-hab, J. K. 1968. Larval of culicine mosquitoes of Iraq with akey for their Identification .Bull.End –Dis.Baghdad.X(1-4):23.

Agudelo-Silva, F and Wassink, H. 1984. Infectivity of avenezuelan strain of *Metarhizium anisopliae* to *Aedes aegypti* Larvae.J.Invert.pathol.43:430-435.

Ahmed, S.; Ashraf, M.R. ; Hussian, A. and Riaz,M.A.2009.Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* from Curjranwala (Pakistan) against *Coptotermes heimi* (Wasmanu) (Isoptera:Rhinotermitidae) . J. Agri. & Biol. 11: 707-777.

Aldridge, D.C. and Turner, W.B. 1969.structures of cytochalasin C and cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae* . J. chemi. Socie. Sect. (organic chemistry)3: 923-928.

Alves, S.B.; Alves, L.F.A.; Lopes, R.B.; Pereira, R.M and Vieira, S.A. 2002.Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dip:Culicidae).J.Appl.Entomol.126:504-509.

Amalraj, D.; Vasuki, V.; Kalyanasundaram, M.; Tay, B.K. and Das,P.K.1988. Laboratory and field evaluation of three insect growth regulators against mosquito vectors. Indian J. Med. Res.87:24-31.

Amiri-Besheli, B.; Khambay,B.; Cameron,S.; Deadman,M.L. and Butt, T.M. 2000.Inter and intra-specific variation in destruxins production by insect pathogenic *Metarhizium spp*. and its significance to pathogenesis. Mycological Research .104:447-452.

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

Bae, J.T. ; Sinha, J. ; Park , J.P. ; Song , C.H. and Yun, J.W. 2000. Optimization of submerged culture conidition for exo- biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. J.Microbiol.Biotechnol. 10:482- 487.

Bains, P.S. and Tewari, J.P. 1987.Purification , chemical characterization and host specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*.Physiol. Molec. Plant Pathol. 30:259-271.