

## دراسة تأثير الفطر *Beauveria bassiana* كمبيد احيائي لبالغات طفيلي القراد الصلب *Boophilus microplus*

عزالدين عطية البيار\* حسام الدين عبدالله محمد\*\* سعاد شلال شحاذه\*

\*كلية العلوم - جامعة الانبار

\*\*كلية الزراعة - جامعة بغداد

E- mail:edu\_sci@yahoo.com

الكلمات المفتاحية: تأثير، *Beauveria bassiana*، بالغات، طفيلي، *Boophilus microplus*

تاريخ القبول: 10 / 6 / 2013

تاريخ الاستلام: 26 / 11 / 2012

### المستخلص:

نفذت هذه الدراسة لمعرفة تأثير فطر *Beauveria bassiana* في بالغات (ذكور واناث) طفيلي القراد الصلب *Boophilus microplus* اظهرت نتائج الدراسة ان ذكور واناث القراد حساسة لتخافيف الفطر (10-3.7×6 و 10-3.7×8 و 10-3.7×4) بوغ. مل<sup>-1</sup>، وكانت نسبة الهلاكات تتناسب عكسيا مع التخفيف المستخدم. اذ بعد (5-6) ايام من التعريض كانت نسبة الهلاكات بالنسبة للذكور (100%، 93.33%، 76.66%) على التوالي، اما بالنسبة للاناث فبلغت نسبة الهلاكات (100%، 90%، 83.33%) على التوالي لكل من التخافيف سابقة الذكر وقد سجلت اعلى نسبة للتشوهات المظهرية لكل من الذكور والاناث عند المعاملة بالتخفيف (10-3.7×4) بوغ. مل<sup>-1</sup>.

## STUDY OF THE EFFECT OF FUNGI *BEAUVERIA BASSIANA* ON THE ADULTS OF A HARD TICKES *BOOPHILUS MICROPLUS*

Ezeddin A. Albayyar\*

Hussamaldeen A . Mohammed\*\*

Suad Shallal Shahatha\*

\*Al-Anbar University - college.of Sciences .

\*\*Baghdad University -college.of Agri.

E- mail:edu\_sci@yahoo.com

Key words: effect, *Beauveria bassiana*, Adults, Parasite, *Boophilus microplus* .

Received: 26 / 11 / 2012

accepted: 10 / 6 / 2013

### ABSTRACT:

This study was conducted to understand the effects of fungi *Beauveria bassiana* on the adults of a hard ticks *Boophilus microplus*. The study shows, that both females and males of hard ticks are significantly sensitive to the fungi's dilutions ( 10-4×3.7 (3.7×8\_10 و 3.7×6-10 و spores.ml<sup>-1</sup>. The mortality rate was inversely correlated to that used dilutions. After five to six days of exposure ,male`s mortality rates were 100% ,93.33% , 76.66% where the female`s mortality rates were 100% ,90% ,83.33% for each dilutions. The highest abnormal features for both sex were occurred at the dilution 10-4×3.7 spores.ml<sup>-1</sup>.

للقضاء على هذه الآفات وذلك باستعمال الفطريات والبكتريا والفيروسات والنيما تودا (Hazir وآخرون، 2004). تم تشخيص اكثر من 700 نوع من الفطريات الممرضة للحشرات والطفيليات (Douglas وآخرون، 2005)، ومنها فطر *Beauveria bassiana* الذي يسبب مرض المسكردين الابيض white muscardin لمضائفه (Shah وآخرون، 2007). قام العديد من الباحثين باستخدام هذا الفطر في مكافحة الاحيائية لأنواع القراد، ومنهم (Monterio وآخرون، 2003). وصلت نسبة هلاك بالغات القراد المتطفة على الابقار الى 100% عند معاملتها بتركيز مختلفة للفطر. ووجد Leemon وآخرون (2008) ان تركيز المعلق

### المقدمة:

يعد القراد من اهم الطفيليات الخارجية التي تتطفل على عوائل حيوانية مختلفة وتقوم بامتصاص الدم منها، ولا يقتصر التطفل على القراد البالغ وانما تقوم به الاطوار اليرقية والحورية ايضا (Marguart وآخرون، 2000). من المشاكل الرئيسية التي طالما هددت الثروة الحيوانية هي الامراض الطفيلية ومنها الطفيليات الخارجية التي يعد القراد اهمها لما يسببه من اعراض خطيره على العائل ومنها حمى القراد وفقدان الشهية وقلة انتاج الحليب واللحوم والهزال (Willdsen , P. and Jongejan ,F 1999). اعتمدت مكافحة الاحيائية

وحفظت الانابيب في الثلجة على درجة حرارة (4) م لحين الاستعمال (Lacey, 1997).

### حساب عدد ابواغ الفطر *B.bassiana*:

تم حساب عدد السبورات في المعلق الفطري الاساس (stock) وفقا لما جاء في (Norris واخرون، 1999) باستعمال شريحة عد خلايا الدم Haemocytometer وذلك بوضع قطره بحجم 0.1 ملتر على هذه الشريحة من المعلق الفطري (stock) ووضع غطاء الشريحة وحساب عدد السبورات في المربعات الخمسة بالمجهر الضوئي الكهربائي على قوة  $\times 40$  وبحسب المعادلة التالية:

$$\text{Number of spores} = N / 80 \times 610 \times 10$$

اذ ان N عدد السبورات التي تم عدّها في المربعات الخمسة

80 مجموع المربعات الدقيقة في مربعات العد الخمسة

610 معامل تصحيح التخفيف

10 معامل تصحيح الحجم

وتم تعديل العد للتخفيف الاخرى للفطر.

### تأثير الفطر *B.bassiana* بالتخافيف

( $3.7 \times 10^4$  و  $3.7 \times 10^6$  و  $3.7 \times 10^8$ ) في هلاك ذكور واناث بالغات القراد *Boophilus microplus* تم اخذ (10) بالغات لكل مكرر من الذكور و(10) بالغات لكل مكرر من الاناث بعمر 24 ساعة وبواقع ثلاث مكررات لكل تخفيف. تم معاملة البالغات ب(5) مل من التخافيف اعلاه بطريقة الرش المباشر اذ تم رش البالغات من مسافة 10\_15 سم لضمان وصول المعلق الفطري لكل جسم البالغات اما معاملة السيطرة فقد رشت البالغات بالماء المقطر فقط. وضعت المكررات السيطرة والمعاملات في الحاضنة على درجة حرارة 25 + 2 ورطوبة 80+5% وتم متابعة البالغات يوميا وتسجيل نسب القتل وملاحظة التشوهات الحاصلة.

### النتائج والمناقشة:

يوضح (الجدول-1) ان العلاقة كانت عكسية بين تخفيف المعلق الفطري و نسبة القتل فقد ازدادت نسبة الهلاك للبالغات (ذكور واناث) من (16.66) لكلا الجنسين في التخفيف الثالث لتصل الى 70 و 36.6% على التوالي في التخفيف الاول بعد 1-2يوم وبفارق معنوي ( $p < 0.05$ ) عن معاملة السيطرة ووصلت النسبة الى 80% و 93.33% في التخفيف الاول بعد 3-4 ايام من المعاملة في حين انخفضت عن التخفيف الثالث وعن التخفيف الثاني لكل من الذكور والاناث على التوالي اما بعد 5\_6 ايام فقد بلغت نسبة القتل 100% في التخفيف الاول وبنسبة قتل اقل في التخفيفين الاخرين ولم يظهر فرق معنوي ( $p < 0.05$ ) بين نسبة القتل للذكور والاناث بعد 5\_6

الفطري 10\_8  $\times 3.7$  بوغ /مل قاتل لبالغات القراد *Boophilus sp* بنسبة 100 % بعد 6 ايام من التعريض. في حين اشار (Cradock, K. and Needham, G, 2011). الى نسبة هلاك عالية لبالغات القراد *Ambloyomma americana* عند المعاملة بعدة تخافيف من هذا الفطر. كان الهدف من اجراء هذه الدراسة هو معرفة مدى تأثير تخافيف مختلفة للمعلق الفطري لفطر *B.bassiana* في ذكور واناث بالغات القراد *Boophilus* التي تتطفل على الابقار لإيجاد الوسائل الكفيلة للقضاء على هذا الطفيلي والمتمثلة بالمكافحة الاحيائية باستخدام هذا الفطر لأجل الحد من انتشار هذه الطفيليات وما ينجم عنها من اضرار صحية واقتصادية

### المواد والطرائق:

#### جمع القراد:

تم جمع بالغات القراد (ذكور واناث) من الابقار المصابة بهذه الطفيليات من حقول تربية الابقار الموجودة في بعض مناطق محافظة الانبار. تم مسح القراد بقطعة من القطن المبلل بكحول ايثيلي 70% وسحب القراد بعناية باستخدام ملقط عريض النهائيين لتجنب تلف اجزاء الفم، ووضعت في انابيب بلاستيكية محكمة الغطاء وجلبت للمختبر لاجراء التجارب عليها.

#### تحضير التخافيف الفطرية:

تم الحصول على عزلة الفطر *B.bassiana* من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة بغداد وتم تنقية العزلة في اطباق بتري على الوسط الزرعي المعقم PDA potato dextrose agar (ديوان، 2010). حضرت التخافيف الفطرية ( $3.7 \times 4 - 10$  و  $3.7 \times 6 - 10$  و  $3.7 \times 8 - 10$ ) بوغ /مل بإضافة 5مل من الماء المقطر والمعقم الى طبق المزرعة الفطرية واستخدمت الحاصدة على شكل حرف (L) لفصل الابواغ ورشحت محتويات الطبق بقطعة من الشاش المعقم والمثبت على قمع زجاجي بعد ان اضيفت 5مل اخرى من الماء المقطر والمعقم لضمان نزول جميع الابواغ. جمع العالق الفطري في وعاء زجاجي وبهذا تم الحصول على العالق الفطري الاساس (stock) ومنه تم تحضير التخافيف الفطرية المطلوبة (and Kirkland Keyhoni, 2004) اذ تم اخذ 8 انابيب اختبار معقمة ومعلمة من رقم 1-8 يحتوي كل انبوب على 9 مل من الماء المقطر والمعقم وقطرة من محلول Tween 20 0.01/0 الذي يساعد على نشر العالق الفطري على سطح جسم الطفيلي، تم سحب 1مل من العالق الفطري الاساس بواسطة ماصة معقمة واضيف الى الانبوبة رقم 1 وبذلك تم الحصول على تخفيف 10-2 وهكذا وصولا الى التخفيف 10-8

وعند الفحص المجهرى لوحظ نمو خيوط الفطر البيضاء على اجزاء الجسم المختلفة والذي سبب هلاك البالغات اذ بين (2005, O, Keyhani, D.J. and Holder) و Fan وآخرون، 2007) ان الفطر يقوم بافراز انزيمات تساعد على اختراق كيتوكل العائل ومنها Lipase, Chitinase, Protease أي تعمل على تكسير الكيتوكل وتثبيت الكونيديا الملامسة لجدار الجسم وتكون انابيب الانبات التي تدخل الجسم ويخترق الغزل الفطري اعضاء الجسم المختلفة وخاصة الاجسام الدهنية Fat bodies وتنمو الكونيديا داخل الجوف الداخلي للعائل ويتكاثر الفطر داخل الجسم وينتج السموم التي من اهمها Beauvercin الذي يؤدي الى قتل العائل (Boucias, D.G. and Pendland, J.G., 1998).

ايام من التعريض للتخافيف الثلاثة. ومن ذلك يتبين ان تأثير الفطر على الذكور يكون اكثر ضراوة منه على الاناث وقد يعود السبب في ذلك الى الدرغ الذي يغطي جميع السطح العلوي للانثى في حين يقتصر على تغطية النصف الامامي من السطح العلوي للذكور اذ يكون مايقرب من نصف السطح العلوي غير مغطى بالكيتوكل السميك كما هو الحال في الانثى وهذا يؤدي الى سهولة اختراق الفطر لجسم القراد من هذه المناطق. نتائج هذه الدراسة تتفق مع ما وجده (Ren وآخرون، 2011) وايضا مع ما وجده (Reis وآخرون، 2007) اذ وصلت عندهم نسب القتل الى 100% بعد 6\_11 يوم من التعريض لتراكيز مختلفة. تمثلت اعراض الاصابة بالفطر بضعف البالغات وقلة نشاطها وعدم قدرتها على الحركة والسير

جدول 1- التأثير التراكمي لفطر *Beauveria bassiana* بالتخافيف الثلاثة المستخدمة في نسب موت البالغات لطفيل القراد *Boophilus microplus*

النسبة المئوية لموت البالغات						التخافيف بوغ، مل <sup>1</sup>
6-5 يوم		4-3 يوم		2-1 يوم		
اناث	ذكور	اناث	ذكور	اناث	ذكور	
0.00 a±100.00	0.00 a±100.00	1.15 b±93.33	1.00 a±80.00	2.08 b±36.66	2.16 a±70.00	10 <sup>4</sup> ×3.7
1.73 a±90.00	1.15 a±93.33	3.21 b±53.33	2.51 a±76.66	2.08 b±23.33	2.08 a±46.66	10 <sup>6</sup> ×3.7
1.52 a±83.33	1.52 a±76.66	2.51 a±46.66	1.00 a±40.00	2.08 a±16.66	2.08 a±16.66	10 <sup>8</sup> ×3.7
0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	السيطرة

/الحروف المختلفة تمثل الفروقات المعنوية (p<0.05) بين الذكور والاناث ضمن الفترة المحددة فقط.

النسبة المئوية للتشوهات الحاصلة للذكور والاناث اذ اعطت التخافيف الثلاثة نسب تشوهات متباينة بلغت 36.66%، 80%، 16.66% بالنسبة للذكور عند معاملتها بالتخافيف الثلاثة المستخدمة اما بالنسبة للاناث فبلغت (30%، 80%، 13.33%) على التوالي وهذا يتفق مع دراسة (Onofre, 2001) اذ بلغت نسبة التشوهات لبالغات القراد 40% بعد 10 ايام من المعاملة.

اما بالنسبة لطبيعة التشوهات الحاصلة فلوحظ ان الكيتوكل يتأثر بشكل كبير وذلك لأنه من اهم المناطق التي يخترقها الفطر وينمو عليها ويبدأ بهضم الكيتوكل وتحلله فضلا عن ظهور بقع سوداء اللون في مناطق اختراق الخيوط الفطرية لمناطق الجسم وكذلك حصول تقوس وانكماش للجسم وهذا من صفات الفطريات الممرضة للحشرات والطفيليات. ويلاحظ من (الجدول-2)

جدول 2- التأثير التراكمي لفطر *Beauveria bassiana* بالتخافيف الثلاثة المستخدمة على النسب المئوية لتشوهات ذكور واناث بالغات طفيلي القراد *Boophilus sp.*

طبيعة التشوهات	% التشوهات		التخافيف بوغ، مل <sup>1</sup>
	اناث	ذكور	
تقوس الجسم وانكماشه	3.05±30.00a	4.04±36.66a	10 <sup>4</sup> ×3.7
تحلل جدار الجسم ونضوح الدم	2.00±20.00a	2.00±20.00a	10 <sup>6</sup> ×3.7
تبقع الجسم ببقع سوداء نتيجة لاختراق الخيوط الفطرية	1.52±13.33a	2.08±16.66a	10 <sup>8</sup> ×3.7
-	0.00±0.00	0.00±0.00	السيطرة

## REFERENCE:

Boucias, D.G. and Pendland, J.G. 1998. Principles of insect pathology. Kuwer. Academic publisher. Boston/Dordrecht/London. pp:537  
Cradock, K. and Needham, G. 2011. Physiological

ديوان، حسين مكطوف. 2010. تحضير مستحضر حياتي للفطر *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill وتكوينه فعاليتها ضد حشرة فراشة الهانة *revicoryne brassicae* L. أطروحة دكتوراه - كلية العلوم - جامعة بغداد.

- effects upon *Amblyomma amaricanum* (Acari : Ixodidae) infected with *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales). Exp. Appl. Acarol . 53: 362-369 .
- Douglas, L. M. Avlazer, F. J. McCreary, C. and Konopoka, J.B. 2005. Sqptin Function in yeast model system and pathogenic Fungi . Eukaryot. Cell 4:1503-1512 .
- Fan, Fang,W. Guo, S. Pei, X. Zhang, Y. Xiao. L. Di Jin, K. Bidochko, M.J. and Pei. 2007 Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strain over expressing an engineered chitinase. J. Appl. Environ. Microbiol.(1) :295-302 .
- Hazir, S. Kaya, H.K. Stock, S.P. and Keskin ,N. 2004.Entomopathogenic Nematods (steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological control of soil pests. Turk. J. Boil. 27:181-202 .
- Holder, D.J. and Keyhani, N. O. 2005 (Cordyceps) Adhaesion of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to subtrata .J. Appl Environmental Microbiology. 71 (9): 5260-5266.
- Kirkland, B.H. and Keyhoni, N.O. 2004. Differential susceptibility of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Biol control. 31:414-421.
- Lacey, L.A. 1997. Mahual technigues in insect pathology (Biological technigues). Academic press sandiego. London . Boston . pp. 408.
- Leemon, D.M. Jonsson, N.N. 2008 Laboratory studies on Australian isolates of *Beauveria bassiana* as biopesticide for cattle tick *Boophilus microplus* . J. Invertebr pathol 97: 40 49.
- Marguardt,W.C. Demuree, R.S. and Grieve, R.B. 2000 . Parasitology and Vector Biolgy. Second Edition .Academic press. Attareurt science and Technology comp. san. Diego. Cali, USA, 92101-4495
- Monterio, S.G. Bahiense, T.C. Bitten cort, V.R.E.P. 2003. Acao do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, (1912 sobre a fase paraitaria do carrapato Anocentor nitens Neumann, 1897. schulze , 1937 (Acari: Ixodidae) . Cienc Rural 33:559-563 .
- Norris, H.A. Elewski, B.E. and channoum, M.A. 1999. Optimal growth condition for the determination of the anti fungal susceptibility of three species of dermatophytes with use of a microdilution method. J.Am. Dermat. 40 (6): 509-513 .
- Onofre, S.B. Miniuk, C.M. Barros, N.M. 2001. Pathogenicity of four of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. AJVR 62: 1478-1480 .
- Reis, R.C.S. Frnandes, E.K.K. Bittencourt, V.R.E.P. 2007. Effect of fungal formulation on viability of engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. Annals of the IX Biennial conference of the society for tropical veterinary medicine .Meridae , Mexico, p 197.
- Ren, Q. Sun, M. and Guan, G. 2011 Biological control of engorged female *Haemaphysalis ginghaiensis* (Acari :Ixodidae ) ticks with different Chinese isolates of *Beauveria bassiana*. parasit Res. 109 :1059-1064 .
- Shah, F.A. Ansari, M.A. Prasad, M. and Butt, T.M. 2007. Evaluation of black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus* ) control strategies using *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of insecticides in disparate hortc growing media . Biol. Control 40:246-252 .
- Willdsen, P. and Jongejan, F. 1999. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-born diseases .Parasitol. today. 15. (7):258-261.