التغيرات النسجية في يرقات وبالغات بعوض *Culex pipiens pipiens* المتسببة عن الإصابة بفطر *Beauveria bassiana*

*هالة هيثم محمد علي** *حسام الدين عبد الله محمد***

استلام البحث 1، ايلول، 2008
قبول النشر 12، حزيران، 2011

الخلاصة:

هدفت الدراسة إلى تسليط الضوء على التغيرات النسجية التي يحدثها فطر *Beauveria bassiana* ليرقات وبالغات بعوضة *Culex pipiens pipiens*. إذ تمت معاملة يرقات الطور الرابع والبالغات بتخفيف 10^{-4} بوغ/مل من المعلق الفطري, وبعد 96 ساعة من المعاملة،أخذت عينات ليرقات وبالغات مصابة لإجراء الدراسة النسجية. أظهرت نتائج الدراسة النسجية إن الفطر يهاجم طبقة الكيوتكل والبشرة والأجسام الدهنية محدثاً تغييرات نسجية كبيرة فيها ثم يغزو الجهاز الهضمي بغزارة. وبعد 120 ساعة من التعريض تبدو الحشرة المصابة مثل كتلة بيضاء مغطاة بشبكة كثيفة من الخيوط الفطرية مؤدية إلى موتها ، وهذا مايؤشر ان فطر *B.bassiana* يمكن ان يكون فعالا في الاستخدام لإغراض السيطرة الحياتية لهذا النوع من البعوض.

الكلمات المفتاحية:*Culex pipiens pipiens ,Beauveria bassiana*

المقدمة:

يُعد البعوض احد أعداء الإنسان والحيوان لدوره في نقل العديد من الإمراض الخطيرة مثل مرض الحمى الصفراء Yellow fever والملاريا Malaria وفيروسات West Nile Virus(WNV),Eastern Equine Encephalitis(EEE) والتي تسبب مرض السحايا وغيرها من الأمراض التي تشكل في مجملها تهديداً للإنسان والبيئة المحيطة به. لذلك استخدمت العديد من المبيدات الكيمائية للسيطرة على البعوض ، وعلى الرغم مما قدمته هذه المبيدات من نجاحات كبيرة في السيطرة على مسببات الأمراض فان استمرار استخدامها ولد مقاومة لهذه المبيدات لدى العديد من الأنواع فضلا عن كونها أصبحت عاملا يساعد على تلويث التربة والغذاء والهواء ومن ثم إحداث تأثيرات ضارة للإنسان والحيوان والنبات[1]. ولأجل ذلك لجأت العديد من الدراسات إلى استخدام طرائق المكافحة الحيوية ، فقد استخدمت الفطريات في مكافحة البعوض و بضمنها فطر *Beauveria bassiana* وهو من أوائل الفطريات الممرضة للحشرات،كونه يسبب مرض White Muscardine الذي ينتشر على مدى واسع من العوائل في أنحاء العالم. ينتمي هذا الفطر إلى شعبة الفطريات الناقصةDeueteromycetes ويمتاز بقابليته على الالتصاق واختراق الكيوتكل والتضاعف داخل جسم العائل واستنزاف مغذياته، فضلاً عن أطلاقه للتوكسينات التي تتداخل ليس مع تطور العائل فقط وإنما مع الجهاز الدفاعي المناعي للعائل [3,2]. فقد ذكر[4] بان فطر *B.bassiana* أعطى نسب قتل عالية ضد يرقات الطور الرابع لبعوضة *C.Pipiens* ، وذكر[5] بان كونيديات الفطر فعالة ضد يرقات بعوضة *C.quiquifasciatus* و *Anophele stephensi*. لذلك هدفت الدراسة إلى دراسة التغيرات النسجية لليرقات والبالغات المصابة بالفطر والتعرف على مواقع الإصابة.

المواد وطرائق العمل:

1. تربية البعوض

استخدم خلال الدراسة الحالية سلالة مختبرية لبعوض *C. pipiens pipiens* والتي تم الحصول عليها من مركز السيطرة على الأمراض الانتقالية التابعة لوزارة الصحة، وضعت الأدوار غير البالغة (اليرقات) في أواني بلاستيكية سعة 500مليلتر تحوي على 400 مليلتر ماء حنفية (tap water) متروك لمدة 72 ساعة، وضعت أواني التربية في حاضنة نظيفة ومعقمة بدرجة حرارة 27±2مْ ورطوبة نسبية 70-80% وإضاءة 12 ساعة يومياً. غذيت اليرقات بإضافة 0.05غم من عليقة الفئران (mice-chow) ناعم جداً. ، بينما وضعت العذارى المتحولة في إناء بلاستيكي نظيف سعة 500مليلتر يحتوي على 400 مليلتر ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة. وضع الإناء في أقفاص تربية مكعبة الشكل ذات أبعاد 30×30×30 سم ، القاعدة من الخشب والأوجه الأربعة من المشبك المعدني والوجه الأخير مغطى بقماش التول ذي فتحات

*قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد
** قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة بغداد

صغيرة جداً لا تسمح بخروج الحشرة، وضعت اقفاص التربية في حاضنة ذات درجة حرارة 25±2مْ ورطوبة نسبية 70-80% وإضاءة 12 ساعة يومياً، غذيت الإناث والذكور حديثة البزوغ بوضع قطنه مشبعة بمحلول سكرّي 10% في طبق بتري داخل القفص لتغذية الحشرات وحصولها على الطاقة الضرورية للطيران والنشاطات الحياتية الأخرى[8,7,6]. شخصت سلالة البعوض المختبرة من مركز السيطرة على الأمراض الانتقالية / وزارة الصحة على أنه النوع *C. pipiens pipiens* تم الاستناد الى هذه السلالة لاطوال مدة البحث .

2. تهيئة وتنمية مستعمرة الفطر *B. bassiana*

تم الحصول على مستعمرة الفطر *B. bassiana* BJH-12.3 من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة/ أبو غريب، نميت في أطباق بتري نظيفة ومعقمة بجهاز المؤصدة Autoclave وبدرجة حرارة 121مْ وضغط جوي 1 جو (باوند/أنج^2) ولمدة 15 دقيقة وتحتوي هذه الأطباق على الوسط الزرعي (Sabourauds Dextrose Agar) SDA مع 0.0005غم من المضاد الحيوي Streptomycin لمنع النمو البكتيري وضعت الأطباق في حاضنة بحرارة 25±1مْ ورطوبة نسبية 70-80% لمدة10-12 يوم [4].

3. تحضير المعلق الفطري

حُضِر المعلق الفطري Spore suspension على وفق ماجاء في [9] .

4. تحضير التخافيف الفطرية

حضر التخفيف الفطري conidia/ml 10^{-4} على وفق ماجاء في [3].

5. معاملة الطور اليرقي الرابع لبعوضة *C. Pipiens pipiens* بفطر *B. bassiana*

لدراسة التأثير الحيوي للفطر *B. bassiana* في الطوار اليرقي الرابع، أُخذت 10يرقات من الطور الرابع ووضعت في إناء زجاجي سعة 250 مليلتر نظيف ومعقم بجهاز التعقيم، يحتوي على 100 مليلتر من التخفيف، كررت التجربة ثلاث مرات للتخفيف ومثلها للسيطرة، أضيف لكل المكررات 0.01غم من غذاء اليرقات.

6. معاملة بالغات بعوضة *C. Pipiens pipiens* بفطر *B. bassiana*

اتبعت الطريقة المتبعة في [10] في معاملة البالغات باستخدام جهاز اختبار حساسية البالغات للمبيدات. إذ تم وضع 10 من الإناث البالغات. أعيدت التجربة ثلاث مرات للتخفيف ، وقد وضعت للمكررات كافه قطعة من القطن المشبعة بمحلول سكري بنسبة 10%.أخذت البالغات المصابة الميتة للتقطيع النسيجي بعد مرور 96 ساعة من التعريض.

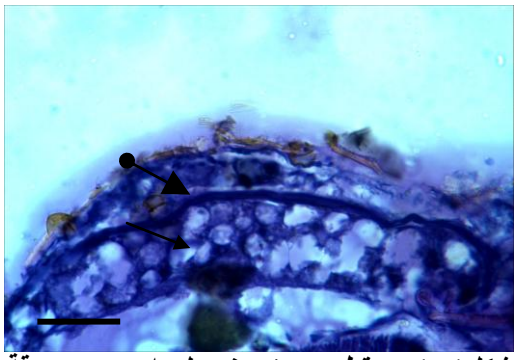
7. الدراسة النسيجية Histological Study

حضرت المقاطع النسجية للدراسة بحسب ما جاء في[13,12,11] ، اذ ثبتت العينات بفورمالين 10% لمدة 24 ساعة ونكزت بسلسلة تصاعدية من الكحولات 70% ←100%، روقت العينات بالزايلين ثم شربت العينات بشمع البرافين بعد وضعها في محلول بنسبة 1:1 من شمع البرافين والزايلين في فرن بدرجة حرارة 58-60مْ، ثم مررت بثلاث مراحل بشمع البرافين داخل الفرن. وأخيرا طمرت بالشمع المستخدم في التشريب نفسه بوضعه في قوالب خاصة، وشذبت وقطعت بمقاطع 6.0 مايكروميتر وصبغت بملون هيماتوكسيلين-ايوسين ، ثم حملت الشرائح بوساطة وسط التحميل الدائمي كندا بلسم وتركت على صفيحة دائمة للتجفيف

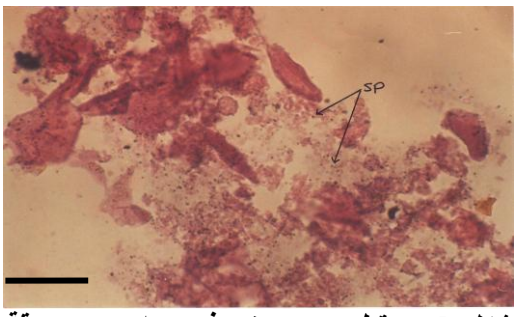
النتائج والمناقشة:

تمت دراسة التغيرات النسجية المرضية Histopathological changes، باخذ عينات من يرقات الطور الرابع المصابة بالفطر لدراستها نسيجيا Histological study وبعد فحص المقاطع النسيجية المحضرة والمصبوغة بملون الهيموتوكسلين – أيوسين، لوحظت تغيرات نسجية لليرقات المعاملة بعد 96-120 ساعة بتخفيف 10^{-4} بوغ/مليلتر، اذ أظهر الفحص أضراراً كبيرة في جميع أجزاء الجسم وخاصة في جدار الجسم، منطقة المعى المتوسط ونسيج الدم، ولوحظ أن جدار الجسم وخاصة طبقة فوق الكيوتكل Epiculticle في اليرقات مهشم ومقطع إلى قطع صغيرة، فضلاً عن وجود كتلة كثيفة من السبورات وظهور فجوات عديدة هي على الأغلب مناطق لاختراق الخيوط الفطرية (شكل1b) مقارنة بالسيطرة التي ظهر فيها الجدار غير مهشم (شكل1a)، أن الغزو الفطري لا يقتصر على أغلفة الجسم فقط بل يتعدى إلى النسيج الدهني، اذ وجد أن خلايا النسيج الدهني في اليرقات فاقدة لتخصصها الوظيفي، لانتشار السبورات عليها ، فضلا عن إفراز الفطر لإنزيم lipase الذي يعمل على هضم الأنسجة الدهنية، وكذلك تأثيره في الغشاء البلازمي للخلايا الدهنية مما يؤدي إلى تحللها واندماجها مع بعضها مكونة فجوات كبيرة متفاوتة الحجوم ضمن النسيج (شكل 2). أن التغيرات النسجية في اليرقات أمتد تأثيرها لتشمل خلايا البشرة. فقد اظهر حالة تنخر necrosis من نوع الـ Karyolysis (شكل3). أما عند أخذ مقطع في النسيج الدموي فلوحظ حدوث حالة انتفاخ swelling لنوى الخلايا الدموية وسبب الفطر أيضا تغيراً في شكل الخلايا الدموية إلى spherical shape (شكل 4b)، وهذا ما توصل اليه[14].وعند أخذ مقطع مستعرض في

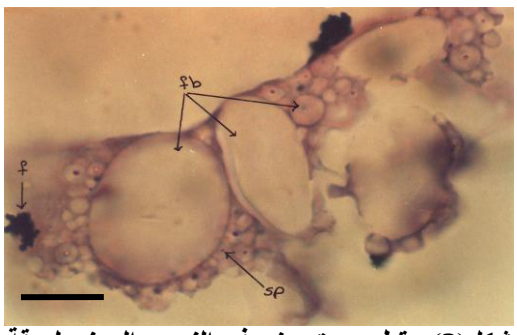
القناة الهضمية (alimentary canal) اظهر الفطر تأثيره في الطبقات العضلية مما أدى إلى تغير في سمك الطبقات العضلية مقارنة بمجموعة السيطرة فضلا عن فقدان الطبقة العضلية لمعالمها وكذلك الحال للطبقة الظهارية للمعى والناجمة عن الغزو الفطري كما في الشكل (شكل5b). ولربما تشير نتائجنا الى ان تأثير الفطر لألياف الطبقات العضلية والظهارة المعوية خير دليل على استنزاف الفطر للقناة الهضمية التي جاءت متفقة مع ما توصل اليه [15,14,2].



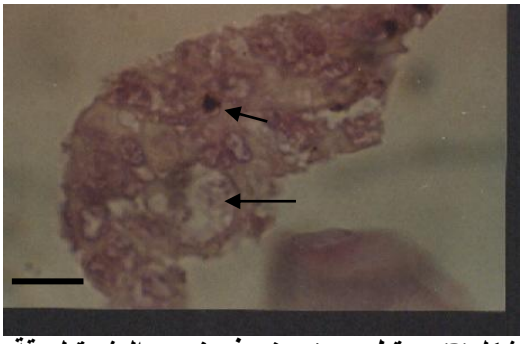
شكل(1a): مقطع مستعرض لجدار جسم يرقة سليمة، يلاحظ جدار الجسم المتكامل(↑) وللأسفل النسيج الدهني (↑) .



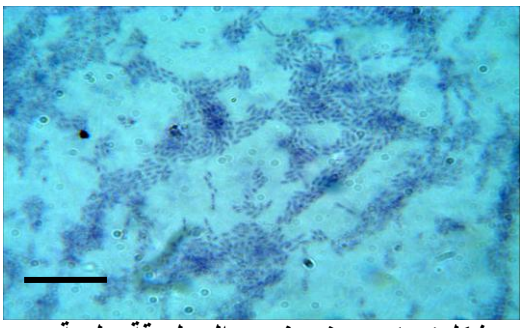
شكل(1b):مقطع مستعرض في جدار جسم يرقة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة من المعاملة يبين انتشار السبورات sp على القطع الجسمية المتقطعة .



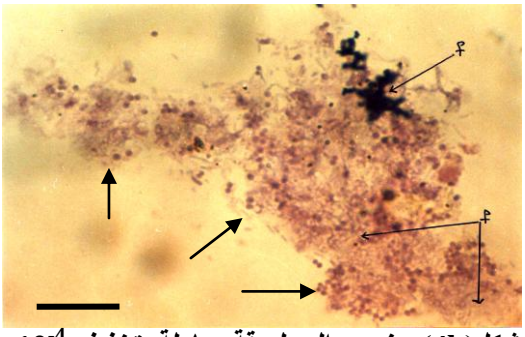
شكل(2) مقطع مستعرض في النسيج الدهني ليرقة معاملة بتخفيف 10^{-4}بعد96 ساعة، يبين انتشار السبورات(sp) داخل الأجسام الدهنية(fb)، وكذلك بداية النمو الفطري(f) .



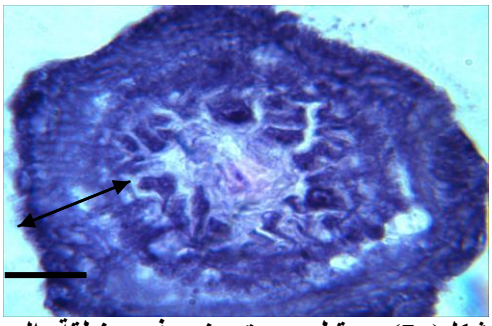
شكل(3): مقطع مستعرض في نسيج البشرة ليرقة معاملة بتخفيف 10^{-4} بعد96 ساعة، يوضح تنخر الخلايا(n) و بداية النمو الفطري(f) .



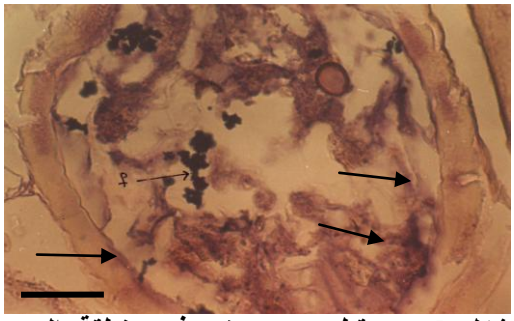
شكل(4a) : يوضح نسيج الدم ليرقة سليمة .



شكل(4b) : نسيج الدم ليرقة معاملة بتخفيف 10^{-4} بعد96 ساعة، يوضح انتفاخ الخلايا (s) والنمو الفطري(f).



شكل(5a): مقطع مستعرض في منطقة المعي المتوسط ليرقة سليمة يوضح فية الطبقة العضلية (السهم) .

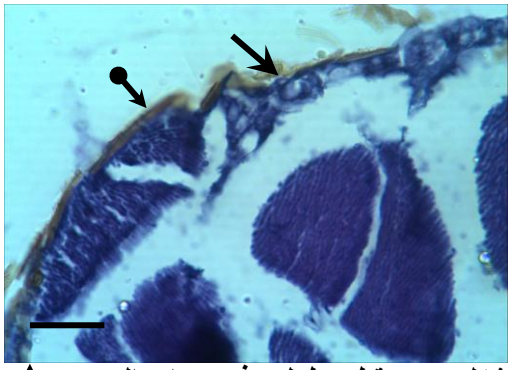


شكل(5b): مقطع مستعرض في منطقة المعى المتوسط ليرقة معاملة بتخفيف 10^{-4}بعد96 ساعة، يوضح تنخر طبقة العضلات (n) و وجود النمو الفطري داخل التجويف المعوي(f) .

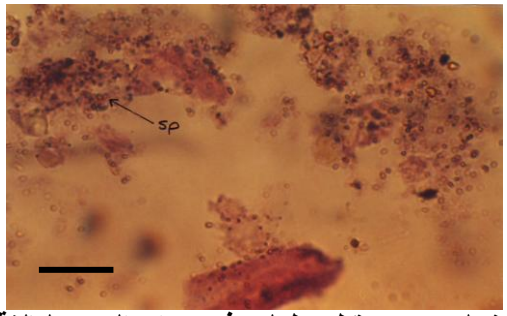
إن تأثير فطر *B. bassiana* لم يقف عند اليرقات فقط بل يتعدى ذلك ليشمل البالغات من الإناث وذلك لأن الخيوط الفطرية تستطيع اختراق طبقة الكيوتكل والانتشار داخل الجسم فقد لوحظت تغيرات نسجية كبيرة للبالغات المعرضة بتخفيف 10^{-4} بوغ /مل بعد 96-120 ساعة. اذ أظهر الفحص المجهري الدقيق أضراراً كبيرة في جدار الجسم الخارجي الذي يبدو مهشما إلى قطع صغيرة تنتشر عليها السبورات بكثافة عالية (شكل 6b). وفي أثناء موت البالغات تتحول الأجسام الهايفية إلى مايسيليم (mycelium) تنمو وتتوزع خلال جسم الحشرة وتخرج من خلال الكيوتكل للخارج، وأحيانا لوحظ بأن المايسيليم لا تبرز من الجسم بل تكون تركيباً غريباً مقاوماً ذا جدار صلب داخل جسم الحشرة [2]، اذ يتضاعف بشكل كبير ويبدأ باستنزاف المغذيات الموجودة في التجويف الجسمي والأجسام الدهنية المحيطة بالقناة الهضمية، فضلاً عن إفراز التوكسينات التي تضعف الوسائل المناعية وتعمل على تثبيطها.

كما لوحظ أن النسيج الدهني متضرر من توكسينات الفطر، إذ إن خلايا النسيج الدهني فاقدة لتخصصها الوظيفي، لانتشار السبورات عليها ، فضلا عن إفراز الفطر لإنزيم lipase الذي يعمل على هضم الأنسجة الدهنية، وكذلك تأثيره في الغشاء البلازمي للخلايا الدهنية مما يؤدي إلى تحللها واندماجها مع بعضها مكونة فجوات كبيرة متفاوتة الحجوم ضمن النسيج تنخر النسيج الدهني واندماج الخلايا مع بعضها (شكل 7). كما اظهر نسيج البشرة في البالغات تغيرات نسيجية ، إذ وجد تنخر necrosis في الخلايا واضمحلالها. فضلا عن وجود حوافظ بوغية (Sporangium) تحوي على سبورات (شكل8). ويلاحظ تأثير الحوافظ البوغية في نسيج البشرة إذ يعاني من تنخر شديد severe necrosis فقد أشار[15] إلى إن تأثير الفطر يبدو واضحا في سايتوبلازم وغشاء الخلايا البلازمي، كما لوحظ إن المحافظ السبورية لخلايا البشرة تنطلق داخل جسم الكائن الحي نحو التجويف الجسمي (شكل 8،9) [15,2].كما أظهرت المقاطع النسجية إن المحافظ السبورية تطلق السبورات داخل جسم الكائن الحي لتصيب مواقع جديدة (شكل 10). كما إن تأثير الفطر في الخلايا الدموية للبالغات مماثلٌ لتأثيره في اليرقات (شكل11). وكما هو الحال في اليرقات فقد أظهرت المقاطع النسجية للمعي في البالغات تأثيرا مماثلا، من خلال تأثيره المباشر في الطبقة الظهارية والعضلية التي تبدو فاقدة للتنظيم العضلي وأشكال الخلايا الظهارية (شكل12). وهذا يؤكد ما أشار إليه [2] بان الفطر يخترق القناة الهضمية ويفرز التوكسينات التي ترتبط مع المستلمات في جدار المعدة ومن ثم يؤدي إلى تحطيم جدار المعدة والسماح بالعديد من السبورات والبكتريا الموجودة بصورة طبيعية في المعدة من الدخول إلى مجرى الدم ومن ثم يحدث الموت في غضون 1-2 يوم فقط [2].

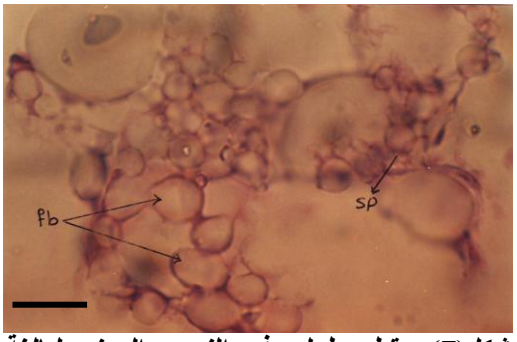
فضلا عن إن تمزق الأغشية الخلوية ناجم عن تنخر النسيج الذي يؤدي إلى إذابة الأغشية الخلوية للجسيمات الحالة التي تحتوي على أنزيمات الـ lipase و carbohydrase و protease ومن ثم أطلاق هذه الأنزيمات التي تحلل أغشية العضيات الأخرى والجسيمات الحالة الأخرى مؤدياً بذلك إلى سلسلة من الخلايا الميتة [15].



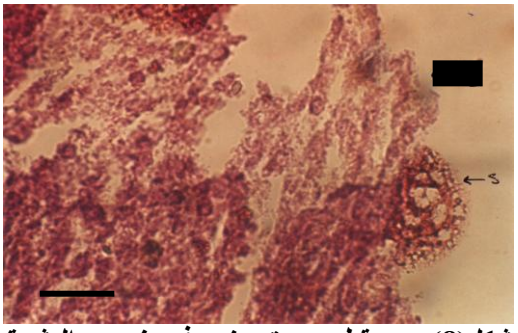
شكل(6a):مقطع طولي في جدار الجسم( ) والنسيج الدهني ( ) ليرقة سليمة .



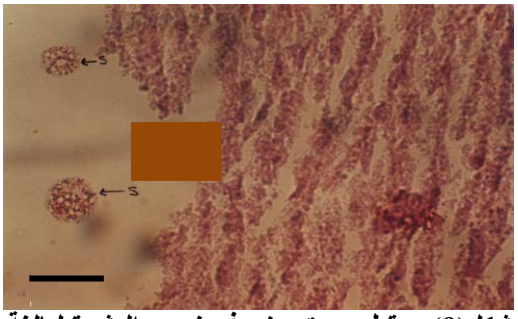
شكل(6b): مقطع طولي في جدار الجسم لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد 96 ساعة، يبين انتشار السبورات(sp) على جدار الجسم المتكسر.



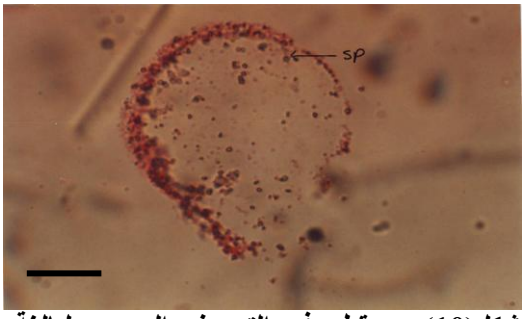
شكل(7) مقطع طولي في النسيج الدهني لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة،يوضح تضرر الأجسام الدهنية (fb) بتوكسين الفطر فضلاً عن انتشار السبورات(sp).



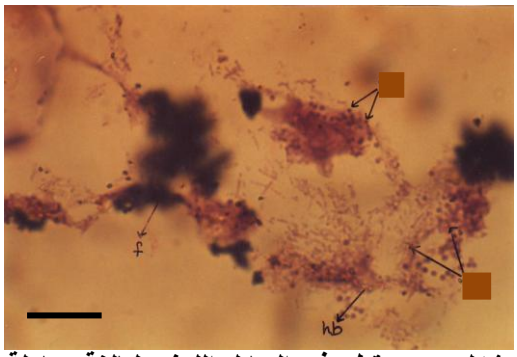
شكل(8) : مقطع مستعرض في نسيج البشرة لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة، يوضح وجود الحوافظ السبورية (s) وهي مهيأة للانطلاق باتجاه التجويف الجسمي .



شكل(9) :مقطع مستعرض في نسيج البشرة لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة، يوضح انطلاق الحوافظ السبورية(s) باتجاه التجويف الجسمي .



شكل(10) : مقطع في التجويف الجسمي لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة، يوضح الحافظة السبورية (sp) وإطلاقها للسبورات.



شكل(11) مقطع في السائل اللمفي لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4} بعد96 ساعة،يوضح انتفاخ الخلايا الدموية وانتشار الأجسام الهايفية (hb)، ونمو كثيف لمستعمرة الفطر(f) .

شكل(12) مقطع طولي في منطقة المعى المتوسط لبالغة معاملة بتخفيف10^{-4}بعد96 ساعة، تنخر الطبقة العضلية (n).

المصادر:

1. Rajkumar, S. and Japanesan, A. 2005. Oviposition detterent and skin repellent activities of *Salanum trilobatum* leaf extract against the material vector *Anopheles stephensi*. J. Insect. Sci. 5(15): 1-3
2. Boucias, D.G. and Pendland , J.G. 1998. Principles of Insect pathology. Kluwer Academic

publisher. Boston/ Dordreant London. P. 537.

3. Lacey, L.A. 1997. Manual of techniques in Insect pathology (Biological techniques). Academic press. Sadiego. London. Boston. P:408.

4. Clark, T.B.; Kellen, W.R.; Fukuda, T. and Lindegren, J.E. 1968. Field and labrotary studies on the pathologicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. J. Invert. Pathol. 11(1): 1-7.

5. Geetha, I. and Balaraman, K. 1999. Effect of entomo pathogenic fungus *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. J. Indian. Exp. Biol. 37(11) :1148-50.

6. Sivagnaname, N. and Kaly Anasundaram, M. 2004. Laboratory Evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (family: rutaceae) against immature stayes of mosquitoes and Nontarget organisms. J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.99 (1):115-8.

7**.** Al- Faisal, A.H. and Zayia. H.H. 1986. Effect of different temperature on some various biological aspect of *Culex pipiens quinquefasciatus*. Say. J. Biol. Sci. Res. Baghdad. 17(1) : 69-76.

8. Service, M.W. 1993. Mosquito (culicidac) chapter 5. cited in medical Insect and arachnid. Ed. Richard, P-Plan and Roger, WC Rossky. Published by Chapman and Hall 15 B. P:422.

9. Kirkland, B.H.; Westwood, G.S. and Keyhani., N.O. 2004 Pathogenicity of Entomo pathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* anisopliae to Ixodidae Tick species. *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodus scapularis*. J. Med. Entomol. 41(4) : 705-711.

10. WHO. 1981.Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes organochloride , organophosphate, and carbamate insecticide-diagnostic test. WHO/VBC/81-806:7p

11.الحاج، حميد احمد 1998. التحضيرات المجهرية الضوئية (التقانات المجهرية). الأسس النظرية والتطبيقات.مركز الكتاب الأردني، عمان، الأردن. 340 صفحة

12. Humason, G. H. 1972.Animal tissue techniques. W. H. freeman and Company San Francisco. P:641

13. Bancroft, J. 1982. Enzyme histochemistry . In theory and practice of histological techniques Bancroft and Stevens A.2nd edition. Churchill livingstone, London. P:3374-105

14. Miranpuri, G.S. and Khachattourians, G.G. 1991. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Entomol. Exp. Appl. 59(2):19-27.

15. Darzynkiewicz, Z. ; Juan,G. ; Li,X. ; Gorczyca,W.; Murakami,T. and Traganos,F. 1997. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). Cytometry 27:1–20.

Histological study of *Culex pipiens pipiens* larvae and adults infected with *Beauveria bassiana*

Hala Haitham Mohamed Ali* ***Hussam Alddin Abdallaa*****

*Biology Department/College of Science for women
**Plant protection/College of Agriculture

Abstract:

This study aimed to show the histological changes that 0ccured in *Culex pipiens pipiens* larvae and adults infected with *Beauveria bassiana* . The 4^{th} instar larvae and adult mosquitoes were infected with *B.bassiana* in 10^{-4} spore/ml dilution, after 96 hours histological section was studied showing that the fungi infected all the body parts specially Cuticle , Epiderms, fat bodies and midgut. After 120 hours of exposure to the fungi the insect have a white appearance and covered with a thick coat of hyphea. Thus study shows biological control of *B .bassiana* on mosquitoes.