Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science
مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة و التطبيقية
No. 2 Vol. 25 Year 2012
العدد 2 المجلد 25 السنة 2012

التغيرات النسيجية المرضية للاصابة بالفطر *Metarhizium anisopliae* ليرقات الذبابة المنزلية *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)

وفاء برغش عبيد* ، نوال صادق مهدي ، حسام الدين عبد الله محمد *****
وزارة التربية *
قسم علوم الحياة ، كلية التربية (ابن الهيثم) ، جامعة بغداد **
قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد ***
استلم البحث في: 23 تشرين الاول 2011 قبل البحث في: 16 تشرين الثاني 2011

الخلاصة

تضمنت الدراسة استعمال الفطر *Metarhizium* مبيداً احيائياً للذباب المنزلي hous fly *Musca domestica* إذ تم معاملة يرقاتها بطريقة الرش المباشر ورش الغذاء بتركيز $10^8 \times 2.3$ بوغ/مل من معلق ابواغ الفطر ، اظهرت اليرقات المصابة خمولاً وبطئ في النمو وأوضحت الدراسة النسيجية المرضية لليرقات الميتة التحام واختراق انبوب الانبات لجدار الجسم وبداية نمو الخيوط الفطرية تحت الجلد واجتياح الهايفات ونموها في تجويف الجسم والقناة الهضمية .

الكلمات المفتاحية: *Metarhizium anisopliae , Musca domestica* ،دراسة نسيجية لليرقات الميتة

المقدمة

تعد الذبابة المنزلية *Musca domestica* (L.) من اخطر الحشرات من الوجهة الطبية نظراً لانتشارها وملازمتها للانسان في البيئات القذرة [1] وان وجودها باعداد كبيرة يشكل مصدر ازعاج شديد للناس ينغص عليهم عملهم أو لهوهم ويلوث براز الذباب الاشياء الموجودة داخل وخارج المنازل كما ان الذباب له تأثير نفسي سلبي لأن وجوده يُعدِّ علامة على سوء الظروف الصحية [2] . يمكن للذباب أن ينقل الأمراض لأنه يتغذى بحرية على كل أطعمة البشر وفضلاته ، ويلتقط الجراثيم المسببة للأمراض بينما يمشي ويتغذى وقد سجل Greenberg (1971) اكثر من 100 نوع من الممرضات تحملها الذبابة المنزلية ومنها 65 تنقل ميكانيكياً [3] ، وقد ثبت مختبرياً أن الذباب يمكن أن ينقل ثلاثين نوعاً من الأمراض للإنسان والحيوان بعضها خطير ومميت وقد ذكر West (1951) [4] ان 44% من الذباب الذي تم جمعه من غرفة مصابين بمرض التيفوئيد كان حاملاً للبكتريا المسببة للمرض وقد استمر عزل هذه البكتريا مدة ستة ايام في قناتها الهضمية ومن الجدير بالذكر ان اليرقات التي تغذت على أطعمة ملوثة بالجراثيم تنتج ذباباً بالغاً مصاباً بها[5].

بقدر ما يعتقد ان عمليات مكافحة الذبابة المنزلية من العمليات السهلة نسبياً مقارنة بالآفات الحشرية الأخرى إلا ان ما تم من جهود في هذا الاطار لم يؤدِ إلى تحقيق الاهداف المرسومة بصورة مثلى وذلك لعدد من العوامل المهمة منها ظهور المقاومة تجاه العديد من انواع المبيدات الكيميائية المستعملة في انحاء عديدة من العالم نتيجة لذلك فقد لجأ الانسان الى استخدام طرائق أخرى للقضاء على هذه الآفة ، تعد النظافة البيئية من انجح الطرائق في القضاء على هذه الآفة والتي تتمثل بالقضاء أو التخلص من اماكن توالد وتغذية الذباب في المدن والقرى والبيوت [6] .

تصاب الحشرات في الطبيعة بانواع مختلفة من الاحياء المجهرية الممرضة مثل البكتريا والفطريات التي تقضي على مجاميع كبيرة منها لاسيما عند توافر الظروف الملائمة لنموها وانتشارها لذلك فأن استعمال مثل هذه الاحياء في مكافحة الذباب يسمى بالمكافحة الجرثومية Microbal Control . تصيب الفطريات أنواع مختلفة من الحشرات وتمتاز هذه الممرضات بأنها تسبب اصابات مميتة ، من الفطريات الممرضة لبالغات الذباب أنواعاً تعود لرتبة Entomophthoraleane وهو الفطر *Entomophthora musca* واستعمل في مكافحة بالغات الذبابة المنزلية وقد تميز بسرعة قتله للذباب الذي يلاحظ ملتصقاً على الجدران والزجاج [7] ، وسجلت عبد (2009) [8] حساسية الذباب المنزلي للفطر *Beauveria bassiana* ومن الفطريات الأخرى المستعملة بنجاح في مكافحة بعض الآفات التابعة لرتبة ثنائية الاجنحة ومنها الذباب الفطر *Metarhizium anisopliae* . وقد تم البحث لدراسة التأثيرات النسيجية المرضية في اليرقات المصابة بهذا الفطر .

المواد وطرائق العمل

1- تربية الحشرة :

جمعت بالغات الذبابة المنزلية بوساطة شبكة هوائية من حقل دواجن تابع لكلية الزراعة في أبي غريب ، تم تربية واكثار المستعمرة في مختبر الحشرات المتقدم / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة بغداد ، وضعت البالغات في قفص ذي هيكل خشبي مكعب الشكل 30 × 30 × 30 سم مثبت على جوانبه مشبك معدني ، جُهز القفص بطبق بتري قطره 4 سم يحتوي على طبقة خفيفة من القطن الطبي المرطب بالحليب والسكر لغرض تغذية البالغات ، ولغرض تغذية اليرقات ووضع البيض زود القفص بإناء بلاستيكي يحوي روث الاغنام المجفف المطحون المعقم المضاف له مسحوق الخبز المجفف والمعقم. رطبت هذه المواد بالماء المقطر المعقم بنسبة2:1 [9] تم تنقية المستعمرة لاجيال عديدة قبل اجراء التجارب ، تم تأكيد تشخيص الحشرة من متحف التاريخ الطبيعي العراقي ، جامعة بغداد على أنها *Musca domestica* (L.) .

2- تنمية مستعمرة الفطر

استعملت عزلة من فطر *M.anisopliae* تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية / وحدة انتاج المبيدات الحيوية / جمهورية مصر العربية ، نميت العزلة في اطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي Patato Dextrose Agar (PDA) المضاف إليه المضاد الحيوي Chloram Phenicol حضنت الاطباق بدرجة حرارة 27 m 2 ورطوبة 80 m 5 مدة 7 – 14 يوماً [10] .

3- التجربة الحيوية وتحضير المقاطع النسيجية

لدراسة تأثير التركيز 10^8 × 2.3 بوغ/ مل من معلق ابواغ الفطر *M.anisopliae* في يرقات الذبابة المنزلية نقلت 15 يرقة حديثة الفقس من مستعمرة التربية إلى طبق بتري قطره 5 سم ، رُشت بـ 4 مل من معلق ابواغ الفطر تركيز 10^8 × 2.3 بوساطة مرشة يدوية سعتها 25 مل رشاً مباشراً من مسافة 10 – 15 سم نقلت بعدها اليرقات إلى وعاء بلاستيكي نبيذ سعة 100 مل يحوي 5 غم من الوسط الغذائي المعامل بـ 10 مل من معلق ابواغ الفطر وبالنسبة الى معاملة السيطرة رشت 15 يرقة بالماء المقطر المضاف إليه Tween – 20 بتركيز 0.01% وعومل الوسط بـ 10 مل منه كذلك ، غطيت اواني المعاملات بقطع من قماش التول ربطت برباط مطاطي لضمان عدم خروج اليرقات ، نقلت اواني التجربة الى الحاضنة بدرجة 27 m 2 ورطوبة 80 m 5 ومدة اضاءة 12 ساعة وتم متابعة اليرقات يومياً لملاحظة الاصابة [11] نقلت اليرقات الميتة والمشوهة الى محلول حفظ (كحول 70%) ، تم عمل مقاطع نسيجية متسلسلة لبعض اليرقات الميتة لدراسة التأثير المرضي النسيجي للفطر ، إذ تم تثبيت اليرقات في محلول الفورمالين تركيز 10% مدة 24 ساعة ثم أجريت عليها عمليات الغسل Washing والتجفيف Dehydration والترويق Clearing والترشيح Infiltration بعد ذلك طمرت في شمع البرافين وقطعت بسمك 5 ملم باستخدام المشراح الدوار Rotary microtome وعوملت المقاطع بصبغة الهيماتوكسلين أرلخ المزدوج مع الايوسين ، فحصت وصورت المقاطع النسيجية المنتخبة باستخدام مجهر ضوئي مركب مزود بكاميرا [12] .

النتائج والمناقشة :

أدت معاملة اليرقات بمعلق ابواغ الفطر إلى قلة نشاطها وحركتها وبطئ نموها وتجمعها في قعر اواني التجربة ولوحظ أن اليرقات المصابة الميتة كان بعضها ذو لون وردي أو معتم ولوحظ انكماش او استطالة بعضها عن الحد الطبيعي مقارنة باليرقات الطبيعية (شكل 1) فضلاً عن أن بعضها كانت صغيرة الحجم بسبب قلة التغذية وتم التثبت حالة الاصابة بالفطر عن طريق حضن اليرقات الميتة على الوسط الزرعي PDA والتثبت طريق الفحص المجهري للنمو الفطري (شكل 2) . أظهرت الدراسة النسيجية التي أجريت على بعض اليرقات الميتة بسبب الاصابة بالفطر *M.anisopliae* أن المقاطع النسيجية المتسلسلة لتلك اليرقات أكدت الاصابة بالفطر ، وأظهر الفحص المجهري لتلك المقاطع وجود مظاهر للاصابة الفطرية في مناطق متعددة من جسم اليرقات، إذ ظهرت ابواغ الفطر ملتصقة على جليد (كيوتكل) اليرقات كما في (الشكل 3) وأظهرت المقاطع أيضاً بداية أنبات الابواغ على سطح الكيوتكل كما في (الشكل 4) ، كما أظهرت بعض المقاطع وجود تراكيب تحت الجلد في السائل الدموي لليرقات متمثلة بالحامل الفطري لتراكيب Blastospore (شكل 5) ، وأوضحت الدراسة كذلك تطور الاجسام الفطرية داخل السائل الدموي لليرقات وبأشكال مختلفة منها الاجسام المستطيلة Rectangular bodies التي يوضحها (شكل 6) وأظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية نمو الفطر بشكل خلايا متبرعمة شبيهة بخلايا الخميرة في التجويف الجسمي الدموي لليرقات (شكل 7) ، وأظهرت دراسة المقاطع النسيجية أن القناة الهضمية أمتلأت بالغزل الفطري نتيجة لنمو الخيوط الفطرية الناتجة عن نمو الابواغ التي تناولتها الحشرة مع الغذاء (شكل 8) وأظهر الفحص كذلك تحلل وتمزق جدران القناة الهضمية بسبب الضغط الفيزياوي لهذه الخيوط وكذلك بسبب بعض المواد السامة التي ينتجها الفطر في اثناء نموه وهذا ومن ثم أدى إلى هلاك الحشرة بسبب قلة تناولها للغذاء والموت جوعاً وهذا يتفق مع ما ذكره Tefera and pringle (2003) [13] أن الاصابة بالفطريات ونموها داخل الجوف الجسمي يؤدي الى افراز مركبات سامة وان كتلة الخيوط الفطرية التي تكونت داخل الجوف الجسمي ادت الى تمزيق وتلف اجهزة الجسم لاسيما الجهاز الهضمي ومن ثم اثرت في كمية استهلاك الغذاء من اليرقات ، ويتفق هذا أيضاً مع الدراسة التي اجراها Sajap and kaur (1990) [14] على عاملات حشرة الارضة نوع *Coptoterms curignathus* عند تعريضها لابواغ الفطر *M.anisopliae* إذ أظهرت ان انبات الابواغ على كيوتكل الحشرة وتكوين انبوب الانبات يحدث

بعد 24 ساعة من التعريض وعملية مد أنبوب الانبات Germ tube وتكوين عضو الاختراق Appresorium تحدث في منطقة دخول الفطر ، وبعد الاختراق تبدأ الهايفات بالتشعب داخل جسم الحشرة وعمليات الاختراق هذه تحدث بسبب فعالية الانزيمات والضغط الميكانيكي [15] ، وبعد مرور 36 ساعة على المعاملة تبدي الحشرات المصابة اعراض الموت البدائي، إذ تصبح الحشرات خاملة ، وأن خمول الحشرات ناتج من ان الاصابة بالفطر تعيق وصول الايعازات الى العضلات من الجهاز العصبي ونتيجة لذلك يختل التناسق الحركي للحشرات المصابة وخلال هذه المرحلة تبدأ الخيوط الفطرية بغزو الاجسام الدهنية المتواجدة تحت طبقة الكيوتكل وتكون هذه الاجسام في الحشرات السليمة بشكل انسجة واضحة تملأ الفراغات بين الاعضاء الحيوية ، وبعد مرور 48 ساعة على المعاملة تبدأ الخيوط الفطرية بغزو السائل الدموي [14] ، لوحظ من خلال الدراسة التي اجراها Hanel (1982) [16] ان هناك مراحل مختلفة لنمو الفطر *M.anisopliae* في السائل الدموي لحشرة *Nasutiterms exitiosus* منها حدوث تغيرات في اشكال خلايا الدم فضلاً عن زيادة اعدادها في مناطق غزو الخيوط الفطرية نتيجة لتأثرها بالسموم التي ينتجها الفطر في اثناء نموه [17] .ويمكن ملاحظة تراكيب Blastospore ايضا داخل السائل الدموي التي يلاحظ ظهورها بعد 8–42 ساعة من الاصابة وأمكن أيضاً ملاحظة الاجسام المستطيلة Rectangular bodies في السائل الدموي إذ هذه الاجسام من انقسامات الاجسام الهايفية التي تكون تراكيب مستطيلة الشكل تتجمع مع بعضها ، كذلك توجد الاجسام الهايفية والاجسام المتبرعمة فيها والتي تمثل مراحل حرة للفطر تختلف من حيث الطول والعرض ، تنتشر هذه الاجسام في مجرى الدم داخل التجويف الجسمي وبعد موت العائل فأن تراكيب Blastospore تتضاعف بالتبرعم لكي تعطي اجساماً فطرية جديدة أو خيوط فطرية [16]. بعد اكتمال غزو السائل الدموي يقوم الفطر باختراق العضلات ، فبعد مرور 60 – 72 ساعة من المعاملة يتم غزو الاجسام الدهنية والانسجة العضلية بغزارة من الخيوط الفطرية فضلاً عن حدوث تغيرات خلوية تحدث في خلايا الاجسام الدهنية تتمثل بانحلال السايتوبلازم والاغشية الخلوية لخلايا الاجسام الدهنية وبتقدم الاصابة سوف تنحل الاجسام الدهنية وتتلف فضلاً عن أن الخيوط الفطرية سوف تنمو وتتشعب داخل العضلات وتمزق الالياف العضلية وتحولها من حزم طويلة إلى حزم قصيرة وصغيرة خلال هذه المرحلة[14] . تظهر علامات الاصابة على القناة الهضمية والانسجة العصبية فيلاحظ أن الخيوط الفطرية تغزو الطبقات العضلية المعوية والطبقات التالية المتمثلة بالخلايا الطلائية لتجويف المعدة وخلال غزو القناة الهضمية فأن الحوصلة والقانصة تهاجم عن طريق الفطر ويتم تحطيم طبقات العضلات الدائرية للقانصة وخلال مرحلة الـ 72 ساعة سوف تنحل جميع الطبقات المحيطة بالقانصة فضلاً عن تحطم الطبقات الكايتينية المحيطة بها وبذلك يسهل اختراق القانصة ، ورغم أن موت الحشرات يحدث بين الساعة 36 – 48 بعد المعاملة ، إلا أن الخيوط الفطرية لا تظهر على جسم الحشرة الخارجي إلا بعد مرور 100 ساعة بعد المعاملة وتظهر الخيوط الفطرية في البداية صفراء شاحبة اللون ثم تتحول إلى اللون الاخضر بعد مرور 120 ساعة وخلال هذه المدة تبدأ مولدات الابواغ بالتكون فيتحول لون الحشرة إلى اللون الاخضر [14] .

المصـــادر

1. أبو الحب ، جليل كريم . (1979) ، الحشرات الطبية والبيطرية في العراق (القسم النظري) ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد ، 450 صفحة .

2. Willomitzer, J. and Tomanek, J. (1981) Larvicidal efficiency of some inorganic compounds and plant extracts against house fly, ACTA VET. BRNO, 50 : 105 – 112 .

3. Marcon, P.C.R. ; Thomas, G.D. ; Siegfried, B.D. ; Campbell, J.B. and Skoda, S.R. (2003) Resistance status of house flies (Diptera : Muscidae) from southeastern Nebraska Beef Cattle feedlosts to selected insecticides, Journal of Economic Entomology, 96 (3) : 1016 – 1020 .

4.West, L.S. (1951) The house fly, Comstock Publishing Company, Ithaca, New York, PP : 584 .

5. سيرفس ، م. م. (1984) ، المرشد إلى علم الحشرات الطبية ، علي محمود سليط ، زهير محمود الصفار ورياض احمد العراقي (مترجمون) ، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، 485 صفحة .

6. Rozendaal, J.A. (1997) Vector control, methods for use by individuals and communities , world health Organization , Geneva. 412 PP .

7. الباروني ، محمد ابو مرداس والحجازي ، عصمت محمد (1994)المكافحة الحيوية لممرضات الحشرات ،الجزء الثاني ، منشورات جامعة عمر المختار ، الجماهير الشعبية الليبية ، 635 صفحة .

8. عبد ، نور سعدي (2009) تأثير المستخلص الكحولي والماء الحار لاوراق نبات حلق السبع الشجيري *Adhatoda vssica* والفطر *Beauveria bassiana* في حياتية حشرة الذبابة المنزلية *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae) ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد .

9. البيار ، عز الدين عطية (2004) تأثير جرع مختلفة من المبيدات الكيميائية في التبدلات الوظيفية والوراثية للذبابة المنزلية *Musca domestica* ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الانبار .

10. Hoe , P. ; Bong , C.J. ; Jugah, K. and Rajan , A. (2009) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var.*anisopliae* (Deuteromycotina : Hyphomycete) Isolates and their effects on subterranean Termite *Coptotrtmes curvignathus* (Isoptera : Rhinotermitidae) , American Journal of Agricultura and Biolgical Sciences 4 (4) : 289 – 297.

11.Sharififard, M. ; Mossadegh, M.S. ; Vazirianzadeh, B and Mahmoudabadi, A.Z. (2011) Laboratory evaluation of pathogenicity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and Metarhizium anisopliae (Metch) Sorok. to larvae and adults of the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae). Asian J. Biol. Sci, 4 : 128 – 137 .

12.Bancroft .; J.D and Stevens, A. (1982), Theory and practice of histology techniques 2nd ed. Churchill Livingston, London : 662PP.

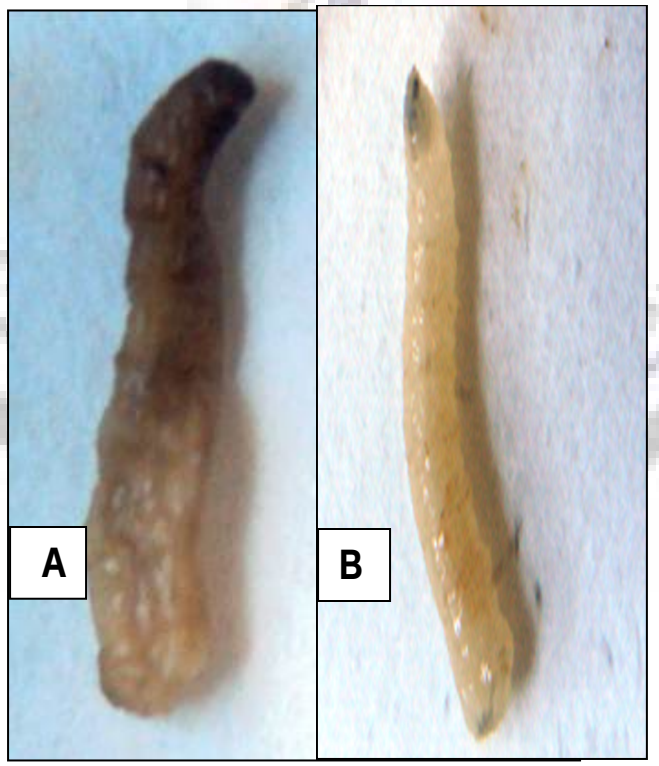
13.Tefera, T and Pringle, K.L. (2003), Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera : Pyralidae) larve infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J. Inverter. Pathol. 84 : 220 – 225 .

14.Sajap, A.S and Kaur, K. (1990) Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus, Infection in the Termite, *Coptoterms curvignathus*, pertanika 13 (3) : 331 – 334 .

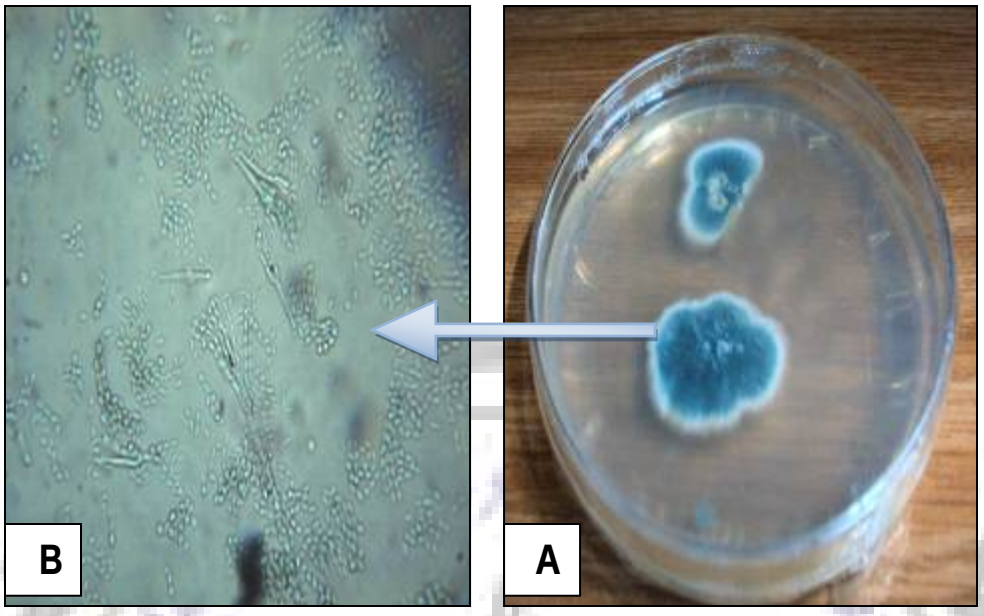
15.Zacharuk,R.Y. (1973) Electron-microscope studies the histopathology of fungal infections by *Metarhizium anisopliae*. Miac.Publ.Entomol.Sac.Am.9:112-119.

16.Hanel , H. (1982) The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus* , Mycopathologia 80 : 137 – 145 .

17.Sannasi,A. (1969) Studies of an insect mycosis 1-Histopathology of the integument of the queen of the mound-bulding termite *Odontotermes obesus*.J.Invertebr.Pathol.13:4-10.



شكل (1): الطور اليرقي الثاني للذبابة المنزلية قوة التكبير بالمجهر التشريحي (10X)
A: يرقات ميتة نتيجة المعاملة بمعلق ابواغ الفطر بالتركيز $2.3X10^8$.
B: يرقات طبيعة من معاملة السيطرة .

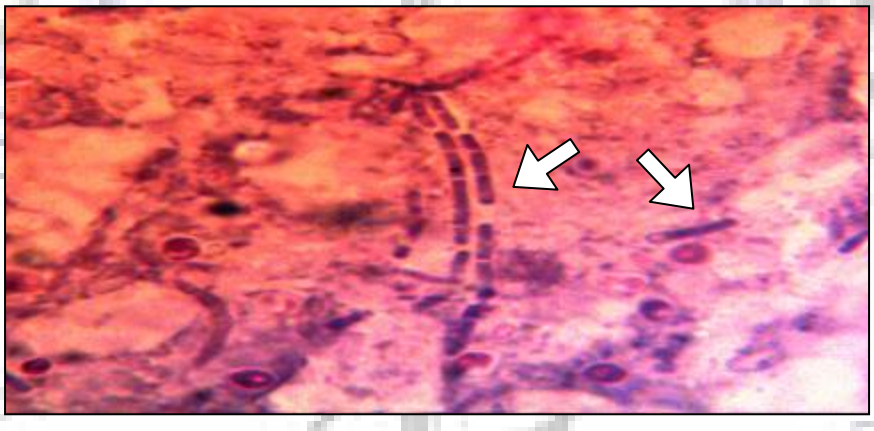


شكل (2)A: اعادة عزل الفطر *M.anisopliae* من اليرقات الميتة بعد تنميتها على وسط الـ PDA وفحص النمو الفطري تحت المجهر الضوئي لتأكيد الإصابة بالفطر (B)

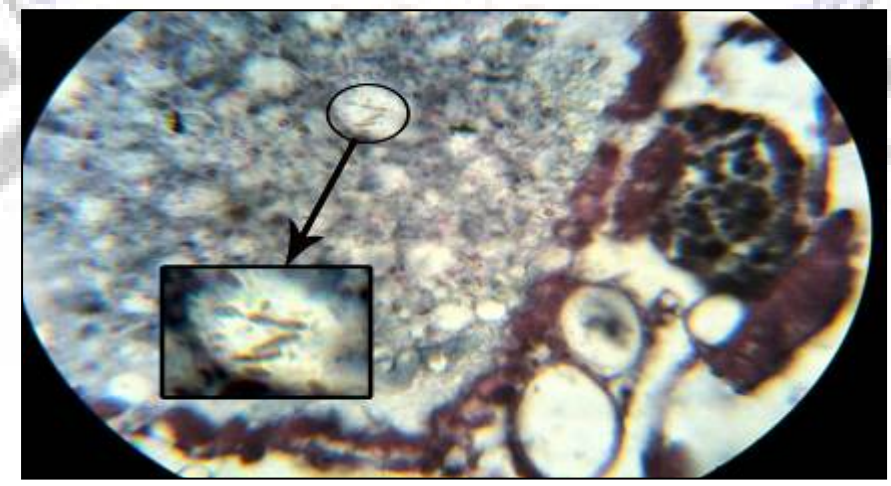
شكل(3):مقطع مستعرض مار خلال جدار جسم يرقات الذبابة المنزلية المصابة الميتة يوضح التحام الابواغ على جدار الجسم **ملون الهيماتوكسلين والايوسين 1000X**

شكل(4):مقطع مستعرض مار خلال جدار جسم يرقات الذبابة المنزلية المصابة الميتة يوضح بداية نمو واختراق الابواغ لجدار الجسمملون الهيماتوكسلين والايوسين 1000X****

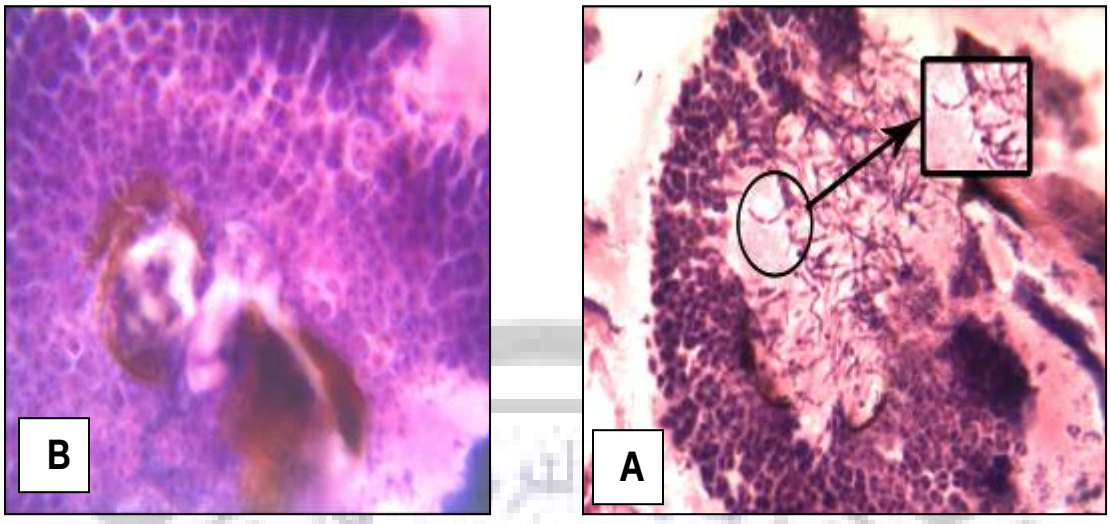
شكل(5):مقطع مستعرض مار خلال جسم يرقات الذبابة المنزلية المصابة الميتة يوضح دخول الابواغ ونموها داخل الجوف الجسمي لليرقة **ملون الهيماتوكسلين والايوسين 1000X**



شكل(6): مقطع مستعرض مار السائل الدموي ليرقات الذبابة المنزلية يوضح الاجسام المستطيلة Rectangular bodiesنتيجة الاصابة بالفطر *M.anisopliae*ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير 1000x****



شكل(7):مقطع مستعرض مار خلال السائل الدموي ليرقات الذبابة المنزلية *M.domestica* يوضح نمو فطر *M.anisopliae* بشكل شبيه لخلايا الخميرة yeast like **ملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير 1000X**



شكل (8) A:مقطع مستعرض مار خلال القناة الهضمية ليرقات معاملة بتراكيز معلق الفطر يظهر الغزل الفطري يملأ تجويف القناة الهضمية /(B)مقطع مستعرض مار خلال القناة الهضمية ليرقات معاملة السيطرةملون الهيماتوكسلين والايوسين قوة التكبير 1000X****

Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science
مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة و التطبيقية
No. 2 Vol. 25 Year 2012
2012 السنة 25 المجلد 2 العدد

Histopathology of *Metarhizium anisopliae* Entomopathogenic fungus Infected Larve of *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae)

W. B. Obaid* , N. S. Mehdi , H.A. Mohammad *****
Ministry of Education*
Department of Biology , College of Education/ Ibn Al-Haitham, University of Baghdad **.
Department of Plant Protection , College of Agriculture , University of Baghdad *.**
Received in: 23 October 2011 Accepted in: 16 November 2011

Abstract

This study consist of using *Metarhizium anisopliae* as abioinsecticide against house fly *Musca domestica* L. For controlling it biologicaly its Larvae were treated by sprying them directly and sprying their food with 2.3×10^8 conidia / ml of *Metarhizium anisopliae* . Infected Larve showed symptoms of slugishness and slow growth. Histopathological study of the dead Larve showed Conidial adhesion and germ tube penetrations through body wall and begining of fungus hyphal growth under the body wall and hyphal invasion in haemocoel and gut.

Key Words : *Metarhizium anisopliae* , *Musca domestica* , Larve , histopathological study.