عزل وتشخيص بعض المسببات الممرضة المصاحبة لعثة الطماطة *Tuta absoluta* Meyrik (Lepidoptera : Gelechiidae)

جهينة ادريس محمد علي وسهل كوكب الجميل وندى صبيح عثمان

قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل، موصل، العراق

الخلاصــة

تم عزل ثلاث مسببات مرضية بكتيرية تعود للجنس Bacillus من يرقات حشرة عثة الطماطة *Tuta absulata* و هي B. thuringiensis و B.cereus و *B. subtilis* وكانت البكتريا *Bacillus thuringiensis* اكثرها ضراوة و اعطى المعلق الجرثومي للبكتريا *B. thuringiensis* بالتركيز (12×10^6) خلية بكتيرية / مل اعلى نسبة قتل للحشرة بمعدل 90 % مقارنة بنوعي البكتريا *B. cereus* و *B. subtilis* عند ذات التركيز وبمعدل 78 و80 % على التوالي بعد 72 ساعة من المعاملة. وباختبار كفاءتها النسبية للقتل مع كل من مبيد السوبرسيرين ومنظم النمو الحشري ماتش، تبين ان منظم النمو الحشري اكثر كفاءة نسبية حيث بلغت 40,8% وذلك بعد 28 يوم من المعاملة تلاه المبيد سوبرسيرين والمعلق الجرثومي للبكتريا *B. thuringiensis* فبلغا 33.40 و 33.10 % على التوالي وقد بلغت نسب الاصابة بعد 28 يوم من المعاملة بالمبيد سوبرسيرين 3.558 يرقة/ ورقة نباتية تلاه 3.521 يرقة/ ورقة نباتية بالمعاملة في المعلق الجرثومي للبكتريا *Bacillus thuringiensis* .

الكلمات المفتاحية :
عزل ، تشخيص ، عثة الطماطة.

للمراسلة :
جهينة ادريس محمد علي
البريد الالكتروني:
Juhina1234@yahoo.com

Isolation and Identification of Entomopathogenic Bacteria Companion to Tomato Moth *Tuta absoluta* Meyrik

Juhaina I. M. Ali ; Sahil K. AL- jamil and Nada S. Othman
Plant protection Dept. - College of Agriculture and Forestry - Mosul University

ABSTRACT

Three bacterial pathogen isolated from Tomato leave borer Tuta absoluta . *Bacillus thuringiensis* isolates at conc.$(12 \times 10)^6$ bac. Cell / ml. give 90% mortality mean corrected compared with two isolates B. cereus and B. subtilisat the same conc. About (78. 80 %) respectively after 72 hours. From treatment . By test the efficiency of death about *B. thruingiensis* isolate compared with insecticide (supercyren) and insect growth regulator(match) after 28 days from treatment.
Results show that *B. thruingiensis* isolate at conc. (12×10^6) bact. Cell / ml. is the best at mean 40.8 % and super cyren , Match are(33.40, 33 .10 %) respectively. No significant different show at infected ratio of T. *absoluta* larvae after 28 days from treatment by *B. Thuringiensis* and *supercyren*.

Key words:
Isolation, Identification , Entomopathogenic Bacteria, Tomato Moth, *Tuta absoluta* Meyrik .

Correspondence:
Juhaina I. M. Ali
E-mail:
Juhina1234@yahoo.com

المقدمــة :

تعد حشرة عثة الطماطة *Tuta absoluta* افة خطيرة على الطماطة أضافة الى محاصيل خضر اخرى من العائلة الباذنجانية. وتسبب اليرقات أضرار بالغة في النباتات في الحقل والبيوت المحمية، إذ تحفر اليرقات باعمارها المختلفة الانفاق على السطحين العلوي والسفلي للورقة النباتية مما يعرقل عمليات التركيب الضوئي في الورقة فيؤثر سلبا على النبات عموما كما تهاجم اليرقات الثمار في المراحل الاولى من تكوينها مسببة انفاق عليها نتيجة التغذية اسفل بشرة الثمرة (OEPP ، 2005).

تكافح هذه الحشرة بالعديد من المبيدات الكيمائية مثل ذات المدى الواسع مثل methomyl (abroad - speetrum) بمقدار (0,5– 1) كغم / هكتار. كما استخدم المبيد الحيوي Dipel بمقدار 0.56 كغم / هكتار وقد اعطى نتائج فعالة في مكافحة هذه الحشرة في حقول الطماطة في كاليفورنيا (Johnson واخرون ، 1984) تباين تأثير المبيدات الحيوية على يرقات الافة بين 61.7 % لمستخلص النيم و100 % للمبيد الحيوي نيوترفيرت بعد 14 يوم من المعاملة (مفلح واخرون ،2011) وفي التسعينات استخدمت بعض عوامل المكافحة الحيوية من طفيليات ومفترسات والمسببات الممرضة تم تسجيل ثلاثة انواع من الطفيليات الخارجية على يرقات الحشرة في سوريا تتبع عائلتي Aphelinidae و Braconidae . كما سجل وجود سلالة ممرضة تتبع الجنس Bacillus .واثبتت المسببات المرضية انها تؤثر في هذه الحشرة إذ استخدم عامل المكافحة الحيوية البكتريا *Bacillus thuringiensis* Brin كمعلق بوغي وبتركيز 60×10^6 سبور / ملغم ضد العديد من ناخرات الاوراق ولفترة تزيد عن 30 سنة وثبت تخصصها للانواع الحشرية التابعة لرتبتي Lepidoptera و Diptera (Van Frankeuhuyzen ، 1993).

المواد وطرق البحث:

اجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم وقاية النبات – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل. وكذلك في البيوت البلاستيكية المزروعة بالطماطة والتابعة لدائرة زراعة نينوى (مركز المكافحة الحيوية). تم جمع الاطور المختلفة لعثة الطماطة *T. absoluta* من نباتات طماطة مصابة وربيت على نباتات الطماطة المزروعة في البيت البلاستيكي وتمت مراقبة الحشرات للتعرف على اعمارها اليرقية وسلوكها وتم مراعاة فحص المزرعة الحشرية لاجراء الاختبارات اللاحقة عليها.

1–**عزل المسببات المرضية:** جمعت اعداد من يرقات عثة الطماطة من البيوت البلاستيكية التابعة لكلية الزراعة والغابات والتي شوهدت عليها اعراض واصابات مختلفة ووضعت حشرة واحدة في كل انبوبة زجاجية داخل حاويات معقمة وجلبت الى المختبر. عقم الجسم الخارجي لليرقات المصابة بمحلول القاصر تركيز 2% وتم ختم فتحتي المخرج والفم بالشمع لمنع دخول البكتريا والتلوث بالاحياء المجهرية الاخرى، غطست في الكحول الاثيلي بتركيز 70% لمدة دقيقتين ثم نقلت الى محلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز 5.25% لمدة 3– 5 دقائق، غسلت اجسام الحشرات بالماء المقطر المعقم عدة مرات. ثم تم أخذ عينات من دم وسوائل اجسام الحشرات بالماء المقطر المعقم وزرعت في اطباق بتري معقمة حاوية على وسط الاكار المغذي حضنت على درجتي حرارة 25 – 37° م لمدة 24 – 72 ساعة. كما اخذت عينة من أنسجة الحشرات المصابة ووضعت في 2 مل من الماء المقطر المعقم وتم سحقها بواسطة قضيب زجاجي ومن ثم أخذت خزعة من هذا النسيج وزرعت بنفس الطريقة السابقة على وسط الاكار المغذي. نقيت المستعمرات البكتيرية باعادة زرعها على الاكار المغذي في أطباق وملاحظة شكل وحجم وقوام المستعمرات، كما تم عمل مسحات وصبغها بصبغة كرام وفحصها بالمجهر الضوئي.

كذلك تم التحري على القدرة الامراضية Pathogencity للعزلات المختلفة للتأكد من أنها السبب في أحداث الاعراض المرضية وطبقا لفرضيات كوخ. كذلك لوث طعام الحشرات السليمة بالبكتريا المرضية لمعرفة حدوث العلامات المرضية ذاتها من عدمها.

2– **تشخيص العزلات البكتيرية الممرضة للحشرات:** تم أجراء سلسة من الاختبارات الكيموحيوية لغرض تشخيص العزلات البكتيرية الى مستوى الجنس والنوع وبالاعتماد على موسوعة بيركي المقررة لتشخيص البكتريا (Holt واخرون ، 1994).

3– **تحضير المعلقات الجرثومية للعزلات:** تم أخذ مستعمرة نقية لكل عزلة من العزلات المختبرة وبعمر 7 أيام ووضعت في أنبوبة اختبار حاوية على 10 مل ماء مقطر معقم وتم تحضير تراكيز مختلفة من المعلق البكتيري حسب طريقة (Cantwell و George، 1974)، إذ تم أخذ 1 مل من المزيج اعلاه بواسطة ماصة معقمة واضيف الى 9 مل ماء مقطر معقم للحصول على التخفيف 10/1 ، ثم أخذ 1 مل منه وأضيف الى 9 مل ماء مقطر معقم ليصبح التخفيف 100/1 وصولا الى أقل تخفيف.

4- **تحضير وحساب التراكيز البكتيرية** : اذ اضيف 1 مل من كل تخفيف في طبق بتري معقم ثم صب عليه الاكار المغذي وحرك حركه محورية لتوزيع البكتريا ، تم عمل اربع مكررات لكل عزلة بكتيرية وحضنت على درجة حرارة 25 °م لمدة 24 – 48 ساعة، وبعد عد المستعمرات البكتيرية النامية في الاطباق تم الحصول على ثلاث تراكيز بكتيرية هي 12 و 30 و 75 $\times 10^6$ خلية بكتيرية / مل.

5- **أختبار كفاءة العزلات البكتيرية في قتل يرقات حشرة *T . absoluta* تحت ظروف الحقل:**

تم أختبار ثلاثة خطوط كل خط يحتوي على 40 نبات طماطة صنف بيرسون امريكي بعمر 45 يوم، أخذ منها 10 نباتات متقاربة في الكثافة النباتية عشوائيا وجرى تقدير شدة الاصابة فيها بحشرة عثة الطماطة وذلك بأخذ ثلاث أوراق نباتية في كل نبات وعد ما فيها من يرقات حية للحشرات داخل الانفاق وذلك قبل المكافحة بيوم واحد.

تم حساب نسبة الاصابة المئوية والتي تمثل عدد الاوراق المصابة في المجموع الكلي للاوراق المفحوصة.

أجريت المكافحة بأستخدام مرشة ظهرية سعة 20 لتر وتم تغطية النبات بالكامل بالمعلق الجرثومي، أخذت القراءات بعد 24 ساعة من المكافحة ثم بعد 7 و14 و28 يوم وذلك بحساب عدد اليرقات الميتة لكل ورقة نباتية (مكرر).

6- **أختبار كفاءة المبيدين سوبر سيرين super cyrenEc 50 مل/ لتر ومنظم النمو الحشري Match 50 Ec% مستحلب مركز لشركة سنجنتا Syngenta بتركيز 50 PPm** . إذ تم الرش بنفس الطريقة السابقة وبنفس العدد من المكررات والنباتات وبأستخدام المرشة الظهرية سعة 20 لتر.

اما معاملة المقارنة بالنسبة للجميع فاستخدم فيها الماء فقط في عملية الرش وبنفس الطريقة وبنفس العدد من المكررات.

حسبت الكفاءة النسبية للمبيدات بموجب معادلة Henderson & Telton (العادل وعبد ، 1983)

$$\% \text{ لفاعلية المبيد} = 100 - \frac{\text{عدد أفراد الافة بعد المعاملة} \times \text{عدد أفراد الافة في المقارنة قبل المعاملة}}{\text{عدد أفراد الافة قبل المعاملة} \times \text{عدد أفراد الافة في المقارنة بعد المعاملة}}$$

النتائج والمناقشة :

1-**تشخيص العزلات البكتيرية الممرضة:** في ضوء نتائج الاختبارات الكيموحيوية وبالرجوع الى المصادر العلمية امكن التعرف على جنس ونوع العزلات البكتيرية إذ يعود جميعها الى الجنس Bacillus وهي:

1- *B. thruingiensis*
2- *B. cereus*
3- *B. subtilis*

2- **وصف الاعراض المرضية على اليرقات المصابة:**

امتنعت اليرقات المصابة عن التغذية قبل يوم من ظهور اعراض المرض الواضحة عليها بعد ان صنعت ثقوب صغيرة على سطح الاوراق ثم بدأ عليها الخمول مع انتفاخ في الجسم ثم ظهرت على اليرقات اعراض المرض، إذ تحول اللون الى البني ولم تلاحظ اية حركات انفعالية ثم أصبح الجسم رخو القوام وحدث شلل في المعدة واصبحت منطقة البطن رقيقة مع خروج بعض السوائل البنية الداكنة اللون. وقد تباينت هذه الاعراض بالعزلات الثلاث اعلاه كما تباينت ضراوتها على الحشرة فالبكتريا *B. thruingiensis* سببت اعراض على اليرقات المصابة خلال 12 ساعة ثم تبعها شلل تام خلال 24 ساعة، اما بكتريا *B. cereus* فقد تغير لون الحشرات المصابة وماتت بعد 72 ساعة، في حين كانت اليرقات المصابة بالبكتريا *B. subtilis* قد امتنعت عن التغذية ثم السكون تحت الاوراق النباتية وحدث الشلل خلال 48 ساعة وهذه الاعراض المختلفة تباينت في ظهورها تبعاً لتأثير نمط فعل أنزيمي Hyduronidase و Phospholipase إذ سببا شلل في القناة الهضمية الوسطى وتسرب محتوياتها

الى الدم وموت اليرقة جوعاً مع انتشار المحتويات القلوية الى الدم ومؤدياً الى حدوث تسمم خلال فترات متباينة وهذا يتفق مع (محمد، 2003).

تشير النتائج في الجدول (1) الى تفوق المعاملة بالتركيز الثالث للمعلق البكتيري *B. thruingiensis* إذ اعطى اعلى نسبة قتل والتي بلغت 90 % من الحشرات المعاملة، فيما سجلت العزلتين الاخريتين *B. cereus* و *B. subtilis* 78 و 80 % على التوالي بالتركيز الثالث. كما أظهرت البكتريا *B. thruingiensis* تفوقها على بقية الانواع البكتيرية المعزولة.

تتفق هذه النتائج مع ما وجده (عبدالله والسماك، 2006) من أن عزلة البكتريا *B. truingiensis* استطاعت قتل 100 % من يرقات البعوض *Culex pipiens* خلال اليوم الاول من التحضير عند درجة حرارة المختبر 20 ± 3 °م. كذلك مع ما وجده (سليمان، 2006) من أن نوعي البكتريا *B. thruingiensis* و *B. macerance* بالتركيزين 1 × 10^3 و 1 × 10^6 بوغ / مول حققا نسبة قتل بلغت 90% ليرقات خنفساء الخابرا *Trogoderma granarium* مقارنة مع نسبة القتل 70% للمبيد Manco-Zeb عند ذات التركيزين.

الجدول (1): تأثير تركيز المعلق الجرثومي *B. thuringiensis* في يرقات عثة الطماطة بعد 72 ساعة من المعاملة.

المعلق الجرثومي / التركيز خلية بكتيرية / مل	% للقتل		
	B. cereus	*B. subtilis*	*B. thruingiensis*
10×12^6	26 جـ	24 جـ	30 جـ
10×30^6	48 ب	48 ب	46 ب
10×75^6	78 أ	80 أ	90 أ

المتوسطات التي تشترك بأحرف متشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب أختبار دنكن عند مستوى احتمال 0.05.

3–تأثير المبيدات (سوبرسيرين ومنظم النمو الحشري ماتش والمعلق البكتيري *B. thuringiensis*:

يبين الجدول (2) بأن المعاملة بالمبيدين اعلاه قد أعطى حماية للنبات إذ لم تتجاوز نسبة الاصابة في اليوم الاول 17.124 و 17.860 و 16.311 يرقة / ورقة نباتية، لكل من المبيد سوبرسيرين ومنظم النمو الحشري ماتش والمعلق الجرثومي للبكتريا *B. thuringiensis* واستمرت الحماية لغاية 28 يوم، إذ تفوق كل من مبيد سوبرسيرين والمعلق الجرثومي إذ بلغت نسبة الاصابة 3.588 و 3.521 يرقة / ورقة نباتية، تلاه منظم النمو ماتش إذ بلغت نسبة الاصابة بعد 28 يوم 6.091 يرقة / ورقة نباتية تلتها معاملة المقارنة 17.24 يرقة / ورقة نباتية.

تتفق نتائجنا مع ما وجده (خلدوز وجبري، 2009) في ايران عند مكافحة يرقات *Helicuverpa armigera* بجرعات مختلفة من البكتريا *B. thuringiensis* تحت الظروف المختبرية. وكذلك مع ما ذكره (محمد، 2000) في استخدامه ثلاثة أنواع من بكتريا الـ Bacillus لمكافحة دودة الشوندر السكري *Spodoptera exigua* .

الجدول (2): تأثير المبيدات (سوبرسيرين ومنظم النمو الحشري ماتش والمعلق الجرثومي) في مكافحة حشرة عثة الطماطة *T.absulata*.

المعاملة	نسبة الاصابة قبل المكافحة يرقة / ورقة نباتية	متوسط نسبة الاصابة بعد المعاملة			
		بعد واحد يوم	بعد 7 أيام	بعد 14 يوم	بعد 28 يوم
سوبرسيرين	17.124 أ	2.224 جـ	0.446 ب	0.264 جـ	3.558 جـ
منظم النمو الحشري ماتش	17.860 أ	2.250 جـ	0.264 ب	0.135 جـ	6.091 ب
المعلق الجرثومي	16.311 أ	8.158 ب	0.826 ب	1.290 ب	3.521 جـ
المقارنة	17.860 أ	12.33 أ	15.440 أ	17.11 أ	17.24 أ

المتوسطات التي تشترك بأحرف متشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا فيما بينها حسب أختبار دنكن عند مستوى احتمال 0.05.

كذلك نلاحظ من الجدول (3) الكفاءة النسبية للمبيدات سوبرسيرين ومنظم النمو الحشري ماتش والمعلق الجرثومي إذ تفوق المبيد سوبرسيرين تلاه منظم النمو الحشري ثم المعلق الجرثومي وبكفاءة نسبية 88.10 و 87.70 و 51.20 % وعلى التوالي خلال اليوم الاول من المعاملة. واستمرت كفاءة هذه المبيدات فبلغت بعد 28 يوم 40 % لمنظم النمو الحشري ماتش تلاه سوبرسيرين 33.4 % ثم المعلق الجرثومي 33.10 %.

واختلفت نتائجنا مع ما وجده (الملاح والطائي، 2011) إذ وجدا تباين في نسب القتل بين سلالات البكتريا *B. thuringiensis aegypti* و *B. thuringiensis alesti* و *B. thuringiensis kurstaki* والمبيدات Fastac و Medame و Runner عند استخدامها ضد يرقات العمر الثالث لدودة درنات البطاطا *Phthoremia operculella* وذلك بسبب اختلاف المبيدات المستخدمة.

الجدول (3): الكفاءة النسبية للمبيد (سوبرسيرين) ومنظم النمو الحشري ماتش والمعلق الجرثومي في مكافحة حشرة عثة الطماطة *T. absulata*.

المعاملة	الكفاءة النسبية للمبيدات بعد فترة			
	واحد يوم	7 أيام	14 يوم	28 يوم
سوبرسيرين	88.10	88.90	89.10	33.40
منظم النمو الحشري ماتش	87.70	76.50	72.20	40.80
المعلق الجرثومي	51.20	88.90	64.40	33.10
المقارنة	7.10	8.20	7.30	7.10

المصادر :

حسني، محمد محمود، محمود عبد الحليم عاصم والسيد عبد النبي نصر (1976). الافات الزراعية والحشرية والحيوانية. الطبعة الثانية، دار المعارف بمصر 1074 ص.

خلدوز، جلال ومحمد ابراهيم جبري (2009). معدلات موت يرقات *Helicoverpa armigera* بجرعات مختلفة من البكتريا *B. thruingiensis* تحت الظروف المختبرية، المؤتمر العاشر لجمعية وقاية النبات العربية، بيروت، 2009.

سليمان، سراب داؤد وخالدة عبدالله سليمان (2006). التأثير الحيوي لبعض أنواع البكتريا Bacillus في يرقات خنفساء الخابرا *Trogoderma granarium* . المؤتمر التاسع لجمعية وقاية النبات العربية، دمشق، 2006.

العادل، خالد ومولود كامل عبد (1983). المبيدات الكيماوية في وقاية النبات. مطبعة جامعة الموصل ، 430 ص.

عبدالله، باسمة أحمد واسراء غانم السماك (2006). المكافحة الاحيائية ليرقات بعوض كيولكس من نوع *Culex pipsens* بواسطة بعض سلالات النوعين *B. thruingiensis* و *B. sphaericus* ، المؤتمر التاسع لجمعية وقاية النبات العربية، دمشق، 2006.

محمد، جهينة ادريس (2003). تحديد التركيز المناسب من البكتريا *Bacillus sphericus* في مكافحة يرقات دودة قرنات اللوبيا. مجلة تكريت للعلوم الزراعية العدد (7) المجلد (3).

مفلح ، ماجدة ،حنان حبق ، فاضل القيم ، رفيق عبود، عمر حمدي، لينا عدرا و محمد احمد (2011). الوضع الراهن لعثة البندورة *Tuta absoluta* في المنطقة الساحلية من سوريا. المؤتمر الثاني للادارة المتكاملة للافات الزراعية 26 –28 نيسان 2011 كلية الزراعة – جامعة تشرين.

الملاح، نزار وفائز عبد الشهيد الطائي (2011). التكامل في فاعلية بعض المبيدات الكيماوية والميكروبية ومخاليطها في دودة درنات البطاطا، المؤتمر الثاني للادارة المتكاملة للافات الزراعية 26– 28 نيسان، 2011، اللاذقية، سوريا.

Avrdc, (1982).Vegetable pest control insecticide evalution test.Asian Vegetable research and Development Center.

Kfir, R, (1994). Attempts at biological control of the stem borer *chilo partellus*. (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in Sauth Africa. African Entomology, 2 (1): 7 – 68.

Lacey,L. A (1999). Progress in the development and use of *Bacillus sphaericus* for pest control. Inver.Pathol., 7- 14. P. 460 – 465.

Lacey,L. A and Harper, J. D. (1999). Microbial control and integrated pest management. J. Entomol Sci., 21 (3): 206 – 213.

OEPP \ EPPO. (2005*).* European and Mediterranean Plant Protection Organization *Tuta absluta* balletin OEPP \ EPPO Bulletin., 35: 434 – 435.

Singer, S. (1998). The biotechnology for Strains of *Bacillus sphaericus* to control potential Against Certain (Ades, Anophels, Spodoptera) Species. Soc. Invert Pathol., 10 (6): 485 – 489.

Van Frankenhuyzen, (1993). The challenge *of Bacillus thuringensis.* Oxford England. Wiley & Sons, New York. Chapter 1 P. 1- 35.