# فعالية فطر Metschnikoff (Sorokin) *Metarhizium anisopliae* كعامل مكافحة احيائية لبعوض *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) مع دراسة نسجية لليرقات المصابة

نسرين أحمد قره داغي*، نوال صادق مهدي**و هادي مهدي عبود***

*مركز إنعاش الأهوار والأراضي الرطبة العراقية- وزارة الموارد المائية.

**قسم علوم الحياة، كلية التربية-ابن الهيثم، جامعة بغداد.

***دائرة البحوث الزراعية- وزارة العلوم والتكنولوجيا.

E-mail: dr.nawalsadiq@yahoo.com

**الخلاصة:**

أُجريت هذه الدراسة لتقييم كفاءة تراكيز متسلسلة من عالق ابواغ الفطر *Metarhizium anisopliae* في الادوار الحياتية (بيوض، يرقات، عذارى، بالغات) لبعوض *Culex quinquefasciatus* تحت ظروف المختبر مع دراسة نسجية لليرقات المصابة.

اوضحت نتائج الدراسة ان جميع ادوار الحشرة حساسة لتراكيز ابواغ الفطر المدروسة وهي $2.5 \times 10^6$ و $2.5 \times 10^7$ و $2.5 \times 10^8$بوغ/مل وظهر ان معاملة البيض بالتراكيز أعلاه أدت الى خفض نسب الفقس مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كانت نسبة الفقس عند المعاملة بالتركيز $2.5 \times 10^8$ بوغ/مل 71.3% بالمقارنة مع معاملة السيطرة والتي كانت 95.03%. اما عند معاملة يرقات الطورين اليرقيين الثاني والرابع لوحظت نسب هلاكات تراكمية عالية جداً وصلت الى 100% عند معاملة يرقات الطور الثاني بالتركيزين$2.5 \times 10^6$ و$2.5 \times 10^8$بوغ/مل وتم تسجيل نسبة من التشوهات المظهرية، وأوضحت الدراسة النسيجية لليرقات الميتة تواجد ابواغ الفطر بشكل سلاسل في السائل الدموي وكذلك امتلاء القناة الهضمية الوسيطية بابواغ الفطر الممزوجة بالغذاء وتحلل جدرانها أما عند معاملة عذارى البعوض فقد سجلت أعلى نسبة هلاكات تراكمية عند المعاملة بالتركيز $2.5 \times 10^6$ بوغ/مل والتي بلغت 65.47% كما لوحظت بعض حالات التشوه نتيجة للإصابة.

سجل دور البالغ حساسية عالية جداً اتجاه تراكيز عالق أبواغ الفطر إعتماداً على التركيز وقد وصلت نسبة الهلاكات التراكمية الى 100% عند المعاملة بالتركيز$2.5 \times 10^8$بوغ/مل.

**كلمات مفتاحية:** مكافحة احيائية، بعوض منزلي، عالق فطري، دراسة نسجية.

# Efficacy of *Metarhizium anisopliae* [Metchnikoff] Sorokin in a biological control agent of*Culex quinquefasciatus* Say [Diptera: Culicidae] with histological study of infected larvae

Nisreen Ahmed Karadaghi, Nawal Sadek Mahdi, Hadi Mahdi Abboud

## ABSTRACT

Efficacy of serial concentrations of *Metarhizium anisopliae* were measured against eggs, larval instars, pupae and adults of *Culex quinquefasciatus* under labolatory conditions. The results showed that all insect stages were sensitive to the fungal concentrations $2.5 \times 10^6$ , $2.5 \times 10^7$ and $2.5 \times 10^8$ conidia/ml.

Treating eggs with $2.5 \times 10^8$ conidia/ml caused reduction its hatching percentage up to 71.03% and treating second and fourth instars larvae by mixing their foods with of *M. anisopliae* conidia led to ccumulative high mortality percentage reached to 100% when treating the second instar with the concentrations $2.5 \times 10^6$ and $2.5 \times 10^8$ conidia/ml. , various malformation were depicted. Infected larvae showed symptoms of sluggishness and slow in growth. Histopathological study of the dead larvae showed conidial chains in the haemocoel and the mid gut was full with conidia that mixed with food and a decomposition of walls, the blastospores were found surrounded the mid gut and a decomposition in the muscle tissue with its absence of fungal filaments.

Treating mosquito pupae with $2.5 \times 10^6$ conidia/ml of *M. anisopliae* had an average of 65.47% mortality and various malformation level were depicted.

Adult stage showed a high sensitivity against fungal conidia concentrations to ccumulative high mortality percentage reached to 100% when treated with $2.5 \times 10^8$ conidia/ml.

**Keywords**: Biological control, *Culex quinquefasciatus*, *Metarhizium anisopliae*, Histological study.

## المقدمة

تهاجم اناث البعوض الانسان والحيوان للحصول على الدم الضروري لإدامة فعالياتها الحيوية وتكوين البيض. وقد وجد انها تفضل امتصاص الدم من الوجه والاطراف العليا والقدم لكون هذه المناطق تتميز بوجود الغدد العرقية فيها [1]. ان طبيعة معيشة بالغات البعوض في ترددها على عدد من المضائف للتغذية يجعلها واسطة مهمة لنقل مسببات الامراض من الشخص او الحيوان المصاب بها الى شخص او حيوان سليم [2].

ينقلبعوض الكيولكس*Cx.quinquefasciatus* العديد من الرواشح التي تسبب امراضاً خطيرة للإنسان والحيوان منها الراشح المسبب لحمى غرب النيل وراشح التهاب الدماغ الياباني وراشح مرض الجدري المائي [3،4]، يقوم كذلك بنقل مسبب مرض الفيلاريا اللمفية وهو من الامراض الخطيرة التي تسببها بعض من انواع من الديدان الدقيقة *Wuchereria bancrofti*. وفي تقرير نشر عام 1996 تم تسجيل ما يقرب من 107 مليون شخص مصاباً بمرض الفيلاريا في اجزاء من الصين والهند واجزاء من جنوب شرق آسيا وجزر المحيط الهادي وفي أفريقيا المدارية والامريكيتين الجنوبية والوسطى [2].

تصاب الحشرات في الطبيعة بأمراض عديدة تسببها كائنات حية دقيقة، يمكن أن تؤدي هذه الاصابة الى إحداث نسب موت عالية في مجتمع هذه الحشرات، وتشمل هذه الكائنات الرواشح والبكتريا والفطريات وان إستخدام مثل هذه الكائنات في السيطرة على مجتمع الحشرات الضارة (الآفات) هو مانعني به بالمكافحة الجرثومية Microbial control[5].

تختلف الفطريات في طريقة إصابتها للحشرات عن الممرضات الاخرى كالأبتدائيات والبكتريا والرواشح حيث تخترق جدار جسم العائل [الجليد] عند أماكنه الرقيقة لاسيما منطقة الجنب والمسافات المحصورة ما بين الحلقات البطنية وأحياناً عن طريق الثغور التنفسية ثم تدخل تجويف الجسم حيث تبدأ بمهاجمة أنسجته المختلفة وتستمر بالنمو والتكاثر وبالتالي يمتليء تجويف جسم الحشرة المصابة بالغزل الفطري Hyphae والذي يعرقل عمل الأعضاء ويوقف دوران الدم مما يؤدي للموت [6]. وقد ينجم الموت أيضاً بسبب إفرازات سميّة ينتجها الفطر داخل جسم العائل [7].

تهاجم الحشرات من قبل عدة مئات من أنواع الفطريات بعضها شائع جداً ويمكن ان يسبب أمراضاً وبائية ومن المهم دراسة هذه الأنواع بشكل جيد والتركيز على كفاءتها كعوامل في المكافحة الاحيائية. ويمكن ان تصاب جميع رتب الحشرات بالفطريات الممرضة ومنها رتبة ثنائية الاجنحة [8] ومن هذه الفطريات أنواعاً من الاجناس التالية: *Lagenidium*،*Coelomomyces* ، *Leptolegnia*،*Culicinomyces*، *Beauveria*،*Entomophthora*، *Metarhizium*[9، 10، 11].

يعدّ الفطر [ Metsch.] *Metarhizium anisopliae* Sorokinمن أكثر الفطريات شيوعاً في إصابة الحشرات وله انتشار عالمي يتواجد بالأساس في التربة ويصيب غالباً جميع حشرات التربة ، لايعدّ البعوض عائلاً طبيعياً لهذا الفطر [12]، ولكن وجد بأن بعض عزلاته فعالة اتجاه اليرقات [13]. يصيب هذا الفطر عوائله بعد ان يخترق جدارها الخارجي ثم يصل الى التجويف الجسمي وينمو مشكلاً غزلاً فطرياً كما يقوم بانتاج السموم التي تقتل العائل بعد 4 – 16 يوماً بعد الاصابة (حسب نوع العائل)[14]. ان هدف اجراء البحث كان لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من عالق ابواغ الفطر *M. anisopliae*في أدوار الحشرة المختلفة مع دراسة نسيجية لليرقات المصابة بالفطر بعد موتها.

**المواد وطرائق العمل:**

1.تربية الحشرة:

جُمع بيض الحشرة من حوض في الحديقة النباتية في كلية التربية للعلوم الصرفة– ابن الهيثم / جامعة بغداد خلال شهر أيلول من عام 2010، تمت تربية وإكثار مستعمرة الحشرة في مختبر الحشرات المتقدم، وضع البيض (2-3 قوارب) في أواني لدائنية بأبعاد 17×11×5.5 سم حاوية على 500 مل من ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة، وضعت أواني التربية في حاضنة بدرجة 27± 2 °م ورطوبة نسبية 70 – 80 % ومدة إضاءة 12 ساعة يومياً. غذيت اليرقات الفاقسة بعليقة (محورة) تتألف من مزيج 5:1 من الخميرة وغذاء الأسماك، مع ملاحظة تبديل ماء حوض التربية في حالة ظهور عكورة لتلافي تعفن المادة العضوية في الماء مما يؤدي الى موت اليرقات [15].

نُقلت العذارى الى أواني لدائنية نبيذة سعة الواحد منها 500 مل (لغرض الحصول على البالغات)، وضعت الأواني في أقفاص تربية ذات هياكل حديدية مكعبة الشكل بأبعاد 30×30×30 سم محاطة بقماش التول، تركت الأقفاص في المختبر تحت حرارة 25±2ºم ورطوبة نسبية 70 – 80% وإضاءة 12 ساعة يومياً. غُذيت الذكور الحديثة البزوغ بوضع طبق بتري قطره 9 سم يحتوي على قطنة مشبعة بمحلول سكري 10% داخل القفص ولغرض الحصول على البيوض غذيت الاناث على دم حمامة [16]. تم تشخيص نوع الحشرة على انها *Cx. quinquefasciatus* Say استناداً الى [17].

2 . تنمية مستعمرة الفطر:

استُخدمت عزلة من الفطر *Metarhizium anisopliae* تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية/ وحدة إنتاج المبيدات الحيوية/ جمهورية مصر العربية، نميت عزلة الفطر في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي Potato Sucrose Agar (PSA) المضاف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol، حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 26±1ºم ورطوبة نسبية 80±5 % لمدة 15 يوما [18].

3. حساب عدد الأبواغ وتحضير التراكيز الفطرية:

أُضيف 5 مل من الماء المقطر والمعقم الى مزرعة فطرية بعمر 14يوماً على وسط PSA في اطباق بتري بلاستيكية نبيذة بقطر 9 سم مع اضافة مادة الـ Tween-20 بتركيز 0.01% ، حصدت الأبواغ بوساطة قضيب زجاجي بشكل حرف L. رُشحت محتويات الطبق بوساطة قمع زجاجي مثبت يحوي قطعة شاش معقمة مع إضافة 5 مل أُخرى من ماء مقطر معقم لضمان ترشيح جميع الأبواغ الفطرية، جُمع الراشح في دورق زجاجي (المتضمن حوالي 10 مل من عالق الماء المقطر وأبواغ الفطر) والذي عُدَ العالق الأساس Stock suspension ولحساب عدد الأبواغ في العالق الفطري تم استخدام شريحة العد Haemocytometer الخاصة بعد كريات الدم الحمر حيث أُضيف 1 مل من المحلول الأساس الى 99 مل من الماء المقطر المعقم. ثم وضع 0.1 مل منه على الشريحة بعد وضع غطاء الشريحة وتم حساب عدد الأبواغ إستناداً الى المعادلة التالية [19]:

**عدد الأبواغ (بوغ/مل) = معدل عدد الأبواغ × معامل التخفيف × $25 \times 10^4$**

وبعد تطبيق المعادلة كان معدل عدد الأبواغ في المحلول الأساس ولعدة مرات يساوي $2.5 \times 10^9$ بوغ/مل، حضرت التراكيز الفطرية المراد دراسة تأثيرها وهي $2.5 \times 10^8$، $2.5 \times 10^7$، $2.5 \times 10^6$ بوغ/مل.

4 . التجارب الحيوية:

1. دراسة تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae* في بيض البعوض *Cx. quinquefasciatus*

لغرض دراسة تأثير التراكيز أعلاه نقل قارب بيض بعمر 1 – 6 ساعة من مستعمرة التربية الى إناء لدائني نبيذ سعة 500 مل يحتوي على 100 مل من ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة عوملت البيوض بطريقة الرش المباشر باستخدام مرشة يدوية سعة 25 مل ومن مسافة 15 سم تقريباً بحوالي 3 مل من كل تركيز من التراكيز الآنفة الذكر. كُررت المعاملة ثلاث مرات لكل تركيز فضلاً عن معاملة السيطرة حيث رُشت قوارب البيض ب 3 مل من محلول مائي مضافاً اليه مادة الـ Tween-20 بتركيز 0.01% حُضنت مكررات المعاملة والسيطرة في حاضنة كهربائية بدرجة حرارة 27 ± 2ºم ورطوبة نسبية 80 ± 5 % ومدة إضاءة 12 ساعة يومياً ، بعد مرور 24 ساعة تم تسجيل عدد البيض الفاقس ونُقلت اليرقات الفاقسة مع الماء المعامل الى أواني سعة 500 مل حاوية على ماء حنفية متروك أُضيف اليها تقريباً 1.5 غم من العليقة وتم متابعة تطورها لحين تحولها الى بالغات سجل خلالها عدد اليرقات الميتة وعدد البالغات البازغة .

2. دراسة تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae* في يرقات الطورين الثاني والرابع لبعوض *Cx. quinquefasciatus*:

لدراسة تأثير تراكيز عالق الفطر *M. anisopliae* في يرقات البعوض اتُبعت طريقة[20]. استخدمت التراكيز أعلاه بواقع 150 مل لكل تركيز، وزع كل تركيز منها في ثلاثة أواني لدائنية نبيذة سعة الواحد منها 100 مل وبواقع 50 مل لكل اناء (حيث ان كل اناء يمثل مكرر) ثم نُقلت 15 يرقة طور ثاني من مستعمرة التربية الى كل إناء واضيف اليه حوالي 1.5 غم من العليقة المعقمة لغرض التغذية. أما بالنسبة لمعاملة السيطرة فقد

عوملت بـ 3مل من محلول مائي مضافاً اليه مادة الـ Tween-20 بتركيز 0.01% مع إضافة 1.5 غم تقريباً من العليقة لغرض التغذية وكُررت ثلاث مرات، غُطيت جميع أواني المعاملة بقطع من قماش التول ورُبطت برباط مطاطي، نُقلت أواني التجربة الى حاضنة بدرجة حرارة 27 ± 2°م ورطوبة نسبية 80 ± 5 % وفترة إضاءة 12 ساعة يومياً تم متابعة اليرقات يومياً سُجلت عدد اليرقات الميتة والمشوهة تراكمياً وعدد البالغات البازغة، أُجريت المعاملة السابقة نفسها على يرقات الطور الرابع.

لدراسة تأثير النسجي المرضي للتركيز التركيز $2.5 \times 10^8$بوغ/ مل من عالق ابواغ الفطر *M. anisopliae*في يرقات البعوض نُقلت بعض يرقات الطور الرابع الميتة والمشوهة وبعض يرقات معاملة السيطرة الى محلول حفظ كحول أثيلي 70%. تم عمل مقاطع نسيجية متسلسلة حسب طريقة [21] حيث تم تثبيت اليرقات في محلول الفورمالين 10% لمدة 24 ساعة ثم أُجريت عليها عمليات الغسل Washing والتجفاف Dehydration والترويق Clearing والتشرب Infiltration، بعد ذلك طُمرت بشمع البرافين وقطعت بسمك 5 µm باستخدام جهاز المشراح الدوار Rotary microtome ولونت المقاطع بملون الهيماتوكسلين ارلخ المزدوج مع الايوسين، ثم صورت المقاطع النسيجية المنتخبة باستخدام مجهر ضوئي مركب نوع KRUSS وكاميرا تصوير رقمية نوع Nikon coolpix.

3. دراسة تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في عذارى البعوض *Cx. quinquefasciatus*

تم اختبار التراكيز أعلاه بواقع 150 مل لكل تركيز وُزع كل تركيز منها في ثلاثة أواني بلاستيكية نبيذة سعة الواحد منها 100 مل وبواقع 50 مل لكل اناء (حيث ان كل اناء يمثل مكرر) ثم نُقلت 10 عذارى من مستعمرة التربية بعمر 6 -12 ساعة الى كل إناء. أما بالنسبة لمعاملة السيطرة فقد وضعت العذارى في محلول مائي مضافاً اليه مادة الـ Tween-20 بتركيز 0.01% وبمقدار 3مل، غُطيت جميع أواني المعاملة بقطع من قماش التول ورُبطت برباط مطاطي لضمان عدم خروج البالغات بعد البزوغ، نُقلت أواني التجربة الى حاضنة بدرجة حرارة 27 ± 2°م ورطوبة نسبية 80 ± 5 % وفترة إضاءة 12 ساعة يومياً. تم متابعة العذارى يومياً لحين إكتمال البزوغ تم حساب عدد العذارى الميتة والمشوهة وعدد البالغات البازغة لتحديد نسب البزوغ والتشوهات اما العذارى الميتة فقد ازيلت وفحصت بمجهر التشريح.

4. دراسة تأثير تراكيز الفطر *M. anisopliae*في بالغات البعوض *Cx. quinquefasciatus*:

لغرض دراسة تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في بالغات البعوض *Cx. quinquefasciatus* طبقت طريقة [22] باستخدام جهاز اختبار حساسية البالغات للمبيدات وقد تم دراسة تأثير التركيز $2.5 \times 10^6$، $2.5 \times 10^7$، $2.5 \times 10^8$ في بالغات البعوض. كُررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز فضلاً عن عمل ثلاث مكررات لمعاملة السيطرة حيث عوملت أوراق الترشيح بـ 3مل من محلول مائي مضافاً اليه مادة Tween-20 بتركيز 0.01%. حُضنت جميع المعاملات في حاضنة بدرجة حرارة 27 ± 2°م ورطوبة نسبية 80 ± 5 % ومدة إضاءة 12 ساعة يومياً تم تسجيل عدد البالغات الميتة كل 24 ساعة لمدة 8 أيام لحساب نسبة الهلاك التراكمي.

5 . التحليل الاحصائي

صُححت النسب المئوية للهلاكات إستناداً الى معادلة [23] التي تنص على:

$$\% \text{ الهلاك} = \frac{\% \text{ هلاك المعاملة} - \% \text{ هلاك السيطرة}}{100 - \% \text{ هلاك السيطرة}} \times 100$$

تبع ذلك أستعمال البرنامجSAS[24] في التحليل الإحصائي لدراسة تأثير التراكيز المدروسة في نسبة الفقس والهلاك والتشوهات والبزوغ للبعوضوقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي LSD.

**النتائج والمناقشة:**

1. تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في فقس بيض البعوض *Cx. quinquefasciatus*:

أظهرت النتائج المسجلة في جدول (1) تأثير تراكيز من عالق ابواغ الفطر *M. anisopliae* $2.5 \times 10^6$ و $2.5 \times 10^7$ و $2.5 \times 10^8$بوغ/مل في النسبة المئوية لفقس بيوض البعوضة ففي الوقت الذي لم تؤدِ المعاملة بالتركيزين $2.5 \times 10^6$ و 2.5

$10^7$ × بوغ/مل الى خفض في النسب المئوية للبيوض الفاقسة والتي بلغت 80و79.37% وعلى التوالي مقارنة بـ 95.03% عند معاملة السيطرة ، أحدثت المعاملة بالتركيز 2.5 × $10^8$بوغ/مل خفضاً معنوياً في النسبة المئوية للبيوض الفاقسة بنسبة بلغت 71.03%، كما تظهر النتائج عدم وجود فرق معنوي في النسبة المئوية للموت التراكمي المعدل ليرقات البعوض الناتجة من البيوض الفاقسة المعاملة بالعالق البوغي للفطر *M. anisopliae* في جميع التراكيز المختبرة اذ سجلت نسب هلاك بلغت 89.77 و 88.33 و99.33% وعلى التوالي أما فيما يخص التأثير في النسبة المئوية للبزوغ فقد أظهرت النتائج فعالية جميع التراكيز المختبَرة في خفض النسبة المئوية للبزوغ اذ سجلت 6.36 و7.27 و 0.40% وعلى التوالي مقارنة بـ62.4 في معاملة السيطرة.

ان النتائج اعلاه تتفق مع ماتوصلت اليه [25] من ان معاملة بيوض الذبابة المنزلية *Musca domestica*بالفطر *M. anisoplia* عند التركيز 2.3 × $10^8$بوغ/مل وصلت نسبة الفقس فيها الى 66.64% مما قلل من نسبة بزوغ البالغات الى 26.66% مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت نسب فقس البيوض فيها 96.66%.

2. تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في يرقات البعوضة *Cx. quinquefasciatus*:

يوضح الجدول (2) تأثير ثلاثة تراكيز من عالق ابواغ الفطر *M. anisopliae*في الطورين الثاني والرابع لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*، حيث وجدان جميع التراكيز المختبرة أحدثت زيادة معنوية في النسبة المئوية لليرقات الهالكة بلغت 100 و 97 و 100% وعلى التوالي وبدون أي فرق معنوي فيما بينها الا انها جميعاً تفوقت على معاملة السيطرة التي لم تسجل اي نسبة مئوية للهلاك. وأظهرت النتائج حدوث تشوهات مظهرية نتيجة المعاملة بعالق أبواغ الفطر فعند التركيز2.5 × $10^8$بوغ/مل كانت نسبة التشوهات عند معاملة يرقات الطور الثاني 64.63% لتنخفض الى 55.53% عندالمعاملة بالتركيز2.5 × $10^6$ بوغ/مل ويتضح من الجدول ايضاً ان معاملة يرقات الطور الثاني أظهرت نتائج هلاكات أكثر من هلاكات الطور الرابع. كما اظهرت النتائج ان جميع التراكيز المختبرة احدثت زيادة معنوية في النسب المئوية لمعدل عدد اليرقات المشوهة بلغ 55.53 ، 62.2 ، 64.63، و 42.2، 59.97، 64.4 % للطورين الثاني والرابع مقارنة بمعاملة السيطرة التي لم تسجل اي نسبة من التشوهات أما فيما يخص التأثير في معدل النسبة المئوية للبزوغ فقد أحدثت المعاملة بتراكيز ابواغ الفطر الثلاثة خفضاً معنوياً في معدل بزوغ اليرقات اذ سجلت 0.0 ، 2.23 ، 0.0 و 13.33 ، 0.0 ، 4.43% مقارنة بـ 84.47 و 84.47% في معاملتي السيطرة وللطورين الثاني والرابع، فيما لم تظهر اي من التراكيز المختبرة تأثيراً معنوياً مختلفاً فيما بينها.

ان الاطوار اليرقية المعاملة بعالق أبواغ الفطر التي استطاعت إكمال الدور اليرقي قد ظهرت عليها أعراض الاصابة بالفطر الممرض بشكل واضح ومنها خمول اليرقات المصابة وقلة حركتها وامتناعها عن التغذية قبل موتها بساعات قليلة بعد المعاملة وبعض اليرقات اما غطست اوطافت على سطح الماء. امتازت بعض اليرقات الميتة باختزال في حجم الصدر وقلة شعيرات الجسم، انفصال الرأس عن باقي الجسم، تحلل اجزاء من القناة الهضمية وبروزها احيانا الى خارج الجسم (صورة 1).

ان هذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه [20] عند دراسة تأثير 80 عزلة من الفطر *M. anisoplia*في يرقات البعوض *Ae. aegypti*في البرازيل حيث ظهران بعض تلك العزلات اثرت على اليرقات وسببت لها خمول وبطئ الحركة وهلكت بعضها بعد ساعات قليلة من المعاملة بعالق أبواغ الفطر بالتركيز 2.5 × $10^6$ بوغ/مل وقد تراوحت نسب الهلاكات فيها مابين 10 – 100% بعد 5 أيام و 10 أيام وعلى التوالي في حين لم تصل نسبة الهلاك في معاملة السيطرة وطوال مدة التجربة البالغة 10 ايام الى 5%.

بينت الدراسة النسيجيـــــــة التي تم اجراؤها على بعض اليرقات الميتة بسبب الاصابة بالفطر ان المقاطع المتسلسلة لتلك اليرقات قد أكدت الاصابة بالفطر*M. anisopliae* وأظهر الفحص المجهري لتلك المقاطع وجود مظاهر للاصابة الفطرية في مناطق متعددة من جسم اليرقات حيث ظهرت أبواغ الفطر بشكل سلاسل في السائل الدموي صورة (2) كما أظهر فحص المقاطع النسيجية ان القناة الهضمية الوسطى ممتلئة بالكامل بأبواغ الفطر الممزوجة مع الغذاء وان جدرانها تحللت وتمزقت بسبب الضغط الفيزيائي للخيوط الفطرية النامية

وكذلك بسبب تأثير المواد السامة التي ينتجها الفطر أثناء النموكما أظهرت بعض المقاطع وجود الأبواغ البلاستية Blastospores التي تحيط بالمعي الوسطي والذي أدى الى قلة تناول اليرقة للغذاء مما نتج عنه موتها جوعاً صورة (3 A, B, C, D) ويلاحظ كذلك ظهورتحلل في الأنسجة العضلية مع عدم وجود خيوط فطرية خلالها صورة (4).

ان هذا يتفق مع ماذكره [21] عنـد معاملـة يرقـات *Cx. qinquefasciatus*بعالق أبواغ الفطر*M. anisopliae* بتركيز $4.5 \times 10^4$ بوغ/ملحيث ان المقاطع النسيجية اوضحت امتلاء القناة الهضمية بالكامل بأبواغ الفطر بعد 6 – 24 ساعة. وبعض الأبواغ قد أظهرت بداية مراحل التجرثم في المعي الوسطي لليرقة ولكن لم يلاحظ حدوث اختراق للانسجة الاخرى كالانسجة العضلية. كما وتتفق النتائج أعلاه مع [26] حيث اشاروا الى ان معاملة يرقات الذباب *Musca domestica*بالتركيز $2.3 \times 10^8$ بوغ/مل ادى الى موتها وأظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية اجتياح الهايفات لسائل الدم والقناة الهضمية.

3. تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في تطور عذارى البعوضة *Cx.Quinquefasciatus*بعمر 6 - 12 ساعة:

يظهر الجدول (3) أثر معاملة عذارى البعوضة المنزلية بعمر 6 - 12 ساعة بثلاثة تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*($2.5 \times 10^6$ و$2.5 \times 10^7$ و$2.5 \times 10^8$بوغ/مل) حيث تبين النتائج ان التراكيز المختَبرة لم تختلف معنوياً في النسب المئوية للموت التراكمي اذ سجلت 65.47 و53.40و58.57% وعلى التوالي. كما تظهر النتائج ان جميع التراكيز المختبرية احدثت زيادة معنوية في النسبة المئوية للتشوهات اذ سجلت 26.67 و 20 و 10% على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة التي لم تسجل أي تشوهات فيها ولم تظهر اي من التراكيز المختبرة تفوقاً معنوياً على بقية التراكيز المختبرة أما مايخص النسبة المئوية للبزوغ فقد أحدثت جميع التراكيز خفضاً معنوياً في النسبة المئوية للبالغات البازغة من عذارى معاملة بعالق أبواغفقد أحدثت جميع التراكيز خفضاً معنوياً في النسبة المئوية للبالغات البازغة من عذارى معاملة بعالق أبواغ الفطر اذ سجلت 33.33 و 30 و 40% وعلى التوالي مقارنة بـ 63.33% في معاملة السيطرة دون أي تفوق معنوي للتراكيز المختبرة فيما بينها.

ان التشوهات المظهرية للعذارى الميتة المعاملة بتراكيز الفطر تمثلت بظهور البعض منها أقصر وأنحف من عذارى معاملة السيطرة(صورة 5 B, A) وظهور النمو الفطري على العذارى الميتة المعاملة بتراكيز الفطرعند حضنها في طبق حاوي على الوسط الزرعي PSA تؤكد حدوث الاصابة الفطرية(صورة B,A6).

ان هذه النتائج تتفق مع ماتوصلت اليه [20] عند معاملة عذارى الذبابة المنزلية بعمر 24 ساعة بالفطر *M. anisopliae*حيث وصلت أعلى نسبة هلاكات فيها الى83.33% عند معاملتها بالتركيز $2.3 \times 10^7$بوغ/مل.

4. تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في نسب الهلاك المعدلة لبالغات البعوض *Cx. quinquefasciatus*:

توضح النتائج المدونة في جدول (4) تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae* في بالغات البعوضة حيث لوحظ بوضوح وجود علاقة طردية بين تراكيز عالق الفطر ونسبة الهلاكات.فقد سجلت أعلى نسبة هلاكات عند المعاملة بالتركيز $2.5 \times 10^8$بوغ/مل بلغت 100% بينما كانت نسبة الهلاك عند التركيزيـــــن $2.5 \times 10^6$و $2.5 \times 10^7$بوغ/مل 51.73 و73.23% وعلى التوالي اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين جميع التراكيز المختبرة.

كما لوحظ خمول وقلة حركة البالغات بعد المعاملة وهذه النتائج تبين حساسية الدور البالغ للبعوضة اتجاه أبواغ الفطر وهذا ما أكده الفحص المجهري للبالغات حيث أظهر غزو الخيوط الفطرية للوامس والرأس والصدر والارجل وبعد مرور 4 أيام من حضن هذه البالغات في طبق بتري حاوي على الوسط الزرعي PSA تحول لون الحشرة الى اللون الأخضر (صورة 7 و8).

ان هذه النتائج تتفق مع ماتوصل اليه [27] اذ عند معاملة بالغات البعوض *Cx. quinquefascia*و *An. gambiae* بالعالق الزيتي للفطر *M. anisopliae*وبتراكيز تتراوح مابين $1.6 \times 10^7$ و$1.6 \times 10^{10}$بوغ/مل حيث سجلت نسب هلاك تراوحت بين 4.4 – 83.7% كذلك أظهر الفحص

المجهري نمو أبواغ الفطر على ارجل البالغات | الميتة والتيتجمعت على شعيرات الرسغ.

**الجدول (1): تأثير تراكيز عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae* في معدل نسب فقس بيوض البعوضة *Cx. quinquefasciatus***

| التراكيز بوغ/مل | معدل %نسبة فقس البيوض ± الخطأ القياسي | معدل % التشوهات ± الخطأ القياسي | معدل % لبزوغ البالغات ± الخطأ القياسي |
|---|---|---|---|
| السيطرة | 3.78 ± 95.03 | 0.00 ± 0.00 | 18.80 ± 62.40 |
| $10^6 \times 2.5$ | 6.15 ± 80.00 | 3.75 ± 89.77 | 2.34 ± 6.36 |
| $10^7 \times 2.5$ | 8.43 ± 79.37 | 6.38 ± 88.33 | 3.97 ± 7.27 |
| $10^8 \times 2.5$ | 3.69 ± 71.03 | 0.67 ± 99.33 | 0.20 ± 0.40 |
| LSD | * 19.084 | 14.858ns | * 31.571 |

ns تعني عدم وجود فرق معنوي Non significant ، (*) تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى احتمال (P<0.05) بحسب اختبار اقل فرق معنوي LSD.

**جدول (2): تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر *M. anisopliae*في بعض الاطوار اليرقية للبعوضة *Cx. quinquefasciatus*:**

| التراكيز بوغ/مل | معدل %الموت التراكمي ± الخطأ القياسي | | معدل % نسبة التشوهات ± الخطأ القياسي | | معدل % لبزوغ البالغات ± الخطأ القياسي | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | الطور اليرقي الثاني | الطور اليرقي الرابع | الطور اليرقي الثاني | الطور اليرقي الرابع | الطور اليرقي الثاني | الطور اليرقي الرابع |
| السيطرة | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 2.23 ± 84.47 | 2.23 ± 84.47 |
| $10^6 \times 2.5$ | 0.00 ± 100.00 | 9.11 ± 84.20 | 12.38 ± 55.53 | ± 42.20 5.87 | 0.00 ± 0.00 | 7.71 ± 13.33 |
| $10^7 \times 2.5$ | 2.67 ± 97.33 | 0.00 ± 100.00 | 5.87 ± 62.20 | ± 59.97 3.83 | 1.12 ± 2.23 | 0.00 ± 0.00 |
| $10^8 \times 2.5$ | 0.00 ± 100.00 | 5.27 ± 94.73 | 4.33 ± 64.63 | ± 64.40 5.87 | 0.00 ± 0.00 | 2.21 ± 4.43 |
| LSD | 5.327ns | 21.043ns | * 23.439 | * 14.929 | * 5.150 | 14.949 |

ns تعني عدم وجود فرق معنوي Non significant ، (*) تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى احتمال (P<0.05) بحسب اختبار اقل فرق معنوي (LSD).

**جدول (3): تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر*M. anisopliae*في هلاك وتطور عذارى البعوضة *Cx. quinquefasciatus*بعمر 6 - 12 ساعة**

| التركيز بوغ/مل | معدل % للموت التراكمي المعدّل ± الخطأ القياسي | معدل % للتشوهات ± الخطأ القياسي | معدل % للبزوغ ± الخطأ القياسي |
|---|---|---|---|
| السيطرة | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 13.79 ± 63.33 |
| $10^6 \times 2.5$ | 9.14 ± 65.47 | 8.81 ± 26.67 | 8.81 ± 33.33 |
| $10^7 \times 2.5$ | 3.00 ± 53.40 | 5.00 ± 20.00 | 15.27 ± 30.00 |
| $10^8 \times 2.5$ | 5.97 ± 58.57 | 5.00 ± 10.00 | 5.77 ± 40.00 |
| LSD | 10.627* | * 17.177 | * 16.035 |

(*) تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى احتمال (P<0.05) بحسب اختبار اقل فرق معنويLSD.

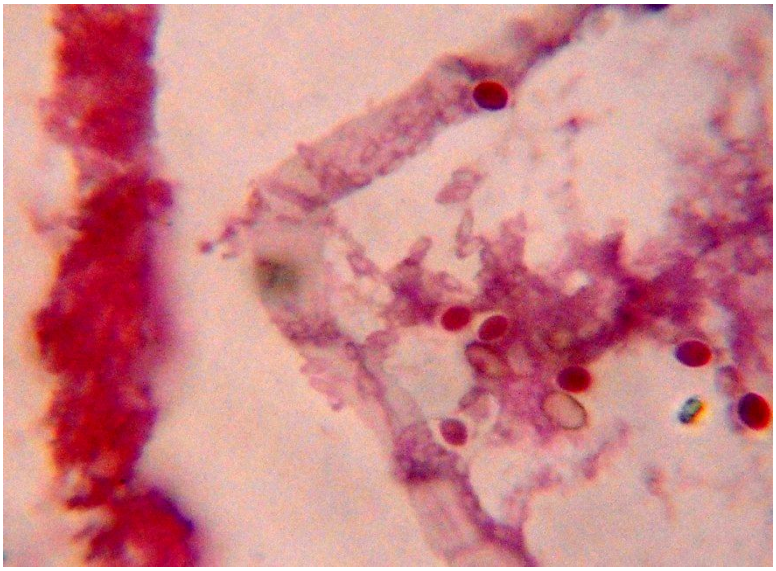
**جدول (4): تأثير تراكيز من عالق أبواغ الفطر*M. anisopliae*في نسب هلاك بالغات البعوضة *Cx. quinquefasciatus*المعدلة.**

| التراكيز بوغ/مل | معدل % للموت التراكمي المعدل ± الخطأ القياسي |
|---|---|
| **$10^6 \times 2.5$** | **3.08 ± 51.73** |
| **$10^7 \times 2.5$** | **15.47 ±73.23** |
| **$10^8 \times 2.5$** | **0.00 ± 100.00** |
| **LSD** | **2 1.523*** |

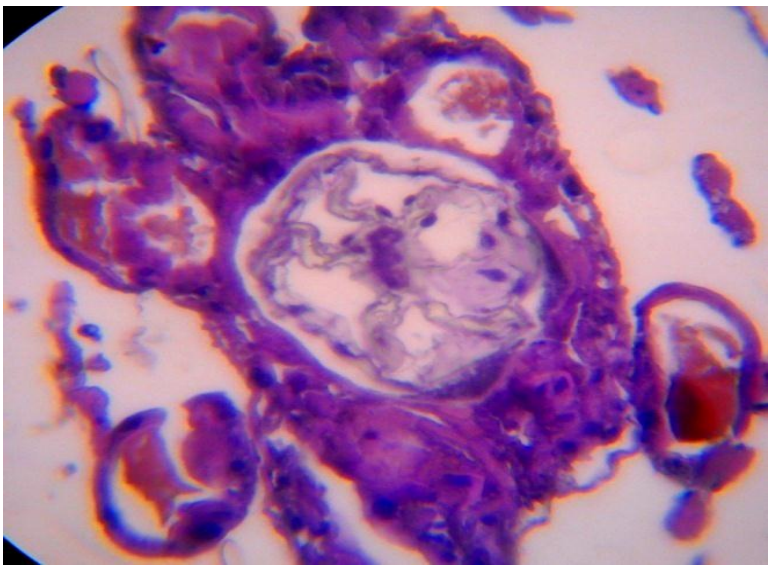
(*) تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى احتمال (P<0.05) بحسب اختبار اقل فرق معنوي LSD.

**صورة(1) A : يرقة عمر ثاني طبيعية من معاملة السيطرة (Control). قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**

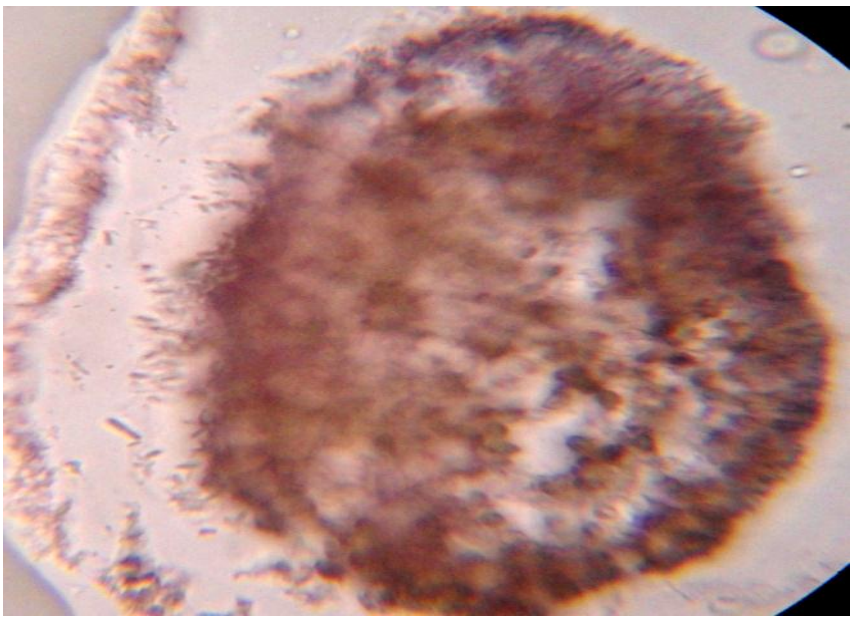
**B : يرقة عمر ثاني معاملة بعالق الفطر *M. anisopliae* تظهر نحيفة مقارنة بيرقات معاملة السيطرةقوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**



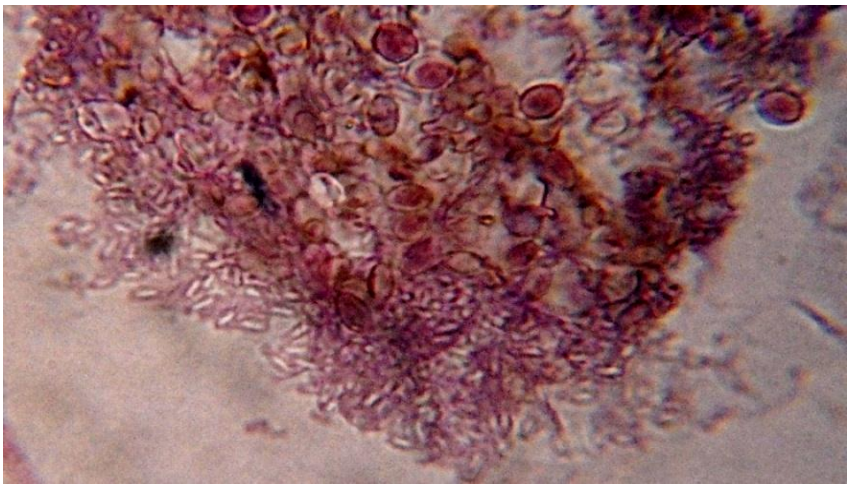
صورة (2): مقطع مستعرض خلال جسم يرقة البعوضة يوضح سلاسل أبواغ الفطر *M. anisopliae* في السائل الدموي." ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000"



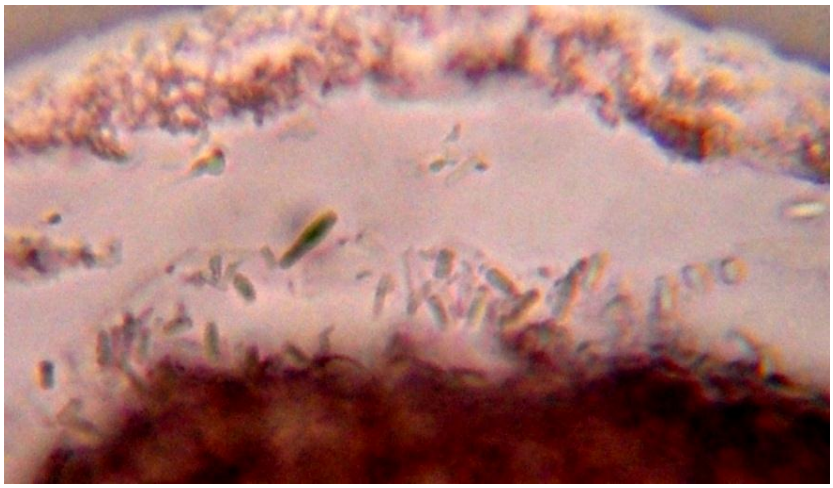
صورة(3) A : مقطع مستعرض خلال القناة الهضمية ليرقة معاملةالسيطرة " ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000"



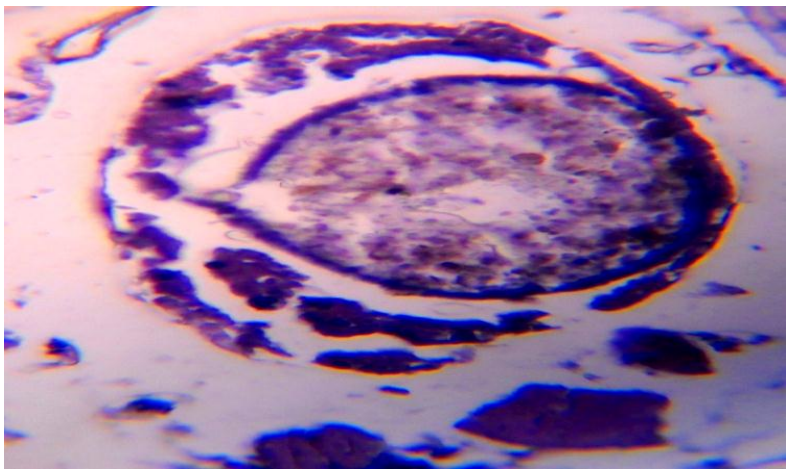
صورة (3) B : مقطع مستعرض خلال القناة الهضمية ليرقة معاملة السيطرة " ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000".



صورة C(3): مقطع مستعرض خلال القناة الهضمية ليرقة البعوض تظهر ممتلئة بأبواغ*M. anisopliae*بعد تحلل جدارها. "ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000"



صورة D (3): مقطع مستعرض خلال جسم يرقة البعوض يوضح الخيوط الفطرية وأبواغ الفطر المتبرعمة المحيطة بالقناة الهضمية ." ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000".



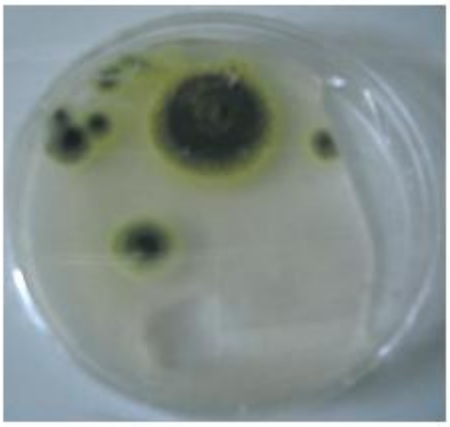
صورة (4): مقطع مستعرض خلال جسم اليرقة البعوضة يوضح تحلل وتفكك الانسجة العضلية المحيطة بالقناة الهضمية. " ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير X1000".

صورة (٢) A

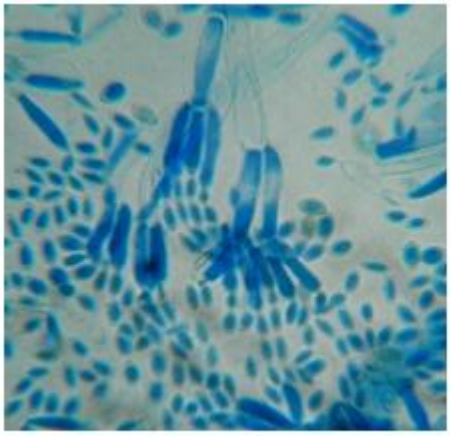
صورة (٢) B

**A : عذراء طبيعية من معاملة السيطرة (Control). قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**

**B: عذراء معاملة بعالق الفطر *M. anisopliae* يظهر قصر طولها ونحافتها مقارنة بعذراءمعاملة السيطرة. قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**



A [٣]



B [٤]

**صورة (6): A- تأكيد اصابة عذراء البعوضة بالفطر*M. anisopliae* بعد تنميتها على وسط PSA.قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**

**B- فحص النمو الفطري تحت المجهر الضوئي لتأكيد الاصابة بالفطر. تحت قوة تكبير (X40).**

[٧]

[٨]

**صورة (7): بالغة البعوضة مصابة بالفطر*M. anisopliae* ويظهر النمو الفطري على اللوامس والرأسوالصدر. قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**

**صورة (8): بالغة بعوضة ميتة تظهر عليها حالة Mycosis ويظهر النمو الفطري بعد 3 – 4 أيام من المعاملة. قوة التكبير بالمجهر التشريحي (X10).**

**المصادر:**


1. Rozendal, J. A.(1997). Vector control, methods for use by individuals and communities, World Health Organization, Geneva: 412pp.
2. Oduola, A.O. and Awe, O.O. (2006). Behaviourpreference of*Culex quinquefasciatus* in human host in Lagos metropolis Nigeria. J.Vect.Dis. 43: 16-20.
3. Hubalak, Z. and Halouzka, J. (1999). West Nile fever. a reemerging mosquitoe-borne diseasein Europe. Emerging Infectious Dis. 5(5): 643-650.
4. Moosa Kazemi, S.H.; Karimian, F. and Davari, B. (2010). Culicinae mosquitoes inSanandaj country, Kurdistan province, Western Iran. J.Vect. Borne Dis. 47: 103-107.
5. عذيب، علي مهدي(2001). المكافحة البايولوجية واهميتها الصحية في مكافحة الأمراض والوقاية منها.رسالة دبلوم، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
6. الباروني، محمد ابو مرداس والحجازي، عصمت محمد (1994). المكافحة الحيوية لممرضات الحشرات، الجزء الثاني. منشورات جامعة عمر المختار، الجماهيرية الشعبية الليبية: صفحة635 .
7. Mohanty, S. S.; Raghavendra, M. P. K. and Dash, A. P. (2008). Efficacy of culturefiltrates of Metarhizium anisopliae against larvae of Anopheles stephensi andCulex quinquefasciatus. J. Microbiol. Biotechnol., 35: 1199-1202.
8. Scholte, E. J.; Knols, B. J. and Takken, W. (2004). Autodissemination of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae amongst adult of malaria vector Anopheles gambiae. Malaria J., 3: 45.
9. الزبيدي، حمزة كاظم (1992). المقاومة الحيوية للآفات. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل: 271 صفحة.
10. Poopathi, S. and Tyagi,B.K. (2006). The challenge of mosquito control strategies: from primordial to molecular approaches. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 1(2): 51-65.
11. Hallman, C. F.; Schreiber, E. T.; Vo, T. and Bloomquist, M. A. (2000). Field trials of three concentrations of Laginex asbiological larvicide compared to Vectobac- 2 as biocontrol agent of Culex quinquefasciatus. J. Amer. Mosq. Cont. Ass., 16: 5- 8.
12. Scholte, E. J.; Njiru, B. N.; Smallegang, R. C.; Takken, W. and Knols, B. GJ.[2003a]. Infection of malaria (Anopheles gambiae) and filariasis (Culex quinquefasciatus) vectoer with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Malaria J. 2:29.
13. Alves, S. B.; Alves, L. F.; Lopes, R. B.; Pereira, R. M. and Vieira,S. A.(2002). Penetration of some Metarhiziumanisopliae isolates forcontrol of Culex quinquefasciatus(Diptera: Culicidae). J. Appl.Entomol., 126: 504 – 509.
14. Gayathri, G.; Balasubramanian, C.; Moorth, P. V. and Kubendrant, T. (2010).Larvicidal potential of Beauveribassiana (Balsamo) Vuillemin and Poecilomyces fumosoroseus (Wize.) Brown and Smith on Culexquinquefasciatus(Say). J. Biopesticides, 3(1):147-151.
15. مهدي، نوال صادق (2001). تأثير مستخلصات ثمار نباتي السبحبح azedarach L. والنيمMelia (A. Juss)Azadirachta indica في الاداء الحياتيلبعوض (Diptera:

Culicidae)Anopheles pulcherrimus Theobo اطروحة دكتوراه، كلية التربية (ابن الهيثم)، جامعة بغداد.

16. Mohsen, Z. H.; Ouda, N. A. and Zaiya, H. H. (1989). Predatory efficiency and tolerance of Gambusia affinis to mosquito larvicides. J. Biol. Sci. Res., 20: 120-125.
17. Harbach, R.E. (1988). The mosquitoes of the subgenus Culex in Southwest Asiaand Egypt(Diptera: Culicidae). Contrib. Amer. Ent. Ins. 24(1): 1-246.
18. Mnyone, L.L.; Russell, T.L.; Lyimo, I. N.; Lwetoijero, D.W.; Kirby,J. and Christian, L. (2009). First report of M etarhizium anisopliae IP 46 pathogenicity inadult Anopheles gambiae s.s.and Anopheles arabiensi (Diptera: Culicidae). ParasiteandVector, 2:59.
19. Aube, C. and Gagnon, C. (1969). Effect of carbon on and nitrogen nutrition on growthand sporulation of Trichoderma viride . Pers. Exfires, Canadian J. Microbiol, 703-706.
20. Silva, R. O.; Silva, H. H. G. and Luz, C. (2004). Effect of Metarhizium anisopliaeisolates from soil samples of the central Brazilian cerrado against Aedes aegyptilarvae under labolatory conditions. Revista De PatologiaTrop., 33(2): 207-216.
21. Lacey. C. M.; Lacey, L. A. and Roberts, D. W. (1988). Route of invasion and histopathology of Metarhizium anisopliae in Culex quinquefasciatus. J. Invertebr. Pathol., 52(1): 108 – 118.
22. W.H.O. (1982). Manual on environmental management for mosquito control withspecies emphasis on malaria vector. Geneva. W.H.O. offset PuplicationNo.66.
23. Abbott, W. S. (1925). Amethod of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265 – 267.
24. SAS, (2004).Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
25. عبيد، وفاء برغش (2011). فعالية فطر Metschnikoff (Sorokin)Metarhizium anisopliae في المكافحة الاحيائية للذبابة المنزلية Musca domestica L. (Diptera: Muscidae) تحت ظروف المختبر مع دراسة نسيجية مرضية لليرقات المصابة. رسالة ماجستير، كلية التربية ابنالهيثم، جامعة بغداد.
26. Obaid, W. B.; Mehdi, N. S. and Mohammed, H. A. (2012). Histopathology of Metarhizium anisopliae, Entomopathogenic fungus infected larvae of Musca domestica L. (Diptera: Muscidae). Ibn Al- Haitham J. Pure and Appl. Sci. 25 (2): 18 – 25.
27. Scholte, E. J.; Takken, W. and Knols, B. G. J. (2003). Pathogenicity of five east African entomopathogenic fungi against adult Anopheles gambiae s.s. mosquitoes(Diptera: Culicidae). Proc. Exper. Appl. Entomol., 14: 25-29.