

دراسة إمكانية استخدام المبيد الحيوي Thurine W.P باختباره على حشرة خنفساء الخابرا *Trogoderma granarium*

بسعاد عبد زيد جبار عبادي سينا جاسم
كلية العلوم - جامعة الكوفة كلية التربية - جامعة الكوفة كلية الطب البيطري - جامعة القادسية

الخلاصة

تضمن هذا البحث إمكانية استخدام المبيد الحيوي Thurine W.P. المتكون من كربونات الكالسيوم كمادة حاملة ولفاح البكتريا *Bacillus thuringiensis* بهدف مكافحة حشرة خنفساء الخابرا *T. granarium* إضافة إلى دراسة بعض الصفات التشخيصية للبكتريا .

وقد أظهرت نتائج التقييم ألامختبري للمبيد الحيوي كفاءته الجيدة في السيطرة على المراحل المختلفة لنمو حشرة خنفساء الخابرا. إذ سبب هلاكا في البيوض بلغ (65.4%) في التركيز (15غم/لتر) مقارنة بـ(12.9%) في معاملة السيطرة وبعد أسبوع من المعاملة. وكان الطور اليرقي الأول أكثر الأطوار حساسية للمبيد الحيوي إذ بلغت نسبة الهلاك (62%) في التركيز (15غم/لتر) وبعد خمسة أيام من المعاملة، في حين اظهر الطور اليرقي الخامس حساسية اقل متمثلا بانخفاض نسبة الهلاك إلى (45.3%). كما ازدادت نسب هلاك العذارى من (5.3%) في معاملة السيطرة إلى (50.7%) في التركيز (15غم/لتر) من المبيد الحيوي وبعد أسبوع من المعاملة. كما ارتفعت نسب هلاك البالغات من (5.7%) في معاملة السيطرة إلى (51.4%) في التركيز (15غم/لتر) من المبيد الحيوي وبعد خمسة أيام من المعاملة.

Abstract

This research includes the possibility of using bio-cidal Thurin w.p which content from calicim carbonate as a carrier and inoculum's of bacteria *Bacillus thuringiensis* to control the Khapra beetle *T. granarium* as well as study of some caracstric dignosis to this bacteria. The results of the laborcetory evaluation referred to god efficiency of the bio-cidal in controlthe different stages for the Khapra beetle growth ,it's caused eggs mortality 65.4% at the con centration 15g/l ,compareelwith12.9%in the control treatment after week from the treatment. The first larval instar was more sensitive to the bio-cidal, mortality rate reached to 62%at the concentration 15 g/l, after 5 days from the treatment ,while the fifth larval instar reduced to45.3% pupal mortality rate increasecl from 5.3%inthe control treatment to 50.7%at the concentration 15g/l ,of the bio-cidal after week from the treatment . Adult mortality rate increased from 5.7% in the control treatment to 51.4% at the concentration 15g/l ,of the bio-cidal after 5 days from the treatment .

المقدمة

تعد الآفات الزراعية ذات تأثير مباشر من خلال تغذيتها على مختلف أجزاء النباتات وبجميع مراحل نموها فضلا عن ما تخلفه من مخلفات انسلاخ وبراز ونقل للمبيدات المرضية ،كلها أضرار تسبب خفض المحاصيل المختلفة ونوعيتها . (الحيدري والمصلح، 1989). وتشكل المكافحة الكيميائية الأسلوب الأكثر شيوعا في مكافحة الحشرات الضارة ومع ذلك صاحب استعمالها عدد من المشكلات تمثلت بظهور سلالات مقاومة لفعل المبيدات ،وبالتالي البحث عن مركبات كيميائية بديلة وسببت عبئ مادي كبير إضافة إلى الأضرار البيئية الكبيرة الناتجة عن استعمال المبيدات الكيميائية، هذه الأسباب جعلت التفكير يتوجه نحو استعمال الأساليب البيولوجية أو الحيوية من خلال الاستفادة من الكائنات الحية كالطفيليات والميكروبات المختلفة في السيطرة على الحشرات لما لها من مردود في مجال المكافحة وخفض مستويات التلوث بالمواد الكيميائية (Dipietro وآخرون ، 1993).

ومن العوامل الحيوية المستعملة بعض أنواع البكتريا التي تعد من أهم عناصر المكافحة الحيوية لما تمتاز به من سرعة في نموها وتكاثرها وقدرتها على استعمال مختلف المصادر الغذائية في النمو . (السعد، 1990). وقد استعملت بكتريا *B. thuringiensis* في المكافحة الإحيائية ،حيث إن هذه البكتريا لا تنتج مواد سامة للنبات ،ولا تحدث تأثيرات سلبية في الوسط البيئي ،وليس لها قدرة تطفلية على الإنسان والحيوان . (الزيدي، 1992).

يعزى هلاك الحشرات المصابة بالبكتريا *B.thuringiensis* إلى قدرت هذه البكتريا على إنتاج أنواع مختلفة من السموم منها السم الخارجي - ألفا (Alpha- exotoxin) أو ما يعرف بـ (Lecithenase) وهذا السم له القابلية على تكسير المواد العضوية مثل المواد المكونة للبروتينات الدهنية. إذ يعمل على الأصرة الأيونية الرابطة بين ذرة الكربون الثالثة C3 للكلسيرول ومجموعة جذر الفوسفات منتجا فسفوركولين مع الكلسيرول الثنائي. أما السم الخارجي بيتا (Beta-exotoxin) يعمل على منع اليرقات المتحسسة من التطور إلى طور العذراء كما يحدث تغييرات خلقية وفسلجية وتهلك أثناء الانسلاخ والتعذر، مما يدل على احتمال تداخله مع الهرمونات المسؤولة عن هذه التطورات. (Lüthy، 1980).

ويعد تكوين البلورة (اسلم الداخلي - دلتا Delta-endotoxin) أهم الفعاليات الايضية المميزة للبكتريا *B.thuringiensis* والبلورة تشغل فراغا محددا من الخلية كثيرا ما يكون بجانب السبور وقد يزداد عددها ضمن الخلية الواحدة ليصل إلى ثلاث بلورات، تتحرر من جدار الخلية البكتيرية مع السبور عند تحلل الخلية الأم وتبقى مدة طويلة جدا. (Lizuka، 1983). إن أول ما يحدث للبلورات في داخل القناة الهضمية للحشرات هو إذابتها جزئيا بفعل ارتفاع الرقم الهيدروجيني المحيط بها (وهذا ما يجعل بكتريا *B.thuringiensis* تؤثر على الحشرات دون غيرها من الحيوانات بسبب ملائمة الرقم الهيدروجيني لإذابة هذا النوع من السموم) حيث إن تأثيرات البلورة البروتينية على القناة الهضمية تكاد تكون ثابتة في جميع اليرقات على الرغم من تنوع وتعدد عوائلها، إذ يكون الغشاء الطلائي أول موقع للفعل المدمر، مما يؤدي إلى حدوث تغييرات نسجية واضحة. وإن الزغابات (microvili) هي أول العضيات التي تتحطم نسيجيا، ثم تنتفخ (بهئية فقاقيع) التراكيب الليفية الدقيقة على طول القناة المعوية، وتشمل هذه الانتفاخات الأغشية مابين الخلايا العمودية أيضا ومن جانب آخر تكون الإعراض الخارجية واضحة من خلال توقف اليرقات عن التغذية، وشلل في الجزء العلوي من البلعوم والقناة الهضمية، ويستمر حتى الشلل الكامل، ثم اسوداد اليرقات والموت بعد يوم واحد إلى ثلاثة أيام. (Lüthy، 1980). إن التأثيرات الخلوية التي يحدثها السم المتكون من إذابة البلورة يحفز انتفاخ خلايا الغشاء الطلائي، وتغيير طبيعة وعمل الشبكة الاندوبلازمية الخشنة والميتوكوندريا فيها، معرقل بذلك عملية انتقال الايونات وسكر الكلوكوز والتقاط الأوكسجين في ما بينها، فضلا عن فقدان مركب (ATP) منها، يصاحب ذلك انفصال خلايا المعوي الوسطي عن الغشاء القاعدي، وانفجار الخلايا المنفصلة منه في داخل تجويف المعوي.

تؤدي هذه التغييرات النسيجية واختلال الوظائف إلى عدم انتظام انتقال الايونات وتغيير الرقم الهيدروجيني في سوائل (Haemolymph) نفسه، فضلا عن شلل كامل في الجسم ثم الموت المحقق. (Aronson، 1986). أما بالنسبة لحشرة خنفساء الخابرا فهي من الحشرات التي تتكون خارج الحبوب حيث تتغذى على أجزاء الحبوب المتكسرة وأجنة وغبار الحبوب المتكون في المخازن والطحين وغيرها من منتجات الحبوب وعادة توضع البيوض بين الحبوب أو منتجاتها حيث تنفس عن يرقات واضحة تتحرك بين الخزين. لإكمال دورة حياتها كحشرة بالغة. (السعيد، 1983).

المواد وطرائق العمل

التجارب المختبرية: نفذت التجارب المختبرية في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم علوم الحياة - جامعة الكوفة .

تم الحصول على عزلة مشخصة من البكتريا *B.thuringiensis* من مختبر الأحياء المجهرية في قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الكوفة استخدمت كمييد حيوي Thurine W.P (عبود، 2005) ولغرض تأكيد التشخيص تم تحضير وسط Nutrient agar وبعد تعقيمه وتبريده لقتح الأطباق بعزلة البكتريا بطريقة (Streak method) ومن ثم حضنت في درجة حرارة (35)م لمدة (24) ساعة وسجلت الصفات المظهرية لمستعمرات البكتريا وأبعادها وألوانها. أعقبها دراسة الصفات الميكروسكوبية بعد تصبغها بصبغة كرام وتمثلت هذه الصفات بأشكال وتجمعات خلايا البكتريا وملاحظة موقع السبور وأبعاد الخلايا. وخضعت عزلة البكتريا للاختبارات الكيموحيوية وذلك باستخدام تقنية 20 api.

حيث ظهرت مستعمرات بكتريا *B.thuringiensis* على الوسط ألزري (Nutrient agar) على هيئة مستعمرات دائرية وغير منتظمة الشكل وذات لون اصفر باهت إلى ابيض، دهنية القوام كما إن حوافها متموجة وبلغ معدل قطر المستعمرة (0.7-1.5) ملم. والمستعمرات تكون كتلا غير قابلة للتفكك بسهولة أثناء فترة حضنها على وسط المرق المغذي (Nutrient broth) المحضون بدون اهتزاز. (Monora، 1961).

كما بين الفحص ألمختبري لعزلة من البكتريا إن خلاياها عصيات موجبة لصبغة كرام، مستقيمة وتكون بشكل سلسلة قصيرة لا يتجاوز عدد الخلايا في السلسلة عن (5) خلايا بالإضافة إلى خلايا ثنائية ومفردة والبكتريا كونت سبورات في موقع شبه نهائي (Sub terminal)، ولها القابلية على الحركة، ومكونة للسبورات يبلغ قطر خلاياها بين 1 و 1.2 مايكرو متر وطول خلاياها بين 3 و 5 مايكرو متر. (Monora، 1961). اما نتائج الفحوصات البايوكيميائية فهي مطابقة لما ذكره Monora (1961).

اما فيما يخص الحشرة المدروسة فتم الحصول على عينة مشخصة من حبوب حنطة مصابة بحشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) *T.granarium*، من مختبر الدراسات العليا - كلية الزراعة جامعة بغداد. وتم تربيتها في مختبر أبحاث علم الحيوان - قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الكوفة. وعملت مستعمرة دائمة لها في المختبر، وذلك بوضع الحشرات مع بذور الحنطة داخل أوعية زجاجية أقطارها 12 سم وارتفاعها 20 سم، غطيت الفوهات بقماش المللم، واحكم سده بواسطة أحزمة مطاطية، بعدها وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة (30) م. كانت المزرعة تراقب وتجدد بعد كل جيل. تم تأكيد تشخيص الحشرة في متحف التاريخ الطبيعي - جامعة بغداد.

وللحصول على بيوض الحشرة في يوم واحد وبكميات كافية، أخذت مجاميع من الحشرات البالغة الحديثة الظهور، وضعت داخل أطباق بتري قطر 9 سم وارتفاع 1.5 سم مثقوبة الغطاء العلوي ومغطاة بقماش المللم، وضع داخل كل طبق قطعة قماش سوداء خشنة لغرض وقوف الحشرات عليها وعدم تأثر البيض بعد الوضع، أخذت عشرين بيضة بعمر يوم واحد / مكرر، ورشت بتراكيز 5، 10، 15 غم / لتر، بواسطة مرشة يدوية سعة 50 مل وبواقع 1 مل لكل طبق، وبواقع 3 مكررات لكل تركيز، أما معاملة السيطرة رشت بمحلول المادة الحاملة وبمعدل 1 مل / مكرر حضنت جميع الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (30) م، سجلت نسبة الهلاك بعد أسبوع من المعاملة.

كذلك تم معاملة الأطوار اليرقية المختلفة لحشرة الخابرا، من خلال الحصول على الطور اليرقي الأول بعد فقس البيوض مباشرة في حين تم الحصول على الأطوار اليرقية الأخرى بعد الانسلاخ للطور الذي سبقه. حضرت أطباق بتري وضع فيها 6 غم حنطة سليمة، نقلت 20 يرقة من كل طور على حدة وبواقع 3 مكررات لكل تركيز رشت وحضنت بنفس الأسلوب أعلاه سجلت نسبة الهلاك في الأطوار اليرقية المختلفة بعد 5 أيام من المعاملة.

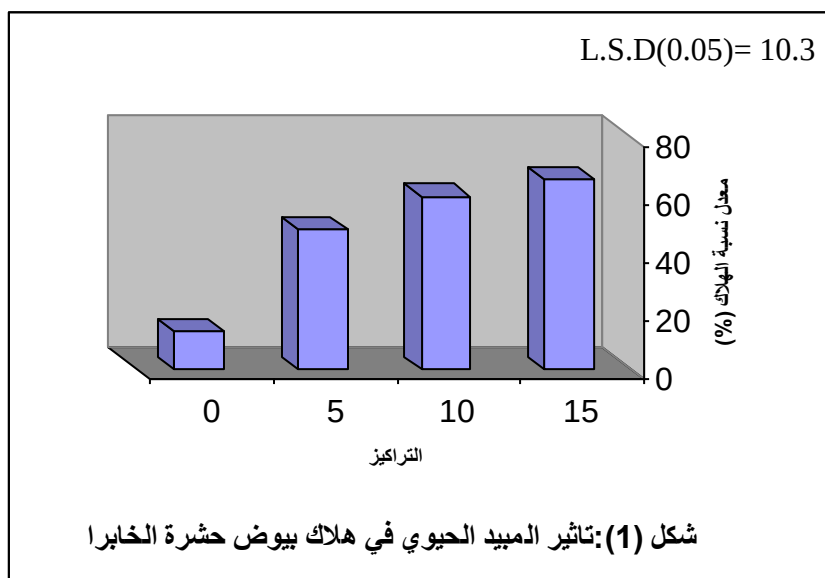
كما تم نقل العذارى الحديثة العمر بواقع 20 لكل طبق وبواقع 3 مكررات لكل تركيز في أطباق بتري ،فضلا عن معاملة السيطرة .رشت وحضنت بنفس الأسلوب السابق ،سجلت نسبة الهلاك بعد أسبوع من المعاملة

في حين تم الحصول على بالغات الحشرة بعمر يوم واحد من خلال نقل عذارى متقدمة في العمر ،إذ أخذت 20 بالغة لكل تركيز وبواقع 3مكررات لكل تركيز فضلا عن معاملة السيطرة ،وضعت في أطباق بتري تحتوي على 6 غم حنطة سليمة ،رشت وحضنت بنفس الأسلوب السابق ،سجلت نسبة الهلاك بعد 15 أيام من المعاملة .

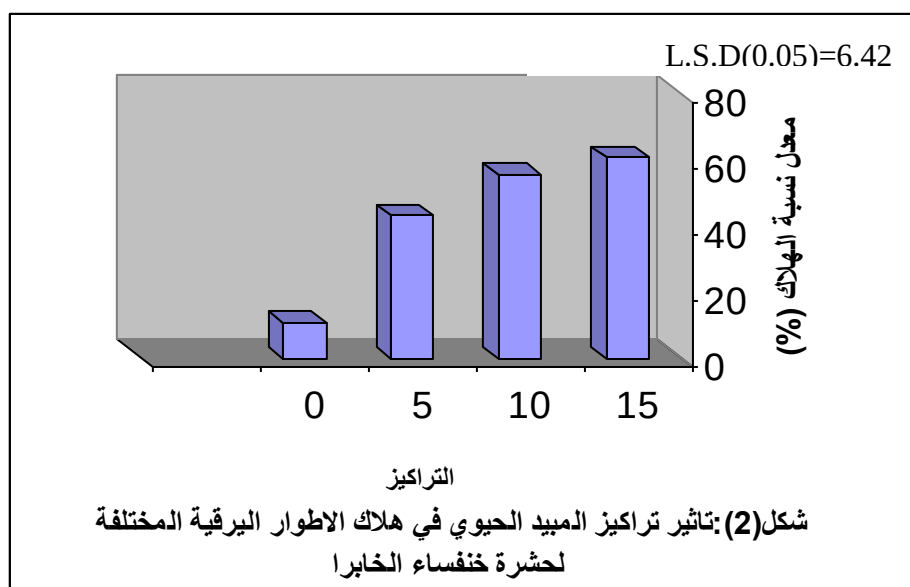
وقد دلت التجارب المختبرية بكونها تجارب كاملة على وفق التصميم العشوائي الكامل (C.R.D). واختبرت النتائج باستعمال اقل فرق معنوي (L.S.D) وعند مستوى احتمال (0.05)،(الراوي ،خلف الله،1980).

النتائج والمناقشة

يتضح من الشكل (1) إن المبيد الحيوي قد اثر وبشكل معنوي على هلاك بيوض حشرة خنفساء الخابرا ،فضلا عن وجود علاقة طردية في زيادة معدل نسب الهلاك بزيادة تراكيز المبيد الحيوي ،إذ بلغت أقصاها عند تراكيز 15غم/لتر وكانت 65.4 وبفارق معنوي عن التراكيز الأخرى،في حين بلغت 12.9 في معاملة السيطرة .وقد يعود سبب فعالية المبيد الحيوي إلى قدرة البكتريا على النمو تحت ظروف المختبر والتأثير على نمو وتطور البيضة (الحدراوي،2000).

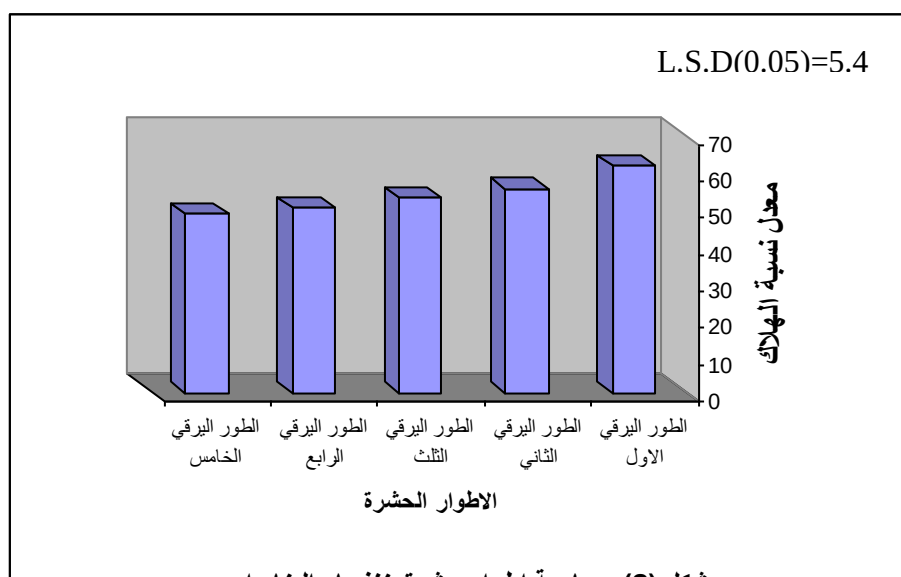


أوضحت النتائج الواردة في شكل (2) إن تراكيز (15)غم مبيد حيوي /لتر ماء قد سبب أعلى نسبة هلاك لأطوار الحشرة ،حيث بلغت 60.8% ويتفوق معنوي على جميع التراكيز الأخرى فعالية جيدة في مكافحة الحشرة،مقارنة بمعاملة السيطرة (تركيز صفر) والبالغة 10.88. من هذا يتضح إن للتركيز دورا مهما في زيادة النسب المئوية للهلاك حيث وجد إن هناك علاقة طردية ما بين تركيز الالبواغ ونسب الهلاك حيث كلما ازداد التركيز ازداد معدل هلاك الحشرة ،وهذا يعود إلى زيادة الوحدات الفعالة من البكتريا (السبورات) بزيادة المبيد الحيوي المستعمل (الربيعي وجماعته ،1997) وهذه النتيجة تتفق مع Barker (1999) الذي أشار إلى إن نسبة الهلاك للحشرات ضعيفة في التراكيز ألقيله ثم تتجه للتضاعف بزيادة التراكيز البو غية المستعملة .



يتضح من النتائج المبينة في شكل (3) أن المبيد الحيوي اثر على جميع أطوار الحشرة حيث سبب نسب هلاك تراوحت بين 48.89-62%. كان الطور اليرقي الأول أكثر تأثراً بالمبيد من بقية الأطوار الأخرى، في حين أبدا الطور اليرقي الخامس مقاومة أعلى للمبيد متمثلاً بانخفاض نسبة الهلاك إلى 48.89%. ويمكن تفسير الحساسية العالية للطور اليرقي الأول هو نتيجة امتلاكه جدار كائتي رقيق يسهل على البكتريا اختراقه وإحداث أضرار به مقارنة بجدار الحشرة ألبالغه الذي يكون أكثر سمكا.

وقد أكدت هذه النتيجة عبود (2005) حيث ذكرت إن حشرة من الخوخ الأخضر أظهرت علاقة عكسية بين نسب الهلاك وتقدم عمر الحشرة عند معاملتها بالمبيد الحيوي Thurine W.P وقد أكدت هذه النتيجة Singer ، Lacey (1982) إذ ذكرت إن الطورين ألهوري الأول والثاني لحشرة المن أكثر تأثراً من الأطوار الأخرى عند معاملتها بلفاح البكتريا *B.thuringiensis*.



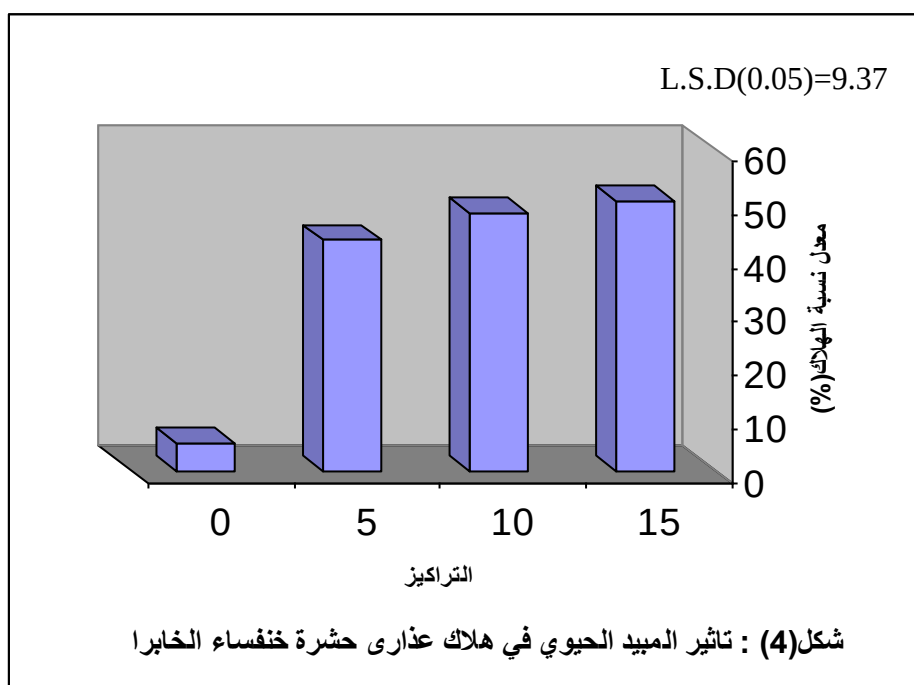
وكان للتداخل بين التراكيز والأطوار تأثيرات متباينة في معدلات نسب الهلاك. فالتركيز 15 غم /لتر كان أكثر تأثير في الطور اليرقي الأول مقارنة ببقية الأطوار ،حيث سبب نسب هلاك وصلت إلى 68.8% وبفارق معنوي عن بقية المعاملات ،بينما كانت اقل نسبة هلاك عند التراكيز 5 غم مبيد حيوي /لتر ماء ،ضد الطور اليرقي الخامس وبلغت 38.93%. حيث كان للتركيز العالية من المبيد الحيوي وتداخلها مع الأطوار اليرقية المبكرة اثر كبير في زيادة معدلات نسب الهلاك مقارنة ببقية المعاملات الأخرى (جدول 2). ومن هذه النتائج نستنتج بان لتداخل التركيز (15 و10) غم مبيد حيوي /لتر ماء والأطوار اليرقية المبكرة (الأول والثاني) دورا مهما في زيادة كفاءة المبيد الحيوي المستعمل ضد الحشرة وهذا يماثل ما ذكره Lacey (1997).

جدول (2): تأثير التداخل بين تراكيز المبيد الحيوي والأطوار اليرقية في معدلات نسب الهلاك

التركيز غم/لتر	النسب المئوية للهلاك (%)				
	الطور اليرقي الأول	الطور اليرقي الثاني	الطور اليرقي الثالث	الطور اليرقي الرابع	الطور اليرقي الخامس
0	10.8	8.3	8.3	0	0
5	53.27	50.5	43.53	41.26	35.3
10	56.81	53.24	51.35	48.2	43.32
15	68.8	65.26	59.86	52.28	48.39

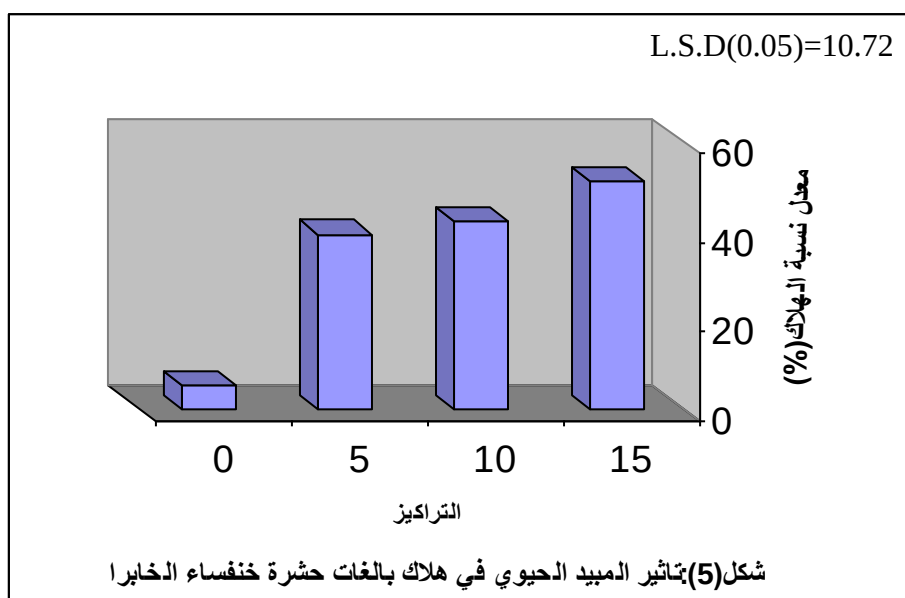
L.S.D(0.05)=8.5

تشير نتائج التحليل الإحصائي (شكل 4) إلى وجود تأثير معنوي للمبيد الحيوي في قابليته لإحداث أضرار لعذارى حشرة خنفساء الخابرا تحت ظروف المختبر إذ بلغت نسب الهلاك (50.7، 48.4، 43.37) عند التركيز (5، 10، 15) على التوالي ، مقارنة ب(5.3) لمعاملة السيطرة. هذه النتيجة تقارب ما ذكره الحد راوي (2000) بان معاملة عذارى حفار ساق الذرة. *Sesamia creticaled* بعمر (1-2) يوم بعالق مائي لاربوغ الفطر *B.bassiana* بتركيز 6 بوغ /مل سبب نسبة هلاك بلغت 89.16 بعد 15 يوم من المعاملة.



من خلال استعراض نتائج هذه التجربة المبينة في الشكل (5) يتضح إن المبيد الحيوي اثبت كفاءة جيدة في مكافحة بالغات حشرة خنفساء الخابرا إذ سبب نسبة هلاك بلغت 51.4% عند التركيز 15 غم مبيد حيوي/لتر ماء، مقارنة بـ 5.7% عند معاملة السيطرة. هذه النتيجة تؤكد كفاءة المبيد الحيوي المنتج في مكافحة الحشرة المختبرة، شكل(5).

ويبدو إن تأثير هذا المبيد الحيوي لا يقتصر على التأثيرات المرضية للبكتريا فقط وإنما يتعداه إلى المادة الحاملة حيث إن مادة الكربونات الداخلة بكونها مادة حاملة للمبيد قد يتسبب عنها غلق الفتحات التنفسية ومن ثم اختناقها وموتها أو انه يتسبب في ضعف الحشرة وهذا يساعد البكتريا على حدوث ألامصابه (الريبيعي وآخرون، 1997).



المصادر

- الحدراوي، عادل أمين طه. 2000. دراسة مختبرية وحقلية في تأثير الفطر *Beauveria bassiana* Entomopathogenic Fungi على حفار ساق الذرة *Iesamia cretice* Led (Lepidoptera: phalaenidae) رسالة ماجستير. كلية الزراعة-جامعة بغداد. 66 صفحة.
- الحيدري، نظام كاظم عبد الأمير ورشيد محجوب المصلح. 1989. الأحياء المجهرية الصناعية. مطابع التعليم العالي في الموصل، 688 صفحة.
- الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله. 2000. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر -جامعة الموصل. الطبعة الثانية. 488 صفحة .

- الربيعي، حسين فاضل وجبار فرحان المعاضدي و لؤي غازي سليم. 1997. تأثير المستحضرات المختبرية والتجارية لبكتريا *Bacillus thuringiensis* على نسب إصابة التمر بحشرة الحميرة *Batracheder amydraula*. مجلة العلوم الزراعية العراقية 28(2):193-196.
- الزبيدي، حمزة كاظم. 1992. المقاومة الحيوية للآفات. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل 440 صفحة.
- السعد، مها رؤوف. 1990. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. دار الكتب للطباعة والنشر -جامعة الموصل. الطبعة الثانية. 400. صفحة .
- السعيد، محمد عبد. 1983. تكنولوجيا الحبوب. مديرية مطبعة جامعة الموصل. 200 صفحة.
- عبود، بسعاد عبد زيد. 2005. دراسة إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus thuringiensis* لمقاومة حشرة من الخوخ الاخضر .
- Aronson, A.I., Beckman, W., and Unn, P. (1986). *B. thuringiensis* and related insect pathogen. Microbiol. 5(1): 24. Amer. Socie. Microbiol.
- Barker, J.F. 1999. Labortary evaluation of the pathogenecity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Larvae of the banded sunflower Moth *cochylys hospes*. Gt. Lakes Entomol. 32(3): 101-106.
- Dipietro, A.; Lorilo, M.; Hayesc, K.; Broadway, R.M. and Harman G.E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium Vireus*: isolation, Characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin-phytopathology. 83(3): 308-313.
- Lacey, L.A. and Singer, S. (1982). Larvicidal activity of new isolates of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* (H-14) against *anopheline culicine* mosquitoes. mosq. News. 42, 537-543.
- Lacey, L.A. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Academic press. Santiago. C.A. 409 PP.
- Lizuka, T. & Yamamoto, T. (1983). Two of entomociddal toxins in the parasporal crystals of *B. thuringiensis* var *kuristaki*. Archives of Biochem. and Biophy. Vol. 227(1): 233-241.
- Monora, R.E. (1961). protein turnover and formation of protein inclusion during spovulation of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J. 81: 225-232.