

# التأثيرات الهستوباثولوجية لبعض سلالات البكتريا *Bacillus thuringiensis* في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا (*Phthorimaea operculella* (Zell.))

نزار مصطفى الملاح و فائز عبد الشهيد الطائي

قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

## المخلص

أظهرت المقاطع النسيجية في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا (*Phthorimaea operculella* (Zell.)) أن التراكيز النصفية القاتلة من سلالات البكتريا *Bacillus thuringiensis* *alesti* و *B. thuringiensis* *aegypti* و *B. thuringiensis* *kurstaki* قد سببت تحطماً في الخلايا الطلائية للقناة الهضمية الوسطى وانفصال الطبقتين العضليتين الطولية والدائرية عن الطبقة الطلائية ، فضلاً عن تحطم الغشاء القاعدي والغشاء الحول غذائي وكثرة الفسح بين الخلايا نتيجة لتكسر الروابط الخلوية ، وأن هذا التأثير في تركيب ووظيفة المعى الأوسط كان من أحد الأسباب الرئيسة التي أدت إلى تثبيط عملية الهضم وامتصاص الغذاء أو توقفها مما أدى إلى موت اليرقات بعد فترة وجيزة من المعاملة.

## المقدمة

السلالة *B.t. var. kurstaki* : تباع كمستحضر تجاري تحت اسم Dipel من إنتاج Abbot laboratories ، ومجهز بشكل مركز ذواب ويحتوي على الأبواغ والأجسام البلورية. والمادة الفعالة هي -Delta endotoxin ، وتباع مستحضرات هذه السلالة تحت العديد من الأسماء التجارية مثل Agrobac ، Delfin ، Bactospeine ، Thuricide . (Meister ، 1998).

تم تحضير خمسة تراكيز لكل سلالة على ضوء الاختبارات الأولية الكاشفة Pilot Experiment وهي 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 لسلالة *B.t. aegypti* و 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 لسلالة *B.t. kurstaki* وتمت معاملة اليرقات بتراكيز السلالات المذكورة وذلك بتغطيس شرائح بطاطا بسمك 0.5 سم في محلول تراكيز السلالات الثلاثة لمدة دقيقتين وتركت الشرائح لتجف في الهواء (طارق ، 1997) بعدها نقلت كل شريحتين من البطاطا إلى طبق بتري قطره 9 سم بداخله ورقة ترشيح ، وتم نقل 10 يرقات عمر ثالث ثم غطيت الأطباق بقماش الموسلين وربطت برباط مطاطي. استخدم لكل تركيز 30 يرقة موزعة على ثلاث مكررات أما التجربة الضابطة فغطست فيها الشرائح بالماء فقط ، أخذت القراءات وحسبت نسبة القتل بعد مرور 72 ساعة من المعاملة ، تم بعد ذلك تصحيح نسبة القتل باستخدام معادلة Abbott (1925) وتم رسم خط السمية لكل سلالة وحساب قيم LC<sub>50</sub> والميل وحدود الثقة حسب طريقة Finney (1977).

لبيان التأثيرات الهستوباثولوجية للسلالات البكتيرية في القناة الهضمية ليرقات عثة درنات البطاطا ، أعدت المقاطع النسيجية باتباع طريقة (Romeis ، 1968) انظر Schmidt وآخرون ، 1997) مع استبدال Benzol و Methylbenzoate بمادة الزيلول لترويق النماذج. حيث تم غمر شرائح البطاطا بمحاليل التراكيز النصفية القاتلة LC<sub>50</sub> من سلالات البكتريا وبنفس الطريقة المذكورة سابقاً ونقلت 20 يرقة عمر ثالث لكل معاملة فضلاً عن معاملة التجربة الضابطة التي غمرت شرائحها بالماء فقط. وبعد 48 ساعة من المعاملة بالسلالات البكتيرية تم وضع عشرة من اليرقات المعاملة وقبل موتها (لضمان ملاحظة التأثيرات مبكراً تجنباً لحدوث تلف

لعل من المؤشرات على أهمية عثة درنات البطاطا هو تعدد وسائل مكافحتها إذ استخدمت في ذلك الطرق الزراعية والفيزيائية وغيرها إلا أن الوسيلة المعول عليها في المكافحة هي استخدام المبيدات. ونظراً للتأثيرات السلبية للمبيدات على الإنسان والبيئة ، فقد بدأ البحث عن طرائق ووسائل تسعى إلى ترشيد استخدام المبيدات عن طريق تكاملها مع عناصر المكافحة الأخرى أو استخدام المبيدات المايكروبية في مكافحتها. وتستخدم في الوقت الحاضر العديد من سلالات البكتريا *Bacillus thuringiensis* على نطاق واسع في المكافحة المايكروبية للآفات نظراً لتخصصها وعدم سميتها للإنسان والحيوان والأعداء الطبيعية للعديد من الآفات الحشرية (Ellis ، 1991). لذا فان الدراسة الحالية تهدف إلى تحديد آلية تأثير بعض سلالات هذه البكتريا من خلال دراسة تأثيراتها الهستوباثولوجية في القناة الهضمية الوسطى ليرقات العمر الثالث.

## المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة الحالية في مختبر بحوث الأحياء المجهرية / القسم الطبي في المعهد الفني / الموصل ، خلال عام 2004.

استخدمت ثلاث سلالات من بكتريا *Bacillus thuringiensis* بشكل مستحضرات جاهزة للاستخدام الحفلي وهي :

السلالة *B.t. var. aegypti* (C18) : تباع كمستحضر تجاري تحت اسم Agerin مجهز بشكل مسحوق قابل للبلل ، والمادة الفعالة هي البكتريا البلورية *B.t.* بتركيز 3200 وحدة دولية \* / ملغم ، أنتجت الشركة المصرية Biogro international.

السلالة *B.t. var. alesti* : استخدمت بشكل معلق جرثومي للبكتريا العسوية المعزولة مسبقاً من يرقات دودة البنجر السكري المصابة ، والمحفوظة بموائل الاكار المغذية عند درجة حرارة 4°م في مختبر بحوث الحشرات في كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل.

\* الوحدة الدولية = مايكرو مول / لتر.

المركب Compound microscope من نوع Zeiss والعدسات الشبكية 4X ، 10X ، 40X في عملية الفحص واستخدام الكاميرا الرقمية نوع Benq صينية المنشأ لالتقاط الصور للمقاطع المطلوبة.

### النتائج والمناقشة

من الجدول (١) يتبين أن سلالة *B.t. alesti* كانت أكثر السلالات البكتيرية المستخدمة في الدراسة سمية ليرقات العمر الثالث لعثة درنات البطاطا إذ بلغت قيمة  $LC_{50}$  لها ٠,١٩% تلتها السلالة *B.t. kurstaki* وبلغت قيمة  $LC_{50}$  لها ١,٤% فيما احتلت السلالة *B.t. aegypti* المرتبة الأخيرة وبلغت قيمة  $LC_{50}$  لها ١,٨% وهذا يتفق مع ما وجدته محمد علي (٢٠٠٠) من أن السلالة *B.t. alesti* كانت سامة جداً لدودة البنجر السكري *Spodoptera exigua*. كما يتبين من الجدول (١) أيضاً أن قيم الميل لخطوط السمية لسلالات البكتيريا قد اختلفت باختلاف السلالة، إذ بلغت أعلى قيمة للميل ٣,٨٨ عند استخدام السلالة *B.t. alesti* تلتها السلالة *B.t. kurstaki* إذ بلغت ٣,٢٧ ثم السلالة *B.t. aegypti* فكانت ٣,٠٥ ويتبين من هذا أن اليرقات أظهرت تجانساً في استجابتها للسلالة *B.t. alesti* أكثر من بقية السلالات وربما يرجع ذلك إلى حساسية اليرقات العالية لتلك السلالة البكتيرية.

الجدول (١) قيم التراكيز النصفية القاتلة  $LC_{50}$  وحدود الثقة والميل

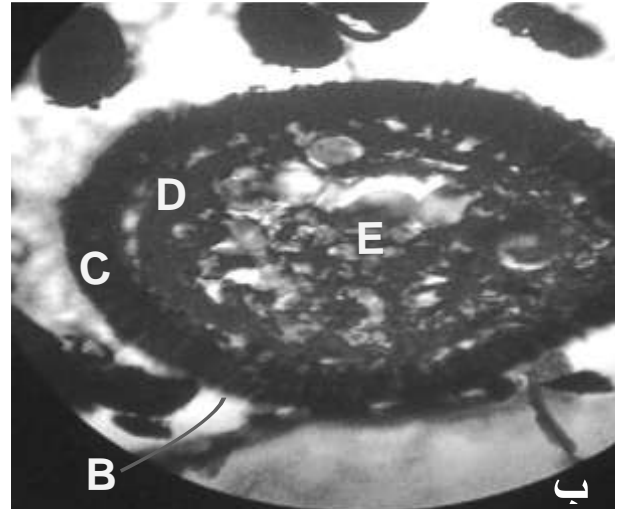
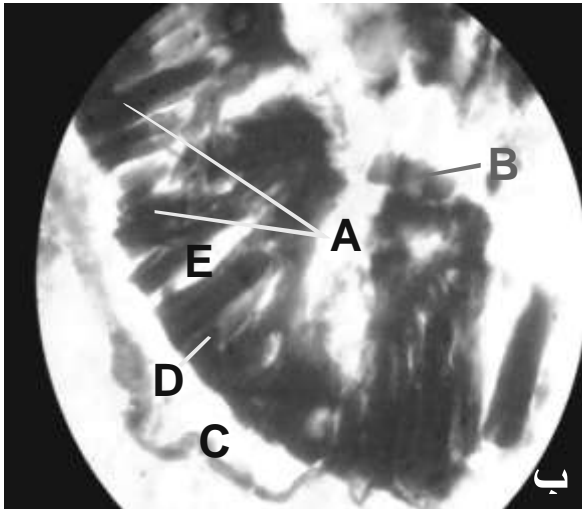
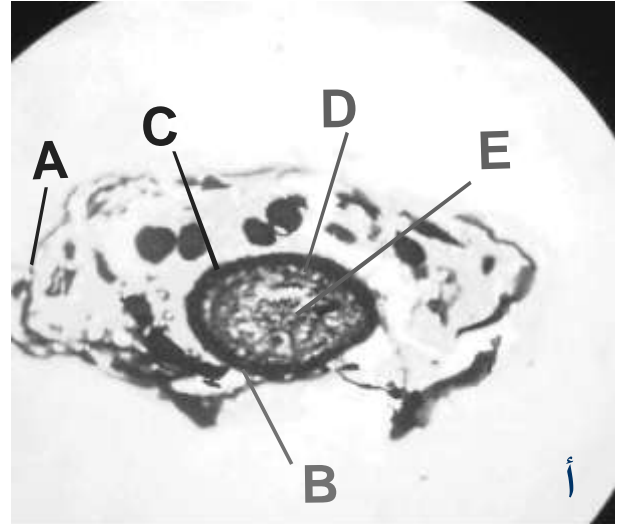
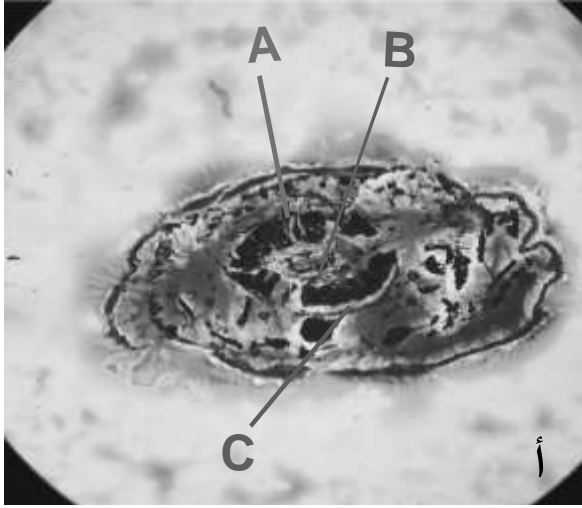
لبعض سلالات البكتيريا في يرقات العمر الثالث لعثة درنات البطاطا

#### *Phthorimaea operculella* (Zell.)

الميل	حدود الثقة لقيمة $LC_{50}$		% $LC_{50}$	سلالات البكتيريا
	الأدنى	الأعلى		
٣,٠٥	١,٦٢ - ١,٩٨	١,٨٠	<i>B.t. aegypti</i>	
٣,٨٨	٠,١٧ - ٠,٢١	٠,١٩	<i>B.t. alesti</i>	
٣,٢٧	١,٢٦ - ١,٥٤	١,٤٠	<i>B.t. kurstaki</i>	

يُظهر الشكل (٢ أ ، ب) المقطع النسيجي العرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا المتغذية لمدة ٤٨ ساعة على البطاطا المعاملة بالتركيز نصف القاتل  $LC_{50}$  من سلالة البكتيريا *B.t. aegypti*. إذ تبين من الشكل أنها أدت إلى انفصال الطبقتين العضليتين الطولية والدائرية عن الغشاء الطلائي، فضلاً عن انتفاخ العضلات الطولية في بعض المناطق، مع تحطم كل من الغشاء القاعدي والغشاء الحول غذائي. وقد أصبح شكل الخلايا العمودية وترتيبها غير منتظم مع وجود استطلاات سايتوبلازمية فيها، فضلاً عن أن المسافات بين الخلايا قد توسعت في بعض المناطق نتيجة لتكسر الروابط الخلوية (Desmosomes). انظر (الشكل ١ أ و ب) للمقارنة.

كلي للقناة الهضمية بمرور الوقت) فضلاً عن التجربة الضابطة، في محلول بويون الكحول Alcoholic Bouin's Solution لمدة ٢٤ ساعة، ثم غسلت بالكحول الايثيلي تركيز ٧٠% (استبدل مرتين، مدة كل منها نصف ساعة)، ثم قطعت اليرقة من طرفيها وذلك بإزالة الرأس والصدر من جهة ونهاية البطن من الجهة الثانية وأخذ الجزء الوسطي من اليرقة لعمل الشرائح، وتم سحب الماء (الانكاز) من النماذج باستخدام تراكيز متصاعدة تدريجياً من الكحول الايثيلي إذ نقلت النماذج إلى تراكيز ٨٠% ثم ٩٠% لمدة نصف ساعة ونقلت إلى تركيز ٩٦% لمدة ساعة واحدة ثم نقلت إلى كحول مطلق ١٠٠% لمدة أربع ساعات (استبدل مرتين)، وروقت النماذج بالزليلول ١٠٠% لمدة ١٠ دقائق (استبدل مرتين)، وأجريت عملية التشرب Impregnation في خليط من الشمع المنصهر والزليلول بنسبة ١ : ١ ولمدة ٣٠ دقيقة داخل فرن Oven على درجة حرارة ٦٠م°، ثم نقلت النماذج إلى شمع البرافين النقي (درجة انصهاره ٥٦-٥٨م°) لمدة ٢٤ ساعة (استبدل مرتين) بعدها أجريت عملية الطمر Embedding في قوالب البرافين، ثم تلتها عملية تشذيب النماذج التي قطعت بعد ذلك إلى مقاطع عرضية باستخدام المشرح Rotary microtome (نوع R. Jung Heidelberg) ألماني الصنع بسمك (٧-١٠) مايكرومترات، وثبتت المقاطع على الشريحة الزجاجية بعد وضع قطرة من البومين البيض Egg albumin على الشريحة بشكل طبقة رقيقة وتركت لتجف، ثم نقلت بعد ذلك الشرائح المحملة بالنسيج إلى صفيحة حارة Hot plate ذات حرارة معتدلة بحدود (٣٥-٣٧م°) وتركت لتجف في المختبر داخل حافظات تمنع تعرضها للغبار. تمت عملية صبغ المقاطع بصبغة الهيماتوكسولين أرلخ (Ehrlich's haematoxylin) وصبغة الايوسين Y (Eosine Y)، وذلك بعد اعتماداً على طريقة (جمعة، ١٩٩٨) و (الجهصاني، ٢٠٠٤)، وذلك بعد إزالة الشمع من المقاطع بوضع الشرائح الزجاجية في الزليلول بعد تعليمها بطريقة الحفر على الزجاج ثم غمرت في كحول ايثيلي ١٠٠% ثم في كحول ٩٠% ثم في كحول ٧٠% (لمدة دقيقتين في كل تركيز من الكحول)، بعدها صبغت بصبغة Haematoxylin لمدة ٦ دقائق، ثم غسلت بماء الحنفية الجاري لمدة ١٠ دقائق، بعدها مررت الشرائح لعدة ثواني بكحول محمض (كحول ٧٠% و HCl بنسبة ٩٩ : ١)، ثم غسلت بالماء المقطر لمدة دقيقتين وبالماء الجاري لمدة ١٠ دقائق ثم مررت الشرائح بالصبغة المائية Eosin بتركيز ١% لمدة دقيقتين كما مررت بسلسلة كحولات تصاعدياً ٧٠، ٩٠، ١٠٠ (لمدة خمس دقائق لكل تركيز)، ثم روق النسيج بالزليلول ثم جفف ووضعت عليه ٢-٣ قطرة من مادة D.P.X (خليط من ديسترين Distrene وملدن Plasticizer وزايلين Xylene) ثم غطيت الشرائح بالغشاء Cover slide بعدها تركت لفترة قصيرة لتجف، وبذلك أصبحت المقاطع جاهزة للفحص والقياس إذ تم استخدام المجهر الضوئي



شكل ( ٢ أ ، ب ) مقطع عرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* بعد ٤٨ ساعة من التغذية على البطاطا المعاملة بالتركيز نصف القاتل  $LC_{50}$  من سلالة البكتريا *B.t. aegypti* : خلايا عمودية ذات استطلاات سايوتوبلازمية ، B : بقايا الغشاء الحول غذائي ، C : انفصال الطبقتين العضليتين ، D : خلايا مجددة ، E : فسخ بين خلوية . أ : التكبير ٤٠ مرة ، ب : ٤٠٠ مرة

الشكل ( ١ أ ، ب ) مقطع عرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* بعد ٤٨ ساعة من التغذية على البطاطا (للمقارنة) ، A : البشرة والكيوتكل ، B : العضلات الطولية والدائرية ، C : الخلايا الطلائية ، D : الغشاء الحول غذائي ، E : تجويف داخلي يحتوي على كتل غذائية . أ : التكبير ٤٠ مرة ، ب : ١٠٠ مرة .

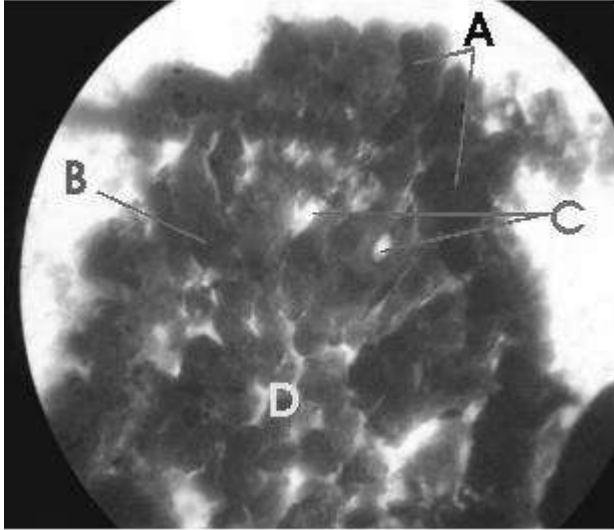
خاضعة للتحلل وان الاستطلاات السايوتوبلازمية قد تبعثرت واختلطت مع الكتل الغذائية، كما زادت المسافات بين الخلايا نفسها نتيجة لتحطم الروابط بين خلوية.

مما سبق يتبين من الأشكال ( ٢ و ٣ و ٤ ) أن السلالات البكتيرية الثلاثة *B.t. kurstaki* ، *B.t. alesti* ، *B.t. aegypti* قد أدت إلى إحداث تغيرات واضحة في تركيب ووظيفة المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا بعد ٤٨ ساعة من المعاملة ، وكان هذا التأثير من الأسباب الرئيسة التي أدت إلى فشل اليرقات في الاستفادة من الغذاء المتناول وذلك بسبب الانخفاض في مستوى عمليات الهضم والامتصاص ، مما أدى إلى تثبيط تطور الحشرة بشكل عام وذلك نتيجة لانفصال الطبقتين العضليتين اللتين تؤثران على الحركة التمعجية للقناة الوسطى التي تساعد في حركة الغذاء ومزجه بالإنزيمات الهاضمة. كما أن زيادة حجم الخلايا العمودية مع حصول زيادة في الامتدادات السايوتوبلازمية ، فضلاً عن تحطم الروابط بين

فيما يُبين الشكل (٣) المقطع النسيجي العرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا المتغذية لمدة ٤٨ ساعة على البطاطا المعاملة بالتركيز نصف القاتل  $LC_{50}$  من سلالة البكتريا *B.t. alesti* ، الذي أثر بوضوح في المعى الأوسط إذ أدى إلى تفكك وتحطم الخلايا العمودية كما يظهر تحلل كامل لخلايا عمودية أخرى ، وكذلك يظهر المقطع وجود مسافات كبيرة بين الخلايا نتيجة تحطم التراكيب الرابطة بينها ، فضلاً عن تحطم الغشاء الحول غذائي وتبعثر الكتل الغذائية داخل تجويف المعى الأوسط.

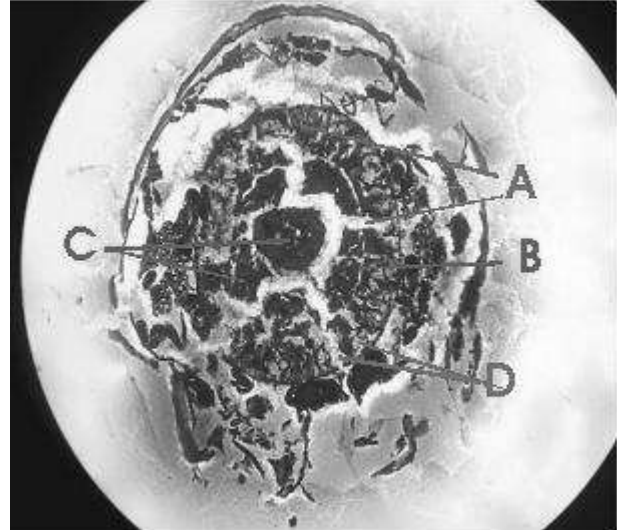
ويتبين من الشكل (٤) أن التركيز نصف القاتل من سلالة البكتريا *B.t. kurstaki* كان مؤثراً في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا المتغذية لمدة ٤٨ ساعة على البطاطا المعاملة بهذه السلالة ، فقد سبب في انفصال الطبقتين العضليتين وتلاشيها. وكان التأثير على أشده في الخلايا العمودية فقد تحطمت وأصبح بعضها قصيراً ومنثقاً ويبدو أن الخلايا

المبطن للقناة الهضمية الوسطى ، فيما تتخلل بعض جزئيات السم الغشاء وتسبب تنقب وانتفاخ وتحلل خلايا الطبقة الطلائية مما يسبب حدوث خلل في التوازن الأزموزي للخلايا. وكذلك تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده Younes وآخرون (١٩٩٦) من أن تأثير البكتريا *B.t. morrisoni* في القناة الهضمية الوسطى لحشرة ذبابة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* (Wied.) كان واضحاً في انفصال الطبقة الطلائية المبطنة للقناة الهضمية الوسطى عن الطبقتين العضليتين وكذلك انتفاخ وتحطم الخلايا العمودية وتحللها ونبذها في تجويف الجهاز الهضمي.



شكل (٤) مقطع عرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* بعد ٤٨ ساعة من التغذية على البطاطا المعاملة بالتركيز نصف القاتل  $LC_{50}$  من سلالة البكتريا *B.t. kurstaki* ، A : خلايا عمودية قصيرة ومنتفخة ، B : استطالات سايتوبلازمية مبعثرة ، C : فسح بين خلوية ، D : أجزاء خلايا متناثرة ومختلطة مع الكتل الغذائية. التكبير ٤٠٠ مرة.

الخلوية وزيادة المسافات بين الخلايا ، وتحطم عدد من الخلايا العمودية والغشاء الحول غذائي كل ذلك أدى إلى حدوث خلل في عمليات هضم الغذاء وامتصاصه. هذه النتائج تتفق مع ما وجده Bauer (١٩٩٥) من أن البلورات البروتينية لبكتريا *B.t.* تعمل كسموم داخلية تذوب في القناة الهضمية الوسطى بعد تناولها مع الطعام من قبل يرقات العثة ذات الظهر الماسي *Plutella xylostella* (L.) وتقوم الإنزيمات الهاضمة للبروتين بتحليل جزئيات السم الأولي إلى سم فعال ، إذ يرتبط بالمستقبلات الموجودة على الغشاء ذي الحافة الفرشائية Bruschi Border Membrane



شكل (٣) مقطع عرضي في المعى الأوسط ليرقات عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* بعد ٤٨ ساعة من التغذية على البطاطا المعاملة بالتركيز نصف القاتل  $LC_{50}$  من سلالة البكتريا *B.t. alesti* ، A : خلايا عمودية مفككة ومطحمة ، B : الغشاء الحول غذائي ، C : كتل غذائية مبعثرة ، D : فسح بين خلوية. التكبير (١٠٠) مرة .

6. Ellis, R. (1991). *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in information submitted to the biological control environmental appeal board, March 1993 by Agriculture Canada. PP 193-236.
7. Finney, D.J. (1977). Probit analysis- 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge Univ. Press. London.
8. Meister, R.T. (1998). Farm Chemicals Handbook 98 Meister Publishing Company, Willoughby, OH. USA.
9. Perrenoud, S. Ingagar. (1993). Potato for yield and quality. International potato Improvement Bulletin 8(2nd revised edition) Basel/ Switzerland.
10. Schmidt, G.H.; Ahmed, A. A. I. and Breuer, M. (1997). Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Noctuidae: Lepidoptera). Anz. Schadlingskde Pflanzenschutz Umweltschutz. 70: 4-12.
11. Younes, M.W.F.; Hashem, A.G.; El-Abbassi, T.S. and Abo-Houla, A.I.A. (1996). Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* on the adult stage mediterranean fruit fly *Ceratitis Capitata* (Wied.). J.Union Arab Biol., Cairo, (5): 189-203.
1. جمعة ، عبير صباح (١٩٩٨). تأثير البريمور على حياتية الدعسوقة ذات النقاط السبع (*Coccinella septempunctata* (L.) (Coccinellidae : Coleoptera) ودور جدار الجسم والأجسام الدهنية كحواجز دفاعية. رسالة ماجستير - كلية الزراعة والغابات- جامعة الموصل - العراق.
2. الجهصاني ، دلزار علي خدر (٢٠٠٤). تأثير بعض المستخلصات النباتية وأشعة كاما في نمو مبيض البعوض *Culex pipiens molestus* (Forsk.) (Culicidae : Diptera) وتطوره. رسالة ماجستير - قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة الموصل - العراق.
3. طارق ، احمد محمد (١٩٩٧). تأثير مثبط النمو الحشري Match في عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* (Zell.) (Gelechiidae : Lepidoptera) وحفار ساق الذرة *Sesamia certica* (Led.) (Phalaenidae : Lepidoptera) رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد - العراق.
4. Abbott, W.S.L. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265- 267.
5. Bauer, L.S. (1995). Resistance : A Threat to insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. <http://www.fcla.edu/FlaEnt/fe78p414.pdf>

## **Histopathological Effects of Some *Bacillus thuringiensis* Strains on Mid-Gut of Potato Tuber Moth Larvae *Phthorimaea operculella* (Zell.) (Gelechiidae , Lepidoptera)**

**Nazar M. Al-Mallah and Faiz A. Al-Taie**

*Plant Protection Department, College of Agriculture & Forestry, Mosul University, Mosul , Iraq*

### **Abstract**

The tissue sections of mid-gut larvae of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zell.) treated with LC<sub>50</sub> concentration of Bacteria strains *B. thuringiensis* *alesti*, *aegypti*, *kurstaki* used in this study showed that the treatments cause destruction to epithelial cells of mid-gut canals of the separation of longitudinal and circular muscles of epithelial layers, besides, the destruction of the basement membrane and peritrophic membrane and the great number of gaps among cells as a result of destruction of desosomes. This effect on the function of mid-gut was one of the principal causes which led to the inhibition of digestion process and absorption of food which caused death to the larvae after a short period of treatment.