فاعلية عزلة محلية للفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. في قتل يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم *Tuta absoluta* Meyrick

محمد أحمد[1]، ابتسام غزال[1]، لبنى رجب[1] وأمل حاج حسن[2]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية، البريد الالكتروني: lobnarajabbassiana@gmail.com؛

(2) مركز إكثار الأعداء الحيوية، مديرية زراعة اللاذقية، اللاذقية، سورية.

الملخص

أحمد، محمد، ابتسام غزال، لبنى رجب وأمل حاج حسن. 2017. فاعلية عزلة محلية للفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. في قتل يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم *Tuta absoluta* Meyrick. مجلة وقاية النبات العربية، 35(1): 1-5.

درس تأثير ثلاثة تركيزات مختلفة من المعلق البوغي للفطر *Beauveria bassiana* المعزول من التربة المحلية بطريقة "الجاليريا كطعم" مخبري في يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم *Tuta absoluta* بالعمرين الثاني والثالث. بلغت نسبة النفوق في اليوم السابع للتجربة 100، 76 و 60% للتركيزات 10^8، 10^6 و 10^4 بوغ/مل، على التوالي، مقارنة مع معاملة الشاهد التي بلغت 4%. سجل متوسط نسب إصابة شتول البندورة بعد معاملة اليرقات بالفطر وكانت 42، 50 و 57% للنباتات المعاملة بالتركيزات الثلاثة، على التوالي، مقارنة مع معاملة الشاهد التي بلغت 95%. أظهر التحليل الإحصائي فروق معنوية بين معاملتي 10^8 و 10^6 بوغ/مل ومعاملة الشاهد، بينما لم تسجل فروق معنوية بين معاملة التركيز 10^4 بوغ/مل ومعاملة الشاهد، كما لوحظ وجود فروق معنوية بين المعاملات الثلاث فيما بينها. وبلغ التركيز القاتل النصفي (LC_{50}) 3×10^5 بوغ/مل.

كلمات مفتاحية: *Beauveria bassiana*، *Tuta absoluta*، فاعلية، الفطور الممرضة للحشرات.

المقدمة

تنتشر الفطور الممرضة للحشرات بشكل واسع في العديد من البيئات الزراعية والمائية وبيئات الغابات والمراعي وغيرها. ويعتبر النوع *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. من أهم هذه الفطور وأكثرها انتشاراً وظهوراً في العالم (10)، مع مدى عوائلي واسع ومتنوع جداً (8) يضم أكثر من 700 نوعاً من الحشرات والأكاروسات ذات الأهمية الزراعية والطبية (9). والفطر *B. bassiana* هو الطور الناقص للفطر *Cordyceps bassiana* (15). تتم مهاجمة العائل الحشري عن طريق جدار الجسم عندما تلامس الأبواغ الكونيدية الأجزاء الحساسة من جسم الحشرة فتنبت ثم تخترق جدار الجسم بعد 3 أيام من التصاقها على سطح العائل، يلي ذلك انتشار هيفات الفطر داخل أنسجة العائل، وتظهر أعراض الإصابة الكاملة بعد 7-10 أيام من حدوث العدوى (8). حالما تموت الحشرة وفي حال توافر ظروف الرطوبة المناسبة ينمو الفطر خارجياً ويغطي الميسيليوم الناتج جسم الحشرة وتنتج الأبواغ الكونيدية خلال عدة أيام (4). أكد أحمد وآخرون (2) وجود هذا النوع في التربة الطبيعية والزراعية في محافظة اللاذقية بسورية بنسبة مرتفعة بلغت حوالي 45% مقارنةً مع الفطور الأخرى الممرضة للحشرات والمعزولة من المنطقة نفسها، وكان أعلى وجود له في تربة الغابات حيث بلغت نسبة وجوده 87.5%.

تتبع حافرة أوراق البندورة/الطماطم رتبة حرشفية الأجنحة (Lepidoptera) وعائلة Gelechiidae وشخصت لأول مرة عام 1917 من قبل Meyrick (18)، كما سجلت في دول الشرق الأوسط في البحرين والعراق وفلسطين والأردن وسورية وتركيا (6). تعد هذه الحشرة آفة مدمرة لمحصول البندورة/الطماطم في الحقول المكشوفة والبيوت المحمية على السواء. تتغذى اليرقة على جميع أجزاء نبات البندورة (19). تضع الإناث البيض على سطح النبات، يفقس البيض طبيعياً وتتجول اليرقات حوالي 5-40 دقيقة قبل البدء بصنع الأنفاق. لليرقة أربعة أعمار يرقية، تعطي الحشرة من 10-12 جيلاً في العام، ويمكن لكل أنثى أن تضع 250-300 بيضة خلال حياتها (17). تستغرق فترة الطور اليرقي (الطور الضار) من 11-19 يوماً وتستكمل حياتها خلال 20-35 يوماً حسب الظروف البيئية (5). استخدم لمكافحتها حيوياً بعض المفترسات أهمها *Macrolophus caliginosus* و *Nesidiocoris tenuis* وبعض المتطفلات والممرضات الحشرية. وفي دراسة تمت في جنوب أمريكا

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-035.1.001005
© 2016 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

تبين أنه لم تبلغ نتائج تطبيق الإطلاق المشترك لطفيل البيض *Trichogramma pertiosum* والبكتريا الممرضة للحشرات *Bacillus thuringiensis* في خفض الأضرار على الثمار إلا 2.5% فقط (11). وبين Medeiros وآخرون (12) صعوبة استخدام المكافحة الكيميائية بالمبيدات لخفض أضرار هذه الآفة حيث وصل عدد الرشات بالمبيدات الحشرية إلى 36 رشة في البرازيل على محصول البندورة خلال موسم زراعي واحد.

تأتي أهمية هذا البحث من حجم الأضرار الاقتصادية التي تسببها حافرة أوراق البندورة، بالإضافة لصعوبة مكافحتها نظراً لطبيعة معيشتها ضمن الأنفاق من ناحية، ونجاح استخدام الفطور الممرضة للحشرات في مكافحة كثير من حرشفيات الأجنحة، من ناحية أخرى. هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن عزلات محلية من هذه الفطور، متكيفة بشكل طبيعي مع ظروف البيئة المحلية علماً بأن السلالات من النوع نفسه تظهر اختلافات في القدرة الإمراضية والشراسة تجاه الحشرات العائلة (16).

مواد البحث وطرائقه

تأمين نباتات التجربة وحشرات الاختبار

أجريت التجارب في مركز إكثار الأعداء الحيوية في اللاذقية خلال عام 2012. زرعت بذور بندورة (بذار هجين) في صواني فلينية (60×40 سم) حتى وصول الشتول لعمر شهر، وذلك ضمن أقفاص شبكية لمنع انتقال أي إصابة إليها، ثم نقلت كل شتلة إلى أصيص خاص بها. جمعت أوراق بندورة مصابة بالآفة من بيت بلاستيكي موبوء تابع لمركز تربية وإكثار الأعداء الحيوية في الهنادي، ومن هذه الأوراق تم الحصول على يرقات الآفة *Tuta absoluta* بأعمار مختلفة، تم تربيتها مخبرياً للحصول على الأطوار المختلفة المطلوبة بالأعداد الكافية لإجراء التجارب. استخدمت في هذه الدراسة العزلة المحلية من الفطر *B. bassiana* المعزولة من تربة بور بإتباع طريقة "الجاليريا كطعم" الموصوفة سابقاً (13).

تحضير المعلق البوغي

استخدم محلول Tween 80 في الماء المقطر المعقم بتركيز 0.05% لتحضير المعلقات البوغية، وأضيف 10 مل من هذا المحلول لكل مستعمرة فطرية متبوغة (بعمر 14 يوماً). كشطت المستعمرة قليلاً باستخدام إبرة معقمة للحصول على الأبواغ، ثم رشح المعلق عبر ورق ترشيح معقم. نفذت هذه الخطوات ضمن غرفة العزل لمنع أي تلوث خارجي. وضع المعلق البوغي على جهاز الرجاج الكهربائي لمدة 10 دقائق لتأمين توزيع متجانس للأبواغ في المعلق، وتم حساب تركيز الأبواغ باستخدام شريحة مالاسييه Malassez counting chamber ثم عدل تركيز المعلق البوغي بإضافة محلول توين للوصول إلى التركيز المطلوب (10^8 بوغ/مل) وهو التركيز الأول المدروس، ومن ثم تخفيفه للحصول على التركيز التالي (10^6 بوغ/مل) وفق المعادلة (8):

نسبة التخفيف = النسبة المحسوبة/النسبة المطلوبة = $10^8/10^6$= 100 مرة

(كل 1 مل من المحلول الأم تركيز 10^8 أضيف له 99 مل ماء توين للحصول على التركيز 10^6 بوغ/مل).

و بالطريقة نفسها تم الحصول على التركيز 10^4 بوغ/مل وهي التركيزات الثلاثة التي تم اختبار تأثيرها في يرقات الآفة.

تنفيذ التجربة

نقلت يرقات الآفة بالعمرين الثاني والثالث إلى شتول البندورة بعمر شهر التي تمت تربيتها وذلك بمعدل 4 معاملات (شاهد، التركيز 10^8، التركيز 10^6، التركيز 10^4) و 5 مكررات لكل معاملة (المكرر= شتلة بندورة مزروعة في أصيص). تم نقل 5 يرقات لكل نبات، وبعد ذلك تم رش نباتات الشاهد بمحلول توين فقط، بينما رشت نباتات كل معاملة بالمعلق البوغي بالتركيز المختبر، مع مراعاة وصول محلول الرش لكل أجزاء النبات ولكلا سطحي الورقة لتغطية النبات بشكل كامل بمحلول الفطر. استخدم للرش مرشات صغيرة سعة 4 مل، وكان معدل الرش لكل نبات بين 2–4 مل حسب حجم النبات وعدد الوريقات. وبعد إتمام عملية الرش تم وضع النباتات ضمن أقفاص شبكية زودت أرضيتها بقطن مبلل بالماء للحفاظ على الرطوبة، ووضع جهاز قياس رطوبة وحرارة ضمن كل قفص، وزودت الأقفاص بمصدر إضاءة للتحكم بعدد ساعات الضوء والظلام. عرضت النباتات لـــ 12 ساعة إضاءة يومياً مقابل 12 ساعة ظلام. تمت مراقبة النباتات وسجلت النتائج والملاحظات بعد 1، 4، 5، 6، 7 أيام مع تجديد مصدر الرطوبة في الأقفاص يومياً وذلك للحفاظ على الظروف المناسبة لنمو الفطر. أنهيت التجربة بعد 7 أيام عندما لوحظ توقف انتشار إصابة النبات بالآفة وتوقف اليرقات عن التغذية في المعاملات التي رشت بمحلول الفطر.

تقدير نسب الإصابة على النباتات

جمع عدد الوريقات المصابة والكلية لكل نبات في كل المكررات والمعاملات بما فيها معاملة الشاهد، لحساب متوسط نسبة الإصابة لكل معاملة وفق المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الإصابة (\%)} = \frac{\text{متوسط عدد الأوراق المصابة}}{\text{متوسط عدد الأوراق الكلي}} \times 100$$

حساب التركيز القاتل النصفي LC_{50}

لحساب التركيز القاتل النصفي LC_{50} اتبعت طريقة Probit Analysis (8) وفق الخطوات التالية:

تم أخذ عدد اليرقات الحية والميتة لكل مكرر بكل معاملة في اليوم الأخير للتجربة، ثم حسبت نسبة الموت التي سببها التركيز المدروس من الفطر، وصححت هذه النسبة وفقاً لمعادلة Abbott (3):

نسبة الموت المصححة = (النسبة المئوية للموت في المعاملة - النسبة المئوية للموت في الشاهد/100 - النسبة المئوية للموت في الشاهد) × 100

حسب بعد ذلك التركيز القاتل النصفي LC_{50} من خلال حساب اللوغاريتم العشري للتركيزات المستخدمة وإيجاد قيم probit من الجدول الخاص بها، ثم رسم المنحنى البياني الموافق، واستخرجت قيمة LC_{50} من معادلة الارتباط الخطي الموافقة.

التحليل الإحصائي

تم تحليل نتائج التجربة باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS V.17 حيث تم حساب الفروق المعنوية باستخدام اختبار One Way ANOVA، عند أقل فرق معنوي (LSD)، وعند الاحتمال 5%.

النتائج والمناقشة

تقدير نسب الإصابة على النباتات

بينت النتائج (جدول 1) تفاوتاً في متوسط نسب الإصابة بين كل من معاملات التركيزات الثلاثة المختبرة ومعاملة الشاهد، حيث بلغ متوسط نسبة إصابة شتول البندورة بيرقات الآفة في اليوم الأخير للتجربة (اليوم السابع) على نباتات الشاهد 95%، في حين لم يتجاوز متوسط نسب الإصابة للنباتات المعاملة بالتركيزات 10^8، 10^6 و 10^4 بوغ/مل 42، 50 و 57%، على التوالي. بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين معاملة الشاهد والمعاملة ذات التركيز 10^4 بوغ/مل، بينما وجد فرق معنوي بين كل من معاملة الشاهد والمعاملات الأخرى، كما وجدت فروق معنوية بين المعاملات ذاتها بالتركيزات الثلاثة المختبرة، التركيز 10^8 بوغ/مل والمعاملتين الأخريين، والتركيز 10^6 بوغ/مل مع التركيز 10^4 بوغ/مل.

حساب قيمة التركيز القاتل النصفي LC_{50}

قدرت النسبة المئوية لموت اليرقات في اليوم الأخير للتجربة (السابع) حيث بلغت 100، 67 و 60% للتركيزات 10^8، 10^6 و 10^4 بوغ/مل، على التوالي، وصححت بالنسبة لنسبة الموت في معاملة الشاهد والتي بلغت 4%. تم حسب اللوغاريتم العشري للتركيزات المدروسة وذلك لإيجاد معامل الانحدار لقيم البروبيت مع اللوغاريتم العشري للتركيزات المدروسة (جدول 2).

حسبت قيمة LC_{50} عند قيمة بروبيت 5 التي تقابل 50%، وعوض في معادلة الارتباط الخطي فتبين أن x=5.48 بالتالي: $LC_{50}=3\times10^5$ بوغ/مل وهو التركيز القاتل النصفي من المعلق البوغي والذي يؤدي لقتل نصف مجتمع الآفة (شكل 1).

تتفق نتائج هذا البحث مع نتائج دراسة سابقة (7) استخدمت فيها عزلة من الفطر *B. bassiana* بتركيز 10^6 بوغ/مل وسببت موتاً بنسبة 50.8 و 43.3 % ليرقات الحشرة بالعمر الأول والرابع على التوالي، كما اتفقت مع نتائج (14) حيث تمت دراستهم بالتركيز 10^8 بوغ/مل على يرقات العمر الثالث وسببت نسبة موت بلغت 95% بعد 10 أيام من العدوى. وبين عزيز وآخرون (1) تأثير الفطر *B. bassiana* في موت الأعمار اليرقية المختلفة لحشرة *T. absoluta* والتي بلغت 77.78، 72.51، 76.74، 78.92 % لكل من الأعمار اليرقية الأول والثاني والثالث والرابع، على التوالي. بينت نتائج هذا البحث بأن الفطر *B. bassiana* من عناصر المكافحة الحيوية الواعدة في خفض كثافة مجتمعات حافرة أوراق البندورة/الطماطم والحد من أضرارها.

جدول 1. تقدير النسب المئوية لإصابة نبات البندورة بيرقات *T. absoluta* بعد رشها بالمعلق البوغي للفطر *B. bassiana*

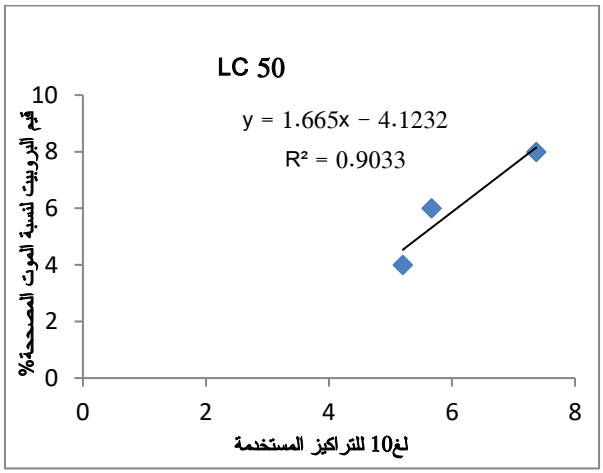
Table 1. Infestation rates of tomato plants with *T. absoluta* larvae after spraying with different concentrations of *B. bassiana*

المعاملة (أيام بعد المعاملة) Treatment (days after application)	متوسط النسبة المئوية للإصابة (%) Mean infestation rate %			
	التركيز 10^8 بوغ/مل Concentration 10^8 spore/ml	التركيز 10^6 بوغ/مل Concentration 10^6 spore/ml	التركيز 10^4 بوغ/مل Concentration 10^4 spore/ml	الشاهد Control
1	49	48	65	47
4	53	51	67	59
6	43	51	59	73
7	42	50	57	95
المتوسط ± الانحراف المعياري Mean ± Standard Derivation	5.19±46.75 d	1.41±50 c	4.76±62 ab	20.62±68.5 a

قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% = 16.81 LSD at 5%= 16.81

المتوسطات التي يتبعها أحرف متشابهة ضمن السطر الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند احتمال 5%

Means followed by the same letters in the same row are not significantly different at P=0.05



شكل 1. معامل الانحدار لنسبة الموت المصححة

Figure 1. Regression Coefficient of the corrected mortality rate

جدول 2. متوسط نسب الموت المصححة وقيم البروبيت للتركيزات المستعملة من الفطر *B. bassiana*

Table 2. Average corrected mortality rates and probit values of the tested concentrations of the fungus *B. bassiana*

التركيز Concentration	لوغ 10 للتركيز Log concentration	متوسط نسبة الموت المصححة (%) Average corrected mortality rate	probit
10^8	8	100	7.37
10^6	6	75	5.67
10^4	4	58	5.2
الشاهد	-	-	-

Abstract

Ahmed, M., I. Ghazal, L. Rajab and A. Haj Hasan. 2017. Efficacy of a local isolate of *Beauvaria bassiana* (Bals.) Vuil. on the mortality of tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick) larvae. Arab Journal of Plant Protection, 35(1): 1-5.

A study was carried out in the laboratory to evaluate the potential of three different concentrations of *Beauveria bassiana*, isolated from local soils using "Galleria bait method", on larvae of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (2nd and 3rd instars). Mortality rate reached 100, 76 and 60% for the concentrations 10^8, 10^6 and 10^4 spore/ml, respectively, 7 days after application, compared to 4% for the control treatment. Average infestation rate of tomato plants after treating the larvae with the fungus was 57, 50 and 42% when 10^8, 10^6 and 10^4 spore/ml concentrations were used, respectively, compared to 95% for the control treatment. Statistical analysis showed significant difference between the 1st and 2nd concentrations and the control treatment, whereas insignificant difference was obtained between concentration 10^4 spore/ml treatment and the control. LC_{50} was calculated to be 3×10^5 spore/ml.

Keywords: *Beauveria bassiana, Tuta absoluta*, potential, entomopathogen.

Corresponding author: Lobna Rajab, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria, Email: lobnarajabbassiana@gmail.com

المراجع

1. **عزيز، خضير عباس، صباح لطيف علوان، سعدي محمد هلال وعلي عبد الحسين كريم.** 2012. المكافحة الحيوية لعثة الطماطة الأمريكية الجنوبية *T. absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gellichiidae) مختبرياً. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية، 4: 195-209.
2. **أحمد، محمد، صباح المغربي وأمل حاج حسن.** 2011. حصر الفطور الممرضة للحشرات في ترب نظم بيئية وزراعية مختلفة في محافظة اللاذقية. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 171-178.
3. **Abbott, W.S.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265- 267.
4. **Boucias, D.G., J.C. Pendland and J.P. Latge.** 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1795-1 805.
5. **EPPO.** 2005. EPPO datasheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. EPPO Bulletin, 35: 434-435.
6. **EPPO.** 2010. First report of *Tuta absoluta* in Bulgaria (2010/002). EPPO Reporting Services 1(002). Paris: European and Mediterranean Plant Protection Organization.

References

7. **Giustolin, T.A., J.D. Vendramin, S.B. Alves and S.A. Vieira.** 2001. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genotipos de tomateiro. Neotropical Entomology, 30: 417-421.
8. **Lacey, L.A.** 2012. Manual of techniques in invertebrate pathology. Second edition. Elsevier Ltd, USA. 513 pp.
9. **Li, Z.** 1987. A list of the insect hosts of *Beauveria bassiana*. First Natl. Symp. Entomogenous Fungi, Gongzhuling, Jilin, People's Republic of China. Crop Protection, 26: 1830-1839.
10. **MacLeod, D.M.** 1954. Investigations on the genera *Beauveria Vuill.* and *Tritirachium Limber*. Canadian Journal of Botany, 32: 818-890.
11. **Medeiros, M.A., N.J. De Vilela and F.H. Franca.** 2006. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. Horticultura Brasileira, 24: 180–184.
12. **Mederios, M.A., G.L. Villas Boas, O.A. Carrijo, N. Makishima and N.J. Vilela.** 2005. Manejo Integrado da Traca- do- Tomateiro em ambiente protegido, EMBRAPA, Brasilia, Circular Tecnica, 10 pp.

(Homoptera: Aphididae) and their predator *Coleomegilla maculata* lengi (Coleoptera: Coccinellidae). Phytoprotection, 81: 15-22.

17. **Tropea Garzia, G., G. Siscaro, A. Biondi and L. Zappalà.** 2012**.** *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. OEPP/EPPO Bulletin, 42: 205-210.
18. **USDA.** 2011. Federal import quarantine order for host materials of tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick)**.** SPRO#DA-2011-12. United States Department of Agriculture, Plant Protection and Quarantine.
19. **Villas Boas, G.L., M. Castelo Branco and M.A. Medeiros.** 2005. Novas formas de manejo integrado da Traca-do- Tomateiro. ComunicadoTecnico, EMBRAPA, n. 99, Brasilia, DF, 5 pp.
13. **Meyling, N.V.** 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Manual for isolation of soil borne entomopathogenic fungi. Deliverable 5.1, VegQure, DARCOF III: Research in Organic Food and Farming (FØJO III), Denmark. p.18.
14. **Rodríguez, M., M. Gerding and A. France**. 2006. Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate, Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). Agricultura Técnica (Chile) 66: 159-165.
15. **Sung, G.-H., N.L. Hywel-Jones, J.-M.Sung, J. J. Luangsa-ard, B.Shrestha & J.W Spatafora.** 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology, 57: 5-59.
16. **Todorova, S.I.** 2000. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolates toward *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Myzus persicae*

Received: January 28, 2016; Accepted: December 10, 2016

تاريخ الاستلام: 2016/1/28؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/12/10