التداخل بين تأثير المستخلص المائي (الحار والبارد) لنبات حلق السبع الشجيري (Nees) *Adhatoda vasica* وبكتريا (Berliner) *thuringiensis Bacillus* في السيطرة على حشرة عثة التين *Ephestia cautella* Walker

حذام صالح بلاسم أياد أحمد الطويل * زاهرة عبد الرزاق عبود* علي جعفر ياس**

استلام البحث 20، كانون الاول، 2012
قبول النشر 8، اذار، 2014

الخلاصة:

تبين بعد اختبار التركيز المثبط الأدنى واختبار الحساسية عدم وجود أي استجابة تذكر من قبل البكتريا *Bacillus thuringiensis* تجاه المستخلصين المائيين الحار والبارد لنبات حلق السبع الشجيري. كما وتبين من دراسة التداخل بين تأثير المستخلصين المائيين الحار والبارد لنبات حلق السبع الشجيري وبكتريا B.t. للسيطرة على مجتمع حشرة عثة التين *Ephestia cautella* تحت ظروف مسيطر عليها بإستخدام التركيز 50% من المستخلص المائي الحار والتركيز 5×10^{-1} لبكتريا B.t. ، إن معدل هلاك اليرقات في المعاملة التي أجريت بعد إطلاق الحشرات وصلت إلى 100% بعد أسبوعين من المعاملة وذلك عند المعاملة بالمستخلص المائي الحار و البكتريا B.t. و97.3% بعد اسبوعين من المعاملة عند المعاملة بالمستخلص المائي البارد والبكتريا B.t. أما في حالة معاملة التمور قبل إطلاق الحشرات فقد هلكت جميع اليرقات في الطور الأول عند المعاملة ذاتها ، وقد أظهرت النتائج تفوق طريقة معاملة التمور قبل اطلاق الحشرات على طريقة المعاملة بعد اطلاق الحشرات حيث وصلت معدلات هلاك اليرقات في الطريقة الأولى إلى 100% في حين كانت 86.0% في الطريقة الثانية .

الكلمات المفتاحية: نبات حلق السبع الشجيري ، البكتريا *Bacillus thuringiensis* و حشرة عثة التين

المقدمة :

لا تختلف بكتريا *B.thurigiensis* عن بقية انواع الجنس *Bacillus* فهي موجبة لصبغة غرام ، عصوية الشكل مكونة للأبواغ ماعدا قدرتها على انتاج البلورات البروتينية والتي يمكن تمييزها بالمجهر الضوئي [1]والتي تكون مجاورة للبوغ في الخلية الام، ومسؤولة عن صفة السمية للحشرات ، ونتيجة لامتلاكها هذه الخاصية ركزت البحوث حولها لاجل استخدامها في مجال السيطرة البايولوجية بوصفها مبيداً للآفات الزراعية .إذ اصبحت تمثل 90% من المبيدات الحشرية المستعملة في الولايات المتحدة نظراً لعدم وجود أي تأثير سام لها على الخلايا الحيوانية حسب ماجاء في اصدار وكالة حماية البيئة الامريكية(US EPA) [2] ، كما وتعد المستخلصات النباتية مصدراً غنياً للمبيدات الحشرية لاحتوائها على مواد طارده ومانعه للتغذية أو قاتله للحشرات وقد استخدمت في جميع أنحاء العالم مبيدات حشرية ذات أصول نباتية وهي أكثر أماناً للبيئة وأقل كلفةً قياساً مع المبيدات الكيميائية [3] . تمتاز هذه المواد ذات الأصل النباتي بسميتها العالية التي لا تقل عن مثيلاتها من المبيدات الكيميائية المصنعة ، فضلاً عن تحللها السريع الى مواد طبيعيه غير سامه بعد استخدامها لمده زمنيه قصيرة و تخصصها العالي في عملها ضد نوع واحد أو عدة أنواع من الحشرات [4] ومنها نبات حلق السبع الشجيري *A.vasica* الحاوي على القلويدات مثل قلويد الفازيسينVasicine وهو من القواعد النيتروجينية إذ يمتلك فعالية فسلجية على الكائن الحي [5]. كما ويمتلك هذا النبات المواد الفعالة الأخرى مثل الكلايكوسيدات والراتنجات والمواد الصابونية والكوينونات والفلافونات والزيوت الطياره والزيوت الاساسية التي تكسب النبات مقاومة نسبية ضد الحشرات نباتية التغذية .ونظراً للأضرار الاقتصادية الكبيرة التي تسببها حشرة عثة التين *E.cautella* للتمر منذ جنيه حتى تسويقه واستهلاكه فقد تم تنفيذ هذا البحث بدراسة التداخل بين تأثير المستخلص المائي الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري وبكتيريا *Bacillus thuringiensis* للسيطرة على مجتمع حشرة عثة التمور تحت ظروف مسيطر عليها .

المواد وطرائق العمل:

مصدر الحشرة:

استخدمت في هذا البحث حشرة عثة التين *E. cautella* المرباة في مختبرات/مركز المكافحة المتكاملة/قسم المكافحة الوراثية التابع إلى دائرة

*وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البحوث الزراعية /مركز المكافحة المتكاملة/ بغداد / العراق

البحوث الزراعية /وزارة العلوم والتكنولوجيا ، على وسط غذائي إصطناعي [6].ولإكثار هذه الحشرة بشكل موسع تكفي لتنفيذ التجارب الخاصة بهذه الدراسة وضع 250 غرام من الغذاء الأصطناعي داخل عدة قناني بلاستيكية معقمة قطرها 11سنتيمتر وارتفاعها 12سنتيمتر و أطلق فيها 25 زوجاً من بالغات الحشرة (الاناث والذكور) بعمر 24 ساعة . غطيت فوهات هذه القناني بغطاء بلاستيكي في منتصفه فتحة قطرها 2 سنتيمتر لغرض التهوية مغطاة بقماش الموسلين. وضعت هذه القناني داخل حاضنة درجة حرارتها 25 ± 2 مْ ورطوبتها النسبية 60-70% ومدة إضاءة (ضوء:ظلام) 16 8 : ساعة ولمدة خمسة وعشرون يوماً ليصل البيض الذي ألقته إناث الحشرات إلى الطور اليرقي الأخير حيث تلاحظ بحالة تجوال على جدران القناني لغرض التهيؤ للتعذر .تجمع اليرقات عادة في هذه المرحلة وتنقل إلى قناني زجاجية معقمة بالأبعاد نفسها التي ذكرت في أعلاه تحوي بداخلها قطن مبثوث لتعذر اليرقات ثم للحصول على حشرات بالغة فيما بعد وهكذا تستمر التربية لأجيال متعاقبة .

جمع النبات وتشخيصه :

جمعت أوراق نبات حلق السبع الشجيري(Nees) *Adhatoda vasica* المزروع كنبات زينة في حدائق جامعة بغداد /الجادرية في شهر آذار من عام 2011 .صنف النبات من قبل استاذ علم تصنيف النبات الدكتور علي الموسوي / قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة بغداد.الذي أكد جنسة ونوعه وهو *Adhatoda vasica* .تم مراعاة جمع الأوراق في شهر آذار لضمان زيادة المواد الفعالة المطلوبه فيها ، جمعت الاوراق الفتية غير المصابة بإمراض نباتية بكتيرية أو فطرية أو فيروسية ، نظفت من الاتربة والمواد الملوثة بغسلها بالماء المقطر جيداً جففت في الظل أوبدرجة حرارة الغرفة ذات ظروف تهوية جيدة لمنع تلف النماذج .بعد ذلك وعند جفاف الاوراق جيداً طحنت بواسطة (طاحونة يدوية) ثم حفظت الاوراق المطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال [7 و 8].

تحضير المستخلصات المائية:

حُضِّرَ المستخلص المائي الحار من إضافة 500 مل ماء مقطر الى 50غم من مسحوق الاوراق ومن ثم وضع المزيج في حمام مائي هزاز عند درجة حرارة 60 مْ لمدة ساعة ثم تركَ المزيج عند درجة حرارة المختبر لكي يبرد وبعد مرور 24 ساعة رُشّح المزيج بوساطة 4 طبقات من الشاش ثم استعمل ورق ترشيح (Whattman No.4). وزع الراشح في انابيب خاصة سعة كل واحدة 10 مل وعُرضّت للطرد المركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق اهملَ الراسب واخذ الراشح وركز باستعمال جهاز المبخر الدَوار -Rotary evaporator للحصول على المستخلص المائي الجاف والذي كان وزنه 6.96 غم/50 غم.. حُضِّرَ محلول الخزن (Stock Solution) بتركيز 70% بأخذ 70غم من المسحوق الجاف للمستخلص ووضع في دورق حجمي سعة 100 مل حيث أكمل الحجم بإضافة الماء المقطر إلى 100مل . ومن هذا المحلول حُضِّرَ التركيز 50% المطلوب في دراسة الفاعلية الاحيائية Bioactivity . وبالطريقة نفسها حُضِّرَ المستخلص المائي البارد ولكن وضع المزيج على المحرك الدوار (Stirrer) لمدة ساعتين بدل الحمام المائي ثم ترك المزيج عند درجة حرارة المختبر وبعد مرور 24 ساعة أكملت خطوات تحضير المستخلص المائي البارد ، كما هو الحال مع المستخلص المائي [9] وكان وزن المستخلص المائي البارد الجاف 6 غم/ 50 غم .

تحضير التراكيز البكتيرية:

استعمل المسحوق البكتيري التجاري (*Bacillus thuringiensis* kurstaki) والمجهز من قبل (Dr.Rajan laboratories) في هذه الدراسة حيث وزن 1غم من المسحوق البكتيري وأذيب في 100 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تخفيف (0.001) من العالق البكتيري ،خفف العالق البكتيري الى سلسلة من التخافيف ،أخذت عينات من كل تخفيف وزرعت على الوسط ألزرعي الصلب Nutrient agar وحفظ في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، وذلك لحساب الوحدة المكونة للمستعمرة (colony forming unit) في 1 مل من المزرعة البكتيرية ، حيث استعملت لهذا الغرض الشريحة الزجاجية Hemocytometer.نقل 1 سم ^{3} ن المزرعة البكتيرية بوساطة الثاقب الفليني Cork borer وأضيف إلى 10مل من الماء المقطر المعقم لغرض الحصول على التخفيف 0.1 وعملت من هذا التخفيف سلسلة من التخافيف ،أخذت قطرة من كل تخفيف ووضعت وسط الشريحة الزجاجية إذ تكون مقسمة إلى مربعات مجهريه حسبت أعداد البكتريا في بعض المربعات عشوائياً وقسم العدد على المربعات للحصول على عدد الخلايا البكتيرية في المربع الواحد ، وبتطبيق المعادلة

معدل عدد الخلايا البكتيرية × مقلوب التخفيف ×(4×10^6) = عدد الخلايا البكتيرية الموجودة في 1 مل من الوسط البكتيري .

اختبار تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للبكتريا B.t باستخدام المستخلص النباتي الخام:

1-حضرت تراكيز مختلفة من مستخلصات حلق السبع الشجيري ، وذلك بعد ترشيح المستخلص المائي الخام بمرشح Millipore لغرض تعقيمة

وكانت التراكيز بالتدرج الآتي:- 8,4,2,1 ملغم /مل

2 -حضر الوسط المغذي الصلب Nutrient agar

3-أضيفت المستخلصات الخام الى الأوساط التي تم تحضيرها باستعمال التراكيز التي تم ذكرها من المستخلص المائي الخام (الحار والبارد كل على حده) ثم مزجت المحتويات جيداً وصبت في اطباق بتري وتركت لتتصلب .

4- وضع (5) ميكروليتر من المزرعة السائلة المحفوظة في Nutrient broth للبكتريا B.t وحضنت في درجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة ومن ثم تمت ملاحظة النمو ودونت النتائج .

الكشف عن تأثير المستخلص الخام باستخدام اختبار الحساسية:

لقح سطح الاكار (مولر –هنتون) باستخدام الناشر المعقم بالعالق البكتيري وعملت بعدها حفر بقطر (5) ملم على سطح الوسط المزروع باستخدام الثاقب الفليني Cork borer المعقم .نقلت تراكيز المستخلص الخام (الحار والبارد كل على حدة) وبمقدار 50مايكروليتر في كل حفرة مع بقاء حفرة واحدة بوصفها سيطرة (control) حاوية على الماء المقطر المعقم .تحدد فعالية التراكيز للمستخلص الخام بوجود أو عدم وجود منطقة تثبيط (Inhibition zone) المتكونة حول الحفرة مقدرة بالمليمتر بعد حضانة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ .

التداخل بين تأثير المستخلص المائي الحار والبارد لنبات حلق السبع الشجيري وبكتريا *Bacillus thuringiensis* في السيطرة على مجتمع حشرة عثة التين *E.cautella* تحت ظروف مسيطر عليها.

هيأ لهذه التجربة 12 صندوقاً من الزجاج العضوي بأبعاد 40×40×40 سم كما هُيَ 35 كغم من التمر الزهدي الخالي من الاصابة حيث جني حديثاً و فحصت عينات منه أخذت بصوره عشوائية للتأكد من خلوه من الاصابة فضلاً عن ذلك وضعت هذه الكمية في المجمدة لغرض قتل البيوض أو اي مرحلة من مراحل نمو حشرة عثة التين ان وجدت ، عقمت الصناديق بالكحول الاثيلي تركيز 70% وتركت لتجف ومن ثم وضع بكل صندوق 3 كغم من التمر ، نفذت التجارب بطريقتين وكالآتي :-

أولاً : اطلقت خمسة ازواج من حشرة عثة التين بعمر 24-48 ساعة وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع عوملت الصناديق الحاوية على التمور من الداخل بطريقة الرش بالمستخلصين المائيين الحار والبارد لأوراق حلق السبع الشجيري والعالق البكتيري لبكتريا B.t حيث تركت مسافة 5 سم من جميع الجهات بين التمر وجوانب الصندوق لكي نتجنب وصول المادة المستخدمة الى التمر كما انه من المعروف بأن يرقات حشرة عثة التين تلجأ الى مكان ما خارج التمرة قبل ان تتعذر [10] وكما يلي :

- المجموعة الاولى اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالمستخلص المائي الحار .
- المجموعة الثانية اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالمستخلص المائي البارد .
- المجموعة الثالثة اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالمبيد البكتيري .
- المجموعة الرابعة اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالمستخلص المائي الحار والمبيد البكتيري .
- المجموعة الخامسة اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالمستخلص المائي البارد والمبيد البكتيري .
- المجموعة السادسة اطلقت الحشرات وعند ملاحظة يرقات الطور الرابع رشت بالماء المقطر المعقم .

ثانياً :عوملت الصناديق الحاوية على التمر بالطريق الاولى المذكورة اعلاه بالمستخلصين المائيين الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري والعالق البكتيري لبكتريا B.t ومن ثم تم اطلاق خمسة ازواج من حشرة عثة التين بعمر 24-48 ساعة وكما يلي :

- المجموعة السابعة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالمستخلص المائي الحار ومن ثم اطلقت الحشرات .
- المجموعة الثامنة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالمستخلص المائي البارد ومن ثم اطلقت الحشرات .
- المجموعة التاسعة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالمبيد البكتيري ومن ثم اطلقت الحشرات .
- المجموعة العاشرة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالمستخلص المائي الحار والمبيد البكتيري ومن ثم اطلقت الحشرات .
- المجموعة الحادية عشرة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالمستخلص المائي البارد والمبيد البكتيري ومن ثم اطلقت الحشرات .
- المجموعة الثانية عشرة : رشت الصناديق الحاوية على التمور بالماء المقطر المعقم ومن ثم اطلقت الحشرات .

اختير التركيز القاتل في التجارب المختبرية للمستخلص المائي الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري وللعزلة البكتيرية على الاطوارالبرقية لتنفيذ التجربة الريادية .وضعت الصناديق جميعها في غرفة تربية الحشرات عند درجة حرارة 26±1 مْ ورطوبة نسبية 60-70 % ومدة اضاءة (ضوء:ظلام) 16:8ساعة كررت التجربة 3 مرات .

حُسِبَ عدد التمر المصاب سواء باليرقات أو ببرازها وأعداد اليرقات الميتة والمتحولة إلى عذارى والبالغات التي بزغت من العذارى بعد (3، 7، 14) يوماً من تاريخ الاصابة للمعاملات التي

اجريت بعد إطلاق الحشرات ومشاهدة الطورالبرقي الرابع وذلك بفحص 100 تمرة عشوائياً من صناديق المعاملة في كل فحص . أما المعاملات التي اجريت قبل إطلاق الحشرات ،تركت الصناديق لمدة تتراوح بين 21–30 يوماً ثم فحص جميع التمرالمعامل بعد ملاحظة يرقات الطور الرابع.

التحليل الإحصائي :-

اتبع التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D) في تنفيذ التجارب وصححت نسب الهلاك المئوية للقتل استنادا الى معادلة أبوت (Abbott formula) [11] والمعروفة بأسم المعادلة (Schneider-Orelli formula) [12 و13] والتي تنص:-

$$\% \text{ الهلاك} = \frac{\text{الهلاك في المعاملة} - \text{الهلاك في السيطرة}}{100 - \text{الهلاك في السيطرة}} \times 100$$

وحددت معنوية الاختلافات ما بين المعدلات باستعمال اختبار دانكن متعدد الحدود Duncan Multipel Range Test عند مستوى الاحتمالية $P\leq 0.05$ [14] وبأستعمال البرنامج الاحصائي الجاهز (Spss) .

النتائــج والمنــاقشة:

-اختبار تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للبكتريا *B. thuringiensis* باستخدام المستخلص النباتي الخام لاوراق نبات حلق السبع الشجيري :

درس تأثير المستخلصين المائيين الحار والبارد الخام لنبات حلق السبع الشجيري في العزلة التجارية *B. thuringiensis* وبعد تحديد التركيز المثبط الادنى بالمعاملة بالتراكيز 1، 2، 4، 8 ملغم/مل لوحظ عدم وجود أي استجابة تذكر من قبل البكتريا B.t تجاه هذين المستخلصين، وقد يكون السبب هوعدم وجود القلويدات في هذين المستخلصين فالقلويدات هي مركبات لا تذوب او صعبة الذوبان في الماء بصورة عامة خاصة اذا كانت موجودة في الجزء النباتي بشكل حر وغير ملحي بينما تذوب في الكحوليات لذلك نجد القلويدات لا تظهر في المستخلص المائي ولهذا السبب يستخدم الماء بشكل مزيج في عمليات الاستخلاص [15] .

وكما بين البالاني [5] في دراسته حول تأثير قلويد الفازيسين (Vasicine) في بعض الجراثيم المرضيةعند استخلاصه بالمذيبات الكحولية ، ان نتائج استجابة السلالات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام بصورة عامة كانت اقل تاثرا وتحسسا مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام ،كما بين ان هذا القلويد له الدور الاساس في اعطاء الفعالية المضادة للاحياء المجهرية في نبات حلق السبع الشجيري *A.vasica*ومستخلصاته النباتية الخام .

-الكشف عن تأثير المستخلص الخام باستخدام إختبار الحساسية:

اوضحت نتائج دراسة حساسية بكتريا B.t للمستخلصين المائيين الحار والبارد لاوراق نبات حلق السبع الشجيري عدم وجود مناطق تثبيط (Inhibition zone) حول الحفر التي تحوي على تراكيز المسخلصين المائيين الحار والبارد لنبات حلق السبع الشجيري ، وقد يعزى السبب الى الى عدم وجود القلويدات في هذين المستخلصين كقلويد الفازيسين كما ذكر في أعلاه .وهذه النتيجة هي الاولى من نوعها حيث لم نلاحظ اجراء اختبار التضادية للمستخلص الخام لنبات حلق السبع الشجيري في المصادر بينما اشارت المصادر الى اختبار MIC [5 و 15] .

-التداخل بين تأثير المستخلصين المائيين الحار والبارد لنبات حلق السبع الشجيري وبكتريا *B.thuringiensis* للسيطرة على مجتمع حشرة عثة التين *E.cautella* وتحت ظروف مسيطر عليها :

إن النتائج المشار اليها في أعلاه مهمة جداً لتنفيذ تجربة التداخل بين تأثير المستخلصين المائيين الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري وبكتريا .B.t في السيطرة على مجتمعات حشرة عثة التين وتحت ظروف مسيطر عليها . وفي ادناه النتائج التي سجلت من هذه الدراسة.

إطلاق حشرات عثة التين *E.cautella* قبل معاملة التمر بالمستخلص النباتي والعالق البكتيري حتى مشاهدة الطور اليرقي الرابع :

اختير التركيز القاتل لليرقات من التجارب المختبرية الذي وصلت نسبة القتل فيه إلى 100% للمستخلص المائي الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري والذي كان بتركيز 50% كما اختيرت العزلة البكتيرية وبالتركيز 5×10^{-1} في تنفيذ التجارب لكفائتها وتفوقها في قتل الاطوار اليرقية وكما بينت ألساعدي [16] . يبين الجدول (1)تأثير المعاملات المختلفة والتي تشمل البكتريا .B.t ، والمستخلص المائي البارد لاوراق نبات حلق السبع الشجيري ، المستخلص المائي الحار لنبات حلق السبع الشجيري ، والمعاملات المشتركة وهي المستخلص المائي البارد +البكتريا .B.t ، المسخلص المائي الحار +البكتريا .B.tعلى التمر المصاب بيرقات حشرة عثة التين *E.cautella* إذ تبين هذه النتائج ومن خلال التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين معاملة المستخلص المائي البارد والمعاملات الاخرى وبينها وبين معاملة السيطرة Control في نسبة التمر المصاب بعد ثلاثة ايام من المعاملة سواء باليرقات او ببرازها ، في حين لم تظهر فروق معنوية بين المعاملات

نفسها وبينها وبين معاملة السيطرة Control بعد سبعة ايام من المعاملة اما بعد اسبوعين من المعاملة فلم تظهر فروق معنوية بين المعاملة B.t. والمعاملات الاخرى والتي هي المستخلص المائي البارد والمستخلص المائي الحار ومعاملة المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.كما لم تظهر فروق معنوية بين معاملات المستخلص المائي البارد والمستخلص المائي الحار والمستخلص المائي البارد +البكتريا B.t. والمستخلص المائي الحار +البكتريا B.t ولكن اختلفت معاملة المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t. عن معاملة البكتريا B.t. وعن معاملة السيطرة في نسبة التمر المصاب .ويعود السبب في ارتفاع نسب الاصابة في التمرهونتيجةلإطلاق الحشرات قبل اجراء المعاملات المذكورة في اعلاه والى حين ظهور الطور اليرقي الرابع .وبين الجدول ذاته عدم وجود فروق معنوية بين معاملة البكتريا B.t. ومعاملة المستخلص المائي الحار في معدل نسب اليرقات الميتة بعد ثلاثة أيام من المعاملة في حين اختلفت جميع المعاملات معنوياً في ما بينها وكذلك اختلفت جميعاً عن معاملة السيطرة Control ، حيث كان أعلى معدل لنسبة اليرقات الميتة بعد ثلاثة ايام من المعاملة 88.4% في المعاملة المستخلص المائي الحار+البكتريا B.t. في حين كان أقل معدل لنسبة اليرقات الميتة في معاملة المستخلص المائي البارد حيث كانت 40.0% مقارنةً مع معاملة السيطرة والتي كانت 2.6% واظهرت النتائج بعد سبعة ايام من المعاملة عدم وجود فروق معنوية في معدل اليرقات الميتة بين المعاملتين (بكتريا B.t.) والمعاملة (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.) وكذلك عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.)و(المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t) في حين اختلفت المعاملات الاخرى معنوياً في ما بينها وكذلك اختلفت جميعها معنوياً عن معاملة السيطرة Control فكان أعلى معدل لموت اليرقات في المعاملة(المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) وهي 97.2% وأقل معدل لموتاليرقات في المعاملة(المستخلص المائي البارد)حيث كانت 46.3% مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي كانت 1.3% .اما بعد اسبوعين من المعاملة فأظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين المعاملة بكتريا B.t. والمعاملات (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.) و(المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) في معدل موت اليرقات ،كما اختلفت المعاملتين (معاملة المستخلص المائي البارد ومعاملة المستخلص المائي الحار) معنوياً في معدل موت اليرقات واختلفت جميع المعاملات معنوياً عن معاملة السيطرة Control فكان أعلى معدل لموت اليرقات 96.9% ، 96.9% و 96.8% عند المعاملات (مستخلص مائي بارد +B.t.)، معاملة بكتريا B.t. ، (معاملة المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) على التوالي .في حين كان أقل معدل لموت اليرقات 47.4% عند معاملة المستخلص المائي البارد ، مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي كانت 1.9% .وبين الجدول (1) نفسه عند مستوى الاحتمال $P \leq 0.05$ عدم وجود فروق معنوية في معدل اليرقات المتحولة الى عذارى بعد ثلاثة ايام من المعاملة بين المعاملات وكذلك عدم وجود فروق معنوية بين جميع المعاملات ومعاملة السيطرة Control ، ويعود السبب الى ان اليرقات الحية لم تكمل الدور اليرقي لتتحول الى عذارى في هذه المدة الزمنية ، اما بعد سبعة ايام من المعاملة فلم تظهر فروق معنوية بين معاملة البكتريا B.t. ومعاملة المستخلص المائي الحار ومعاملة (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.) كذلك لم تظهر فروق معنوية بين معاملة البكتريا والمعاملات (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.)و (المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t) وظهرت فروق معنوية بين معاملة المستخلص المائي البارد ومعاملة المستخلص المائي الحار ومعاملة (المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) كما اختلفت جميع المعاملات عن معاملة السيطرة Control في معدل تحول اليرقات الى عذارى بعد سبعة ايام من المعاملة فكان أقل معدل لليرقات المتحولة الى عذارى عند معاملة (المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) والتي كانت 2.8% واعلى معدل في معاملة المستخلص المائي البارد والتي كانت 47.0% مقارنةً بمعاملة السيطرة Control والتي بلغت 98.8% . اما بعد اسبوعينمن المعاملة فلم تظهر فروق معنوية بين المعاملة بكتريا B.t. ومعاملة المستخلص المائي الحار والمعاملتين (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t.)و(المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) في معدل اليرقات المتحولة الى عذارى واختلفت معاملة المستخلص المائي البارد معنوياً عن جميع المعاملات كما اختلفت جميع المعاملات معنوياً عن معاملة السيطرة Control فكانت 12.3% عند معاملة المستخلص المائي البارد و 0.9% عند المعاملة بكتريا B.t. مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي بلغت 19.3% واظهر الجدولنفسه عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات وكذلك بينها وبين معاملة السيطرةControl في معدل البالغات البازغة بعد ثلاثة ايام وبعد سبعة ايام من المعاملة ويعود السبب في ذلك الى ان العذارى لم تكمل الدور العذري في هذه المدة لأجل بزوغ البالغات اما بعد اسبوعين من المعاملة فقد اختلفت معاملة المستخلص المائي البارد معنوياً عن المعاملات الاخرى في معدل البالغات البازغة و

كذلك اختلفت جميع المعاملات معنوياً عن معاملة السيطرة Control فكان اعلى معدل للبالغات البازغة عند المعاملة بالمستخلص المائي البارد وهو 39.6% في حين كان أقل معدل للبالغات البازغة عند معاملة (المستخلص المائي الحار +البكتريا B.t.) مقارنةً مع السيطرة Control والتي بلغت 79.2% . ومن هذا نستنتج انالمعاملات المشتركة للمستخلصات والبكتريا معاً أظهرت تفوقاً في معدلات موت اليرقات على كل من المعاملة بالبكتريا B.t. لوحدها وكذلك على كل من المعاملتين التاليتين المستخلص المائي البارد والمستخلص المائي الحار لأوراق نبات حلق السبع الشجيري وذلك بعد ثلاثة ايام وسبعة ايام من المعاملة في حين اظهرت المعاملة بكتريا B.t مع المعاملات المشتركة تفوقاً في موت اليرقات بعد اسبوعين من المعاملة .

وبين Manjunath [17] ان البروتين البلوري عالي التخصص في تأثيره. ويختلف التأثير السمي للبلورة البروتينية حسب عمر اليرقة [18] .وتختلف الاصابة بهذه البكتريا عن الاصابة بالمبيدات الكيمياوية اذ يجب ان ترش الاغذية أو تعفر بالبكتريا لكي تستهلكها اليرقات لكون بكتريا.B.t لاتنفذ من خلال جليد اليرقات [19] .

وقد اوضح Amiri Besheli [20] ان كفاءة البكتريا B.t تزداد بزيادة التركيز ومدة التعريض عند مكافحته ليرقات حشرة الحمضيات *Phyllocnistis citrella*في الطورين اليرقيين الثاني والثالث .كما اوضحت نتائجه زيادة في هلاك اليرقات بصورة معنوية عند استعمالةبكتريا . B.tبأعلى تركيز لها في دراسته مع الزيوت الطيارة كمعاملة مشتركة .وقد عزى الزيادة في هلاك اليرقات عند استعماله للمعاملات المشتركة الى ان الزيوت تؤدي الى المساعدة في نفاذ البكتريا من خلال اوراق الحمضيات التي تتغذى عليها اليرقات .

جدول (1) معاملة التمر بالمستخلصين المائيين الحار والبارد والعالق البكتيري قبل اطلاق حشرات عثة التين *E.cautella*

نوع المعاملة	النسبه المئويه للتمر المصاب ±S.E بعد		
	3 أيام	7 أيام	14 يوماً
البكتريا .Bt	a 0.7±99.3	a 1.2±98.0	b 1.2±96.7
المستخلص المائي البارد	b 1.5 ±94.3	a 1.2±98.0	ab 0.6 ±99.0
المستخلص المائي الحار	a 1.0 ±99.0	a 0.6±99.0	ab 0.3 ±99.7
مائي بارد+.Bt	a 1.2 ±98.0	a 0.7 ±99.3	ab 1.8 ±97.3
مائي حار+Bt	a 1.7± 98.3	a 1.0 ±99.0	a 0.0 ±100
Control	a 0.7 ±99.3	a 1.6 ±98.0	b 0.7 ±96.7
نوع المعاملة	النسبه المئويه لليرقات الميتة ±S.E بعد		
	3 أيام	7 أيام	14 يوماً
البكتريا .Bt	a 1.2±63.7	bc 0.9±94.2	c 0.3 96.9
المستخلص المائي البارد	d 1.4 ±40.0	d 1.4 ±46.3	c 1.5 ±47.4
المستخلص المائي الحار	c 2.9 ±67.2	c 0.6 ±92.8	b 0.7 ±92.2
مائي بارد+.Bt	b 0.4 ±83.6	ab 0.5±95.5	a 1.0 ±96.9
مائي حار+Bt	a 0.4 ±88.3	a 0.5±97.2	a 0.4 ±96.8
Control	e 0.6 ±2.6	e 0.2 ±1.3	d 0.6 ±1.9
نوع المعاملة	النسبه المئويه للعذارى الناتجة±S.E بعد		
	3 أيام	7 أيام	14 يوماً
البكتريا .Bt	a 0.0±0.0	cd 0.9 ±5.8	c 0.2 ±0.9
المستخلص المائي البارد	a0.0±0.0	b 2.0 47.0±	b2.7 ±12.3
المستخلص المائي الحار	a 0.0±0.0	c 7.6 ± 6.6	c 0.4 ±2.0
مائي بارد+.Bt	a 0.0±0.0	cd 0.5 ± 4.5	c 0.2 ±1.2
مائي حار+Bt	a 0.0±0.0	d 0.5 ± 2.8	c 0.4 ±0.9
Control	a 0.0±0.0	a 0.2 ±98.8	a1.6 ±19
نوع المعاملة	النسبه المئويه للبالغات البازغه ±S.E بعد		
	3 أيام	7 أيام	14 يوماً
البكتريا .Bt	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	c 0.3±2.2
المستخلص المائي البارد	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	b 2.6 ±39.6
المستخلص المائي الحار	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	c 0.7 ±5.7
مائي بارد+.Bt	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	c 0.7 ±2.0
مائي حار+Bt	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	c 0.6 ±1.6
Control	a 0.0±0.0	a 0.0±0.0	a3.9 ±76.2

*الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات في العمود الواحد عند مستوى الأحتمال (P≤ 0.05) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود

تشير النتائج الموضحة في الجدول (2) وعند مستوى الاحتمال $P\leq 0.05$ وجود فروق معنوية في نسبة التمر المصاب بيرقات حشرة عثة التين *E.cautella*أو ببرازها بين جميع المعاملات ومعاملة السيطرة حيث كانت صفراً% لجميع المعاملات في حين بلغت 99.8% في معاملة السيطرة.واظهر الجدول ذاته عدم وجود فروق معنوية في معدلات هلاك الطور اليرقي الاول بين المعاملات المستخلص المائي الحار ومعاملة (المستخلص المائي البارد +البكتريا .B.t) ومعاملة (المستخلص المائي الحار +البكتريا .B.t)في حين اختلفت المعاملة بكتريا B.t معنوياً عن معاملة المستخلص المائي البارد كذلك اختلفتا عن جميع المعاملات الاخرى معنوياًواختلفت جميع المعاملات معنوياً عن معاملة السيطرة Control . حيث بلغ معدل الهلاك 98% ، 100% ، 97.1% للمعاملات المستخلص المائي الحار، معاملة (المستخلص المائي الحار+البكتريا .B.t) ومعاملة (المستخلص المائي البارد +البكتريا B.t) على التوالي و 71.2% في معاملة المستخلص المائي البارد مقارنةً بمعاملة السيطرة Control والتي كانت صفراً % . كما بين الجدول (2) عدم وجود فروق معنوية في معدل هلاك الطور اليرقي الثاني بين المعاملات المستخلص المائي الحار ، (المستخلص المائي البارد + البكتريا .B.t)،(المستخلص المائي الحار + البكتريا .B.t) والسيطرة Control في حين اختلفت المعاملة بكتريا B.t معنوياًعن معاملة المستخلص المائي البارد كما اختلفتا عن جميع المعاملات وعن السيطرة Control معنوياًحيث كان اعلى معدل موت ليرقات الطور الثاني عند معاملة المستخلص المائي البارد وأقل معدل له عند المعاملة (المستخلص المائي الحار+ البكتريا .B.t)حيث كانت صفراً% مقارنةً بمعاملة السيطرة Control والتي كانت صفراً % ايضاً وقد يعزى السبب في انخفاض معدلات الهلاك في يرقات الطور الثاني هو ازدياد هلاك اليرقات في الطور الاول عند المعاملات في حين تطورت في معاملة السيطرة Control الى الاطوار اللاحقة بحيث لم تظهر يرقات ميتة في الطور الثاني .

جدول (2) تأثير المعاملات بالبكتريا تركيز (5×10^{-1})غم/لتر والمستخلصين المائيين لنبات حلق السبع الشجيري تركيز (50%) تحت ظروف مسيطر عليها / قبل اطلاق الحشرات

نوع المعامله	النسبه المئويه للتمر المصاب ± S.E	النسبه المئويه لليرقات الميته		S.E±	النسبة المئوية لمجموع اليرقات الميتة ±S.E
		الطور الاول	الطور الثاني	الطور الثالث	
البكتريا .Bt	b0.0 ±0.0	b 2.4±88.7	b2.4±11.3	b 0.0±0.0	a 0.0±100
المستخلص المائي البارد	b 0.0±0.0	c 1.5±71.2	a 0.1±19.7	a 1.6±9.1	a 0.0±100
المستخلص المائي الحار	b0.0±0.0	a 0.4±98	c 0.4±2.1	b 0.0±0.0	a 0.0±100
مائي بارد+Bt	b0.0±0.0	a 0.8±97.1	c0.8±2.9	b0.0±0.0	a 0.0±100
مائي حار+Bt	b0.0±0.0	a 0.0±100	c 0.0±0.0	b 0.0±0.0	a 0.0±100
control	a 0.2±99.8	d0.0±0.0	c0.0±0.0	b0.0±0.0	b0.0±0.0

*الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين المعاملات في العمود الواحد عند مستوى الأحتمال ($P\leq 0.05$) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود .

وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين المعاملة بالمستخلص المائي البارد وجميع المعاملات في معدلات هلاك يرقات الطور الثالث وكذلك اختلفت المعاملة ذاتها معنوياً عن معاملة السيطرة Control في حين لم تختلف المعاملات الاخرى معنوياً عن معاملة السيطرة Control حيث كان اعلى معدل هلاك للطور اليرقي الثالث 9.1% في معاملة المستخلص المائي البارد في حين كان معدل هلاك يرقات الطور الثالث صفراً% ولجميع المعاملات الاخرى، مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي كانت صفراً % .وقد يعزى السبب في ذلك الى هلاك اليرقات جميعاً قبل تطورها الى الطور اليرقي الثالث في المعاملات في حين تطورت في معاملة السيطرة Control الى الاطوار اللاحقة .ووصلت معدلات هلاك اليرقات الى 100% في جميع المعاملات إذ لم تصل الى الطور اليرقي الثالث أي يرقة .

وقد أوضح Sabbour [21] أن LC50 للحشرات *P.interpunctella* و*E.cautella* و *E.kuehniella* انخفض الى (71 ، 63 ، و 69)% على التوالي عند استخدامه للمستخلص الميثانولي لاوراق نبات *Taxodiumdistichum* مع البكتريا B.t.في حين انخفض الى (45 ، 35 ، و 20)% على التوالي ، عند استخدامه للفطر *Beauveriabassiana* مع 0.05% من المستخلص الميثانولي لأوراق نبات *T.distichum* وهذه النتائج تتفق مع ماحصل عليه بهذه الدراسة عند استخدام التداخل بين المستخلصين المائيين والعالق البكتيري.

-مقارنة المعاملات في التجربة الريادية بعد وقبل اطلاق حشرات عثة التين *E.cautella*

يبين الجدول (3) أن معدلات هلاك اليرقات عند معاملة التمور بعد اطلاق حشرات عثة التين *E.cautella* كانت 86.0% في حين كانت 100% عند معاملتها قبل اطلاق الحشرات مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي كانت صفراً% و 1.9% للمعاملتين على التوالي .في حين كانت نسبة التمر المصاب 97.8% للمعاملة بعد اطلاق الحشرات وصفراً% للمعاملة قبل اطلاق الحشرات مقارنةً بمعاملة السيطرة والتي كانت 99.8% و 98.0% للمعاملتين على التوالي. مما يدل على وجود فروق معنوية بين الطريقتين في إجراء المعاملات في التجربة الريادية ويمكن ان نستنتج ان معاملة التمور قبل اطلاق الحشرات عليها قد تفوقت على طريقة معاملة التمور بعد اطلاق الحشرات وذلك في معدلات هلاك اليرقات فضلاً عن عدم وجود إصابة للتمور في المعاملة قبل إطلاق الحشرات .

جدول (3) المقارنة بين معاملات التجربة الريادية /المعاملات قبل وبعد اطلاق الحشرات

نوع المعاملة	% اليرقات الميتة±S.E	% التمر المصاب ±S.E	السيطرة	
			% اليرقات الميتة ±S.E	%التمر المصاب ±S.E
قبل اطلاق الحشرات	a0.00±100.0	b 0.0±0.0	0.4±1.9	1.0±98.0
بعد اطلاق الحشرات	b5.20±86.0	a1.22±97.8	0.0±0.0	0.2±99.8

المصادر:

[1] Agaisse,H.&Lereclus ,D. 1995. How does Bacillus thurhngiensis produce so much insecticidal crystal protein?.J.Bac.177:6027-6032.

[2] Environmental protection agency ((EPA).1998. EPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) Bacillus thurhngiensis US EPA,preventation pesticides and toxic substance, EPA 738-R-98-004,19P.

[3] Belmain,S.R.G.E. Neal,D.E. Ray &P.Golop.(2001).Isecticidal and vertebrate toxicity associated with enthnobotanicals used as post harvest protectants in Ghana .F. and Chem. Tox. 39:287-291.

[4] AL-Rubeai,H.F. 1987. Precocene as control measure for Galleria Mellonela larvae. J.Agric.Water Reso.Res. 6(2):69-81.

[5] البالاني ،ماجد رشيد مجيد (2003) .تأثيرالمستخلصات النباتيه الخام وقلويد الفازيسين (Vasicine) لنبات حلق السبع الشجيري*AdhatodaVasica* في بعض الجراثيم المرضيه .رسالة ماجستير .كلية العلوم.جامعة بغداد.

[6] Ahmed,M.S.H.; A.A.Hameed and A.A.Kadhum.1986. Disinfestation of CommercialyPaked dates by Combination Treatments.Acta Alimin.15(3):221-228.

[7] احمد ، هبة شاكر .(2009) .تأثير المستخلصين الكحولي والمائي لاوراق نبات حلق السبع الشجيري*Adhatodavasica*في بعض الجوانب الحياتية لذبابة البحر الابيض المتوسط *Ceratitiscapitata* .رسالة ماجستير كلية العلوم للبنات . جامعة بغداد.

[8] عبد ،نور سعدي . 2009 . تأثير مستخلصي الكحول والماء الحار لاوراق نبات حلق السبع الشجيري *Adhatoda vasica* والفطر *Beauveria bassiana* في بعض الجوانب الحياتية لحشرة الذبابة المنزلية *Musca domestica* .رسالة ماجستير /كلية العلوم للبنات . جامعة بغداد.

[9] الدميري ، محمد ، مصطفى البو حسيني ومحمد نايف السلتي .2000. دراسة تأثير المواد المستخلصة من ثمار نبات الازاداراخت (*Meliaazedarach* L.) في مكافحة سوسة ورق العدس (*Sitonacrinitus* H.) مجلة وقاية النبات العربية.18: 64-67 .

[10] عبد الله ، ليث محمود (1992) حماية التمور المخزونة في مكابس التمور العراقية من الاصابة بحشرة عثة التين Ephestia cautella (Walk) باستعمال ابواغ البكتريا *Bacillus thuringiensis* (Berliner) والفطر *Beauveria bassiana* (Vuill) مجلة العلوم الزراعية العراقية 23 (1): 124-128 .

[11] Abbot , W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide . J. Econ. Entomol. , 18: 265-267.

[12] Schneider-Orelli; O. 1947. Entomologisches Parktikum VerlagSauerlander , Aarau . 237 PP.

[13] شعبان ، عواد و نزار مصطفى الملاح . 1993 . المبيدات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل . 520 صفحة.

[14] Dunncan, B.D. (1955). Multiple ranges and multiple f-test. Biometrics, 11:pp.1-42.

[15] قطب ، فوزي طه (1981) .النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها - دار المريخ للنشر - الرياض .
[16] الساعدي ، حذام صالح(2012). دراسة مختبريه لاستعمال بكتريا *Bacillus* (Berliner) *thuringiensis* والمستخلص المائي الحار والبارد لأوراق نبات حلق السبع الشجيري(Nees) *Adhatoda vasica* للسيطرة على حشرة عثة التين *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: pyralidae) (تحت النشر).
[17] Manjunath, M.T. (2001). Bt-crops: Biosafety assessment and risk management .Monsanto Research Center, India. P.175-179.
[18] Gilliland, A.; C.E. Chmbers; E.J. Bone; and D.J. Ellar. (2002). Role of *Bacillus thuringiensis*Cry 1 endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. J. App. Environ. Mic.68(4):1509-1515.
[19] Tree Care. (2005). B.t. microbial insecticide. Minnesota Department of Natural Resources . (CNR).
[20] AmiriBeshelly.(2007) .Efficacy of Bacillus thuringiensis and Mineral Oil against PhyllocnistiscitrellaStainton (Lepidoptera :Gracillariidae) Int. J. Agri. & Bio.1560-853.
[21] Sabbour ,M.M.(2003).Combined effect of some microbial control agents mixed with botanical extracts on some stored products insects. Pakistan .J. Bio.Sci.6(1):51-56 .2003 ISSN 1028-8880.

The interference between effects of *Adhatoda vasica* (Nees) extracts and *Bacillus thuringiensis* (Berliner) for controlling population of fig moth, *Ephestia cautella* Walker

Hutham S. Balasim* Ayad A. AL-Taweel* Zahira A.AL-Gharbaui* Ali J. Eass*

*Integrated Pest Management Center/Directarate of Agricultural Research/Ministry of Science and Technology .Baghdad/Iraq

Abstract:

The activity of *Adhatoda vasica* crude plants extracts against *B.thuringiensis* bacteria was determined by MIC test and sensitivity test which showed no response of this type of bacteria against extracts .The interference between the effect of hot and cold aqueous extracts and *Bacillus thuringiensis* bacteria for controlling the population of fig moth when males and females released before treatment under control condithion was gave a highly percentage of larval mortality which reached to 100% in (B.t. + hot aqueous extract) and 97.3% in (B.t + coldaqueous extract) after two weeks of treatment when concentration of 50% of aqueous extracts and $5\times10^{-1}$of *Bacillus thuringiensis* bacteria but when the insect (males & females) released after the dates treated with B.t & hot aqueous extract , the mortality was 100% in all first instar larvae. The results also showed that when treatment of the dates before the insects released more influence than that treated the date after the insects released so the percentage of mortality of larvae reached to 100% in first method and to 86.0% in second methods .