

الكشف عن بعض الفطريات الممرضة للحشرات

في تربة حمص

الباحثة: د. امانى الحبيب

كلية الزراعة - جامعة البعث

الملخص

تم الكشف عن الفطريات الممرضة للحشرات في تربة حمص, بأخذ ثلاث عينات تربة من مناطق مختلفة جغرافيا في محافظة حمص (شين, حمص المدينة, المخرم). تم العزل باستخدام طريقة الغاليريا (*Galleria bait method*) أظهرت النتائج الحصول على عزلة ممرضة للحشرات من الفطر *Beauveria* وباقي العزلات لم تثبت امراضيتها حسب فرضية كوخ. أظهرت العزلة A قدرة امراضية على يرقات دودة الشمع ويرقات ذبابة الفاكهة تحت الظروف المخبرية (25 ± 2 م° ورطوبة نسبية 60 ± 5 %). كما بينت الأولية لاختبار كفاءة العزلة الممرضة للفطر *Beauveria* في قتل يرقات دودة الشمع ويرقات ذبابة الفاكهة عند معاملة تسع يرقات لكلا الحشريتين كلاً على حدى كفاءة جيدة في قتلها, فقد بلغ عدد اليرقات الميتة في اليوم العاشر من المعاملة 8 لدودة الشمع و 6 لذبابة الفاكهة بينما كانت في الشاهد الغير معامل (1,0) يرقة ميتة على التوالي. ولتأكيد هذه النتائج لابد من اجراء اختبارات على عدد أكبر من اليرقات وحساب نسبة الموت المصححة.

الكلمات المفتاحية: تربة حمص, *Beauveria*, طريقة الغاليريا , فطريات ممرضة للحشرات

Detection of some entomopathogenic fungi in Homs soil

Abstract

Insect-pathogenic fungi were detected in Homs soil, by taking three soil samples from geographically different regions in Homs Governorate (Sheen, Homs City, and Al-Mukharam). Isolation was carried out using the Galleria bait method

The results showed that an entomopathogenic isolate of *Beauveria* was obtained, and the rest of the isolates were not pathogenic according to Koch's hypothesis

Isolate A showed pathogenicity to waxworm larvae and fruit fly larvae under laboratory conditions ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of $60\pm 5\%$)

The preliminary test of the efficiency of the *Beauveria* pathogenic isolate in killing waxworm larvae and fruit fly larvae when treating nine larvae of both insects separately showed a good efficiency in killing them. The number of dead larvae on the tenth day of treatment was 8 for waxworm and 6 for fruit fly, while in the untreated control (1,0) larvae were dead respectively. To confirm these results, it is necessary to conduct tests on a larger number of ...larvae and calculate the corrected death rate

.Key words: *Beauveria*, *Galleria bait method*, Homs soil, Insect-pathogenic fungi.

1- مقدمة

ازداد الاهتمام بالبحث عن آليات جديدة للقضاء على الآفات بأساليب تحاكي الطبيعة ولا تؤثر سلباً على الإنسان والنبات والحشرات النافعة، فتم العمل على تطوير الطرق البيئية الصديقة لمكافحة الآفات (15) فظهرت المبيدات البيولوجية وهي عبارة عن مستحضرات طبيعية تحتوي سلالات لبعض الكائنات الحية مثل البكتيريا، الفطر، الفيروس والتي تتميز بقدرتها على إصابة الآفات الحشرية والقضاء عليها، ومن أهم هذه الكائنات الفطريات الممرضة للحشرات والتي تشكل بديلاً آمناً على البيئة، ويمكن استخدامها على الآفات التي شكلت سلالات مقاومة للمبيدات الكيميائية التقليدية، كما أن مجالها العائلي واسع ولسالنتها القدرة على اختراق كيوتيكل الحشرة بآلية انزيمية تتوافق مع العائل (6) (14).

أثبتت الفطريات الممرضة للحشرات قدرتها في القضاء على العديد من الآفات الحشرية كذبابة ثمار الزيتون، ذبابة الفاكهة وغيرها من الآفات (2)(3) (11) .

تحل الفطريات الممرضة للحشرات مكانة هامة كعناصر مكافحة حيوية، استخدمت بشكل واسع ضمن برامج الإدارة المتكاملة للآفات في مناطق كثيرة من العالم، فتم ادخال الممرضات الفطرية بنسبة 49.3% ضمن 136 برنامج مكافحة حيوية(7).

ونظراً لأهمية الفطريات الممرضة في السيطرة على الآفات وقلّة الأبحاث المتعلقة بها في سورية، تأتي أهمية البحث عن الفطريات الممرضة المتواجدة في بيئتنا المحلية، ومن ثم وتقييم فعاليتها ضد الآفات .

2-هدف البحث

عزل الفطريات الممرضة من التربة بواسطة يرقات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*(Lepidoptera:Pyralidae) وتقييم قدرتها الإراضية على يرقات

ذبابة الفاكهة (*Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) ويرقات دودة الشمع الكبرى في الظروف المخبرية.

3- مواد وطرائق البحث

3-1- مكان البحث

تم تنفيذ البحث في مخبر أبحاث مكافحة ومخبر الأمراض في كلية الزراعة جامعة البعث عام 2020-2021.

3-2 عينات التربة: تم جمع 3 عينات من التربة ، كل عينة 1 كغ ، من قرى شين، مخرم، حمص المدينة(دوار تدمر). تم أخذ هذه العينات من التربة على عمق 10-20 سم، ووضعها في كيس نايلون كتب عليه معلومات الجمع وتاريخه.

3-3- تربية يرقات دودة الشمع: تم الحصول على يرقات دودة الشمع الكبرى *G. mellonella* من منحل في ريف حمص الغربي صورة (1)، وغذيت اليرقات على بيئة غذائية مكونة من 200 غ طحين، 80 مل عسل، 70 مل جليسرول، 50 غ خميرة. تمت تربية يرقات العمر اليرقي الرابع وفق (5)(13).



صورة(1): يرقات دودة الشمع الكبرى

3-4- تنفيذ التجربة: ابعدت الحصى ووضع 300 غ تربة في كل وعاء بلاستيكي سعة 1 لتر وذلك بواقع 3 مكرارت لكل موقع. نقلت يرقات دودة الشمع بالعمر الرابع بواقع 3 يرقات للمكرر الواحد صورة (2)، ووضعت مقلوبة ضمن الوعاء بطرف المخبّر وتم تقلبيها بشكل يومي لمدة ثلاث ايام. لضمان تعرض اليرقات للتربة وابواغ الفطور في حال تواجدها. وبعد 14 يوم تم الكشف عن اليرقات الميتة .



صورة (2): يرقات دودة الشمع ضمن التربة المدروسة

تم غسل اليرقات الميتة التي يبدو عليها نمو فطري بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 0.5%، وغسلت اليرقات بعدها ثلاث مرات بماء مقطر ومعقم، نقلت الحشرات المعقمة بعدها لأطباق بتري تحوي بيئة PDA ومضاد حيوي (Ciprofloxacin) CEFLEX بنسبة 10مغ/500مل وحضنت اليرقات على درجة حرارة 25 ± 2 °م لمدة 15 يوم حتى ظهور النموات الفطرية إن وجدت صورة(3). تم الكشف عليها بعد اسبوع من التحضين. درست الصفات المورفولوجية (شكل الأبواغ، لون الأبواغ، شكل المستعمرة، لون المستعمرة ، شكل الميسليوم، ...) للفطريات النامية (5) (21).



صورة(3): وضع يرقات دودة الشمع على بيئة PDA

إن ارتباط الكائن الممرض بالحشرات الميته ليس برهاناً كافياً على إن هذا الكائن هو المسبب المرضي، حيث أن هذا الكائن قد يكون أصاب الحشرة بعد أن ضعفت أو ماتت بتأثير ظروف بيئية معاكسة. ولكي نثبت أن الكائن الممرض المرافق هو المسبب المرضي فذلك يتطلب تطبيق فروض كوخ (12) كما يلي:

أ- إمكانية عزل المسبب من الحشرات التي تظهر عليها الأعراض ودراسة خواصه المورفولوجية.

ب- إعادة حقنه في صورة نقية بالعائل.

ت- ينبغي أن يظهر العائل نفس الأعراض في حال مصاحبة الكائن الممرض لأنسجته. لذلك وتطبيقاً لفرضية كوخ تم عزل الفطريات على أطباق بتري تحوي بيئة PDA صورة (4) وتم درجة يرقات دودة الشمع عليه ويرقات ذبابة الفاكهة بواقع 3 مكررات، و3 يرقات بكل مكرر، فتم تخصيص 3 مكررات لكل نوع فطري معزول والشاهد تم درجة اليرقات على ورق تنشيف مرطب بالماء . ثم وضعت اليرقات ضمن اطباق بتري وتم مراقبتها مدة 10 أيام . كما تم دراسة الصفات المورفولوجية للمستعمرات الفطرية النقية التي تم درجة اليرقات عليها. وتم تعريف الفطريات بناء على الشكل المورفولوجي للمستعمرة والاعراض المرضية المرافقة على اليرقات والفحص تحت المجهر باعتماد المفاتيح التصنيفية(16)(17)(9)(13).



صورة 4: عزل الفطريات على PDA للحصول على عزلة نقية ودرجة اليرقات عليها

4- النتائج والمناقشة:

1- نتائج العزل من الحشرات:

بعد اسبوع من تحضين يرقات دودة الشمع على بيئة PDA ، ظهرت نموات فطرية على كل الاطباق المحضنة، تم دراسة الصفات المورفولوجية للعزلات المتحصل عليها وتحديد الجنس وفق مفاتيح التصنيف المعتمدة (9-13-16-17)، ومن ثم زراعتها على وسط PDA للحصول على عزلات نقية بهدف التأكد من امراضيتها.

تم الحصول على 3 عزلات تنتمي لجنس واحد هو *Beauveria* و عزلة تنتمي للجنس *Tricogramma* وكانت عزلة واحدة فقط ممرضة تتبع للجنس *Beauveria* وبقية العزلات كانت فطريات رمية وفق فرضية كوخ، والجدول (1) يبين نتائج العزل.

الجدول(1): الفطريات الممرضة للحشرات المعزولة من عينات التربة في مواقع الدراسة

| عدد العزلات | نوع العزلة | الفطريات المعزولة | نوع التربة | التربة | مكان العزل |
|-------------|------------|--------------------|------------|-------------|------------------------|
| 1 | ممرضة | <i>Beauveria</i> | رملية | بور | حمص المدينة(دوار تدمر) |
| 1 | رمية | <i>Tricogramma</i> | - | أشجار مثمرة | شين |
| 2 | رمية | <i>Beauveria</i> | كلسية | زيتون | المخرم |

2-توصيف العزلة الممرضة للفطر *Beauveria* وتصنيفها

درست المواصفات المورفولوجية لمستعمرة وأبواغ العزلة الممرضة *Beauveria* وفق المفاتيح التصنيفية في المراجع.

(17) (9) وكانت وفق الجدول(2) التالي:

الجدول(2): المواصفات المورفولوجية المدروسة للعزلة الممرضة *Beauveria*

| لون المستعمرة | شكل المستعمرة | شكل الأبواغ | الحوامل البوغية | الفطر الممرض |
|------------------|---------------|-------------|-----------------|------------------|
| أبيض مائل للصفرة | قطنية | كروية | شفافة | <i>Beauveria</i> |

3- القدرة الامراضية للعزلة الفطرية الممرضة للجنس *Beauveria*:

لوحظت الأعراض المرضية على يرقات دودة الشمع بعد 24 ساعة من دحرجتها ضمن الأطباق على المستعمرات الفطرية . أصبحت حركة اليرقات المتدحرجة على العزلة A أبطأ. وبعد 48 ساعة أصبح جسمها أكثر شفافية، وفي اليوم الثالث كانت اليرقات غير قادرة على الحركة فقط الرأس يتحرك والجسم مصفر، في اليوم الرابع كانت اليرقات عديمة الحركة بعد لمسها بالفرشاة وأجزاء الفم تتحرك جزئياً، في اليوم الخامس ماتت اليرقات وبدأت تتجمع وتسد وبدأت النموات الفطرية بالظهور عليها.

أما يرقات ذبابة الفاكهة كانت أكثر مقاومة من يرقات دودة الشمع، فلم تظهر عليها أية أعراض بعد 48 ساعة ، وبعد 72 ساعة أصبحت اليرقات أبطأ، وتعذرت اليرقات. تمت مراقبة العذارى لمدة 10 أيام بعد التعذر، تم تشريح العذارى التي لم تخرج منها الحشرات الكاملة ووجدت نموات فطرية ضمن العذراء، كما وجدت عذارى جافة من الداخل.

الكشف عن بعض الفطريات الممرضة للحشرات في تربة حمص

بلغ عدد الحشرات الميتة من دودة الشمع الكبرى بعد 5 أيام من المعاملة 8 حشرات ، بينما كان عدد الحشرات الميتة 6 حشرات عند يرقات ذبابة الفاكهة بعد 10 أيام من المعاملة الجدول(3)، حيث تعذرت اليرقات المعاملة فتم تسجيل عدد العذارى الميتة .

الجدول(3): عدد الحشرات الميتة لدودة الشمع وذبابة الفاكهة نتيجة المعاملة بالعزلة الفطرية الممرضة *Beauveria* بعد 10 أيام من المعاملة

| الحشرة المختبرة | المعاملة | عدد اليرقات المختبرة | عدد اليرقات الميتة |
|---------------------|----------|----------------------|--------------------|
| يرقات دودة الشمع | المعاملة | 9 | 8 |
| | الشاهد | 9 | 0 |
| يرقات ذبابة الفاكهة | المعاملة | 9 | 6 |
| | الشاهد | 9 | 1 |

المناقشة

يمكننا أن نعزو موت يرقات دودة الشمع وذبابة الفاكهة في هذا البحث إلى :

-السموم الفطرية التي تفرزها الفطور الممرضة : تقوم الابواغ بإفراز سموم فطرية تقتل الحشرة قبل انتشار الفطر ميكانيكياً، حيث أثبتت الأبحاث أن أنواع الفطر *B. bassiana* تنتج الكثير من المركبات السامة للحشرات والتي تتميز بأنها ذات وزن جزيئي منخفض ونواتج ثانوية للاستقلاب ومن هذه السموم Beauvericin وBassianin وBeuverolides وTenellin وBassianolide

(20) (21). وهذا يعطي تفسيراً واضحاً لانخفاض نسبة الحشرات المتبوعة كون الحشرات قد ماتت بسبب السموم الفطرية وليس بسبب نمو الفطر وانتشاره ضمن العائل.

-نقص المواد الغذائية المتاحة لأنسجة الحشرة حيث تقوم الفطور بإفراز إنزيمات لتحليل المواد الغذائية الموجودة في الوسط الذي توجد فيه وجعله بصورة قابلة للامتصاص وبالتالي استنزاف المواد الغذائية المتاحة للحشرة (20)

تراوح الزمن الذي احتاجته العزلة المحلية من الفطر الممرض *Beauvaria* لقتل يرقات دودة الشمع وذبابة الفاكهة بين 5-10 يوم العزلات وهو ما ذكره (10) حيث ذكر أن الزمن اللازم للفطور الممرضة حتى تقتل الحشرة يختلف حسب عدة عوامل منها طور الحشرة، الرطوبة، الفطر الممرض ذاته، و تحتاج أغلب الفطور الممرضة فترة زمنية تتراوح بين 3-12 يوم من العدوى حتى تموت الحشرة.

ان الاختلاف بعدد الحشرات الميتة المختبرة قد يعود :

- العائل المأخوذة منه هذه العزلات: حيث تؤكد الدراسات المرجعية أن العزلات الفطرية المعزولة من العائل ذاته تكون أكثر شراسة من العزلات الأخرى (19) فلكي يخترق الفطر جسم الحشرة يفرز إنزيمات خاصة بالإضافة للضغط الميكانيكي، وبما أن الكيوتاكل يختلف من نوع حشري للآخر فإن إفراز الإنزيم المناسب لكل نوع مرتبط بوجود المورث الخاص بذلك فسلالات الفطر المعزولة من العائل ذاته لها قدرة إمراضية أعلى على ذلك العائل من العزلات المتحصل عليها من عوائل مختلفة وهذا ما يفسر ارتفاع شراسة العزلة A كونها معزولة من دودة الشمع الكبرى.

وبالتالي يمكننا أن نعزو انخفاض نسبة إمراضية الفطر *beauvaria* على يرقات ذبابة الفاكهة لـ

التركيب الكيميائي لسطح جسم الحشرة من العوامل التي قد يكون لها دور في تقليل إمرضيه الفطور على اليرقات حيث ذكر (4) أن يرقات ذبابة الفاكهة تمنع تطور الفطور الممرضة بسبب وجود أحماض دهنية حرة تمتلك خصائص مضادة للفطور، كما أن يرقات *Heliiothis helicoverpa* , *Spodoptera frugiperda* وجد أنها تحوي caprylic acid على سطح جسمها الذي يعيق ويمنع انبات الفطر الممرض(18).

كانت طبيعة نمو الفطر على اليرقات واضحة فقد ظهر الميسليوم الفطري من مناطق اتصال حلقات البطن على شكل حلقات عند بعض اليرقات المعاملة بعد التحضين حيث كان النمو الفطري ضعيف على اليرقات وبقيت معظم اليرقات متحجرة وبلون رمادي قاتم ، في حين كان هناك نمو للميسليوم الفطري على العذارى. وهذا ما ذكره (8)(20) أن الميسليوم الفطري يخرج من الأجزاء الملساء للهيكل الخارجي للحشرة كالمنطقة الغشائية من البطن، الرقبة حيث يتبوغ الفطر على عائله بعد اتمام دورة حياته والتي تشمل بشكل عام الالتماس أو الالتصاق، الإنبات، الاختراق، نمو الفطر داخل العائل في الظروف اللاهوائية والانتقال إلى الحالة الرمية التي تنتهي بالتبوغ على سطح جسم العائل بعد موت الحشرة حيث تخرج الحوامل الكونيدية من الأجزاء الضعيفة من هيكل الحشرة وتنتج أبواغ.(20).

الاستنتاجات

- الحصول على عزلة فطرية ممرضة تتبع لجنس *Beauvaria* وباقي العزلات رمية.
- أظهرت يرقات دودة الشمع حساسية عالية تجاه العزلة الفطرية الممرضة، وكانت أكثر حساسية من يرقات ذبابة الفاكهة.

التوصيات

- تعريف نوع الفطر الممرض ومعرفة خصائصه الإمبراضية على أنواع حشرية أخرى.
- التأكيد على تنمية وإكثار هذه العزلة وإقامة بحوث مستقبلية تهدف لدراسة مدى كفاءة هذه العزلة حقليا.
- العمل على الكشف عن فطريات ممرضة للحشرات في العديد من الترب، والتوسع في إجراء التجارب عليها.

REFERENCES:

1-ABBOTT,W.S1925A method of computing the effectiveness of insecticide, Journal of Economic Entomology,18,N.2,265-267.

2- AHMAD, M., Al-MOUGHRAHI .S and Haj Hassan.A. 2011. Survey of Entomopathogenic Fungi in Soils of Different Ecosystems in Lattakia. Arab Journal of Plant Protection, 29: 171-178.

3-ALHABEEB,A.F.,NAMMOUR,D.H and ALI.Y.A 2017The pathogenicity of local isolates of *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuill for larvae of *Bactrocera oleae* (Rossi. 1790),Journal Albaath university,volume.39.(in Arabic)

4-ALI, A. SERMANN, H. BUTTNER, C 2008 Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi, Commun. Agric. Appl. Biology. Sci. 73(3): 589-596.

5-ALUJA, M. 1993.Manejo Integrado de la mosca de la fruta Trillas, Mexico D.F. Aluja, M. 1994. Bionomics and management of Anastrepha Annu. Rev. Entomol. 39: 155-178.

6-BUTT, T.M 2002 Use of entomogenous fungi for control of insect pestes ,In the Mycota xi. Agriculture Application, ed, h kempku .Berlin, Springer Verlag.pp111-134.

-DAANE, K.M., JOHANSON, M.W. 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. Annu. Rev. Entomol, 55: 151-169.

7-FAO, 2011. Available at : <http://www.fao.org>- 2011.

8-FIUME, F and VITA. G. 1977. The use of the juice of olive fruits for the control of *Dacus oleae* Gmel. In the open field. Boll. Lab,Ent. Agr. Portici., 34:25-37.

9-HUMBER, R.A. 1997. Fungi: identification. Pages 153-185. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. L.A. Lacey (ed.). Academic Press. New York. 409 pp. 10. Humber, R.A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA joint annual meeting. 26 pp

10-MACLEOD, D.M 1963 Entomophthorales infection 1. In Insect Pathology, Academic Press, 189-231p.

11- MAHMOUD, M.F 2009 Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizum anisopilae* and *Lecani cilliumlecanii* against adults of olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin)(Diptera: Tephritidae) in the laboratory, Plant Protection, Sci., 45: 98-102.

12-MED,A.I.1982. REBORT Koch American medicine muliitzRC.
The centery of Robert. 97(5):7616.

13-MEYLING N.V. 2007. Methods for isolation of
entomopathogenic fungi from the soil environmentLaboratory
manual. Department of Ecology, Faculty of Life Sciences,
University of Copenhagen, Denmark.18 pp

14- MUSTAFA,U and KAUR,G2010Studies on Extracellular
Enzyme Production in *Beauveria Bassiana* Isolates, Journal of
Biotechnology and Biochemistry, Volume 6 Number 5. pp. 701–
713.

15- NICOLOPOULOU,S, P., MAPAS, S., KOTAMPASI, C.,
STAMATIS, P., and HENS, L 2016 Chemical pesticides and
human health: the urgent need for a new concept in
agriculture. Front, Public Health, 4:148.

16-POINAR, G.O. Jr and G.O. Thomas. 1984. Laboratory
guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press, New
York. 392 pp.

17-SAMSON, R.A. 1981. Identification: entomopathogenic
Deuteromycetes. Pages 93-106. In: Microbial control of pests

and plant disease 1970– 1980. H.D. Burges (ed.). Academic Press London.

18-SMITH, R. J., and E. A. Grula. 1982. Toxic components on the -larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*.Journal of economic entomology.21:11-32.

19-TANADA, Y.and KAYA, H.K.1993.Insect pathology .Academic Press. New York, 665pp.

20-WRIGHT, J. E. and L. D. CHANDLER. 1992. Development of a biorational mycoinsecticide:*Beauveria bassiana* conidial formulation and its application against boll weevil populations(Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 1130 -1135.

20-ZIMMERMAN, G. 1986. The ‘Galleria bait method’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Applied Entomology, 102: 213–215

22- ZIMMERMAN, G.,2007.Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Journal of Biocontrol Science Technology,17(6):553–596.

