



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص البكتيريا *Bacillus thuringiensis* ودراسة
تأثيرها في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات
Dacus ciliatus (Diptera : Tephritidae)

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى
كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة
الاحياء المجهرية
تقدم بها الطالب

إدريس صالح جليل

بكالوريوس علوم الحياة
كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012-2013
بإشراف

أ.د. عدنان نعمة عبد الرضا

كانون الثاني 2015م

محرم 1436هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(تنزيلا ممّن خلق الأرض والسّماوات العلى
الرّحمن على العرش استوى له ما فى
السّماوات وما فى الأرض وما بينهما
وما تحت الثّرى }

صدق الله العظيم

(سورة طه : الآية 4-5)

الإهداء

إلى مالك الأزل والسرمد وبه الخطى تتسدد
الله سبحانه وتعالى

إلى سيد المرسلين إمام المتقين وصفوة العالمين نبي الرحمة
النبي الأعظم محمد الأمين رسول رب العالمين (صلى الله عليه وآله وصحبه وسلم)

إلى شهداء العراق على طول الزمن...

وإلى الروح الطاهرة التي ما انفكت تضيء لي الطريق
وتوقد روح الأمل.. أبي

إلى خيمة الحنان وغيمة المكان
تتحملني دائماً بين يديها دعاء متصل.. إلى السماء
أمي الحبيبه

إلى من رووني من ينابيع الفضيلة، وأخذوا بيدي إلى منهل المعرفة....
وأظلوني بشجرة الإيمان
أخوتي

إلى من تسعد' عيني بروياه ويطرب' قلبي بنجواه
إلى من جمعني بهم القدر وربطتني بهم مودة الصداقة
سرمد و عبد الله

إلى من مهدّ الطريق امامي للوصول إلى ذروة العلم
أساتذتي الأفاضل

إليكم جميعاً أرفع ثمرة جهدي المتواضع عرفانا مني بفضلكم علي

إدريس

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين. أشكر الله مولاي وخالقي الذي منَّ عليَّ بإتمام هذا العمل المتواضع و على توفيقه انطلاقاً من قول رسول (صلى الله عليه وآله وصحبه وسلم): ﴿لا يشكر الله من لا يشكر الناس﴾ وإيماناً بفضل الاعتراف بالجميل وتقديم الشكر والامتنان لأصحاب المعروف فإني أتقدم بالشكر الجزيل والثناء العظيم لكل من ساعد في إنجاح هذا الرسالة وأخص بالذكر : أستاذي ومشرفي الفاضل الدكتور عدنان نعمة عبد الرضا حفظه الله على قبوله الإشراف على هذا البحث ومتابعته له منذ خطواته الأولى وعلى ما منحني من صدر الواسع ونصح وإرشاد ساعد على إخراج هذا العمل بهذه الصورة . أسأل الله أن يجزيه عني خير الجزاء. أتوجه بشكري وتقديري الى مسؤول مختبر تحليلات الوراثية والجزئية وأخص بالذكر الأستاذ مساعد عمار أحمد سلطان لما قدم لي من العون والمساعدة وتعاونه معي. وكما أتقدم بالعرفان وتقدير إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالدكتور غالب إدريس عطية ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه ، و لما قدموه لي من العون والمساعدة طيلة فترة الدراسة. وان فرقتنا الأيام وتباعدت الاجساد .. فإن في الصدر قلب ينبض بك ويحيى بذكرك ويسترجع لحظات عذاب .. ولقاءات الأحباب .. وبسمات صادقة .. ونفوس محلقة في سماء الخلق ، لن نقول وداعاً .. بل ستبقى الذكرى .. وصور المحبة شامخة في الذاكرة مع امل بلقاء.. ووعد بدعاء لا ينقطع.. وحب متجدد لن ينضب، لكم نتقدم بخالص الشكر ووافر الامتنان إلى رفاق دربي سرمد وعبدالله ومحمد سائلين المولى عز وجل أن يجعلنا وإياكم من أهل القران .. وأن يرزقنا وإياكم الفردوس الاعلى من الجنان. ولايفوتني ان أشكر جميع زميلاتي وزملائي من طلبة الدراسات العليا وجميع المنتسبين في مختبر الاحياء المجهرية داعيا لله لهم بدوام النجاح والموفقية والتمس العذر ممن فاتني أن أشكرهم ,جازهم الله عني خير الجزاء.و كما اقدم شكري العميق الى عائلتي على تشجيعهم ومساعدتهم لي داعياً من البارئ أن يمنّ عليهم بالصحة والعافية.

وخاتماً آمل من الله أن أكون قد وفقت في إعداد هذا البحث بالطريقة التي تنفع وتخدم الدارسين وأن أنال

رضى الله.

إدريس

أقرار المشرف

أشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **{(عزل وتشخيص البكتيريا *Bacillus thuringiensis* ودراسة تأثيرها في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* (Diptera : Tephritidae))}** التي قدمها طالب الماجستير (إدريس صالح جليل) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية .

التوقيع :

المشرف : د.عدنان نعمة عبدالرضا

اللقب العلمي :أستاذ

التاريخ / / 2015

توصية رئيس لجنة الدراسات العليا

بناء على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم: مثنى محمد أبراهيم

اللقب العلمي :مدرس

رئيس لجنة الدراسات العليا رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ / / 2015

إقرار لجنة المناقشة على رسالة

نحن رئيس و أعضاء لجنة المناقشة , نشهد أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الأحياء المجهرية بتقدير (أمتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : د .عباس عبود فرحان

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د .حميد مجيد جاسم

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د.د .عمار أحمد سلطان

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2015

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : أ. د.عدنان نعمة عبدالرضا

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : / / 2015

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الأسم : د. غالب أدريس عطية

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2015

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **{عزل وتشخيص البكتيريا *Bacillus thuringiensis* ودراسة تأثيرها في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* (Diptera : Tephritidae) التي قدمتها طالب الماجستير (إدريس صالح جليل)** قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. هادي رحمن رشيد

التاريخ: ١ \ 2015

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **{عزل وتشخيص البكتيريا *Bacillus thuringiensis* ودراسة تأثيرها في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* (Diptera : Tephritidae) التي قدمتها طالب الماجستير (إدريس صالح جليل)** قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. هادي رحمن رشيد

التاريخ: ١ \ 2015

الخلاصة Summary

تضمنت هذه الدراسة عزل البكتيريا *Bacillus thuringiensis* من مصادر بيئية مختلفة في محافظة ديالى وتشخيصها بالطرق الكيموحيوية والوراثية والجزئية، أذ جمعت 51 عينة من ترب مختلفة وهي (زراعية و حديقة و غير زراعية) وكذلك من الماء ،من خمسة أفضية في محافظة ديالى (بعقوبة ،و الخالص، والمقدادية ،وخانقين، وبلدروز) للمدة من 1 \ 9 \ 2014 لغاية 20 \ 11 \ 2014. أظهرت نتائج التشخيص الكيموحيوية وجود اربع عينات وبنسبة 7.8% كانت ذات نمو سالب للزرع البكتيري و 46 عينة وبنسبة 90.1% كانت ذات نمو موجب للزرع البكتيري وتبين أن 41 عينة منها وبنسبة 80.3% تعود للجنس *Bacillus* وللنوع *Bacillus thuringiensis* ووصلت نسبة البكتيريا المعزولة من الترب الزراعية 94% ومن الترب الحدائق 93% و من الماء 75%، ومن الترب غير زراعية 44%. تعد البكتيريا الممرضة *Bacillus thuringiensis* من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ومكونة للأبواغ وأكثر المواطن الطبيعية لهذه البكتيريا هي التربة. تم اختبار جميع العزلات لهذه البكتيريا التي استطاعت النمو على الوسط الانتقائي Acetate Sodium Selective والمكونة للبروتينات البلورية المبيدة للحشرات (ICP) insecticidal crystalline proteins عند تصبيغها بصبغة براءة Coomassie brilliant blue (CBB) لأجراء التشخيص الوراثي باستخدام عدة الاستخلاص (Mini DNA Bacteria Kit) المجهزة من قبل شركة Bioneer وكانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح ما بين (1.22-2.01) لجميع العزلات المختارة، تم تشخيص البكتيريا على مستوى الجنس والنوع باستخدام الجين 16S rDNA ذو الوزن الجزيئي 380 زوج قاعدي حيث أظهرت نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) أن جميع العزلات تحتوي على هذا جين وبنفس الوزن الجزيئي وهو 380 زوج قاعدي ،كذلك تم تشخيص العزلات الحاوية على الجين المكون للبروتينات البلورية وهو

cry ذو الوزن الجزيئي 200 زوج قاعدي وبأستخدام بادئ متخصص لهذا الجين في تفاعل البلمرة التسلسلي وأظهرت نتائج تضاعف الجين أن جميع العزلات كانت تحتوي على هذا الجين وبنفس الوزن الجزيئي وهو 200 زوج قاعدي. بعد التأكد من البكتيريا الممرضة بأنها تعود للجنس *Bacillus* والنوع *Bacillus thuringiensis* حسب التشخيص الكيميائي الحيوي والتشخيص الوراثي الجزيئي، حضرت تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي وهي (1،2،3،4،5) غم/لتر من المستحضر الحيوي لهذه البكتيريا لدراسة تأثيرها على الأدوار المختلفة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*. تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لهذه البكتيريا المعزولة من التربة والماء على أدوار هذه الحشرة وهي البيوض واليرقات والعذارى والكاملات .

أظهرت نتائج اختبار تأثير المستحضر الحيوي لهذه البكتيريا على البيوض بعمر (1-2) يوم إذ بلغ أعلى معدل فقس البيض (3.2) وبنسبة (89%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل فقس البيض (0.6) وبنسبة (19 %) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من التربة. و إذ بلغ أعلى معدل فقس البيض (3.1) وبنسبة (92%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل فقس (2.1) وبنسبة 62% عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%) بالنسبة لبكتيريا المعزولة من الماء. وعلى يرقات الطور الأخير، أذ بلغ أعلى معدل هلاك (2.0) وبنسبة (99%) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل هلاك (0.5) وبنسبة (26%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (0.07) وبنسبة (3%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من التربة. و بلغ أعلى معدل الهلاك (1.2) وبنسبة (57%) عند تركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل هلاك (1.0) وبنسبة (6%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة (0.07) وبنسبة (3%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من الماء. وعلى العذارى بعمر (6-7) يوم

، إذ بلغ أعلى معدل بزوغ للعدارى (3.1) وبنسبة (92%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل بزوغ للعدارى (0.4) وبنسبة (13 %) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من التربة. و إذ بلغ أعلى معدل بزوغ للعدارى (3.1) وبنسبة (92%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل بزوغ للعدارى (2.1) وبنسبة (62 %) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من الماء. وعلى قتل بالغات، إذ بلغ أعلى معدل قتل للذكور (1.6) وبنسبة (32%) و الإناث (1.5) وبنسبة (30%) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل قتل للذكور (0.5) وبنسبة (10%) والإناث (0.4) وبنسبة (13%)، مقارنة بمعاملة السيطرة للذكور (0.1) وبنسبة (2%) والإناث (0.1) وبنسبة (2%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من التربة. و بلغ أعلى معدل قتل للذكور (0.8) وبنسبة (32%) و الإناث (0.7) وبنسبة (30%) عند تركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل معدل قتل للذكور (0.2) وبنسبة (4%) والإناث (0.4) وبنسبة (13%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة للذكور (0.1) وبنسبة (2%) والإناث (0.1) وبنسبة (2%) بالنسبة للبكتيريا المعزولة من الماء ، وعلى إنتاجية الأنثى الواحدة من البيض أذ بلغ أعلى معدل إنتاج البيض 84.5 بيضة للأنثى الواحدة عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي ، وأقل معدل إنتاجية البيض 54.5 بيضة للأنثى الواحدة عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة إذ بلغ معدل إنتاجية البيض 87.5 بيضة للأنثى الواحدة بالنسبة للبكتيريا المعزولة من التربة. وبلغ أعلى معدل إنتاج البيض (85%) بيضة للأنثى الواحدة عند لتركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي ، وأقل معدل إنتاجية البيض (79.5%) بيضة للأنثى الواحدة عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة بمعاملة السيطرة إذ بلغ معدل إنتاجية البيض (85.5%) بيضة للأنثى الواحدة بالنسبة للبكتيريا معزولة من الماء.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	قائمة المحتويات	
VI	قائمة الأشكال	
VIII	قائمة الجداول	
X	قائمة الصور	
XII	قائمة المختصرات	
الفصل الأول : المقدمة		
1	المقدمة	1
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
5	التصنيف العلمي لذبابة ثمار القرعيات (المقات): <i>Dacus ciliatus</i>	1-2
5	انتشار ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> (Loew)	2-1-2
6	التأثير الاقتصادي لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> The economic impact of <i>Bt</i>	3-1-2
9	دورة حياة ذبابة القرعيات Life cycle of <i>Dacus ciliatus</i>	4-1-2
12	تربية ذبابة ثمار القرعيات مختبريا <i>Dacus ciliatus</i> (Loew)	5-1-2
13	المكافحة الأحيائية لذبابة القرعيات Bio control of <i>Dacus ciliatus</i>	6-1-2
14	المبيدات الحشرية الميكروبية Microbial Insecticides	2-2
16	جنس البكتيريا The Genus <i>Bacillus</i>	3-2
16	مجموعة بكتيريا The <i>Bacillus cereus</i> Group	1-3-2
17	نبذة تاريخية عن البكتيريا History of <i>B.thuringiensis</i>	4-2
19	تصنيف البكتيريا Classification of Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	1-4-2
21	الخصائص المورفولوجية لبكتيريا Morphological Features of <i>B.thuringiensis</i>	2-4-2

21	Natural Habitats of <i>B. thuringiensis</i> المواطن الطبيعية لبكتيريا	3-4-2
22	<i>Bt</i> of delta (δ) endotoxins السموم الداخلية دالتا للبكتيريا	4-4-2
23	The Crystal Proteins(Cry) بروتينات البلورية	1-4-4-2
24	The Cytolytic Proteins بروتينات التحليل الخلوي	1-4-4-2
25	Classification of Insecticidal Crystal Proteins تصنيف البروتينات البلورية المبيدة للحشرات	5-4-2
26	Toxin Structure تركيب السموم	6-4-2
27	Action Mechanism of δ - Endotoxins آلية عمل السموم الداخلية دلتا	7-4-2
30	Safety of <i>Bt</i> Bio pesticides سلامة المبيدات الحيوية	8-4-2
31	Other Pathogenic Features of <i>Bt</i> الخصائص المرضية الأخرى لبكتيريا	9-4-2
32	<i>Bacillus thuringiensis</i> المحتوى الوراثي لبكتيريا	10-4-2
33	PCR بتحليل <i>Bacillus thuringiensis</i> cry الـ بكتيريا	11-4-2
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
39	Enzymes الأنزيمات	8-1-3
39	طرائق العمل	2-3
39	تحضير المحاليل وكواشف	1-2-3
40	تحضير المحاليل الخاصة بالصبغات	1-1-2-3
41	تحضير المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية	2-1-2-3
41	DNA- Extraction Solutions المحاليل المستعملة في عزل الدنا الكلي	3-1-2-3
42	الإنزيمات المستعملة	4-1-2-3
42	Electrophoresis solutions المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي	5-1-2-3
43	PCR المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا	6-1-2-3
44	Macfarland Standard محلول ثابت العكرة القياسي	7-1-2-3
45	Physiological Saline Solution المحلول الملحي الفسلجي	8-1-2-3

45	الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتيريا	3-3
45	تحضير كاشف الكاتاليز (Catalase reagent)	1-3-3
45	تحضير كاشف الأوكسيديز (Oxidase reagent)	2-3-3
45	تحضير كاشف فوكس بروسكاور VP (Voges – Proskauer reagent)	3-3-3
46	تحضير كاشف الفينول الأحمر (0.2%) (Phenol red reagent)	4-3-3
46	تحضير كاشف البروم الأزرق (Bromothymol blue)	5-3-3
46	تحضير كاشف اليود (Iodine Solution)	6-3-3
46	تحضير كاشف المثيل الأحمر (Methyl red reagent)	7-3-3
46	الايوساط الزرعية التركيبية Culture Media	4-3
47	الوسط الانتقائي لعزل وتشخيص البكتيريا	1-4-3
47	وسط اختبار الحركة	2-4-3
47	وسط فوكس بروسكاور (VP) (Voges- Proskauer media)	3-4-3
47	وسط تحلل اليوريا (urease hydrolysis media)	4-4-3
47	وسط الأكسدة/ التخمر (O/F) (Oxidation\Fermentation media)	5-4-3
48	وسط تحلل النشأ (Starch hydrolysis media)	6-4-3
48	وسط الدم الصلب (Blood Agar basie)	7-4-3
48	وسط احمر المثيل (Methyl red media)	8-4-3
49	وسط ماء الببتون (Pepton water medium)	9-4-3
49	وسط اختزال النترات (Nitrate reduction)	10-4-3
49	الحفظ على مائل الأكار Slant agar	11-4-3
49	جمع العينات Collection of Samples	5-3
50	زرع العينات Samples culture	6-3
51	تشخيص البكتيريا Diagnosis of Bacteria	7-3
51	الخصائص المظهرية والمجهريّة Morphological Characteristics	1-7-3
51	الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests	2-7-3
51	اختبار الحركة (motility test)	1-2-7-3

52	اختبار الكاتاليز (Catalase test)	2-2-7-3
52	اختبار الاوكسيديز (Oxidase test)	3-2-7-3
52	اختبار الاندول (Indole test)	4-2-7-3
53	اختبار الاحمر المثل (Methyl red test)	5-2-7-3
53	اختبار فوكس بروسكاور (Voges Proskauer)	6-2-7-3
53	اختبار تحلل اليوريا (Urease hydrolysis test)	7-2-7-3
54	اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)	8-2-7-3
54	اختبار التأكسد \ التخمر (Oxidation\ Fermentation) (OF)	9-2-7-3
54	اختبار تحلل النشا (Starch hydrolysis test)	10-2-7-3
55	اختبار اختزال النترات (Nitrate reduction)	11-2-7-3
55	اختبار الكشف عن النمو في تراكيز ملحية مختلفة	12-2-7-3
55	اختبار الكشف عن النمو على وسط الدم	13-2-7-3
55	اختبار الكشف عن النمو على وسط الماكونكي	14-2-7-3
56	أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction	8-3
57	الترجيل الكهربائي على الهلام الأكاروز Gel Electrophoresis	9-3
58	قياس تركيز الدنا ونقاوته	10-3
59	تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	11-3
60	تحضير لقاح البكتريا <i>B. thuringiensis</i>	12-3
61	مراحل إنتاج المستحضر الحيوي	1-12-3
63	تربية ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> (Loew)	13-3
64	اختبار فاعلية المستحضر الحيوي <i>Bt</i> على الادوار المختلفة لذبابة القرعيات	14-3
65	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> في نسبة فقس البيض بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>D.Ciliatus</i>	1-14-3
65	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> في تطويرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>D.Ciliatus</i>	2-14-3
66	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> في معدل تطور العذارى بعمر (6-7) يوم الى بالغات لذبابة ثمار القرعيات <i>D.Ciliatus</i>	3-14-3

67	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> في معدل عمر البالغات المتغذية على المستحضر لدبابه ثمار القرعيات <i>D.Ciliatus</i>	4-13-3
67	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> في إنتاجية أنث ذبابه ثمار القرعيات <i>D.Ciliatus</i> للبيض	5-13-3
68	التحليل الأحصائي SSPS	15-3
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
69	عزل و تشخيص بكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i>	1-4
69	العزل Isolation	1-1-4
73	توزيع البكتيريا في نظم بيئية مختلفة	2-1-4
74	الكشف عن البكتيريا <i>B.thuringiensis</i> على مستوى النوع وعن جين المكون للبروتينات البلورية cry باستخدام تقنية P.C.R	3-4
75	تشخيص البكتيريا <i>B.thuringiensis</i> على مستوى النوع	1-3-4
77	الكشف عن الجين المكون للبروتينات البلورية cry	2-3-4
78	إنتاج المستحضر الحيوي <i>B.thuringiensis</i>	4-4
79	اختبار فاعلية المستحضر الحيوي <i>B.thuringiensis</i> على أدوار ذبابه ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i>	5-4
79	معاملة البيض بعمر (1-2) يوم	1-5-4
79	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل فقس بيوض ذبابه ثمار القرعيات <i>Dacus</i> <i>ciliatus</i> وبعمر (1-2) يوم	1-1-5-4
81	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل فقس بيوض ذبابه ثمار القرعيات <i>Dacus</i> <i>ciliatus</i> وبعمر (1-2) يوم	2-1-5-4
86	معاملة الطور اليرقي الأخير	2-5-4
86	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة <i>B. thuringiensis</i> في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابه ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i>	1-2-5-4

89	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء <i>B. thuringiensis</i> في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	2-2-5-4
96	معاملة عذارى بعمر (2-6) يوم	3-5-4
96	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	1-3-5-4
99	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	2-3-5-4
104	تأثير معاملة غذاء البالغات	4-5-4
104	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في بالغات ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	1-4-5-4
108	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في بالغات ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	2-4-5-4
114	تأثير بكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من تربة والماء في معدل عدد البيض الذي تضعه البالغات المعاملة	5-5-4
الاستنتاجات والتوصيات		
118		الاستنتاجات
119		التوصيات
المصادر		
120		المصادر العربية
125		المصادر الإنكليزية
الملاحق		

ملحق 1	أنواع البوادئ المستعملة في الدراسة	143
ملحق 2	الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة bp DNA Ladder100	144
ملحق 3	دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي لـ PCR	145

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
74	النسبة المئوية لانتشار البكتيريا <i>B.thuringiensis</i> في النظم البيئية المختلفة.	شكل (4-1)
80	النسبة المئوية لمعدل فقس البيوض المعاملة بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالمستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (25±2) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-2)
81	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من التربة في النسبة المئوية لمعدل فقس البيض لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بعمر (1-2) وبالأيام وبدرجة حرارة (25±2) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-3)
83	النسبة المئوية لمعدل فقس البيوض المعاملة بعمر (1-2) لذبابة القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> يوم بالمستحضر الحيوي لبكتيري <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من الماء وبدرجة حرارة (25±2) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-4)

83	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من الماء في النسبة المئوية لمعدل فقس البيض بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبالأيام وبدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65 %. نسبية 65±5%.	شكل (4-5)
84	النسبة المئوية للمعدل الكلي لفقس بيض ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> المعامل بعمر (1-2) يوم	شكل (4-6)
88	النسبة المئوية لمعدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> والمعرضة الى تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> غم/لتر المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65 %	شكل (4-7)
88	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> غم/لتر المعزولة من التربة في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالأيام وبدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65 % ..	شكل (4-8)
91	النسبة المئوية لمعدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> والمعرضة الى تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> غم/لتر المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65 %	شكل (4-9)
91	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> غم/لتر المعزولة من الماء في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبالأيام وبدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65 %	شكل (4-10)
92	النسبة المئوية لمعدل هلاك الكلي ليرقات الطور الأخير لذبابة القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> والمعرضة للمستحضر الحيوي لبكتيري <i>B. thuringiensis</i> والمعزولة من الماء والتربة.	شكل (4-11)

98	النسبة المئوية لمعدل بزوغ العذارى المعاملة بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> المعاملة بتركيزات مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيري <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من التربة بدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65%	شكل (4-12)
99	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في النسبة المئوية لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبالأيام في درجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65%	شكل (4-13)
101	النسبة المئوية لمعدل بزوغ العذارى المعاملة بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> المعاملة بتركيزات مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيري <i>B.thuringiensis</i> والمعزولة من الماء بدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-14)
102	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في النسبة المئوية لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبالأيام في درجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-15)
103	النسبة المئوية للمعدل الكلي لبزوغ العذارى المعاملة بالمستحضر الحيوي لبكتيري <i>B.thuringiensis</i> dh المعزولة من الماء والتربة لذبابة القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	شكل (4-16)
107	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل قتل البالغات (ذكور) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالأيام و بدرجة حرارة (2±25) ° م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-17)

107	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من التربة في قتل البالغات (إناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالأيام و بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5%±65.	شكل (4-18)
108	تأثير بكتريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل قتل بالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5%±65	شكل (4-19)
111	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من الماء في قتل بالغات (ذكور) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالأيام و بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5%±65.	شكل (4-20)
111	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل قتل البالغات (إناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بالأيام و بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5%±65.	شكل (4-21)
113	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5%±65 .	شكل (4-22)
113	النسبة المئوية لمعدل الكلي لقتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> المعاملة بالمستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من الماء والتربة.	شكل (4-23)
115	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة	شكل (4-24)

	(2±25)°م و رطوبة نسبية 5±65%.	
116	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا <i>Bacillus thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة (2±25)°م و رطوبة نسبية 5±65%.	شكل (4-25)

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
35	Apparatus & Equipments الاجهزة و الادوات	جدول (3-1)
36	Chemical Materials المواد الكيميائية	جدول (3-2)
37	Reagents Used الكواشف المستخدمة	جدول (3-3)
38	Stains used الصبغات المستخدمة	جدول (3-4)
38	Laboratory Kit العدة المختبرية	جدول (3-5)
39	Ready prepared media الأوساط الزرعية الجاهزة	جدول (3-6)
39	مواد متفرقة	جدول (3-7)
39	مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيري	جدول (8-3)
44	تتابعات وتراكيز البوادئ وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ	جدول (9-3)
59	Master Mix مكونات خليط التفاعل الرئيسي	جدول (10-3)
60	P.C.R برمجة جهاز	جدول (11-3)
69	النسبة المئوية للغلزلات الموجبة لصبغة غرام المعزولة من مواقع بيئية مختلفة	جدول (1-4)
71	الاختبارات الكيموحيوية لـ <i>Bacillus thuringiensis</i>	جدول (2-4)

75	نفاوة وتركيز الدنا البكتيري المستخلص	جدول (4-3)
80	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبعمر (1-2) يوم	جدول (4-4)
82	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> وبعمر (1-2) يوم	جدول (4-5)
84	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> النسبة المئوية للمعدل الكلي لفقس البيض لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus Ciliatus</i>	جدول (4-6)
87	تأثير تراكيز مختلفة من البكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	جدول (4-7)
90	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي البكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	جدول (4-8)
92	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> في النسبة المئوية للمعدل هلاك الكلي لطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus Ciliatus</i> .	جدول (4-9)
98	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	جدول (4-10)
101	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B. thuringiensis</i> المعزولة من الماء في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> .	جدول (4-11)
102	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي <i>B. thuringiensis</i> في المعدل الكلي لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i>	جدول (4-12)
106	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من التربة في	جدول (4-13)

	معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة (25±2)°م و ورطوبة النسبية 5±%65.	
110	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا <i>B.thuringiensis</i> المعزول من الماء في معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i> بدرجة حرارة (25±2)°م و ورطوبة النسبية 5±%65	جدول (4-14)
112	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا <i>Bacillus thuringiensis</i> في معدل الكلي لقتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات <i>D. ciliatus</i>	جدول (4-15)
115	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل إنتاجية البيض للأنتى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i>	جدول (4-16)
116	تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا <i>B.thuringiensis</i> المعزولة من التربة في معدل إنتاجية البيض للأنتى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات <i>Dacus ciliatus</i>	جدول (4-17)

قائمة الصور

الصفحة	العنوان	التسلسل
8	مظهر الإصابة لذبابة ثمار القرعيات (<i>D. ciliatus</i> (Loew) لمحصول القرع قوة التكبير X10	صورة 1
10	دور البيضة لذبابة ثمار القرعيات (<i>D. ciliatus</i> (Loew) داخل نسيج ثمرة القرع قوة التكبير X10	صورة 2
11	دور اليرقة لذبابة ثمار القرعيات (<i>D. ciliatus</i> (Loew) داخل نسيج ثمرة القرع قوة التكبير X10	صورة 3
11	دور العذراء لذبابة ثمار القرعيات (<i>D. ciliatus</i> (Loew) قوة التكبير X10	صورة 4
12	دور الحشرة الكاملة لذبابة ثمار القرعيات (<i>D. ciliatus</i> (Loew) قوة	صورة 5

	التكبير X10	
27	(A) تركيب بروتين البلوري Cry 3A (B) تركيب بروتين التحليل الخلوي Cyt 2A	صورة 6
29	إلية العمل لجين cry δ -endotoxin	صورة 7
30	يوضح إلية السمية لبكتيريا Bt	صورة 8
63	مستحضر الحيوي لبكتيريا Bt المعزولة من التربة والماء	صورة 9
64	صناديق تربية الحشرات.	صورة 10
65	تحضير تخافيف من المستحضر البكتيريا BT	صورة 11
66	معاملة يرقات الطور الرابع	صورة 12
68	صناديق لمعاملة البالغات	صورة 13
72	صبغة غرام Gram stain	صورة 14
72	السبورات (صبغة الملكايت)	صورة 15
72	السبورات والبروتينات البلورية (صبغة كاربول فوكسين).	صورة 16
72	اشكال الكريستالات البروتينية المختلفة (صبغة CBB).	صورة 17
76	الترحيل الكهربائي للكشف عن 16S rDNA المتضاعفة باستخدام تقنية (PCR) الترحيل على هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 100 فولت مدة قدرها 45 دقيقة.	صورة 18
77	الترحيل الكهربائي للكشف عن الجينين cry المتضاعفة باستخدام تقنية (PCR) الترحيل على هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 100 فولت مدة قدرها 45 دقيقة .	صورة 19
93	تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>Bacillus thuringiensis</i> على يرقات الطور الأخير لذبابة القرعيات مصورة بوساطة مجهر ضوئي وبقوة تكبير 45X.	صورة 20
103	عذارى ذبابة ثمار القرعيات <i>D.ciliatus</i> بعمر (6-7) يوم المعرضة الى المستحضر الحيوي لبكتيريا <i>B.thuringiensis</i> بوساطة مجهر ضوئي وبقوة تكبير 45X.	صورة 21

قائمة المختصرات

قائمة المختصرات	
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
bp	Base pair
CBB	Coomasie Brilliant Blue
<i>cry</i>	Crystal
<i>cyt</i>	Cytolytic
dH ₂ O	Deionized water
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DNA	Deoxynuclic acid
EDTA	Ethylene di-amine tetra acetic acid
g	Grams
L	Liter
MD	Mega Dalton
μl	Microliter
PCR	Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
Tris-OH	Tris-(hydroxymethyl) methylamine
WHO	World health organization

المقدمة

Introduction

استعراض المراجع

Literature Review

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

النتائج و المناقشة

Results and Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

المصادر

References

الملاحق

Appendix

1. المقدمة Introduction

عرفت العائلة القرعية باسم Cucurbitaceae ويطلق على محاصيل الخضر التابعة لها اسم القرعيات Cucurbits ومعظمها من المحاصيل الحولية ، إذ يعد البطيخ والخيار وقرع الكوسة من أهم محاصيل الخضر التابعة لهذه العائلة في المنطقة العربية بشكل عام وفي العراق بشكل خاص، وبموجب الإحصائيات لعام 2007 المساحات المزروعة في العراق من البطيخ والخيار بلغت 44.05 و 49.95 ألف هكتار على الترتيب ، وتميز العراق بأنه أكثر البلدان العربية زراعة للخيار وثاني بلد عربي في زراعة البطيخ بعد مصر ، وتشير الإحصائيات نفسها إن الإنتاجية من البطيخ والخيار بلغت 11882 و 6954 كغم/هكتار على الترتيب ، أما مجمل الإنتاج من البطيخ والخيار فبلغا 523.40 و 347.35 ألف طن على الترتيب (الكتاب السنوي للإحصائيات الزراعية ، 2008).

تعدّ عائلة ذبابة ثمار القرعيات (Family:Tephritidae) من أهم العوائل التي تضم أنواعاً ذات أهمية اقتصادية خاصة على ثمار الفاكهة والخضر في المناطق الأستوائية وشبه الأستوائية وتسبب خسارة تتراوح بين 30-70% من الحاصل (Royer و Hancock 2002؛ Gillani وآخرون، 2012). يوجد حوالي أكثر من 4000 نوع يعود الى هذه العائلة يعود الى SubFamily:Dacine ومن بين اهم اجناسها *Dacus* و *Bactorcera* الذي يعود لهما أكثر من 50 نوعاً من انواع الذباب الاشد ضرر بثمار الخضر العائلة القرعية فضلا عن انواعها البرية الأخرى مثل الحنظل البري *Citrullus colocynthus schard* والليف *Luffa* *eaegyptiaca* Miller (مهدي، 2002)، من انواع ذبابة الفاكهة المهمة في العراق ذبابة ثمار القرعيات او ذبابة الفاكهة الاثيوبية *Cucurbit Ethiopian fruit fly or Dacus ciliatus* التي سجلت من قبل Moanas و Abdul-Rassoul (1988) باتت هذه الذبابة عائقاً لتقدم زراعة محاصيل عائلة القرعية في معظم بلدان آسيا وأفريقيا ومنها العراق خاصة بعد ظهورها لأول مرة

فيه عام 1988 في منطقتي الكوت والعمارة وتشخيصها على ثمار القرعيات (1989, Abdul-Rassoul و Moanas) .

تعدّ ذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus* التي تنتمي إلى عائلة الذباب الحقيقي من الآفات الرئيسية على محاصيل العائلة القرعية (2013, Aldawood). إذ تسبب ذبابة ثمار القرعيات أضراراً اقتصادية هامة لمحاصيل العائلة القرعية إذ قدرت هذه الخسائر في العراق بأكثر من 50% من حاصل القرعيات للموسمين 1998 و 1999 (الجبوري، 1999) . وتختلف نسبة الإصابة من سنة إلى أخرى تصل أحياناً إلى 90% في بعض السنين خاصة في المناطق الوسطى والجنوبية من العراق (الوائلي، 2014). أن الأضرار الناجمة عن تغذية اليرقات على الفاكهة يمكن أن تصل إلى 90% من المحصول (2015, Deguine و Delpoux) .

إنّ الزراعة الواسعة لثمار القرعيات في العراق خاصة إذ إنها تزرع مرتان في السنة ، والظروف المناخية الملائمة لمعيشة الحشرة ، و عدم وجود الأعداء الحيوية لها أو قتلها كل هذه العوامل أدت إلى انتشار هذه الحشرة وازدياد أضرارها على ثمار العائلة القرعية وبالتالي زيادة معاناة المزارعين بسبب شدة إصابتها لثمار القرعيات في معظم محافظات القطر مسببه أضراراً اقتصادية كبيرة بسبب تغذية اليرقات على الثمار إذ تفضل هذه الحشرة قرع الكوسة وخيار القثاء وبدرجة اقل خيار الماء والقرع العنكابي من خلال درجة إصابتها لهذه الثمار (مهدي ، 2000). مما يؤدي إلى تعفنها ورداءة نوعيتها وبالتالي صعوبة تسويقها ، وإزاء هذا الواقع ولوضع حلول ناجحة وشاملة لمشكلة ذبابة ثمار القرعيات التي يعاني منها المزارعون في مختلف مناطق العراق إذ استعملت في البداية المبيدات الكيميائية بشكل رئيس ، وبسبب ما لهذه الطريقة من تأثيرات سلبية على النظام البيئي إذ تشكل اليوم احد عناصر التلوث المهمة في البيئة (شعبان والملاح ،

1993) وإخفاقها في السيطرة التامة على الآفات وبالأخص الحشرية منها ولاسيما تلك التي تقضي بعض ادوار حياتها داخل أجزاء النبات (Ahmed وHugue، 1969).

نظراً للانتشار السريع لهذه الآفة في العراق فقد أصبحت خطراً يهدد ثمار القرعيات التي تسهم اسهاماً فعالاً في سد جزء كبير من الاحتياجات الغذائية للشعب العراقي ، لعدم جدوى استعمال المبيدات الكيميائية في الحد من اضرارها ، إضافة لقدرة هذه المبيدات على تلويث النظام البيئي ، فقد ينتج عن ذلك تأثيرات سلبية على الإنسان والحيوان وظهور سلالات حشرية مقاومة لفعل هذه المبيدات، مما يؤدي للبحث عن وسائل بديلة أكثر أماناً من الناحية الصحية وقل ضرراً على النظام البيئي (الطويل وآخرون، 2005).

لذا اتجهت الانظار نحو استخدام الوسائل الحيوية في مجال مكافحة الآفات الحشرية باستخدام الممرضات الحشرية ومن بينها البكتيريا ومن أهمها البكتيريا المنتجة للبروتينات البلورية *Bacillus thuringiensis* (توفيق، 1997). ونتيجة لامتلاك البكتيريا *Bacillus thuringiensis* القدرة على إنتاج البلورات البروتينية Crystal Proteins (Cry) التي تكون مسؤولة عن صفة السمية للحشرات إذ تنتج هذه البكتيريا الكثير من عوامل الضراوة مثل بروتينات المبيدات الحشرية vegetative insecticidal proteins والسموم الداخلية دالتا delta-endotoxins وانزيم chitinase ، والتنوع في إنتاج هذه العوامل المختلفة جدا بين الأنماط المصلية العائدة لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* ، وأحياناً تختلف بين العزلات العائدة للنمط المصلي نفسه (Travis وMaureen، 2000). لذا ركزت البحوث حول استخدام هذا النوع من البكتيريا في مجال السيطرة البيولوجية بوصفها مبيداً للآفات الزراعية (بلاسم

وآخرون، 2014). أهم ميزة لهذه البروتينات هي إمراضية للحشرات وكل بروتين بلوري لديه مضيف مميز.

امتازت مستحضرات *B.thuringiensis* بالتخصص الدقيق وتدني كلفة الانتاج وعدم احداثها تلوث بالبيئة ولا تترك متبقيات في التربة ولا تضر بالأعداء الحيوية لكونها مبيدات متخصصة في تأثيرها وغير سامة للزواحف ولللبائن والبرمائيات (جميل وحمد، 2014).

1-2 الهدف من الدراسة: Aim of study

نظراً لما تقدم من أهمية ذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus* ولقلة وجود الدراسات حول استخدام البكتيريا الممرضة *B.thuringiensis* في السيطرة على الحشرة ولكون المبيدات الكيميائية غير كفوءة في القضاء على الحشرة وكذلك لكونها ملوثات بيئية لذا تم اقتراح موضوع الدراسة ليشمل الجوانب الآتية:

أولاً: امكانية عزل البكتيريا الممرضة *B. thuringiensis* من نظم بيئية مختلفة وتشخيصها وتوصيفها بوساطة بعض الاختبارات الكيمو حيوية.

ثانياً: تصنيف البكتيريا الممرضة *B.thuringiensis* وراثياً باستخدام معلومات جزيئية متخصصة من دنا النواة وهي 16S rDNA وباستخدام تقنية PCR .

ثالثاً: الكشف عن وجود الجين *cry* الذي يشفر للبروتينات البلورية Crystal Proteins في هذا النوع من البكتيريا باستخدام معلومات جزيئية متخصصة.

رابعاً: دراسة تأثير البكتيريا الممرضة *B. thuringiensis* المعزولة من التربة والماء في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus* .

2. استعراض المراجع Literature Review

1-2 التصنيف العلمي لذبابة ثمار القرعيات (المقات): *Dacus ciliatus* (Loew)

تتنمي ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* إلى رتبة ثنائية الأجنحة Diptera عائلة ذبابة الفاكهة الحقيقي Tephritidae صنف الحشرات Insecta (Aldawood, 2013)، وتعد رتبة ثنائية الأجنحة Diptera ثاني أكبر الرتب التابعة لصنف الحشرات إذ تضم حوالي (10000-80000) نوع موزع ضمن 140 عائلة (James و Harwood, 1979). وصنفت ذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* (Loew) من قبل (Norrbon وآخرون، 1999a) إلى:

Kingdom: Anemalia

Subkingdom: Metazoa

Phylum: Arthropoda

Subphylum : Mandibulata

Class: Insecta

Subclass: Pterygota

Division: Endopterygota

Order: Diptera

Suborder: Brachycera

Section: Cyclorrahapha

Series: Aschiza

Superfamily: Tephritoidea

Family: Tephritidae New man, 1834.

Subfamily: Dancinae

Genus: *Dacus*

Species: *Dacus ciliatus*

2-1-2 انتشار ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* (Loew)

تعدّ عائلة ثمار الفاكهة الحقيقي (Family: Tephritidae) من أهم العوائل الحشرية التي تضم أنواعاً ذات أهمية اقتصادية تتراوح بين 30-70% من الحاصل (الجوراني، 2013)، وتعد عائلة

Tephritidae من أشهر عوائل رتبة ثنائية الأجنحة Diptera والتي تنتشر في المناطق المعتدلة والاستوائية (Dhillon وآخرون، 2005 ; Chaudhary, 2013) وهي تضم العديد من الاجناس والانواع والتي تتركز معظمها في مناطق افريقيا الاستوائية وبشكل قليل في الامريكيتين واستراليا ، ونظرا للتنوع الكبير في انواع عائلة الذباب الحقيقي في المناطق الافريقية والاستوائية القديمة فإنه يعزاً لها الاصل لهذه الحشرات ومنها انتشرت إلى مناطق العالم القديم (Hancock, 1986; Norrbom, 1994).

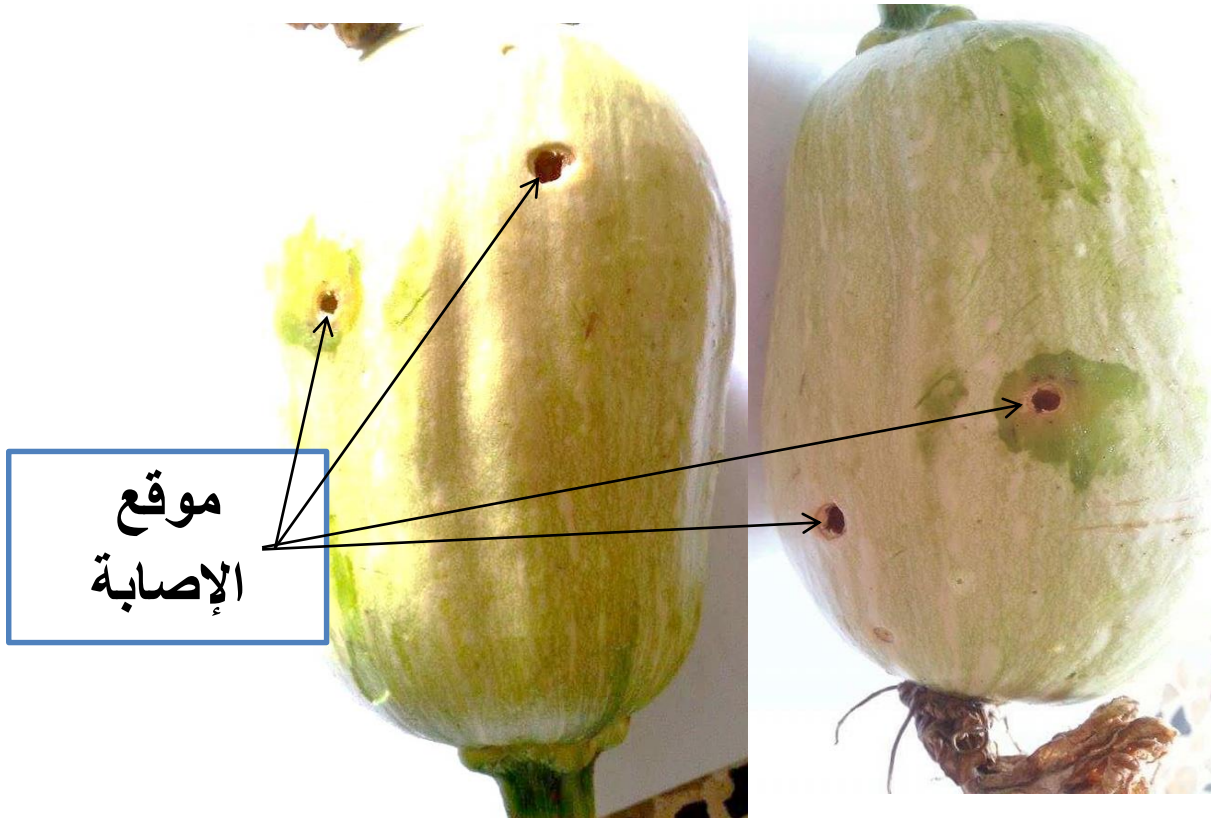
تنتشر أنواع الجنس *Dacus* في العديد من الدول الأفريقية ومنها مصر وموريتانيا ، واريتريا ، وأثيوبيا ، وغانا ، ونايجيريا ، وانغولا وجنوب أفريقيا والسودان وكذلك تنتشر في العديد من دول آسيا ومنها بنغلادش ، والهند ، وإيران ، والباكستان ، والسعودية واليمن ، وكما سجلت في الباكستان وسوريا والأردن (Aldawood, 2013 ; الحريري، 1978؛ Kapoor, 2005) ولأنتتشر في المناطق الباردة من العالم (Castro, 2014). من أنواع ذباب ثمار الفاكهة المهمة في العراق ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* التي سجلت لأول مرة في العراق من قبل Moanas و Abdul - Rassoul (1988) في محافظتي الكوت والعمارة .

3-1-2 التأثير الاقتصادي لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*

تضم عائلة الذباب الحقيقي Tephritidae حوالي 4200 نوع ونوع تعود إلى 470 جنساً وإن 250 نوعاً منها تعد افات اقتصادية، لأنها من آكلات النبات Phytophagus ولا سيما من آكلات الفواكه Frugivorous ، ومن هنا جاءت تسميتها ، وإن العديد من انواعها تقضي جزءاً من دورة حياتها داخل الفواكه او في اجزاء اخرى من النبات كالسيقان والازهار والبذور كما ان بعضها يهاجم الخضراوات (Maria, 2010) .

ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* تعدّ من الآفات الخطرة على محاصيل القرعيات حيث تكمن خطورتها في إكمال دورة حياتها، ولاسيما يرقاتها التي تعد إجبارية التطفل على النسيج الحي داخل الثمرة وبالتالي تسبب خسائر جسيمة في محاصيل هذه العائلة (الطويل وآخرون، 2005)، والأضرار الناجمة عن تغذية اليرقات على الفاكهة يمكن أن تصل إلى 90% من المحصول (Delpoux و Deguine، 2015)

ذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus* التي تنتمي إلى عائلة الذباب الحقيقي تعد من الآفات الرئيسة على محاصيل العائلة القرعية (Aldawood، 2013) ويعتمد ضرر الحشرات على أنواع العوائل النباتية التي تتغذى عليها وعلى طبيعة تغذيتها، إن الضرر الذي تحدثه حشرة ذبابة ثمار القرعيات بثمار عوائلها وخاصة القرعيات يمكن أن يؤدي إلى انخفاض جودة الثمار بسبب ثقب وضع البيض وما تسببه من تشوه أو تجعد للثمار، إضافة إلى تغذية اليرقات على لب تلك الثمار مسببة تعفن الثمار (Azab و Kira، 1954)، وذكر حماد (1977) إن القرعيات تتعرض للإصابة بذبابة ثمار القرعيات بمجرد عقدتها كما تصاب أيضا الثمار الكبيرة، إذ تضع الأنثى بيضها داخل الثمار كما موضح في الصورتين رقم 1 وتظهر أماكن وخز آلة وضع البيض كأماكن طرية تخرج منها مادة لزجة لا تلبث إن تجف ويظهر مكانها ثقب صغير مستديرة، وبعد فقس البيض تتغذى اليرقات داخل الثمار وتتسع الأماكن الطرية تدريجيا بحسب زيادة تغذية اليرقات وربما تتلف الثمرة كلها، ويتسبب عن إصابة الثمار بهذه الحشرة الإصابة بالفطريات والبكتيريا مما يزيد من تلف الثمار.



صورة 1

مظهر الإصابة لذبابة ثمار القرعيات (*D. ciliatus* (Loew) لمحصول القرع

قوة التكبير 10X

أوضحت نتائج إحدى الدراسات في العراق أنَّ الحشرة إضافة إلى إصابتها قرع الكوسة وخيار القثاء وخيار الماء إلا أنها قد تصيب القرع العنكابي والبطيخ والليف (مهدي ، 2000). إذ تتفاوت النسبة المئوية للإصابة بهذه الحشرة في العراق على بعض عوائلها النباتية إذ كان أشدها إصابة في الموسم الخريفي عام 1988 القرع العنكابي يليه نبات الليف بنسبة إصابة 60 % على ثمار القرع العنكابي مقابل 30 % على ثمار الليف في نهاية شهر تشرين الأول ، في حين في الموسم الربيعي لعام 1999 كانت النسبة المئوية لإصابة الثمار على العائلين النباتيين القرع العنكابي والبطيخ واطئة إذ بلغت 30 % و 20 % على الترتيب في حين تباينت نسب الإصابة خلال الموسم الخريفي لعام 1999 بين العوائل النباتية الثلاث وقد تفوق أيضا القرع العنكابي بأعلى نسبة مئوية للإصابة والتي

بلغت 50 % في نهاية تشرين الأول مقابل 20 % على ثمار الليف في حين ظلت نسبة الإصابة المئوية على ثمار البطيخ واطئة (مهدي ، 2000).

2-1-4 دورة حياة ذبابة القرعيات *Dacus ciliatus* Life cycle

بعد إكمال نمو الذبابة جنسياً تتلاقح الذكور والإناث وتبدأ أنثى ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliatus* بوضع بيضها تحت قشرة الثمرة (حديثة التكوين) داخل ثمار القرع وخيار الماء وخيار القثاء والليف بواسطة آلة وضع البيض الحادة الموجودة في مؤخرة بطنها. يوضع البيض في مجموعات تتراوح ما بين ثلاث إلى تسع مجموعات وكل مجموعة بها ما بين 8 - 12 بيضة ويستمر وضع البيض لمدة 10 أيام وتضع الأنثى ما يقارب 200 بيضة (Hancoc, 1989 و Jeyasankar, 2009).

إنّ بيوض ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliatus* إهليلجية متطاولة ذات لون ابيض كما موضح في صورة 2 يفقس البيض خلال (5-10 ايام) معطياً يرقات بيضاء صغيرة عديمة الأرجل ثم تتغذى على أنسجة الطبقة السطحية تحت القشرة صانعة أنفاقاً متعرجة دقيقة وتقذف برازها للخارج فيتجمع على سطح الثمرة ويعتبر هذا البراز أحد الدلائل التي تستخدم في التعرف على الإصابة. وبعد إن تنسلخ اليرقات تبدأ في التحرك نحو قلب (لب) الثمرة محدثة أنفاقاً تتسع كلما اتجهت اليرقات إلى الداخل ثم يتحول لون الأنفاق إلى اللون البني. لليرقة ثلاثة انسلاخات بعد إكمالها تكون قد وصلت منطقة تكوين البذور في الثمرة (Maher, 1957).

تعدّ طريقة وضع البيض وثقب القشرة الخارجية للثمرة (كما في جميع حشرات ذبابة الفاكهة) ثغرات لدخول جراثيم العفن الذي يتكاثر في أنسجة الثمرة مما يسهل عملية هضم الأنسجة الصعبة (القوية) لليرقات. وبدون إفرازات العفن لا تستطيع اليرقات هضم غذائها وربما تموت جوعاً في بعض الأحيان (El-Nahal وآخرون، 1970) ، وعند اكتمال نمو اليرقات يصبح طولها ما بين 10 - 12

ضعفاً عما كانت عليه عند الفقس. واليرقات رقيقة مخروطية الشكل رأسها دقيق يظهر على هيئة نقطة سوداء ومؤخرتها أعرض من منطقة الرأس كما في صورة 3. بعد اكتمال النمو اليرقي فإنها تثقب جسم الثمرة وتسقط إلى الأرض حيث تتحول إلى خادرة مستورة برميلية يكون غلاف العذراء بيضوي نهايته الأمامية مدببة أكثر من الخلفية ، يكون السطح الظهري محدباً في حين يكون السطح البطني مستويا ، لونها عاجي بعد التعذر مباشرة ثم يصبح ابيض ذهبياً كما موضح في صورة 4 وتكون عذارى الإناث اكبر حجماً من عذارى الذكور دائماً و تخرج من العذارى بالغات متوسطة الحجم يبلغ معدل طول الإناث 8 ملم والذكور 7.5 ملم كما في صورة رقم 5 و بعد 10-15 يوماً لتبدأ دورة حياة جديدة ،

(حسني وآخرون، 1976; Azab وآخرون، 1970; Hancock, 1989)



صورة 2

دور البيضة لذبابة ثمار القرعيات (*D. ciliatus* Loew) داخل نسيج ثمرة القرع
قوة التكبير 10X



صورة 3

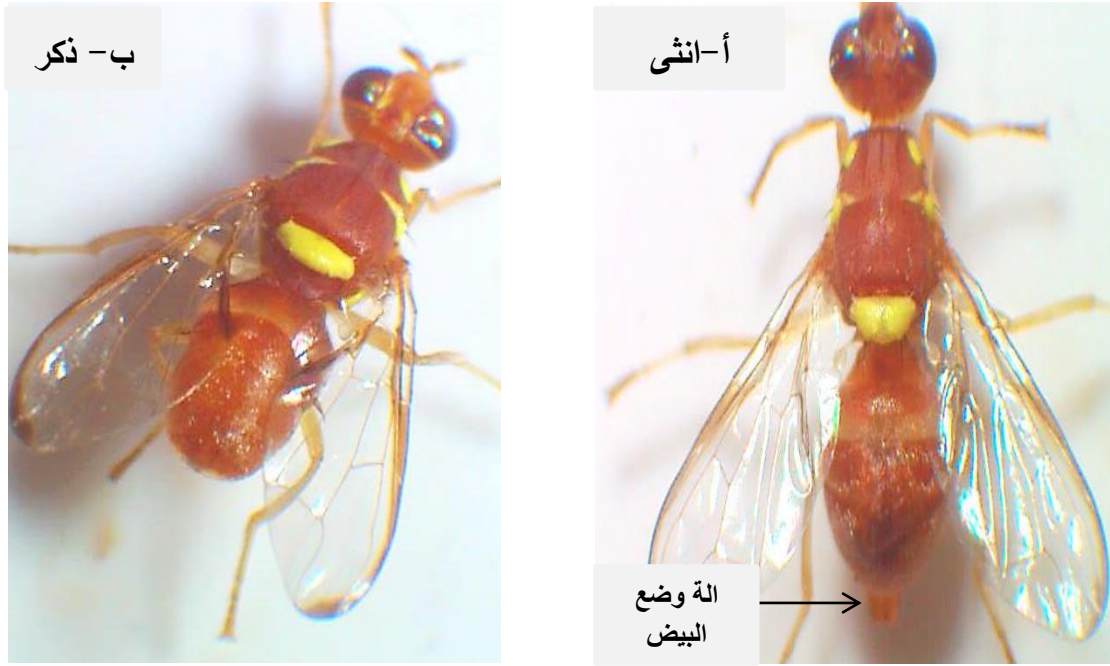
دور اليرقة لذبابة ثمار القرعيات (*D. ciliatus* (Loew داخل نسيج ثمرة القرع قوة التكبير 10X



صورة 4

دور العذراء لذبابة ثمار القرعيات (*D. ciliatus* (Loew

قوة التكبير 10X



صورة 5

دور الحشرة الكاملة لذبابة ثمار القرعيات *D. ciliatus* (Loew)

قوة التكبير 10X

5-1-2 تربية ذبابة ثمار القرعيات مختبريا *Dacus ciliatus* (Loew)

إنَّ تربية الحشرات وإكثارها بالأعداد المطلوبة تعد الخطوة الأساسية في الدراسات والأبحاث الخاصة بالحشرات من الناحيتين العلمية والتطبيقية ، من أجل إيضاح الكثير من الخصائص البيئية والوظيفية والسلوكية وغيرها ومن أجل إن تكون هذه الدراسات مقبولة علميا فلا بد من توفير عدد وفير من الحشرات الأمر الذي يصعب توفيره في الطبيعة بالشكل المناسب و بالكيفية والتوقيت انفسهما وخاصة إذا ما تمت الدراسة على طور محدد من اطوار الحشرة ، وفي مجال مقاومة الحشرات ومكافحتها بالطرائق البيولوجية بما فيها المسببات المرضية حيث تستخدم البكتيريا *Bacillus thuringiensis* في مكافحة هذه الحشرة إذ تلزمتنا أعداد كبيرة من الحشرات لذلك أصبحت عملية

تربية الحشرات خطوة أساسية في المختبرات والمراكز البحثية المتخصصة لمثل هذه الدراسات (الوالي ، 2014). يتم تجهيز كل من ذبابة الفاكهة الشرقية *D. dorsalis* (Hendle) وذبابة البطيخ *D. cucurbitae* (Coquillett) البازغة حديثا بالسكر لافتقادها للطاقة المخزونة أو أنها تمتلك القليل منها (Harris وآخرون، 1968)، وقام El-Nahal وآخرون (1970) بتوفير أغذية مختلفة لبالغات ذبابة ثمار القرعيات لمعرفة مدى تأثيرها في أعمار البالغات المتزاوجة وغير المتزاوجة منها فوجد إن الغذاء المكون من العسل والماء وشرائح من القرع كان الأفضل لكل من الذكور والإناث، وذكر Srivastava وآخرون (1983) كمية الماء المقطر المضافة إلى الغذاء الاصطناعي ليرقات ذبابة البطيخ، وتمكن مهدي (2000) من تربية ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliatus* في المختبر على ثلاثة عوائل طبيعية لها هي قرع الكوسة و خيار القثاء و خيار الماء لدراسة بعض المقاييس الحياتية لهذه الحشرة ومن ثم إجراء بعض طرائق مكافحتها .

6-1-2 Biocontrol of *Dacus ciliatus* القرعيات لمكافحة الأحيائية لذبابة القرعيات

المكافحة الحيوية هو الدور الذي تؤديه الكائنات الحية الطبيعية (الاعداء الطبيعية) للتقليل من كثافة اعداد الكائنات الحيوانية والنباتية الاخرى الضارة (الآفات). وإن من اهم عناصر المكافحة الحيوية الرئيسية هي (الطفيليات، والمفترسات، ومسببات الامراض (فطر - بكتيريا - فيروس)، تنشأ الامراض الحشرية نتيجة لنشاط الكائنات الدقيقة (فطر - بكتيريا - فيروس) داخل عوائلها ويرتبط بذلك افراز هذه الكائنات لمواد كيميائية تضر بها و يظهر على الحشرة المريضة اعراض تتمثل في التغير في السلوك اوفي تركيب جسمها، تعتبر البكتيريا *B. thuringiensis* من اكثر الانواع اهمية في مجال المكافحة الميكروبية للآفات إذ تتميز بنموها على بيئات صناعية صلبة او سائلة وبالتالي امكن

انتاجها بكميات كبيرة في شكل مساحيق قابلة للبلل او مستحلبات او مساحيق التعفير (القناوي، 2011).

إنَّ الإضرار الناتجة من استعمال المبيدات الكيميائية مثل تلويث البيئة وظهور الآفات المقاومة والسمية والتسمم للكائنات غير المستهدفة إضافة إلى الرواسب السمية للإنسان والحيوان أدت إلى البحث عن عوامل مكافحة أكثر أماناً على البيئة والأعداء الطبيعية وصحة الإنسان ومنها المسببات المرضية للحشرات مثل الفطريات والبكتيريا و النيماتودا والفايروسات (كريم ومحمد، 2012 ; Badii وآخرون، 2015). استخدمت البكتيريا *Bacillus thuringiensis* الممرضة للحشرات والفطر *Beauveria bassiana* في مكافحة ذبابة ثمار القرعيات بصورة عامة (الوائل، 2014).

2-2 المبيدات الحشرية الميكروبية Microbial Insecticides

كانت المبيدات في البداية المواد الكيميائية مصنوعة من خصائص معينة يجعلها مفيدة، مثل العمل الطويل والسمية الفعالة لمجموعة واسعة من الحشرات. ومع ذلك، فإنَّ الإفادة منها قد يؤدي إلى نتائج سلبية. وتعدّ المبيدات الحشرية الكيميائية المستخدمة اليوم أكثر أماناً من تلك التي استخدمت في الماضي، ولكن لا تزال هناك بعض المخاوف. إذ إنَّ التعرض الطويل المدى لهذه المواد الكيميائية يمكن أن تسبب السرطان، وتلف الكبد، والعيوب الخلقية والمشاكل الإنجابية في البشر والحيوانات، وكذلك فإنها يمكن أن تسبب التراكم والبقاء الطويل وهي المخلفات السامة في التربة والماء والغذاء. على النقيض من ذلك، المبيدات الميكروبية هي آمنة للنظام البيئي. فهي غير سامة وغير ممرضة للحياة البرية والبشر (Apaydin، 2005).

إن استخدام الكائنات الحية الدقيقة الممرضة للحشرات لتنظيم الآفات الحشرية للمرة الأولى في نهاية القرن 19 من قبل العديد من العلماء ، بما في ذلك الرائد لويس باستور. وهناك مجموعة كبيرة من الكائنات الدقيقة مثل البكتيريا، ومنذ ذلك الحين تم التعرف على الفيروسات والفطريات والأوليات كمرشحين محتملين لاستخدامها في استراتيجيات مكافحة البيولوجية ضد الآفات الحشرية ونظرا للآثار غير المرغوبة في المبيدات الحشرية الكيميائية ومشاكل الصحة العامة في البلدان الاستوائية، و

المبيدات الحيوية لها تأثير طفيف على البيئة (Sanchis و Bourguet, 2008).

شهد العالم خلال العقدين الأخيرين اهتماماً متزايداً بالعوامل الإحيائية كوسائل لمكافحة الآفات الحشرية ذات الإضرار الاقتصادية بهدف ترشيد استخدام المبيدات الكيميائية التي أصبحت خطراً يهدد صحة الإنسان وبيئته إضافة إلى تطور مقاومة العديد من الآفات الحشرية لمثل تلك المبيدات الكيميائية نتيجة الاستعمال العشوائي والمتكرر (المعاضدي وآخرون, 2000).

المبيدات الحشرية الميكروبية تقدم بديلاً للمبيدات الحشرية الكيميائية مع زيادة الخصوصية والسلامة لذا يتم استخدامها في برامج الإدارة المتكاملة للآفات لهذه المبيدات التي تحتوي على الميكروبات أو المواد الكيميائية الحيوية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة، مزايا استخدام عوامل مكافحة الميكروبية هي كفاءتها والسلامة للبشر والكائنات غير المستهدفة الأخرى، والحد من بقايا المبيدات الحشرية في الغذاء، والحفاظ على غيرها من الأعداء الطبيعية، وزيادة التنوع البيولوجي في مدار الأنظمة البيئية وأيضاً العوامل الميكروبية متخصصة للغاية ضد الآفات المستهدفة بحيث تسهل بقاء الحشرات المفيدة في المحاصيل المعالجة (Lacey وآخرون, 2001 ; Çinar, 2005). ويجري تطوير المبيدات الحشرية الميكروبية كعوامل السيطرة البيولوجية خلال العقود الثلاثة الماضية تنتمي البكتيريا المستخدمة كعامل ممرض للحشرات إلى جنس العصيات والتي هي بكتيريا *Bacillus thuringiensis*, *B.lentimorbus*, *B. sphaericus* والمبيدات الحيوية الأكثر شيوعاً تطبيقها في

العديد من النظم البيئية الزراعية هي المستحضرات التجارية من *B.thuringiensis* (Entwistle وآخرون، 1993).

2-3 جنس البكتيريا *The Genus Bacillus*

أفراد جنس العصيات هي بكتيريا عصوية الشكل ومكونة للسبورات، هوائية أو لاهوائية اختيارية، ايجابية لصبغة غرام وهي تابع إلى شعبة الخيطيات Firmicutes. جنس العصيات وصفت وصنفت على يد العالم الياباني فرديناند كوهن في كوهن سنة 1872. وقد تم تقسيم جنس عصية على ثلاث مجموعات مورفولوجيا اعتمادا على شكل السبور والتورم في الكيس البوغي للإنبات، المجموعة الأولى تتميز بوجود السبورات بيضوية في الخلية الأم و غير المنتخبة وتضم هذه المجموعة عددا كبيرا من الأنواع التي تعيش في التربة مثل بكتيريا *sphaericus, B.thuringiensis, B.subtilis* و *B. anthracis* و *B. cereus* بعض هذه الأنواع هي ذات صلة مرتبطة جدا وتشكل مجموعات مختلفة داخل المجموعة الأولى. وأحد هذه المجموعات الفرعية يتضمن مجموعة *B. cereus* (Kolstø و Økstad, 2011).

2-3-1 مجموعة بكتيريا *The Bacillus cereus Group*

وتشمل هذه المجموعة *B. cereus, B. mycoides, Bacillus thuringiensis* و *B. weihenstephanensis, B. anthracis, B. pseudomycoides*، الأنواع الثلاثة السابقة عدّها نظام التصنيف تحت نوع من *B. cereus* لأنها تتصل اتصالاً وثيقاً مع بعضها البعض (Ibrahim وآخرون، 2010). الخصائص الوراثية والمظهرية لـ *Bacillus thuringiensis* هي مشابهة جدا لـ *B. cereus*. يمكن فقط أن تميّز من *B. cereus* بإنتاج واحد أو أكثر من الأجسام البلورية في أثناء عملية تكوين السبورات، التي وُجد بأنها تكون سامّة للافقرات، وخصوصاً الأنواع الحشرية التابعة إلى رتبة غمدية الأجنحة، ورتبة ثنائية الأجنحة ورتبة حشرية الأجنحة، وضد الخلايا

السرطانية البشرية والطفيليات المسببة للأمراض البشرية (Charles وآخرون، 2000 ; Kondo وآخرون، 2002).

4-2 نبذة تاريخية عن البكتيريا *History of B.thuringiensis*

وهي بكتيريا موجبة لصبغة غرام ، مكونة للسبورات ،هوائية او لاهوائية اختيارية وتكون لها القدرة على تكوين الجسيمات المحاذية للسبورات Parasporal bodies أو ما يعرف بالبلورات البروتينية Crystal Protein خلال مرحلة تكوين السبورات (Assaedi وآخرون، 2011; Youssef وHassan، 2013) تحتوي هذه البلورات المحاذية للسبورات سموم داخلية دلتا δ -endotoxin التي تظهر نطاق واسع قاتل للحشرات الزراعية والآفات الحشرية المهمة طبيا لعدة رتب منها رتبة حرشفية الأجنحة Lepidoptera وثنائية Diptera , غشائية الأجنحة، Hymenopter شعريات الأجنحة Trichoptera , غمدية الأجنحة Coleoptera ، متشابهة الأجنحة Homoptera ،مستقيمات الأجنحة Orthoptera واللافقرات غير الحشرية مثل الديدان الخيطية nematodes والأوليات protozoa والعتش mites (Obeidat و AL-Momani، 2013).

اكتشفت البكتيريا الممرضة للحشرات *Bacillus thuringiensis* لأول مرة في اليابان عام 1901 على يد العالم الياباني Ishiwata Shigetane بوصفه مسبباً مرضياً sotto-disease لدودة القز *Bombyx mori* حيث كان يطلق عليها *Bacillus sotto* إذ تعني كلمة sotto الشيء الطري الرخو لأنها كانت تسبب ليونة ورخاوة جسم الحشرة التي تصاب بهذه البكتيريا ثم سجلت من قبل العالم الأحيائي الألماني Ernst Berliner سنة 1911 إذ عزلها من يرقات عثة طحين البحر الأبيض المتوسط *Anagasta kuehniella* مسبباً مرضياً في مطاحن محافظة ثورينجيا Thuringe ، وسميت *Bacillus thuringiensis* وذلك تخليدا لاسم المحافظة ألمانية

سميت *thuringiensis* وكما أثبت وجود بلورات سامة للحشرات (Sanchis و Bourguet, 2008; George, 2011; Beliner, 1915) حتى عام 1977م تم اكتشاف 13 تحت نوع لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* سامة لليرقات حشرات رتبة حرشفية الأجنحة ، في عام 1977 و1988م تم اكتشاف تحت نوعين سامين لحشرات كل من ثنائي الأجنحة وغمديه الأجنحة على التوالي وأما الآن فهناك أكثر من 150 حشرة تابعة لرتبة حرشفية وثنائية وغمديه الأجنحة عرفت بأنها حساسة لبكتيريا *B.thuringiensis* (Bajwa و Kogan, 2001).

تختص هذه البكتيريا *B.thuringiensis* بفاعليتها السامة ضد الحشرات التابعة لرتبة حرشفية وثنائية وغمديه الأجنحة (Ahmad و Hakoori, 2013) وفي الوقت الحاضر تم تسجيل عزلات *B.thuringiensis* النشطة ضد بعض الديدان الخيطية، العث والبروتوزوا أيضا و بالفعل تعدّ بديلا مفيدا أو مكملاً للمبيدات الكيميائية الاصطناعية في نطاق التطبيقات الزراعية التجارية، وإدارة الغابات وأيضا مصدرا رئيسيا للتعبير عن الجينات المعدلة وراثياً في النباتات المقاومة للآفات (Jisha وآخرون، 2013). مما أدى إلى الاهتمام بها تجارياً . كان أول استخدام لبكتيريا

B.thuringiensis على النطاق التجاري سنة 1920 للسيطرة الاوربية على حفار ساق الذرة *Sesamia cretica* في اوربا (Gorashi وآخرون، 2014) , واستخدمت في فرنسا لأول مرة كمبيد حشري عام 1938م وسجلت تجارياً في الولايات المتحدة عام 1961م (Bajwa و Kogan, 2001)، و كما سمحت الولايات المتحدة أيضاً باستخدام حوالي 410 مركباً تجارياً مسجلاً من البكتيريا *B.thuringiensis* وبأشكال مختلفة ضد الآفات الحشرية إذ أصبحت الآن أكثر المبيدات الحيوية شيوعاً واستخدما في العالم حيث يوزع 13000 طن من مستحضرات *B.thuringiensis* سنوياً (WHO, 2000) .

1-4-2 تصنيف البكتيريا *Bacillus thuringiensis* Classification of Bacteria

بدأ العمل الكلاسيكي لتحديد بكتيريا *B.thuringiensis* في الستينات بوصفها فرداً في عائلة Bacillaceae. واستخدمت الطرائق البكتريولوجية، والكيمياء الحيوية والمصلية الكلاسيكية بالإضافة إلى نشاط المبيد الحشري الذي يستخدم كدليل للبكتيريا *B.thuringiensis* في تحت لأنواع مختلفة ومتباينة بين تحت أنواع ذات صلة وثيقة. يتم تصنيف السلالات *B.thuringiensis* في تحت أنواع المختلفة، على أساس مُستَضَّات الأسواط (H antigen) (H de-Barjac و Bonnefoi, 1962) ومع ذلك، كانت هذه الطرائق غير مقنعة تماماً خصوصاً بين تحت أنواع بكتيريا *B.thuringiensis* التي تتشارك نفس الأنماط المصلية (Aizawa و Dulmage, 1982). أن ظهور التقنيات الوراثة الجزيئية مثل البصمة الوراثة DNA finger printing ونسق البلازميد plasmid profiling ، ونسق البروتين protein profiling وتقنية تباين أطوال قطع الدنا المصممة عشوائياً RAPD PCR وفرت طرائق جديدة في تصنيف البكتيريا (Apaydin, 2005).

تم تصنيف سلالات *B.thuringiensis* أيضاً إلى خمسة أنماط مرضية pathotypes على أساس مداها القاتل للحشرات النوع الأول (*var. berliner*) متخصص بالحشرات حرشفية الأجنحة Lepidopteran-specific والنوع الثاني (*var. israelensis*) متخصص بالحشرات ثنائية الأجنحة Dipteran-specific والنوع الثالث (*var. tenebrionis*) متخصص بالحشرات غمدية الأجنحة Coleopteran-specific والنوع الرابع (*var. aizawai*) نشطة ضد كل من حرشفية وثنائية الأجنحة (Mushtaha, 2013). ومؤخراً تم نشر العديد من التقارير حول نشاط بكتيريا *B.thuringiensis* في قتل الديدان الخيطية (مبيد قاتل للدودة الخيطية Nematicidal) (Mozgovaya وآخرون، 2002). ركز الباحثون في تصنيف البكتيريا *B.thuringiensis* على

دراسة تسلسل 16S rDNA للبكتيريا *B. thuringiensis* ، *B. cereus* و *B. mycoides* التي تختلف واحدة عن أخرى وعن *B. cereus* و *B. anthracis* بالنيوكليوتيدات التي تقل عن تسعة

نيوكليوتيد (Ramírez-Lepe و Ramírez-Suero، 2012). وجد الباحثين Tsen و Chen

(2000) إن التميز بين سلالة *Bt* و *B. cereus* بواسطة تضخيم 16S rDNA وجينات *gyrB* بواسطة تقنية PCR عندما تم اختبار عدد كبير من سلالات البكتيريا *Bacillus* كانت هناك صعوبة واقترحوه إن تميز سلالة *Bt* عن *B. cereus* عن طريق ميزة واحدة وهي وجود جينات *cry* أو البروتينات البلورية .

أقترح العالمان Höfte و Whiteley (1989) نظام تصنيف وتسمية للبروتينات البلورية بالأعتماد على تركيب تسلسل الاحماض الأمينية المستنتج من الدنا وعلى مدى المضيف . البروتينات البلورية صنف الى 42 جيناً بروتينياً بلورياً والتي قسمت على 14 مجموعة متميزة والتي قسمت على اربعة اصناف رئيسة وهي CryI متخصصة لرتبة حرشفية الأجنحة (Lepidopter- specific)، CryII متخصصة لرتبة حرشفية وثنائية الأجنحة (Lepidoptera & Diptera-specific)، CryIII متخصصة لرتبة غمدية الأجنحة (Coleoptera-specific)، CryIV متخصصة لرتبة ثنائية الأجنحة (Diptera-specific). وتم تصنيف البكتيريا *B. thuringiensis* اعتماداً على (1915, Berliner)

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Bacillaceae

Genus: Bacillus

Species: Bcillus thuringiensis (1915, Berliner).

2-4-2 الخصائص المورفولوجية لبكتيريا *Bacillus*

thuringiensis

البكتيريا *Bacillus thuringiensis* تكون مستعمرات بيضاء اللون وخشنة و منتشرة، ويمكن إن تمتد على مدى واسع في الطبقة بسرعة كبيرة، وتكون حافات المستعمرات متموجة. السبورات تكون بيضوية، وغير منتقخة وتظهر في موقع طرفي في الخلية الام، وأفضل معايير للتمييز *Bacillus thuringiensis* من أنواع البكتيريا الأخرى هو وجود الجسيمات البلورية المحاذية للسبورات التي يمكن ملاحظتها بسهولة تحت المجهر في مرحلة التباين، إنَّ شكل، وحجم وعدد الجسيمات البلورية قد يختلف بين أفراد بكتيريا *B. thuringiensis* (Schnepf وآخرون، 1998؛ Schünemann وآخرون، 2014).

هناك خمسة أشكال للكريستال متميزة وهي بلورات ثنائية الهرم (Cry1 bipyrarnidal)، بلورات مكعبة الشكل (Cry2 cuboidal)، بلورات مستطيلة مسطحة (Cry3 flat rectangular)، بلورات غير منتظمة (Cry3B irregular)، بلورات دائرية (Cry4B spherical) و (Cry4A) وبلورات شبيهة بالمعين (Cry11A rhomboidal) (Laridon, 2006).

3-4-2 المواطن الطبيعية لبكتيريا *B. thuringiensis*

تنتشر بكتيريا *B.thuringiensis* طبيعياً في جميع أنحاء العالم، توجد بكتيريا *B.thuringiensis* بشكل طبيعي في البيئة، إذ عزلت من الحشرات المصابة، وأسطح النباتات، والماء والحبوب المخزونة ، ومن التربة، إذ عزلت لأول مرة في العراق من اليرقات الميتة لفراشة اللهانة *Pieris rapae* (جعفر وآخرون، 2012). وفي دراسة شملت 80 دولة تم الحصول على 5303 عزلة من *B.thuringiensis* 45% منها عزلت من مواد مخزونة و 25% عزلت من التربة

و 10% عزلت من بقايا الحشرات و 3% عزلت من أجزاء النباتات و 15% عزلت من مواد مختلفة أخرى ، وفي نيجيريا تم الحصول على 6 عزلات لبكتيريا *B.thuringiensis* من التربة كانت جميعها سامة ليرقات البعوض، وفي كندا تم الحصول على 102 عزلة من *B.thuringiensis* ، 33% عزلت من التربة و 66% عزلت من الحبوب المخزونة وخلال إجراء مسح في 12 بيئة مختلفة من 17 موقعا في شمال الأردن تم الحصول على 299 عزلة من بكتيريا *B.thuringiensis* ، وفي دراسة في تايلاند تم الحصول على 299 عزلة من البكتيريا *B.thuringiensis* من عينات التربة جمعت من مناطق زراعة القمح ومطاحن الحبوب وتم الحصول في كوريا حصراً على 58 عزلة من *B.thuringiensis* من التربة لمناطق مختلفة ووجد إنَّ 35% من العزلات ممرضة للحشرات حرشفية الأجنحة و 20% ممرضة للحشرات ثنائي الأجنحة و 9% غير سامة (مهيار، 2011).

4-4-2 السموم الداخلية دالتا للبكتيريا *B.thuringiensis* of delta (δ) endotoxins

خلال مرحلة التبوغ تنتج البكتيريا *B. thuringiensis* بروتين كبير واحد أو أكثر يتكون من محتويات بلورية ، السموم الداخلية دالتا التي يمكن ملاحظتها بسهولة تحت المجهر خلال مراحل متباعدة ، هناك نوعين من السموم الداخلية دالتا delta (δ) endotoxins وهي سموم (crystal) *cry* عالية الخصوصية التي تعمل عن طريق مستقبلات خاصة ، وسموم *cyt* (تحلل الخلوي cytolytic) غير متخصصة مع مستقبلات غير معروفة، تصنف كلاهما على أساس تشخيص تسلسل الأحماض الأمينية (2003, Juárez-Pérez و Porcar).

أهم ميزة لهذه البروتينات هي إمرضيه للحشرات وكل بروتين بلوري لديه مضيف مميز ،إنَّ عدد ونوع السموم الداخلية دالتا δ - endotoxin يحدد النشاط الحيوي لسلالة *Bt* واعتماداً على

تسلسل الأحماض الأمينية تم تصنيف ما يزيد عن 300 جين *cry* إلى 47 مجموعة، وقد تم تقسيم 22 جيناً *cyt* على فئتين (WEB, 2005).

1-4-4-2 البروتينات البلورية (Cry) The Crystal Proteins

البروتينات Cry هي النوع السائد تشفر البروتينات البلورية بوساطة جينات *cry*، أن تراكم البروتين Cry في الخلية الأم يمكن أن يشغل 20-30% من الوزن الجاف للخلايا المتبوعة (جعفر وآخرون، 2012 ; Agaisse وLereclus، 1995). تقسم البروتينات Cry اعتماداً على تشابهه تسلسل الأحماض الأمينية إلى 51 صنفاً classes (Cry1, Cry2, Cry3...etc.) وهذه الأصناف تحتوي على العديد من تحت الأصناف subclasses (Cry1A, Cry1B, Cry1C,... etc.) وهذه مقسمة على تحت العوائل (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.) (Sanchis وBourguet، 2008). إذ أن لكل بروتين بلوري طيفاً قاتلاً للحشرات الخاصة به. ولذلك، تم تصنيف البروتينات Cry على أساس خصوصية المضيف وتركيب الأحماض الأمينية الخاصة بها (Schnepf وآخرون، 1998; Jensen وآخرون، 2003).

البروتينات البلورية لها أشكال مختلفة من ثنائي الهرم (Cry1) إلى مكعب (Cry2)، مستطيل مسطح (Cry3A)، وغير منتظم (Cry3B)، كروية (Cry4A وCry4B)، ومعيني (Cry11A) (Schnepf وآخرون، 1998). تظهر البروتينات Cry1، Cry2، وCry9 سمية عالية للحشرية الأجنحة Lepidopterans (Crickmore، 2000). البروتينات التي تنتمي إلى صنف Cry4 وCry11 كلهما سامة لثنائية الأجنحة Dipteran، تظهر البروتينات Cry3، Cry7، Cry8، Cry14، Cry18، Cry34، وCry35 نشاط مبيدي لحشرات غمدية الأجنحة Coleopteran. أن بعض البروتينات Cry تظهر سمومها على أكثر من صنف واحد من الحشرات على سبيل المثال،

Cry1I نشطة ضد كل من حرشفية الأجنحة Lepidopterans وغمدية الأجنحة Coleopterans (Ellis وآخرون، 2002; de Maagd وآخرون، 2001) ، في حين Cry1B يظهر سمية ضد حرشفية الأجنحة Lepidopterans ، غمدية الأجنحة Coleopteran وثنائية الأجنحة Dipteran (Zhang وآخرون، 2000).

2-4-4-2 بروتينات التحليل الخلوي The Cytolytic Cyt Protein

إضافة إلى بروتينات Cry ، أن بعض سلالات Bt أيضا تنتج بروتينات التحليل الخلوي Cyt التي هي أيضا من المحتويات البروتينية المجاورة للسبور الطرفي لبكتيريا *B.thuringiensis* والتي تظهر نشاطا حاداً للدم ، أو هو أي بروتين الذي يكون لديه تسلسل واضح مشابه للبروتين المعروف Cyt ، إن هذه البروتينات تكون ذات تخصص عالي ضد الحشرات وتكون غير ضارة للإنسان والفقرات والنباتات وقابلة للتحلل الحيوي الكامل، وتشفره بوساطة الجينات cyt التي تقع خارج الكروموسومات على البلازميدات (Jisha وآخرون، 2013) .

إن هذه الصنف من دلتا - السموم الداخلية δ - endotoxins تختلف عن السموم Cry في تكوين الأحماض الأمينية وآلية العمل (Thomas وآخرون، 1983) . إن هذه السموم بالاشتراك مع السموم Cry بوصفها مبيداً قاتلاً للبعوض mosquitocidal على سبيل المثال السموم Cyt1Aa تستطيع إن تكون كمستقبلات لارتباط السموم Cry11Aa بالأغشية الخلوية المعوية لبعوضة الإيدز *Aedes aegypti* (Corre^a وآخرون، 2012). أن السموم Cyt تختلف عن السموم Cry من حيث كتلة أولية الذيفان protoxin للسموم Cyt هي (30 kDa كيلو دالتون) التي تكون أصغر من السموم Cry (Poncet وآخرون، 1994,).

السموم Cyt هي سلالات متخصصة إذ تكون سامة ضد رتبة ثنائية الأجنحة Dipteran فقط ، بينما السموم Cry هي موجودة في العديد من سلالات Bt مع مدى مضيبي واسع إذ تكون سامة ضد العديد من رتب . يوجد سم Cyt واحد في كل سلالة من سلالات Bt، ولكن يمكن أن يوجد اثنين أو أكثر من الفئات الفرعية من السموم Cry في سلالة Bt. على الرغم من أن كل من هذه الأشكال النشطة من هذه السموم يمكن أن تحدث مسامات وفتحات في الغشاء الساييتوبلازمي، إلا أن السموم Cyt تسبب تحليلاً خلوياً في الخلايا حقيقية النواة المختلفة بما في ذلك الكريات الحمر (Gill وآخرون، 1992; Soberón وآخرون، 2012) . يمكن استخدام السموم Cyt للتغلب على مقاومة المبيدات الحشرية وزيادة نشاط المبيدات الحشرية الميكروبية (Guerchicoff وآخرون، 2001) . إن سموم Cyt1 و Cyt2 هي فئتين للتحليل الخلوي من السموم Cyt التي تم تحديدها على أساس تشخيص الأحماض الأمينية وتنقسم إلى 22 قسماً فرعياً (WEB، 2005). من بين هذه الفئات الفرعية، Cyt1Aa و Cyt2Aa تظهر نشاط عالي في قتل البعوض Mosquitocidal (Koni وEllar، 1994) .

5-4-3 تصنيف البروتينات البلورية المبيدة للحشرات Classification of Insecticidal

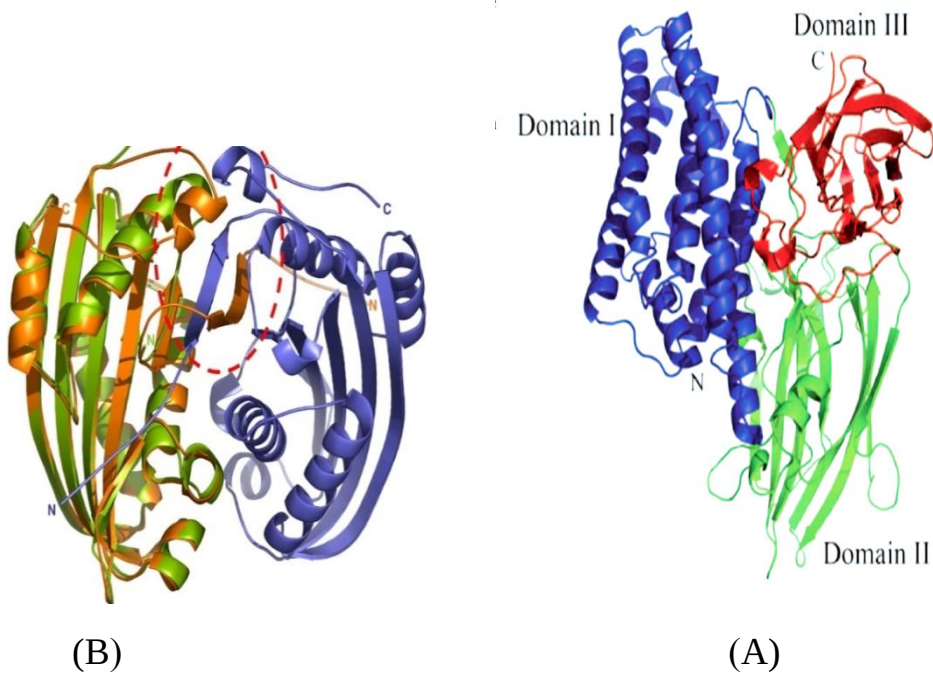
Crystal Proteins

منذ تشخيص واستنساخ جينات البروتينات البلورية المبيدة للحشرات (ICP) لبكتيريا *B.thuringiensis* سنة 1981، صنف البروتينات البلورية المبيدة للحشرات اعتماداً على نشاط البروتينات البلورية القاتلة للحشرة على سبيل المثال CryI متخصصة لرتبة حرشفية الأجنحة (Lepidoptera-specific)، CryII متخصصة لرتبة حرشفية وثنائية الأجنحة (Lepidoptera &)، CryIII متخصصة لرتبة غمدية الأجنحة (Coleoptera-specific)، CryIV متخصصة لرتبة ثنائية الأجنحة (Diptera-specific) (Palma، 2014).

6-4-2 Toxin Structure تركيب السموم

استخدمت الأشعة السينية X-ray crystallography لحل الهيكل ثلاثي الأبعاد للسموم الداخلية دالتا الأربعة (Cyt2A, CryA3, CryA2, CryA1). السموم Cry3, Cry2, Cry1 هي متشابهة بشكل ملحوظ، كل منها يتكون من ثلاثة مجالات كما في صورة رقم 6. المجال الأول الطرفي-N (N-terminal) ، هو حزمة مكونة من سبعة لولاب- α (α -helices). ستة من هذه اللولاب متقابلة الزمر التي تحيط بحلزون اللب المركزي. المجال الثاني يحتوي على ثلاثة صفائح- β (β -sheets) مع ثلاثة طيات متناظرة وهذا التشكل ما يسمى "المفتاح اليوناني" (Greek Key). المجال الطرفي-C (C-terminal) يتكون من صفيحتين- β عكسية التوازي تشكل "اللفة الهلامية" (jelly-roll)، وكل مجال له أثر في طريقة عمل السم. المجال الأول له علاقة في إدخال السم إلى الغشاء وتكوين الفتحات. المجالات الثاني والثالث كلاهما ذو علاقة في التعرف على المستقبلات والأرتباط المحدد، بالإضافة إلى ذلك، فإن المجال الثالث له أثر في تكوين الفتحات، ومع ذلك، Cyt2A يتكون من تركيب مختلف بشكل جذري عن التراكيب الثلاثة السابقة ، وهو يتألف من مجال واحد، كما في صورة رقم 6، ويتكون تركيب المجال من ألفا الحلزون (α helix) والطبقات الخارجية ملفوفة حول صفيحة بيتا المختلطة (mixed beta-sheet)، أن السموم Cry النشيطة لها وظيفتين: ارتباط المستقبلات ونشاط القناة الأيونية، السم النشط يرتبط بمستقبلات معينة على النسيج الظهاري للمعي المتوسط للحشرة، أن عملية الارتباط هي عبارة عن مرحلتين تشمل الارتباط الرجعي وغير الرجعي ، إنَّ هذه الخطوات تتضمن ارتباط السم مع المستقبلات، وإدخال السم في الغشاء القمي أو كليهما. من ناحية أخرى، السموم Cyt ليس لديها مستقبلات محددة ويكون عملها غير متخصص و على الرغم من ذلك فهي تكون الفتحات وتدخل مباشرة إلى الغشاء الدهني (Cohen وآخرون، 2011 ; Çetinkaya, 2002). المنطقة الطرفية C- للسموم الأولية

protoxins تحتوي على بقايا لايسين lysine والسيستين cysteine والتي هي ضرورية في التجمع وإذابة البلورات. المنطقة الطرفية-N لها وظائف الكربوهيدراتية التي توفر روابط لسموم Cry تشبه بالمستقبلات البروتينات السكرية glycoproteins مثل E- N-aminopeptidasesor Cadherins في المعى المتوسط للحشرات (Angst وآخرون، 2001).



صورة 6 : (A) تركيب البروتين البلوري Cry 3A

(B) تركيب بروتين التحليل الخلوي Cyt 2A

(2002, Çetinkaya)

7-4-2 آليه عمل السموم الداخلية دلتا Action Mechanism of δ -Endotoxins

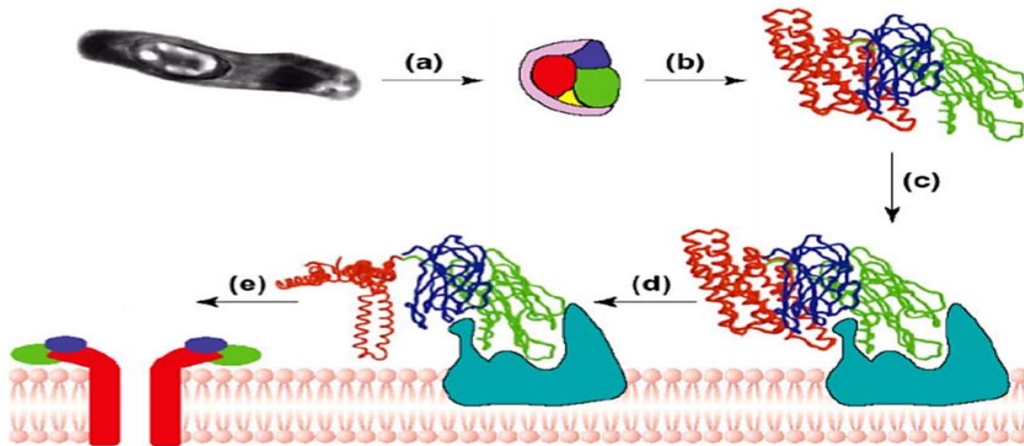
إنَّ بكتيريا *B.thuringiensis* المتبوعة مع البروتينات البلورية المبيده للحشرات insecticidal crystalline proteins (ICP) يجب أن تبتلع من قبل يرقات الحشرات المعرضة , كفاءة ICP تعتمد على الإذابة في بيئة قلوية في المعى المتوسط الحشرة (الرقم الهيدروجيني < 10) مما يؤدي إلى

تحويل الذيفان الأولي protoxin غير النشط إلى ذيفان نشط بيولوجيا بواسطة الأنزيمات المحللة للبروتين proteolytic enzymes , المجال الطرفي C (C-terminal domain) من ذيفان نشط يرتبط بمستقبلات الغشاء المتخصصة الموجودة على أغشية الخلايا الظهارية للمعي المتوسط للحشرة ، وتشكيل ثقب (1-0.5 نانومتر) من قبل المجال الطرفي N (N-terminal domain) مع تحلل لاحق للخلية الظهارية يؤدي الى دخول السبورات والبروتينات البلورية وانتشارها في الجوف الدموي إلى تسمم الدم وينتج عن ذلك موت الحشرة كما في صورة رقم 7،8 (Caroline, 2012).

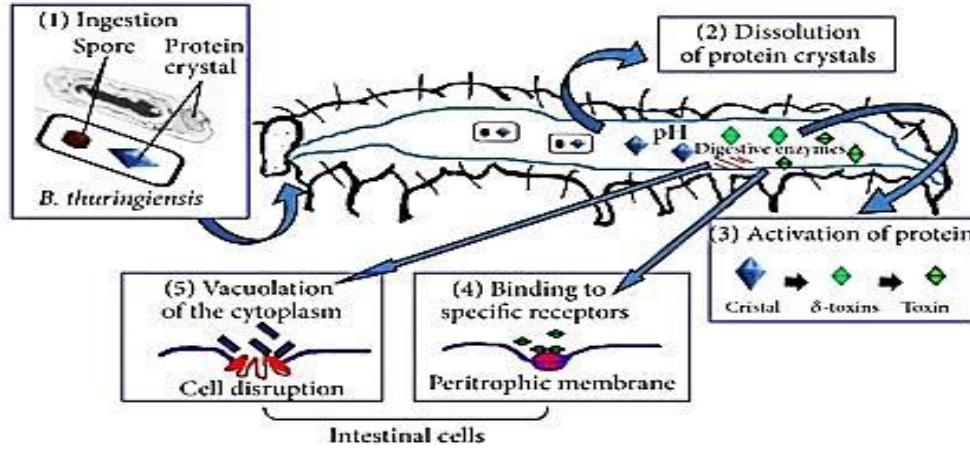
المستقبلات المرتبطة ب ICP هي المحدد الرئيس لخصوصية المضيف إذ ان السموم الداخلية دلتا delta-endotoxins يكون ارتباطها عالي الألفة مع البروتينات الموجودة في حافة الفرشائية لغشاء المعى المتوسط للحشرة الحساسة ويدخل جزء من السم إلى الغشاء عن طريق تكوين الفتحات الموجودة فيه، وان تكوين الفتحات في الغشاء البلازمي للخلية يسبب عدم الاتزان الأيوني بين السايوبلازم والبيئة الخارجية للخلايا ، والتأثير الأولي هو توقف الحشرة عن التغذية وشلل في الأمعاء مما يسبب موت الحشرة (Fiuza وآخرون، 2013).

إنَّ الأنزيمات Serine proteases مثل chymotrypsin, thermolysin, elastase تعتبر مهمة في كل من الإذابة وتنشيط البروتوتوكسين (Dai و Gill, 1993) . وبالإضافة إلى أنزيم البروتياز في الجهاز الهضمي للحشرة، وجدا أن أنزيم الدناز DNase للحشرة يعمل بالاشتراك مع البروتين والكريستال وتحويلها إلى سم حر من DNA نشط في معي اليرقات (Clairmont وآخرون، 1998) ومن المعروف أن الأبواغ تشترك في فعالية البلورات المبيدة للحشرية (ICP) عند اختباره ضد الحشرات. وهذه قد تكون ذات صلة في غزو الجوف الدموي من خلال المعى المتوسط المتفرح والتطور المستمر يؤدي إلى تسمم الدم (Li وآخرون، 1987).

إنَّ كفاءة وفعالية السم Cry تزداد بإضافة انزيم كاييتنز chitinase enzyme في تحضيرات *B.thuringiensis*. إذ أن هذا انزيم يعمل على الغشاء حول الغذاء peritrophic الذي يتكون من شبكة من الكيتين والبروتينين. ويحلل الروابط β -1,4 في الكيتين لذلك قد يحطم الغشاء حول الغذاء peritrophic من خلال عمل الثقوب في الغشاء وهذا يسهل عملية الاتصال بين سموم δ -endotoxins ومستقبلات الغشاء في ظاهرة المعى المتوسط. بعض العوامل مثل أس الهيدروجيني pH، والإنزيمات، الغشاء حول الغذاء peritrophic، أنزيم إزالة السموم enzyme detoxification، والخصائص المضادة للميكروبات في العصير المعوي لأمعاء الحشرة تجعل الحشرات مقاومة للسموم (2013, Mushtaha).



صورة: 7 آلية العمل لجين cry δ -endotoxin (de Maagd وآخرون، 2001).



صورة: 8 آلية السمية لبكتيريا *Bt* (Schünemann وآخرون، 2012)

8-4-2 سلامة المبيدات الحيوية Safety of *Bt* Biopesticides

الميزة الرئيسية لمنتجات *B.thuringiensis* هي سلامتها الناتجة عن الانتقائية والذي يتأثر بعوامل عدة. يتم تنشيط السموم الداخلية دالتا δ -endotoxins بواسطة المحاليل القلوية وربما تتطلب أنواعاً مختلفة من قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة. أيضاً، تحتاج البلورات لتكسيرها إلى العناصر السامة من قبل بعض الأنزيمات التي يجب أن تكون موجودة في أمعاء الحشرة. وبالإضافة إلى ذلك، خصائص خلية معينة في القناة الهضمية للحشرات تشجع على ارتباط الذيفان الداخلي بالمستقبلات ويؤدي إلى تشكيل الفتحات لذلك، كل سلالة قادره على إنتاج البروتينات السامة الفعالة على مجموعة أو عدد قليل من مجموعات محددة من الحشرات. لا تتأثر الأنواع غير المستهدفة مثل الحشرات المفيدة والحيوانات الأليفة والحيوانات البرية وعموما هي ليست سامة للإنسان والحيوان وفقا لعلم سموم الثدييات ودراسات قابلية الهضم المختبرة والتي طلبت من قبل وكالة حماية البيئة Environmental

(EPA) Protection Agency (Flexner; 2005, Apaydin و Belnavis, 1999).

ان مزايها هذه السموم هو تأثيرها القصير والتحلل البيولوجي الكامل، ويستمر الأثر الأبقى لفترات طويلة حيث تؤثر على الاجيال المتعاقبة و تؤدي إلى خفض الكفاءة التناسلية لإنات الحشرات، والمحافظة على التوازن الطبيعي بين الآفة واعدائها الحيوية (القناوي، 2011).

9-4-2 الخصائص الأمراض الأخرى لبكتيريا *Bacillus thuringiensis*

بكتيريا *B.thuringiensis* تنتج السموم الأخرى وهي بيتا السموم خارج خلوية β -exotoxins والفا السموم الداخلية α -endotoxins، إن مجموعة بيتا السموم الخارجية - β exotoxins تتضمن flytoxin, thuringiensin وتكون مستقرة حراريا، وهذه السموم تكون غير مرغوبة في مكافحة البيولوجية بسبب سميتها العالية للفقرات (Rand, 2009). إن السموم بيتا خارج خلوية β - exotoxin لديها طيف أكبر من الفعالية ضد العديد من الحشرات بالمقارنة مع الفا الذيفان الداخلي α - endotoxins (Mohd-Salleh و Lewis, 1982). من ناحية أخرى، لم يتم تسجيل استخدام السموم بيتا خارج خلوية β - exotoxin في أجزاء كثيرة من العالم؛ لأنها تتعارض مع البناء الحيوي الـ RNA مما أدى إلى سمية واسعة الطيف في الفقرات واللافقاريات و تعد بمثابة الخطر البيئي من قبل وكالة حماية البيئة (McClintock وآخرون، 1995). إن سموم ألفا هي الفوسفوبيدات C (phospholipase C) تؤثر في الدرجة الأولى على الدهون المفسفرة في غشاء الخلية (De-Barjac و Bonnefoi, 1962 ; Heimpel, 1954). كما أن هذه البكتيريا تقوم بإنتاج مركبات مثل الأنزيمات المحللة للدهون الفوسفاتية phospholipases وإنزيمات البروتياز proteases وأنزيمات تحلل الكيتين chitenases الى غير ذلك من البروتينات التي تساهم في زيادة ضرورتها للقضاء على الحشرات. (Sela وآخرون، 1998). كذلك ان بعض سلالات تنتج البروتينات المبيده للحشرات في مرحلة النمو الخضري، وتسمى بروتينات المبيدات الحشرية الخضرية

vegetative insecticidal proteins (VIP) (Reddy, 2001). وعلى الرغم من تراكم البروتينات Cry في الخلية، أن VIP يفرز من الخلية في الوسط الزراعي، الأمر الذي يحد من تطبيق هذا المجال، هو إن هذه البروتينات هي فعالة ضد العديد من الآفات المحاصيل الهامة والخاصة بالحشرات حرشفية الأجنحة التي هي أقل حساسية للسموم الداخلية دالتا δ -endotoxins (Estruch وآخرون، 1996; Yu وآخرون، 1997).

10-4-2 المحتوى الوراثي لبكتريا *Bacillus thueingiensis*

كروموسوم بكتيريا *B. thueingiensis* ، يحتوي على كوانين وسائتوسين تقريباً (32%-35%) وحجم الجينوم يتراوح ما بين (2.4-5.7) مليون زوجاً قاعدياً، و عوامل خارج كروموسومية تختلف بأعدادها و اوزانها الجزيئية من نمط مصلي لأخر وقد تكون دائرية أو خيطية ولطالما تم اعتبار أن البروتينات تتألف من الأجسام البلورية parasporal crystal ويتم تشفيرها عموماً بواسطة بلازميدات الكبيرة . إنَّ الصفة المشتركة بين الانماط المصلية لبكتريا *B. thuringiensis* هي وجود ترتيب بلازميدي معقد إذ يكون الاختلاف في عدد و حجم تلك البلازميدات، فيكون التباير كبير بالوزن الجزيئي (MD 180-1.4) (Stahly وآخرون، 1978) و كذلك عددها يتراوح بين 8 - 1 ، إذ اشارت دراسة (Aronson وآخرون، 1987) الى امتلاك تحت النوع *B. thuringiensis subsp* . *israelensis* نسق بلازميدي معقد من ثمانية بلازميدات بأوزان ، 75 ، 68 ، 10.6 ، 4.9 ، 4.2 ، 3.3 هي مختلفة جزيئية ، MD 105,135 ويمكن ان يكون اكثر من ثمانية بلازميدات ، ان العديد من الجينات المشفرة للبلورات البروتينية تكون بلازميدية المنشأ كما ان بعضها كروموسومية المنشأ . وتكون هذه الجينات محمولة على بلازميدات كبيرة MD 150-40 وبالتالي فإن غالبية هذه البلازميدات هي بلازميدات اقترانية [Conjugative Plasmids] ، تستطيع البلازميدات الحاملة

للجينات المشفرة لهذه الصفة تحت الظروف المختبرية الانتقال بين و ضمن الانواع البكتيرية

(جعفروآخرون، 2013) *B. thuringiensis, B. anthracis, B. megaterium B. cereus*

11-4-2 التحري عن جين cry في بكتيريا *Bacillus thuringiensis* بتقنية PCR

تعد تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) Polymerase Chain Reaction أحد أهم التطورات العملية في الهندسة الوراثية ، وقد حصل مخترعه كيري ميلس kary mullis على جائزة نوبل سنة 1983، تستخدم هذه التقنية في تضخيم أي تسلسل قصير من الـ DNA ، مثلاً جين أو قطعة جين ، ذلك لمرات عديدة باستخدام أنزيم DNA polymerase وتعد هذه التقنية ذات قيمة جداً في مجال تعريف الجينات و التلاعب بها ، إذ يتطلب البروتوكول القياسي لهذه الطريقة شريط قالب DNA الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكوّن من عشرات أو عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات ، و زوج من البودائ primers اللذان يرتبطان بأحد أطراف تسلسل جزيئة الدنا المراد تضخيمها و بوجود أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً إضافة إلى محلول دارئ يُمثل وسطاً لإجراء أو حدوث التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الأربعة dNTPs (Nicholl ، 2008) . تتم هذه العملية بثلاث خطوات: الأولى تتضمن مسخ Denaturation لشريط القالب أي فك شريطيه للسماح للبودائ بالارتباط مع التتابع المكمل لها على شريط القالب ، أما الخطوة الثانية فتتضمن ارتباط Annealing البودائ مع شريطي القالب ، والثالثة التي يطلق عليها بخطوة الاستطالة Extension والتي يبدأ من خلالها إنزيم البلمرة بإضافة القواعد النيتروجينية لشريط البادئ من النهاية 3'-OH الحرة (Sambrook و Russell، 2001) . ثم يتم الكشف عن نواتج التفاعل بإستعمال أكثر من طريقة ومن أهمها و أكثر استعمالاً هو الترحيل الهلامي Gel electrophoresis للكشف عن القطع المستهدفة و معرفة حجمها بالمقارنة مع قطع DNA معروفة الحجم و الوزن DNA

ladder ، و تكون عملية الكشف و الاظهار بإستعمال صبغات أو مواد مثل بروميد الاثيديوم Ethidium bromide والذي يعطي تألقاً عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي Ultra violet light (الخفاجي وحسن محمود ، 2013) . تمكنت تقنية PCR من إعطاء نتائج ذات دقة عالية وحساسية نوعية إذ تعد من أحد أهم التقنيات التشخيصية التي يتم من خلالها اختصار العديد من الاختبارات التقليدية منها الكشف عن جينات cry (Nazemi وآخرون، 2013) .

3. المواد وطرائق العمل Materials & Methods

1-3 المواد

أُستخدِمت في هذه الدراسة كل من الاجهزة و الادوات المبينة في جدول (1-3)

الشركة المصنعة او المنشأ Company and Origin	اسم الجهاز Apparatus Name	ت
Human Lab (Korea)	Autoclave موصدة	1
Memmert (GERMANY)	Electric Oven فرن كهربائي	2
Memmert (Germany)	UV. Cabinate كابينة الاشعة فوق البنفسجية	3
AFMA(JORDAN)	Millipor filter مرشحات دقيقة	4
Memmert (Germany)	Water bath حمام مائي	5
Memmert (GERMANY)	Incubator حاضنة	6
صنع محلي	shaking incubation حاضنة اهتزازية	7
Sanyo (Japan)	Deep freeze مجمدة	8
Qean (Egypt)	Refrigerator ثلاجة	9
Lab tech (Korea)	Water Distillator جهاز تقطير الماء	10
Lab tech (Korea)	dH2O جهاز ماء منزوع الايونات	11
Walk Lab (Malaysia)	pH - meter pH جهاز قياس الأس الهيدروجيني	12
Qingdao (Huanya)	Vibration جهاز هزاز كهربائي	13
Helena (USA)	Gel Electrophoresis جهاز ترحيل كهربائي	14
USA	Multigene optimeax cyler PCR جهاز البلمرة	15
Herolab (Germany)	Gel documentation جهاز تصور الهلام	16
Biomeriex (France)	Micro centrifuge جهاز طرد مركزي دقيق	17
KEHANG (China)	جهاز مقياس الحرارة والرطوبة Temperature and Humidity	18
Shimadzu (Japan)	Spectrophotometer مقياس الكثافة الضوئية	19
Stuart (UK)	Hot plate magnetic stirrer	20
Nikon (Japan)	Dissection Microscope مجهر تشريح	21
Nikon (Japan)	Compound Microscope مجهر مركب	22

China	Laptop	حاسبة	23
Lab.Tech (Korea)	Vortex	مازج دوار	24
Millipore System (UK)	pasteur pipette	ماصة باستور	25
Brand (Germany)	Micropipettes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	26
Heraeus (Germany)	Cold Microfuge	جهاز منبذ صغير	27
Consort (Germany)	Power supply	مجهز للطاقة	28
Sartorius (Germany)	Sensitive Electric Balance	ميزان كهربائي حساس	29
E.L.E. (BRITISH)	Balance	ميزان عادي	30
Bioneer (Korea)	Eppendorf tubes	أنابيب إندروف	31
Bioneer (Korea)	Tips		32
Brand (Germany)	Glass flask	دوارق بأحجام مختلفة	33
Brand (Germany)	Glass tube	أنابيب اختبار زجاجية	34
Brand (Germany)	Glass beaker	كؤوس زجاجية	35
Brand (Germany)	Glass cylinder	اسطوانات مدرجة	36

أُستخدمت في هذه الدراسة كل من المواد الكيميائية والمحاليل المبينة في جدول (2-3)

المنشأ	المحاليل والمواد الكيميائية	ت
B.D.H (England)	Glucose	1 كلوكوز
B.D.H	Sucrose	2 سكروز
B.D.H	Dextrose	3 دكستروز
Difco(USA)	Peptone water	4 ببتون
Hi media(India)	Urea	5 يوريا
Hi media	yeast extract	6 خلاصة الخميرة
B.D.H	Glycerol	7 كليسرول
B.D.H	Starch	8 نشأ
B.D.H	Iodine	9 يود
Ajax (AUSTRALIA)	Potassium Iodide	10 يوديد البوتاسيوم
Hi Media	Potassium nitrate	11 نترات البوتاسيوم
B.D.H	KH ₂ PO ₄	12 فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
B.D.H	Chloroform	13 كلوروفورم

B.D.H	Bromothymol blue	البروم الأزرق	14
B.D.H	Absolute ethanol alcohol	كحول إيثانول المطلق	15
USA	Glacial acetic acid	حامض الكبريتيك الثلجي	16
USA	Acetic acid	حامض الخليك	18
Himedia	Paraffine	بارافين	19
B.D.H	BaCl ₂	كلوريد الباريوم	20
Fluka(Switzerland)	Boric acid	حامض البوريك	21
B.D.H	Sodium acetate	خلات الصوديوم	22
Alpha (India)	NaCl	كلوريد الصوديوم	23
Alpha	CaCO ₃	كربونات الكالسيوم	24
B.D.H	NaOH	هيدروكسيد الصوديوم	25
B.D.H	KOH	هيدروكسيد البوتاسيوم	26
B.D.H	Phenol red	أحمر الفينول	27
B.D.H	EDTA	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك	29
B.D.H	Tris – HCL	ترس الحامضي	30
B.D.H	Tris – basic	ترس القاعدي	31
USA	Agarose	الأكاروز	32
Bioneer (Korea)	dH ₂ O	ماء منزوع الايونات	33
Oxoid (England)	Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين	34
B.D.H	phenol	فينول	35

أستخدمت في هذه الدراسة الكواشف المبينة في جدول (3-3).

المنشأ	الكواشف Reagents	ت
Hi Media(India)	α - naphthylamine	1 الفانفتايل امين
Hi Media(India)	Sulphanilamide	2
Hi Media(India)	Kovac`s reagent	3 كاشف كوفاك
B.D.H (England)	Tetra methyl – p- phenylen diamine dihydrochlorid	4 كاشف الأوكسيديز
B.D.H (England)	Phenol red	5 أحمر الفينول
B.D.H (England)	α - naphthol	6 الفا – نفتول
Promega (USA)	Ethidium bromide	7 بروميد الأثيديوم

أُستُخدمت في هذه الدراسة الصبغات المبينة في جدول: (4-3) .

المنشأ	أسم الصبغة	ت
Hi media (India)	Crystal violet البلور البنفسجي	1
	Iodine Gram's أيودين	2
	Safranin سفرانين	3
Sigma (USA)	Ethidium Bromide صبغة برومايد الإيثيديوم	4
Hi media (India)	coomasie brilliant blue صبغة الزرقاء البراقة	5
Hi media (India)	Malachite Green صبغة الملاكايت	7
Hi media (India)	fuchsin basic stain صبغة كاربول	8

أُستُخدمت في هذه الدراسة العدة المختبرية المبينة في جدول (5-3).

الشركة المصنعة (المنشأ)	العدة المختبرية	ت
Bioneer (Korea)	غُدة Master Mix PCR وتحتوي المحاليل الكافية لإجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (20) مايكرو ليتر.	1
	DNA Ladder 100bp 135 ng \ µl	2

أُستُخدمت في هذه الدراسة الأوساط الزرعية الجاهزة المبينة في جدول (6-3)

ت	الأوساط الزرعية	الشركة المصنعة والمنشأ
1	وسط أغار المغذي Nutreint agar	Oxoid (ENGLAND)
2	وسط المرق المغذي Nutreint broth	Oxoid (ENGLAND)
3	وسط أغار سيمون - ستريت Simmon citrate agar	Biolife (ITALY)
4	وسط أغار الدم Blood agar	Oxoid (ENGLAND)
5	وسط أغار الماكونكي MacConkey agar	Rashmi (INDIA)
6	وسط Methyle Red/Vogas proskaur MR/VP	Oxoid (ENGLAND)

أُستُخدمت في هذه الدراسة مواد متفرقة المبينة في جدول (7-3).

ت	المادة	المصدر
1	بذور الشعير المجروش	محلي
2	سكر الطعام	محلي
3	الخميرة	محلي
4	أمو كسيلين Amoxicillin	معمل ادوية سامراء
5	اكياس الدم بشرية صنف AB+	مصرف الدم - مستشفى بعقوبة العام التعليمي

8-1-3 الإنزيمات Enzymes

أُستعمل في هذه الدراسة

- أنزيم (Proteinase K) المجهاز من شركة (Bioneer \ Korea)
- أنزيم (Lysozyme) المجهاز من شركة (Bioneer \ Korea)

2-3 طرائق العمل

1-2-3 تحضير المحاليل وكواشف :

حضرت المحاليل والكواشف والصبغات بالاعتماد على المصادر المتبعة في الدراسة ، عقت

المواد التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز المؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 ° م ولمدة

15 دقيقة وتحت ضغط 15 باوند/ انج² بينما عقت بقية المواد الأخرى التي تتعرض للتلف عند

درجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا والسكريات بالترشيح باستخدام المرشحات الدقيقة Millipore filter بقطر 0.22 مايكرومتر ، أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180°م ولمدة ساعتين .

1-2-3-1 تحضير المحاليل الخاصة بالصبغات:

1- محاليل صبغة غرام (Gram Stain)

استعملت الصبغات الجاهزة و المجهزة من شركة (Himedia \ India) وذلك لتصبغ البكتريا وتصنيفها الى سالبة وموجبة.

2- محلول صبغة الملكايت الأخضر (Malachite Green 5%)

يتكون من 100مل من الماء المقطر ، 5غم من الملكايت الأخضر وبعدها تم ترشيحها بواسطة اوراق الترشيح filter paper (Cawon و Steel, 2004) .

3- محلول صبغة الزرقاء البراقة Coomassie brilliant blue

يتم بأضافة 0.133% من الصبغ CBB في 50% من حامض الخليك acetic acid وبعدها تم ترشيحها بواسطة ورق الترشيح filter papers (Subramaniam وآخرون، 2014)

4- محلول صبغة Carbol fuchsin

تتكون هذه الصبغة من محلولين:

- محلول الفوكسين اساسي fuchsin basic يحضر بإذابة 3 غم من fuchsin basic في 10 مل كحول ايثيلي تركيزه 95%
- محلول الفينول phenol تركيز (5%). يحضر من اضافة 0.5 مل من كرسنال الفينول المتميعة الى 95 مل الماء المقطر.

وبعدها يتم اضافة الفينول phenol الى المحلول fuchsin basic ويمزج جيداً، وبعدها

يرشح بواسطة ورق الترشيح (Zi-shan وآخرون، 2015) .

2-1-2-3 تحضير المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية:

تم تحضير المحاليل الخزينة كافة بحسب ما جاء في (Sambrook و Russel، 2001،

Stephenson، 2003) و كالآتي :-

1. دارئ ترس - حامض الهيدروكلوريك Tris - HCl

تم تحضير هذا المحلول بتركيز 2 مولاري بإذابة 31.52 غم من الترس الحامضي في 80

مل من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى 7.5 بإستخدام حامض HCl المركز

و أكمل الحجم إلى 100 مل وعُقم بالمؤصدة .

2. محلول أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA

تم تحضير هذا المحلول بتركيز 0.5 مولاري بإذابة 93.06 غم من مادة EDTA في 400

مل من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني pH إلى 8 بإستخدام NaOH 10 عياري و

أكمل الحجم إلى 500 مل من الماء المقطر وعُقم بالمؤصدة.

3-1-2-3 المحاليل المستعملة في عزل الدنا البكتيري DNA- Bacteria Solutions

تم أستعمال عدة أستخلاص الـ DNA المجهزة من شركة Bionner لأستخلاص

الدنا البكتيري، DNA جدول (8-3) يوضح محتويات عدة الاستخلاص.

أُستُخدمت في هذه الدراسة جدول مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيريا المبينة في جدول (8-3).

Kit Components	
1	Pellet cells solutions : - • Gram + Buffer (30) ml .
2	Lyse cells solutions : - • Lysozyme (110) m.g • Proteinase K (1.1) m.g + 1.1 ml (ddH₂O) . • GB Buffer (30) ml .
3	DNA Binding : - • Absolute ethanol alcohol (25) ml . • GD Columns (100) .
4	Wash • W 1 Buffer (45) ml . • Wash Buffer (25) ml .
5	Elution • Elution Buffer (30) ml .

3-2-1-4 الإنزيمات المستعملة

- إنزيم Proteinase K حضر بإذابة 11 ملغم في 1.1 مل ماء مقطر منزوع الاستقطاب dH₂O .

- إنزيم Lysozyme حضر بإذابة 110 ملغم في 30 مل من Gram Buffer ومزج جيدا وبعدها يحفظ بدرجة 4 °C ولمدة اسبوعين (للعينة الوحدة يحضر من أذابة 4 مليغرام في 200 مايكرو ليتر من Gram Buffer).

3-2-1-5 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions

حضرت المحاليل الخاصة بالترحيل الكهربائي بحسب ما جاء في (Sambrook و Russel, 2001).

1- محلول Tris- Boric acid – EDTA (TBE) 10x

تم تحضيره من 0.089 مولار من Tris-OH ، و 0.089 مولار من حامض البوريك و 0.002 مولار من Na₂-EDTA في 800 مليلتر من الماء المقطر ، وضبط pH إلى 8 وأكمل الحجم إلى 1000 مليلتر ، وعقم بالمؤصدة ، وحفظ في 4 °م لحين الاستعمال.

2- دارئ التحميل 6 x Loading buffer

حضر من 50% TBE، 30% كليسيرول، 0.25% صبغة بروموفينول الازرق، 20% ماء مقطر.

3- محلول خزين بروميد الإيثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution

حُضر من إذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الإيثيديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم \ مل.

3-1-2-3 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

• محلول PCR pre mix Master,

المحضر مسبقاً والمجهز من قبل شركة (Bioneer (Korea ملحق رقم 2 والذي يتألف من:

Taq DNA polymerase 2.5 U/ml

dNTPS 250 Mm

Tris – HCl 10 mM

KCL 30 Mm

MgCl₂ 1.5 mM

• محاليل البودائ Primers Solutions

أختيرت البودائ المتخصصة والمستهدفة لجين *cry* وفقاً لما ذكر في (Nazemi وآخرون، 2013). والتأكد من البكتريا التي تعود الى النوع *Bacillus thuringiensis* استخدم البودائ 16SrDNA وفقاً لما ذكر في (Greisen وآخرون، 1993) و كما موضح في الجدول (3-7) ، تم تحضير المحاليل الخزينة بحسب تعليمات شركة Bioneer المُجهزة لها بإستعمال dH₂O للحصول على تركيز 10pmol/μL ملحق رقم 2.

جدول: (9-3) تتابعات وتراكيز البوادي وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ.

ت	البادئ	تتابع البادئ 5`—3`	عدد القواعد bp	حجم الناتج bp
1	CU-F	5-GGA TTG GAA TGG GAA ACA- 3	18	200
	CU-R	5- AAA TAG CCG CAT TGA CAC- 3	19	
2	16SrDNA-F	5- AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT – 3	20	380
	16SrDNA-R	5 – AGG AGG TGA TCC AAC CGC A – 3	18	

تم تحضير محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول ١ مايكروليتر، وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ وإضافته إلى 90 مايكروليتر من dH₂O ومُزجه جيداً وحُفظه في الثلج لحين الإستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادي في درجة 20- مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجهِ من الثلج بإستعمال المازج لمُجانسته قبل الإستعمال .

7-1-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard

استعمل المحلول ماكفرلاند Mcfarland Standard ، لمُعايرة عدد الخلايا البكتيرية ، وتم أعداد مقياس ماكفرلاند وذلك بخلط كميات محددة من كلوريد الباريوم (Barium Chloride) وحمض الكبريتيك (Sulfuric acid) مما يؤدي الى تكون راسب من كبريتات الباريوم يعكر المحلول ، يوجد معايير عدة لمقياس ماكفرلاند والشائع هو 0.5 و هو يعطي عدداً تقريبياً للخلايا $10^8 \times 1.5$ خلية ١ مل عند طول موجي 625 nm (Forbes وآخرون، 1998) . ، ويتم تحضيره بخلط 0.5 مل من 0.048 مولاري من ثنائي هيدرات كلوريد الباريوم (Barium Chloride dihydrate) مع 9.95 مل من 0.18 مولاري حامض الكبريتيك (H₂SO₄) ويجب ان تكون اللامتصاصية من (0.08 - 0.10).

8-1-2-3 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution

حُضر من إذابة 8.5 غم من كلوريد الصوديوم في 900 مل من الماء المقطر و أكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر، ثم عُقم بالمؤصدة وحُفظ في درجة حرارة 4°م لحين الإستعمال (Forbes وآخرون، 2002)

3-3 الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا:

1-3-3 تحضير كاشف الكاتاليز (Catalase reagent)

حضر من إضافة 3مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز 22% مع 9مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين وبعدها حضر من إضافة 1مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز 3% مع 9مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين وحفظ بالثلاجة في عبوة داكنة ، ويستخدم في الكشف عن قابيله البكتيريا على أنتاج أنزيم الكاتاليز (Cawon و Steel, 2004) .

2-3-3 تحضير كاشف الأوكسيديز (Oxidase reagent)

حضر آنياً عند الاستخدام وذلك بإذابة 1غم من مادة (Tetra methyl - p - phenylene diamine dihydrochlorid) في 90مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100مل . هذا الكاشف استخدم لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز. (Cawon و Steel, 2004) .

3-3-3 تحضير كاشف فوكس بروسكاور VP (Voges – Proskauer reagent)

الكاشف يتكون من محلولين :

• كاشف الفا- نفثول (α- naphthol) (5%) :

أذيب 5غم من مادة الفا- نفثول (α- naphthol) في 100مل من كحول أثيلي بتركيز 99% .

• كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) (40%) :

أذيب 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 80 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل. أضيف عند الكشف 3 مل من كاشف الفا- نفثول و 1 مل من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم (Cawon و Steel, 2004).

3-3-4 تحضير كاشف الفينول الأحمر (0.2%) (Phenol red reagent)

حضر بإذابة 0.2 غم من الفينول الأحمر (Phenol red) في 100 مل من الماء المقطر (Cawon و Steel, 2004).

3-3-5 تحضير كاشف البروم الأزرق (Bromothymol blue)

حضر من إذابة 1 غم من مادة البروم الأزرق في 25 مل من هيدروكسيد الصوديوم NaOH عياري 0.1 نورمالي، وبعدها خفف بحجم 475 مل من الماء المقطر. (الحديثي , 1988).

3-3-6 تحضير كاشف اليود (Iodine Solution)

حضر من إذابة 2.03 غم من اليود و 5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر بعدها اكمل الحجم الى 100 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 4°م.

3-3-7 تحضير كاشف الميثيل الأحمر (Methyl red reagent)

حضر من إذابة 0.1 غم من أحمر الميثيل في 300 مل من الكحول الأيثيلي بتركيز 95% وأكمل الحجم الى 400 مل بإضافة 100 مل من الماء المقطر. (Cawon و Steel, 2004).

3-4 الاوساط الزرعية التركيبية Culture Media

تم تحضير الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة كل بحسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد ضبط الأس الهيدروجيني عقت بوساطة المؤصدة Autoclave وهذه الأوساط تشمل ما يأتي :

3-4-1 الوسط الانتقائي لعزل وتشخيص البكتيريا

استخدم الوسط الانتقائي Acetate Sodium Selective لعزل البكتيريا بحسب ما جاء في (Travers وآخرون، 1987) حيث ان كل 10 مل من المرق المغذي يضاف اليه 0.25 مول اسيتات الصوديوم.

3-4-2 وسط اختبار الحركة motility test media

حضر بإذابة 10 غم من بيتون و 5 غم من كلوريد الصوديوم و 5 غم من اكار اكار في لتر من الماء المقطر ثم عقم بالموصد بعد ضبط الاس الهيدروجيني 7.2 (Harley و Prescott, 1996).

3-4-3 وسط فوكس بروسكاور (Voges- Proskauer media) (VP)

حضر بإضافة 0.5 غم بيتون (peptone) ، 0.5 غم فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4) ، 1 غم دكستروز (Dextrose)، الى 100 مل ماء مقطر. وبعد ضبط الأس الهيدروجيني (PH 7) وزع في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالمؤصدة (Cawon و Steel, 2004) .

3-4-4 وسط تحلل اليوريا (Urease hydrolysis media)

حضر وسط اليوريا من إضافة 2 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) ، 1 غم بيتون (peptone) ، 5 غم كلوريد الصوديوم NaCl ، 20 غم اكار Agar ، 1000 مل ماء مقطر. وبعد ذلك عدل الأس الهيدروجيني الى (pH 6.8) عقم بالمؤصدة ، وبعد تبريد الوسط بدرجة حرارة 45°م تمت اضافة 1 غم من الكلوكوز المعقم بالترشيح ، 6 مل احمر الفينول (Phenol red) تركيز 0.2% ، و 100 مل يوريا معقمة بالترشيح تركيز 20% ، بعدها وزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة وتم تصليب الوسط بشكل مائل (Cawon و Steel, 2004) .

3-4-5 وسط الأكسدة/ التخمر (O\F) (Oxidation\Fermentation media)

حضر من إضافة 1 غم بيتون (peptone) ، و 2.5 غم كلوريد الصوديوم NaCl و 0.5 غم

فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4) و 1.5 غم اغار agar و 500 مل ماء مقطر , وبعدها عدل الأس الهيدروجيني PH (7.1). يضاف الدليل 7.5 مل من البروم الأزرق Bromothymol blue تركيز 0.2%, وبعد التعقيم بالمؤصدة وتبريد الوسط الى درجة حرارة 45°م اضيف 5 مل من الكلوكوز المعقم بالترشيح , ووزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة (Cawon و Steel, 2004).

3-4-6 وسط تحلل النشأ (Starch hydrolysis media)

حضر من إضافة 10 غم نشأ البطاطا potato starch, 1000 مل الأكار المغذي Nutrient agar الذائب , الى 50 مل الماء المقطر , وبعد مزج النشأ مع الماء ويضاف الى الاغار المغذي الذائب وضبط الأس الهيدروجيني (pH 7) بعدها يعقم الوسط بالمؤصدة (Cawon و Steel, 2004).

3-4-7 وسط الدم الصلب (Blood Agar Base)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وعقم بالمؤصدة , ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة 45°م واضيف اليه 5% من دم الانسان . استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية العزلات على تحليل الدم (Baron وآخرون، 1994).

3-4-8 وسط احمر المثيل (Methyl red media)

حضر احمر المثيل من إضافة 5 غم من الببتون (Peptone)، 5 غم فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4) , الى 1000 مل ماء مقطر. وبعد ضبط الأس الهيدروجيني الى pH 7.6 وزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالمؤصدة , وبعد التعقيم أضيف 20% من الكلوكوز المرشح حيث يتم اضافة 0.25 غم من الكلوكوز لكل 5 مل من الوسط الى وسط المثيل المعقم (Cawon و Steel, 2004).

3-4-9 وسط ماء البيتون (Pepton water medium)

حضر من إذابة 2 غم من البيتون و 0.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، عقم بالمؤصدة بعد ضبط الـ pH الهيدروجيني إلى 7 ، استخدم هذا الوسط في التحري عن إنتاج الاندول (Cawon و Steel, 2004) .

3-4-10 وسط اختزال النترات (Nitrate reduction)

حضر مرق النترات nitrate broth من إذابة 3 غم من خلاصة الخميرة beef extract ، 5 غم بيتون peptone ، 5 غم NaCl ، و 1 غم نترات البوتاسيوم potassium nitrate ، 1000 مل ماء مقطر. استخدم هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم nitrate reductase الذي يختزل النترات nitrate إلى نتريت nitrite و أمونيا ammonia (Burton و Michael, 2005) .

3-4-11 الحفظ على مائل الأكار Slant agar

بعد التشخيص لقحت العزلات البكتيرية على وسط الأكار المغذي Nutrient agar المحضر بشكل مائل وبطريقة التخطيط ، وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة ، ثم حفظت بدرجة 4°م للاستعمال اليومي ، ويتم تجديد العزلات بشكل دوري شهرياً ، وذلك بتنشيطها على وسط أكار المغذي أو وسط نقيع القلب و الدماغ ثم إعادة زرعها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة (Burnett و Crocker, 2005).

3-5 جمع العينات Collection of Samples

أخذت عينات من التربة والمياه ومن خمسة اقصية تابعة لمحافظة ديالى (بعقوبة ، الخالص ، المقدادية ، بلدروز ، خانقين) خلال الفترة من (1 \ 9 \ 2014 لغاية 20 \ 11 \ 2014) . أزيلت الطبقة السطحية للتربة بعمق 3-5 سم باستعمال سكين معقمة واخذ 20 غم من التربة باستعمال ملعقة معقمة إلى كيس نايلون معقم احكم غلقة مع تثبيت المعلومات التالية عليه : اسم المنطقة، طبيعة

الارض وتاريخ اخذ النموذج أما بالنسبة لعينات الماء فجمعت بواسطة قنينة معقمة واخذت عينات من مسافة 2-3سم من سطح الماء وبعدها حفظت العينات الماء والتربة بالثلاجة لحين استعمالها واجراء عملية العزل. شملت العينات من نظم بيئية مختلفة (تربة زراعية ، تربة حدائق، تربة غير زراعية ، شواطئ) .

3-6 زرع العينات Samples culture

إنَّ الطريقة التي زرعت بها العينات حسب طريقة Travers وآخرون (1987) لا تحتاج الى سلسلة من التخافيف ، وذلك بالاعتماد على انبات الابواغ ومن ثم قتل الخلايا الخضرية بالمعاملة الحرارية والتي اجريت كالتالي :نقل 0.5 غم من نماذج التربة البالغة (42) الى دورق مخروطي بحجم 125 مل يحتوي 10 مل من المرق المغذي Nutrient broth الحاوي على خلات الصوديوم بتركيز 0.25 مولاري [pH 6.8] ، وضعت الدوارق في حاضنة هزازة 250 دورة/دقيقة على درجة حرارة 30°م مدة اربع ساعات يتم من خلالها انبات جميع الابواغ باستثناء ابواغ بكتيريا *B.thuringiensis* والذي يثبط انبات ابواغها هو التركيز المستعمل من خلات الصوديوم Sodium acetate. عوملت العينات حرارياً مباشرة على درجة حرارة 80°م لمدة ثلاثة دقائق لقتل جميع الخلايا الخضرية الناتجة من انبات الابواغ بالإضافة الى الخلايا الخضرية الموجودة اصلاً .نقل 0.1 مل من المعلق المعامل حرارياً وزرع على الوسط الزرعي Nutrient Agar في اطباق بتري وحضنت على درجة 30°م لمدة 48 ساعة ، فحصت بعدها المستعمرات وحفظت بالثلاجة لحين اجراء بقية الاختبارات عليها. ما بالنسبة لعينات الماء البالغ عددها ثمانية عينات اجريت سلسلة من التخافيف لعينات الماء (10^{-1} - 10^{-6}) ، وبعدها اخذ 1مل من التخفيف 10^{-3} و 10^{-4} الى دورق مخروطي بحجم 125 مل يحتوي 10 مل من المرق المغذي Nutrient broth الحاوي على 0.25 مول اسيتات الصوديوم [pH 6.8] واجريت عليها عملية العزل بالخطوات نفسها أي التي عوملت بها عينات التربة.

7-3 تشخيص البكتريا Diagnosis of Bacteria

شخصت العزلات المستحصل عليها إعتماًداً على ماورد في (Cawon و Steel, 2004) وعلى الاسس الاتية :-

1-7-3 الخصائص المظهرية والمجهريّة Morphological Characteristics

شخصت العزلة البكتيرية مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية التي تضمنت شكل المستعمرات , ولونها , وخواصها , ورائحتها , وحجمها على وسط الاغار المغذي , اخضعت العزلات الى الفحص المجهرى باستخدام صبغة غرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع صبغة غرام ,ايضاً أخضعت العزلات الى صبغة ملكايت الخضراء للتعرف على توافر السبورات العائدة لهذه البكتريا ،وايضاً أخضعت العزلات الى صبغة الزرقاء البراقة Coomassie brilliant blue و كاربول فوكسين Carbol fuchsin للتعرف على تكوين البروتينات البلورية العائدة لهذه البكتيريا.

2-7-3 الفحوصات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests

أجريت عدد من الاختبارات الكيميائية الحيوية لغرض تشخيص البكتريا النامية على الوسط الغذائي بعد 24 ساعة وهي المدة اللازمة لنموها وفقاً لما ورد في (Cawon و Steel, 2004) . والاختبارات هي :

1-2-7-3 اختبار الحركة Motility test

لفحت الأنابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة المحضر على وفق فقرة (3-4-2)، بطريقة الطعن على ان تكون مسافة الطعن عن ما يقارب (3سم) مع مراعاة عدم دخول الطعن الى قعر انبوبة الاختبار، بعدها حضنت الأنابيب بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة.النتيجة الموجبة تدل على تضبيب حول منطقة الطعن اي ان البكتيريا لها القابلية على الحركة.

2-2-7-3 اختبار الكاتاليز (Catalase test)

اجري هذا الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Catalase) الذي يعمل على كسر جزيئة فوق اوكسيد الهيدروجين (H_2O_2) التي تعتبر مادة سامة للبكتريا الى ماء و اوكسجين . ان ظهور الفقاعات الغازية عند اضافة قطرة من فوق اوكسيد الهيدروجين تركيز 3% المحضر على وفق الفقرة (3-3-1) على البكتريا المنقولة الى شريحة زجاجية نظيفة دليل على ايجابية الاختبار.

3-2-7-3 اختبار الاوكسيديز (Oxidase test)

اجري هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز والذي له القدرة على اكسدة مادة (Tetra methyl – P – phenylene diamine dihydrochloride) وتكوين ناتج ذي اللون البنفسجي. اختبرت العزلات عن طريق نقل 3-5 مستعمرة بكتيرية باستخدام أعواد من الخشب معقمة الى ورقة ترشيح و اضافة قطرات من الكاشف المحضر في الفقرة (3-3-3) ان ظهور اللون البنفسجي بعد عشر ثوانٍ هو دليل على ايجابية الاختبار.

4-2-7-3 اختبار الاندول Indole test

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التريبتوفان نتيجةً لامتلاك البكتريا لأنزيم التريبتوفانيز Tryptophanase ، إذ لقم وسط ماء الببتون السائل المحضر وقف فقرة (3-4-9) بمزروع العزلة قيد الدراسة ، ضمن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 48 ساعة ، ثم أضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent المجهر بهدوء على السطح الداخلي لأنبوبة الاختبار ولأترج اطلاقاً، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال عشرة ثوانٍ من إضافة الكاشف.

5-2-7-3 اختبار أحمر المثيل (Methyl red test)

اجري هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير الكلوكوز وتكوين كمية من الحامض

(اللاكتيك Lactic acid او الفورميك Formic نتيجة ايض الكلوكوز) تكفي لتغير الأس الهيدروجيني pH من (7.2 - 4). حيث لقح الوسط السائل (MR broth) المحضر في الفقرة (3-3-2) بنمو بكتيري وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. بعدها اضيفت 5 قطرات من الكاشف ورج الأنبوبة جيدا، ان ظهور اللون الوردي المائل للاحمرار دليل على ايجابية الاختبار.

3-7-2-6 اختبار فوكس بروسكاور (Voges Proskauer)

اجري هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على تحليل الكلوكوز جزئيا وتكوين مركب وسطي (Acetoin). اذ لقح الوسط السائل (VP broth) المحضر في الفقرة (3-3-4) بنمو بكتيري وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. بعدها اضيف 1مل من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH تركيز 40% و 3مل من الفا نفتول (α -naphthol) تركيز 5% الى الانابيب الملقحة مع رج الأنبوبة بلطف وتهويتها لمدة 30 دقيقة، ان ظهور اللون الاحمر دليل على ايجابية الاختبار.

3-7-2-7 اختبار تحلل اليوريا (Urease hydrolysis test)

اجري هذا الاختبار لمعرفة احتواء البكتريا على انزيم (urease) الذي يحلل اليوريا الى امونيا وثاني اوكسيد الكربون مؤديا الى رفع قيمة الأس الهيدروجيني للوسط وبالتالي يتغير لون الكاشف (Phenol red). اذ لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي المائل (Urea agar) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 5 ايام. ان تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي دليل على ايجابية الاختبار.

3-7-2-8 اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)

اجري هذا الاختبار لمعرفة ان البكتريا لها القابلية على استهلاك سترات الصوديوم بوصفه مصدرا

وحيداً للكاربون. اذ لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزراعي المائل Simmon citrate (agar) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 7 ايام. ان تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الازرق هو دليل على ايجابية الاختبار.

9-2-7-3 اختبار التأكسد \ التخمر (OF) (Oxidation\ Fermentation)

اجري هذا الاختبار لمعرفة ان البكتريا لها قابلية استهلاك الكربوهيدرات بوصفه مصدراً رئيساً للطاقة. حيث لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزراعي المحضر وفق فقرة (3-3-6) شبه الصلب (O\F) بشكل مضاعف بالعزلات البكتيرية، الانبوبة الاولى تكون مغطاة بالبارافين (Paraffin) بسمك 0.5 سم فوق السطح من اجل اختبار التخمر، والثانية بدون بارافين من اجل اختبار التأكسد، وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 14 يوم. ان تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الاصفر في انبوبة التخمر دليل على ايجابية الاختبار، وان تغير لون الوسط من الاخضر الى الاصفر في انبوبة التأكسد دليل على ايجابية الاختبار ايضاً وان البكتريا (مخمرة - مؤكسدة).

10-2-7-3 اختبار تحليل النشأ (Starch hydrolysis test)

اجري هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على نتاج انزيم (Amylase) الذي يحلل النشأ الى مالتوز. حيث خطط وسط اغار النشا (starch agar) المحضر في الفقرة (3-4-4) بالزرع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. بعدها اضيفت كاشف اليود المحضر وفق فقرة (3-3-7) على الوسط الزراعي النامي، ان ظهور هالة شفافة حول المستعمرات البكتيرية هو دليل على تحليل النشأ وإيجابية الاختبار.

Nitrate reductase test

11-2-7-3 اختبار اختزال النترات

اجري هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتيريا على انتاج انزيم nitrate reductase الذي يحول النترات nitrate الى نترتيت nitrite ، لقمح المرق النترات (Nitrate Borth) المحضر في الفقرة (3-10-4) بالزرع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 96 ساعة ، وبعدها اضيف 1مل من كاشف α - naphthylamine و 1مل من كاشف sulphanilamide وتقرأ النتيجة ان تحول اللون الوسط الى اللون الوردي دليل على ايجابية الفحص.

12-2-7-3 اختبار الكشف عن النمو في تركيز ملحي بتركيز 10% NaCl Growth on NaCl 10% Test

لقت المرق المغذي (Nutrient Broth) بالعزلات البكتيرية ، الحاوية على التركيز الملحي فيه 10%، وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. ان ظهور النمو في التركيز الملحي 10% هو دليل على ايجابية الاختبار

13-2-7-3 اختبار الكشف عن النمو على وسط الدم Growth on Blood agar medium

اجري هذا الاختبار لمعرفة ان البكتيريا مرضية ام غير مرضية ، اذ خطط وسط اغار الدم (Blood agar) بالزرع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. ان ظهور هالة من التحلل في الوسط الزرعي دليل على ان البكتيريا مرضية

14-2-7-3 اختبار الكشف عن النمو على وسط الماكونكي Growth on MacConky Test

اجري هذا الاختبار لمعرفة ان البكتيريا مخمرة للاكتوز ام غير مخمرة، إذ خطط وسط اغار الماكونكي (MacConky agar) بالزرع البكتيري وحضن في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

3-8 أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction

تم عزل الدنا البكتيري بأستعمال عدة الأستخلاص (Mini gDNA Bacteria kit) المجهزة من شركة Bionner وبأتباع الخطوات الآتية :-

1. نقل 1مل من مزروع العزلات البكتيرية المنماه بعمر 24 ساعة الى انابيب أيبندروف 1.5 مل

2. طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقة بسرعة 14000 دوره / دقيقة ، بعدها أهمل الطافي .
3. أضيف 200 مايكروليتر من محلول Gram positive بعد تأكد من اضافة اللايسوزايم Lysozyme اليه المحضر على وفق فقرة(3-1-2-4) الى انابيب أيبندروف ومزجها جيداً بوساطة المازج Vortex.
4. وضعت الانبوبة مع الانزيم داخل حمام مائي Water bath لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 37°م مع قلب الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق في أثناء فترة الحضانة .
5. أضيف 20 مايكروليتر من أنزيم Proteinase K المحضر وفق فقرة (3-1-2-4) الى الأنابيب ثم مزجاً بوساطة المازج Vortex جيداً ثم وضعت داخل حمام مائي Water bath مدته عشر دقائق وبدرجة حرارة 60°م و قلب الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاثة دقائق في أثناء فترة الحضانة .
6. أضيف 200 مايكروليتر من دارئ GB الى الأنابيب ثم مزجاً بوساطة المازج Vortex جيداً لمدة عشر ثوان ثم وضعت داخل حمام مائي Water bath لمدة عشر دقائق وبدرجة حرارة 70°م و قلبت الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق في أثناء فترة الحضانة .
7. أضيف 200 مايكروليتر من إيثانول المطلق البارد Absolute ethanol الى الأنابيب ثم خلط المزيج برفق عن طريق قلب الأنابيب لترسيب الدنا .
8. تم وضع عامود GD Column في انبوبة الجمع Collection tube سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط.
9. طردت الأنابيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 14000 دورة / دقيقة بعدها نقل المحتويات الى أنبوبة جمع جديدة .
10. أضيفت 400 مايكروليتر من دارئ W1 الى عمود GD.

11. طردت الانابيب مركزياً بسرعة 14000 دورة / 30 ثانية ثم وضع عمود GD في أنبوبة

الجمع.

12. أضيف 600 مايكروليتر من دارئ Wash buffer الى عمود GD.

13. أجري الطرد المركزي 14000 دورة / دقيقة .

14. أعيد الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 14000 دوره / دقيقة لتجفيف العمود.

15. نقل العمود GD الى أنبوبة ايبيندروف نظيفة 1.5 مل .

16. أضيف 50 مايكوليتير من دارئ Elution المسخن بدرجة 70°م مسبقاً الى الانابيب وتركت

الأنابيب لمدة خمس دقائق ثم طردت مركزياً لمدة نصف دقيقة بسرعة 14000 دورة / دقيقة

وبذلك يتم الحصول على الدنا .

3-9 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis

لأجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص بحسب ما جاء في (Sambrook و Russell, 2001)

بإستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (3-1-2-5) وكالاتي :

حُضر هلام الأكاروز بتركيز 1 % باذابة 1 غم من الأكاروز في 100 مل من محلول 10

x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على 1x TBE، سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وتُرك

ليبرد إلى درجة حرارة 45°م، ثم أضيفت إليه صبغة بروميد الإيثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام

مل بإستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيداً . تم إعداد صفيحة

لإسناد الأكاروز Tray بإحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم تُثبت المشط Comb

لتكوين الحفر Wells المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث

فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، رُفِع المشط بهدوء وتُزَع الشريط

اللاصق . بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب يغطي الهلام

من 1x TBE ثم حُمِلت العينات المُعدة للترحيل 5 مايكروليتر من قالب الدنا وخلطها بعدها مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل 6x بإستعمال ماصة دقيقة Micropipette . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 100 فولت اسم لمدة 45 دقيقة حتى وصول العينات إلى ما قبل نهاية الهلام ، بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 320 نانوميتر .

10-3 قياس تركيز الدنا ونقاوته

قيس تركيز الدنا من خلال تخفيف العينة بإضافة 495 μL من الماء المقطر إلى 5 μL من دنا العينة وقراءة امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer الذي يستعمل لقياس الكثافة الضوئية (O.D) عند الطولين الموجيين 260 ، 280 نانوميتر وتطبيق القانون الآتي :

تركيز الدنا (mg/ml) = مقدار الامتصاصية عند الطول الموجي 260 لمل واحد من العينة x مقلوب التخفيف 50x ، أما النقاوة = الامتصاصية عند الطول الموجي 260 / الامتصاصية عند الطول الموجي 280 ، هذه النسبة هي إحدى المؤشرات الدالة على كفاءة الاستخلاص ومدى تلوث الحامض النووي بالبروتين (Maniatis وآخرون، 1982)

11-3 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

تم الكشف عن الجين *cry* و الجين *16SrDNA* باستخدام تقنية PCR وبأتباع الخطوات الآتية :

1. حضر خليط التفاعل الرئيس Master Mix وذلك بإضافة المكونات الآتية في أنبوبة معقمة كما في الجدول أدناه :

جدول (3-10): مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master Mix

Final Concentration	Volume For 1 Tube	Materials Concentration Manufacturer
.....	6 μ L	D.W
1x	5 μ L	Accupower® PCR Premix
10 pmol	2 μ L	Primer – F (10 pmol)
10 pmol	2 μ L	Primer – R (10 pmol)
15 μ L		Total reaction Volume

ومزجت هذه المكونات بواسطة ماصة زجاجية دقيقة Particle Pipette وذلك بسحبها عدة مرات ثم وضعت في جهاز النبد لمدة 10 ثوان .

2. وزع الخليط على 8 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومعلمة بحسب العينات المراد دراستها وبواقع 15 μ L من الخليط لكل أنبوبة. وبالخطوات الآتية :

3. اضيف 5 μ L من قالب الدنا لكل عينة في الأنبوبة المخصصة لها ، ووزع الـ Master Mix على الأنابيب قبل نقل الـ DNA لتجنب التلوث.

4. استعمل جهاز الطرد المركزي لمدة 15 ثانية لجمع القطرات الملتصقة بجدار أنبوبة الطرد المركزي وإنزالها إلى أسفل الأنبوبة للحفاظ على الحجم النهائي لخليط التفاعل والبالغ 20 μ L.

5. برمجة جهاز PCR The cycling reactions program

تم إجراء خطوات التضاعف للتحري عن البكتيريا *Bacillus thuringiensis* على مستوى النوع

في بحسب ما جاء في (Greisen وآخرون، 1994) وللتحري عن الجينات *cry* بحسب ما جاء في

(Nazemi وآخرون، 2013) ومع إجراء بعض التحويرات تم تمت برمجة جهاز PCR

كما موضح في الجدول (3 - 11)

الجدول (11-3): برمجة جهاز P.C.R

Type of primers	PCR Conditions Temperature / Minute								
	Denaturation				Annealing		DNA-extension		Expected size of products (bp)
	One cycle		35 cycles						
	°C	Min	°C	Min	°C	Min	°C	Min	
CU	94	2min	95	40s	52	1	72	40s	348
16rDNA	94	2min	95	40s	56	1	72	40s	421

* نُقِلَ بعد ذلك (10) مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي.

* حُفِظَ المتبقي من نواتج التضاعف في درجة (- 20°)م.

12-3 تحضير لقاح البكتريا *B. thuringiensis*

نميت البكتيريا على الوسط Nutrient agar بعد تحضيره وتعقيمه وصب في اطباق بتري بعدها لقحت الاطباق بطريقة التخطيط (streaking method) ثم حضنت بدرجة 35°م لمدة 48 ساعة، ولغرض اكلار العزلة التي اظهرت بانها مكون للأجسام البلورية تم اخذ 13غم من المرق المغذي Nutrient broth ووضعت في لتر من الماء المعقم ، وبعدها عقم بالمؤصدة ،بعد التبريد لقحت الدوارق الحاوية على الوسط بمعدل عشر مستعمرات /لتر من البكتيريا المنمأة على وسط اغار المغذي ،ثم حضنت بدرجة 35°م لمدة 48 ساعة (Leben وآخرون، 1987).

3-12-1 مراحل إنتاج المستحضر الحيوي

1- وسط التخمر الملائم لتنمية لقاح البكتريا *B.thuringiensis*

يتم تحضير الوسط التخمر من جريش بذور الشعير بوصفه وسطاً ملائماً لنمو البكتيريا بحسب ماجاء في (تويج، 2009) وكما يأتي:-

- تم تهيئة 200 غم من جريش بذور الشعير وتم وضعها في دورق سعه 1 لتر وثم أكمل لحجم الى 1000 مل من الماء المقطر المعقم ويترك لمدة 24 ساعة .
- رشح المزيج بوساطة قطعة شاش نظيفة ومعقمة.
- اخذ الراشح ووضع فيه 20 غم من سكر السكروز.
- عقم الوسط التخمرى بجهاز الموصد (Autoclave) في درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 15 جو ولمدة 20 دقيقة ثم برد.
- ووضع المضاد Amoxicillin بتركيز 20 ملغم/لتر .
- لقم الدورق ب 50 مل من العالق البكتيري المنما على وسط المرق المغذي ، ثم حضنت بدرجة 35°م ولمدة 48 ساعة ،بعدها حضرت سلسلة من التخفيف (10^{-1} - 10^{-6}) في أنابيب اختبار زجاجية معقمة ، ثم زرع 1مل من العالق المخفف (10^{-6}) على آغار المغذي بدرجة 35°م ولمدة 48 ساعة . حسببت المستعمرات النامية في الأطباق واستخرجت كثافة البكتريا بحسب معادلة (Clark, 1965) كالآتي: عدد المستعمرات النامية في 1 غم لقاح بكتيري = معدل المستعمرات النامية في الطبق × مقلوب التخفيف

2- اختبار مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح البكتريا *B.thuringiensis*

اخذ 100 غم من كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ وعقمت بفرن كهربائي (Oven) في درجة حرارة 160°م لمدة ساعة، تركت لتبرد ثم وضعت في أواني ضحلة معقمة ووضع 100مل من

الوسط التخمرى المعد مسبقا والحاوي على البكتيريا بعمر 48 ساعة. بعدها نقلت الأواني الى فرن كهربائي (Oven) بدرجة 35°م ولمدة خمسة أيام لحين جفافها جيدا" بعدها تم طحن المسحوق المحمل على البكتيريا في غرفة معقمة (Hood) (تويج، 2009). بعد ذلك حضرت سلسلة من التخافيف 10^{-1} - 10^{-6} في أنابيب اختبار زجاجية معقمة ، وذلك بأخذ 1غم من المادة المحملة ووضع في 9مل من الماء المقطر المعقم. ثم نقل 1مل من المحلول المستحضر (10^{-6}) الى أطباق بتري حاوية على آغار المغذي ومضاف اليه المضاد Amoxicillin بتركيز 20 ملغم/لتر وبثلاثة مكررات وحضنت الأطباق بدرجة 35°م ولمدة 48 ساعة. وبعدها تم تقدير كثافة البكتريا في الغرام الواحد من المادة الحاملة وذلك بحساب معدل المستعمرات النامية الأطباق بحسب معادلة (Clark, 1965) .

3-تحديد نسبة وسط التخمر إلى المادة الحاملة للمستحضر

بعدها اثبت كفاءة مادة كاربونات الصوديوم كمادة حاملة اللقاح البكتيري *B.thuringiensis* ان افضل نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة هي 1:1 وذلك بأخذ 100غم من كاربونات الكالسيوم وعقمت بدرجة حرارة 160°م لمدة ساعة وبعدها وضعت في اناء 100مل من اللقاح البكتيري المنمأة على منقوع الشعير المعد مسبقا ،وبعد ذلك وضعت بفرن كهربائي بدرجة 35°م ولمدة خمسة أيام بعد انتهاء التجفيف تم طحن المسحوق في ظروف التعقيم (تويج، 2009) كما في صورة 9. وتم حساب كثافة البكتيريا في وحدة الوزن (غم) بحسب معادلة Clark (Clark, 1965).



صورة 9: المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bt* المعزولة من التربة والماء

4- التحضير النهائي للمستحضر الحيوي

في ضوء نتائج تجربة اختبار الوسط التخمرى لمنقوع الشعير بوصفه وسط لإنتاج المبيد الحيوي ومادة كاربونات الكالسيوم بكونها مادة حاملة اللقاح البكتيري اذ تم الاعتماد على نسبة 1:1 (تويج، 2009).

3-13 تربية ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* (Loew)

جمعت ثمار قرع الكوسة وخيار الماء المصابة بذبابة ثمار القرعيات من الاراضي الزراعية لمحافظة ديالى، ولغرض تربية الحشرة وضعت الثمار المصابة المجموعة من الاراضي الزراعية بأقفاص مصنوعة من الزجاج العضوي بأبعاد (60×60×60 سم) مفتوحة من الأعلى وكل منها مغطى بقماش من المللم وذو باب جانبي للتعامل مع الحشرات كما في صورة 10 ، وثبتت على ارضية من الخشب الفاير سمكه 2سم وفرشت ارضية الأقفاص بمسحوق كوالح الذرة لكي يمتص السوائل التي تخرج من الثمار المصابة وكذلك لكي تتعذر فيه اليرقات كما زودت الأقفاص بأطباق بتري صغيرة تحوي على خليط من خميرة الخبز الجافة مع سكر المائدة وكانت كمية الخميرة إلى كمية

سكر المائدة 1 غم خميرة الخبز : 3 غم سكر المائدة ، تعد الخميرة مصدراً بروتينياً للإناث (1983,Drew ; 1987,Dohary) وكذلك لتحسين نشاط الذكور (Schroeder وآخرون، 1973) ، كما وضعت أطباق بتري أخرى تحوي على قطعة قطن مرطبة بالماء المقطر لتوفير مياه الشرب للحشرة ولضمان نسبة رطوبة ملائمة مثلى 60 ± 10 % داخل الأقفاص ، وتستبدل الثمار التالفة بأخرى غير مصابة وكذلك الماء والغذاء كل ثلاثة أيام وذلك لإدامة المستعمرة ، وبعد ذلك نقلت الأقفاص إلى غرفة التربية التي كانت إبعادها (2.8 X 4 X 4) م ومجهزة بمكيف هواء وشمعات إضاءة مثبتة على جهاز منظم وقت الإضاءة حيث تكون 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات مقياس للرطوبة والحرارة ووضعت في زوايا الغرفة اواني بلاستيكية مملوءة بالماء لضمان الرطوبة المناسبة إذ كانت درجة حرارة الغرفة 27 ± 2 °م والرطوبة النسبية كانت 60 ± 10 % (القره غولي، 2013) .



صورة 10: صناديق تربية الحشرات

3-14 اختبار فاعلية المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* على الادوار المختلفة لذبابة القرعيات (*Dacus ciliatus* (Loew) أجريت التجارب في حاضنة درجة حرارتها 25 ± 2 °م ورطوبة نسبية 65 ± 5 % واستعملت فرشاة رقم 4 للتعامل مع البيض و اليرقات. وشرائح قرع سمك 1 سم .



صورة 11: تحضير تخافيف من المستحضر البكتيري *Bt*

3-14-1 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* في نسبة فقس البيض بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات *D.Ciliatus*

وضعت 10 بيوض بواقع 3 مكررات لكل من التخافيف (1,2,3,4,5) غم من المستحضر الجاف/لتر ماء معقم على شرائح قرع ثم رشّت بوساطة قنينة رش يدوية سعة (50 مل) معقمة بالكحول بمعدل 1مل محلول مستحضر وبحسب التراكيز المستعملة، حتى تنتفع البيوض وقرعة بشكل كامل، ثم نقلت بوساطة ملقط معقم الى أطباق بتري قطر (9 سم). تمت متابعتها يومياً لمعرفة نسبة فقس البيض ومقارنتها بمعاملة السيطرة التي رشّت بمحلول المادة الحاملة (كاربونات الكالسيوم) فقط.

3-14-2 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bt* في تطوירים الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *D.Ciliatus*

جمعت يرقات الطور الأخير من خلال تشريح القرع المصابة في أقفاص التربية في أطباق بتري معقمة واستعمل مشرط معقم للتشريح . تركت اليرقات في الأطباق مدة 24 ساعة قبل المعاملة , ورشّت شرائح القرع بالتخافيف (1,2,3,4,5) غم من المستحضر الجاف/لتر ماء بواقع ثلاثة مكررات لكل تخفيف، بوساطة قنينة رش يدوية معقمة سعة (50 مل) حجم الرشّة (1 مل) بحيث تغطي جميع جوانب شريحة القرع ثم نقلت بوساطة ملقط معقم الى أطباق بتري معقمة. ووضعت فوق

كل شريحة قرع عشر يرقات بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز، وأغلق الطبق إغلاقاً محكماً لمنع هروب اليرقة كما في صورة رقم 12.

فحصت الاطباق يومياً لحين تحول اليرقات الى عذارى وبزوغ البالغات ومقارنتها بمعاملة السيطرة التي رشت بمحلول المادة الحاملة (كاربونات الكالسيوم) فقط.



صورة 12: معاملة الطور اليرقي الأخير

3-14-3 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bt* في معدل تطور العذارى بعمر (6-7) يوم الى بالغات لذبابة ثمار القرعيات *D. Ciliatus*
عزلت العذارى من أقفاص التربية ووضعت عشرة عذارى في اطباق بتري ، ورشت بالتخفيف (1،2،3،4،5) غم من المستحضر الجاف/لتر ماء بواقع ثلاثة مكررات لكل تخفيف، بواسطة قنينة رش يدوية معقمة سعة (50 مل) حجم الرش (1 مل). فحصت الاطباق يومياً لحين بزوغ الى البالغات ومقارنتها بمعاملة السيطرة التي رشت بمحلول المادة الحاملة (كاربونات الكالسيوم) فقط.

3-14-4 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bt* في معدل عمر البالغات

المتغذية على المستحضر لذبابة ثمار القرعيات *D.Ciliatus*

عزلت مجموعة من يرقات الطور الأخير وتركت لحين التحول الى حشرة بالغة أخذ منها 40 زوجاً من البالغات (ذكور واثاث) التي تم تمييزها إذ الإناث يمكن تمييزها عن الذكور من خلال آلة وضع البيض. وضع بواقع خمسة ازواج لكل معاملة بواقع ثلاثة مكررات لكل تخفيف في صناديق تربية بأبعاد $10 \times 10 \times 10$ سم وغطيت فوهة الصناديق بقطعة من قماش الململ كما في صورة رقم 13. رش غذاء البالغات المكون من 1غم من الخميرة و3غم من سكر المائدة في طبق بتري معقم بالتخافيف المذكورة سابقاً . فحصت القناني يومياً لحين انتهاء مدة حياة البالغات. حيث تم حساب مدة حياة الذكور والاثاث ومقارنتها بمعاملة السيطرة التي رشت بمحلول المادة الحاملة (كاربونات الكالسيوم) فقط.

3-14-5 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bt* في إنتاجية أناث ذبابة ثمار

القرعيات *D.Ciliatus* للبيض

عزلت مجموعة من يرقات الطور الأخير وتركت لحين التحول الى حشرة بالغة ووضع زوج واحد (ذكر واثاث) لكل معاملة بواقع ثلاثة مكررات لكل تخفيف وأجريت عليها تجارب التزاوج في أقفاص التربية بقطر $10 \times 10 \times 10$ سم وغطيت فوهة الصناديق بقطعة من قماش الململ ثم وضعت داخل صناديق ثمار القرع غير المصابة كما في صورة رقم 13. ورش غذاء البالغات المكون من 1غم من الخميرة و3غم من سكر المائدة في طبق بتري معقم بالتخافيف المذكورة سابقاً . يتم فحص الثمار يومياً لحساب عدد البيض الملقى من قبل الأنثى لكل تركيز.



صورة 13: صناديق لمعاملة البالغات

15-3 تحليل البيانات Data Analysis

حللت البيانات احصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D). حيث درس فيه تأثير المعاملات على الصفات المدروسة (التأثير في نسبة قتل الادوار المختلفة و في معدل عدد البيض الملقى من قبل البالغات المعاملة) اختبرت معنوية الفروق باستعمال اختبار Least significant different (L.S.D). عند مستوى معنوية $p \leq 0.05$. (الراوي و خلف الله، 1980).

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 عزل و تشخيص البكتيريا الممرضة *Bacillus thuringiensis*.

1-1-4 العزل

بلغ العدد الاجمالي لعينات التربة والماء 51 عينة ، أظهرت أربع عينات وبنسبة (7.8%) نمواً سالباً للزرع البكتيري و 46 عينة وبنسبة (90.1%) نمواً موجباً للزرع البكتيري. عزلت منها 41 عزلة تعود للجنس *Bacillus thuringiensis* التي جمعت من نظم بيئية مختلفة شملت (تربة زراعية وتربة حديقة وتربة غير زراعية والماء) ، شكل 1-4 . توزعت العزلات على وفق ما ذكر في الجدول (1-4) .

جدول (1-4) : النسبة المئوية للعزلات الموجبة لصبغة الزرقاء البراقة (CCB) المعزولة من نظم بيئية مختلفة .

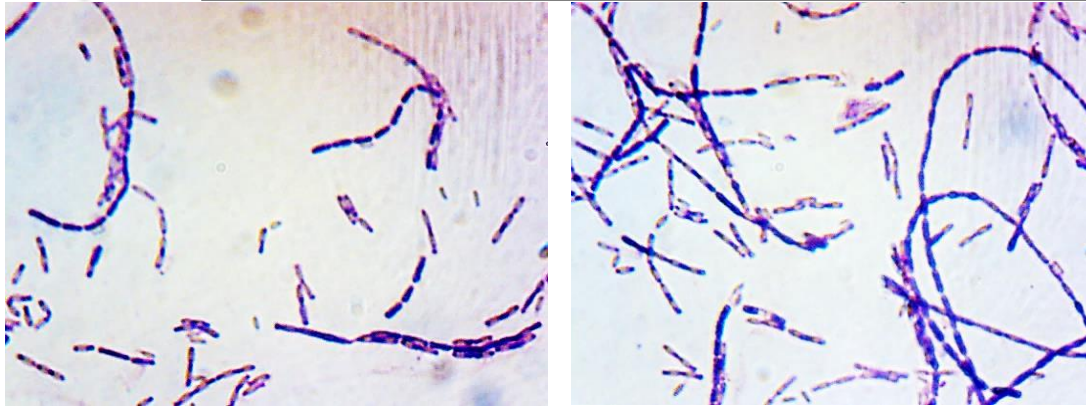
النسبة المئوية %	العزلات الموجبة لصبغة الزرقاء البراقة (CCB)	عدد العينات	مصدر العزل
94.1	16	17	تربة زراعية
93.3	14	15	تربة حديقة
75	6	8	الماء
50	5	10	تربة غير زراعية
80.3	41	51	المجموع الكلي

جمعت العينات من نظم بيئية مختلفة لغرض معرفة مدى أنتشار البكتيريا *B.thuringiensis* و معرفة المدى الأمراضي لهذه البكتيريا ودورها في قتل ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* ، والتحري عن انتاجها للبروتينات البلورية المبيده للحشرات (ICP) وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية. تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتماداً على الصفات المجهرية للخلايا البكتيرية و الصفات المزمرية للمستعمرات و تم بعد ذلك تشخيصها حتى الجنس و النوع بأتابع الفحوصات الكيميائية الحيوية الخاصة بها و المبينة في الجدول (2-4) .، وكانت المستعمرات بعضها خشنة rough، بيضاء اللون white، منتشرة على طبق ، وبعضها بيضاء منتشرة وحافاتها متموجة wavy وبعضها دائرية وبيضاء وخشنة.

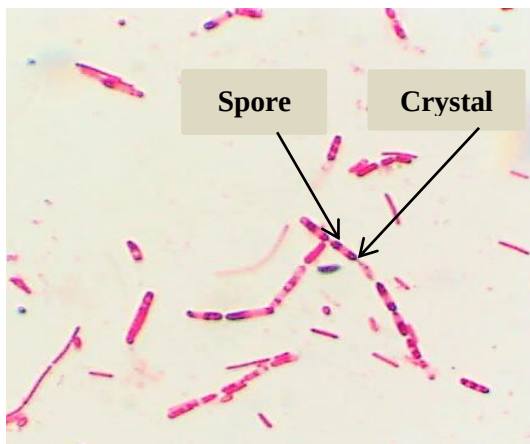
أظهرت نتائج الفحص المجهرى أن خلايا البكتيريا المعزولة كانت عصوية الشكل rod-like shaped ، بشكل سلاسل Chains ، موجبة لصبغة غرام صورة 14، مكونة للسبورات إهليجية الشكل ellipsoidal طرفية الموقع subterminal في خلية الام غير المتورمة صورة15، مكون للبروتينات البلورية مبيده للحشرات (ICP) عند تصبيغها بصبغة الزرقاء البراقة Coomassie brilliant blue وصبغة Carbol fuchsin وهي الصفة المميزة لبكتيريا *B.thuringiensis* التي تميزها عن بقية الانواع بكتيريا *Bacillus* كما في صورة16 و 17 وكما وأظهرت الفحوصات الكيميائية الحيوية فحصاً موجباً للحركة و للاوكسيديز و للكاتاليز ، وإنتاج السترات وبعضها سالبة لإنتاج السترات ، وموجباً لأختبار تحلل النشأ و فوكس بروسكاور (VP) واحمر المثل MR و اختزال نترات و أنتاج انزيم حال الدم Hemolysin من خلال ملاحظة مناطق التحلل المحيطة بالمستعمرات البكتيرية واختبار التخمر/والأكسدة وإنتاج انزيم اليوريز Urease وأعطت فحصاً موجباً للنمو في تركيز ملحي 10% وهي ايضا صفة مميزة لها وفحصاً سالباً للندول.

جدول 4 - 2 : الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا الممرضة *B. thuringiensis*.

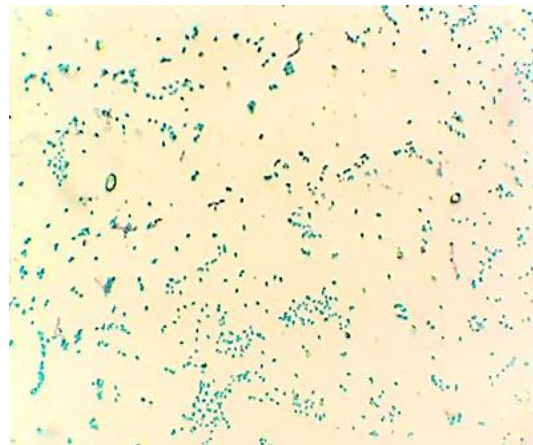
نوع الاختبار	عدد البكتيريا الموجبة للفحص	عدد البكتيريا السالبة للفحص
صبغة غرام Gram stain	41	0
صبغة ملكايت الخضراء	41	0
صبغة كاربول فوكسين	41	0
صبغة الزرقاء البراقة	41	0
اختبار الحركة Motile	41	0
اختبار الكتاليز Catalase test	41	0
اختبار الأوكسيديز Oxidase test	41	0
أستهلاك السترات Citrate	15	26
اختبار اليوريز Urease test	41	0
اختبار اندول Indole test	0	41
أختبار فوكس بروسكاور (VP)	41	0
اختبار احمر المثل MR	39	2
اختبار النترات Nitrate test	41	0
اختبار التخمر/الاكسدة O/F test	41	0
النمو في تركيز ملحي 10%	41	0



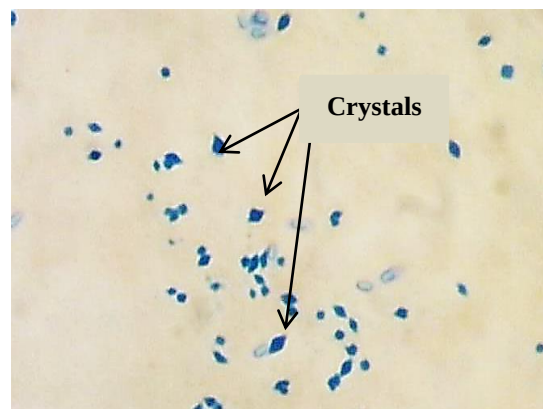
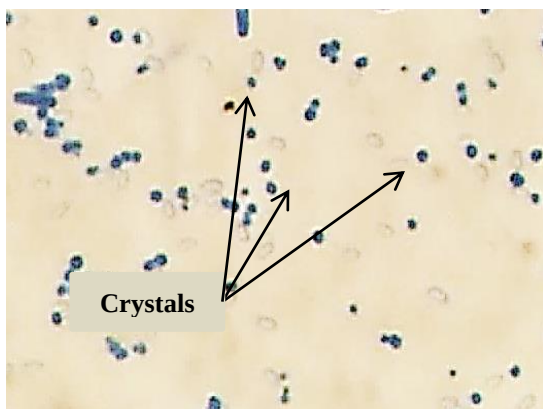
صورة 14: صبغة غرام Gram stain.



صورة 16: السبورات والبروتينات البلورية (صبغة كاربول فوكسين).



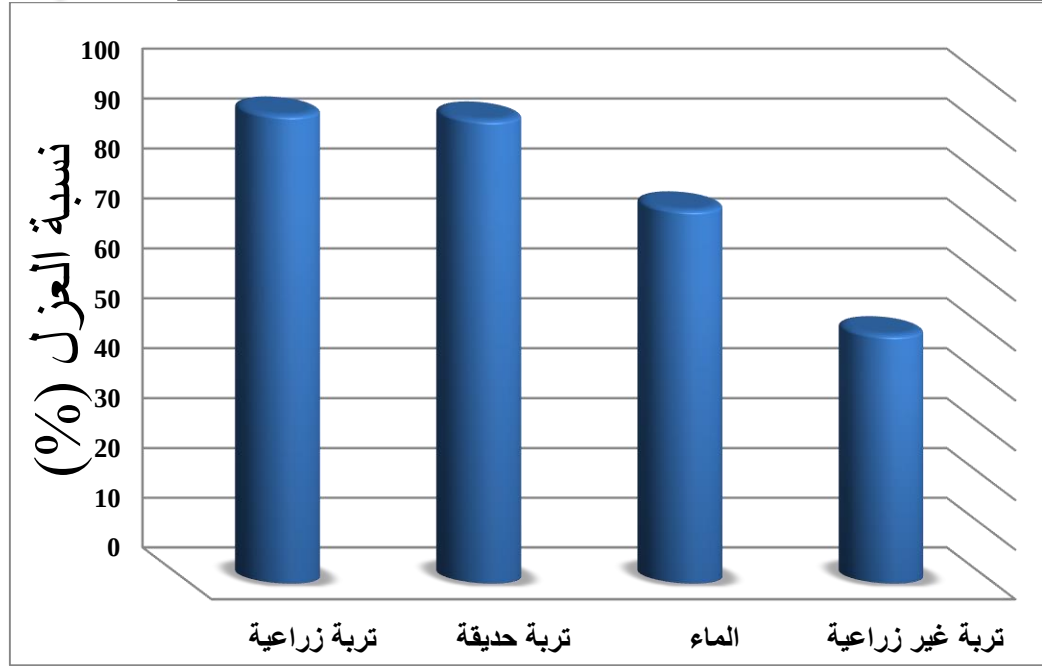
صورة 15: السبورات (صبغة الملكايت).



صورة 17 : اشكال الكرساتلات البروتينية المختلفة (صبغة CBB).

4-1-2 توزيع البكتيريا الممرضة *B. thuringiensis* في نظم بيئية مختلفة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية نسبة وجود البكتيريا *B.thuringiensis* في الترب تحت الدراسة أن 83.3% من مجموع العينات التربة المختبرة في ضوء إيجابيتها في تكوين البروتينات البلورية المبيدة الحشرات (ICP). إذ تتقارب جزئياً من نسبة وجودها في الترب السورية المدروسة إذ كانت نسبة البكتيريا 97% (مهيار، 2011)، وايضاً في آسيا إذ وصلت الى 85% (Martin و Travers 1989). تكون أعلى من نسبة وجودها في الترب الكندية حيث كانت نسبة البكتيريا 26-39% (Morris وآخرون، 1998)، وفي نيوزيلندا وصلت نسبة وجودها 70% (Chilcott و Wigley، 1993)، وفي الأردن 63% (Obeidat وآخرون، 2000) ، وفي بنغلادش 57% (Sanchis و Bourguet، 2008) ، وتتقارب تلك النتيجة جزئياً مع ما توصل له جميل وحمد (2014) إذ بلغت نسبة البكتيريا *B.thuringiensis* في الترب المدوسة في محافظة ديالى 75%. يرجع هذا الاختلاف في نسبة جود البكتيريا *B.thuringiensis* في مواقع الترب المدروسة الى الاختلاف في الموقع الجغرافي والى الاختلاف في البيئة التي اخذت منها العينات ونوع التربة المدروسة والظروف البيئية المحيطة بها (Ohba و Aizawa، 1985; Obeidat وآخرون، 2000). يوضح شكل (1-4) نسبة وجود البكتيريا في الترب المدروسة ، إذ بلغت نسبة وجود البكتيريا في الترب الزراعية قيد الدراسة 94.1 % والحدائق 93.3% والشاطئ 75% مقارنة مع المناطق غير الزراعية 45.4% اي ان هناك فرقاً في توافر البكتيريا في النظم البيئية وهذا يتفق مع ما أشار اليه الباحثان (Martin و Travers، 1989) بانتشار البكتيريا *B.thuringiensis* بشكل اكبر في الغابات والمناطق الزراعية والسهول مقارنة مع المناطق غير الزراعية.



شكل (1-4): النسبة المئوية لانتشار البكتيريا الممرضة *B.thuringiensis* في النظم البيئية المختلفة.

يعزى انتشار هذه البكتيريا *B.thuringiensis* في النظم البيئية المختلفة بوصفها تكون الأبواغ المحتملة للظروف البيئية غير الملائمة من درجات الحرارة المنخفضة تصل إلى -20°م (Adison, 1993)، ودرجات الحرارة المرتفعة تصل إلى 80°م (Petras و Casida, 1985) كما أنها تنمو في ظروف الجفاف والتربة الرملية التي تكون فيها نسبة الرطوبة أكثر من 10% وتنمو جيداً عندما تكون الرطوبة 36% (Adison, 1993). وكما يمكن أن تظهر في أنواع مختلفة من التربة حيث عزلت هذه البكتيريا *B.thuringiensis* من تربة طينية (Clay) وتربة طينية غروية (Clay loam) وتربة رملية غروية (Sandy loam) في مصر (Salama وآخرون، 1986).

3-4 التشخيص الوراثي الجزيئي للبكتيريا الممرضة *B.thuringiensis* على مستوى الجنس والنوع والكشف عن الجين المكون للبروتينات البلورية *cry* باستخدام تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل P.C.R

اختبرت ثمان عزلات تعود لنوع *B.thuringiensis* من نظم بيئية مختلفة والتي تحمل التسلسلات (5،10،12،17،20،24،26،28). إذ اختيرت العزلات التي نمت على وسط الانتقائي

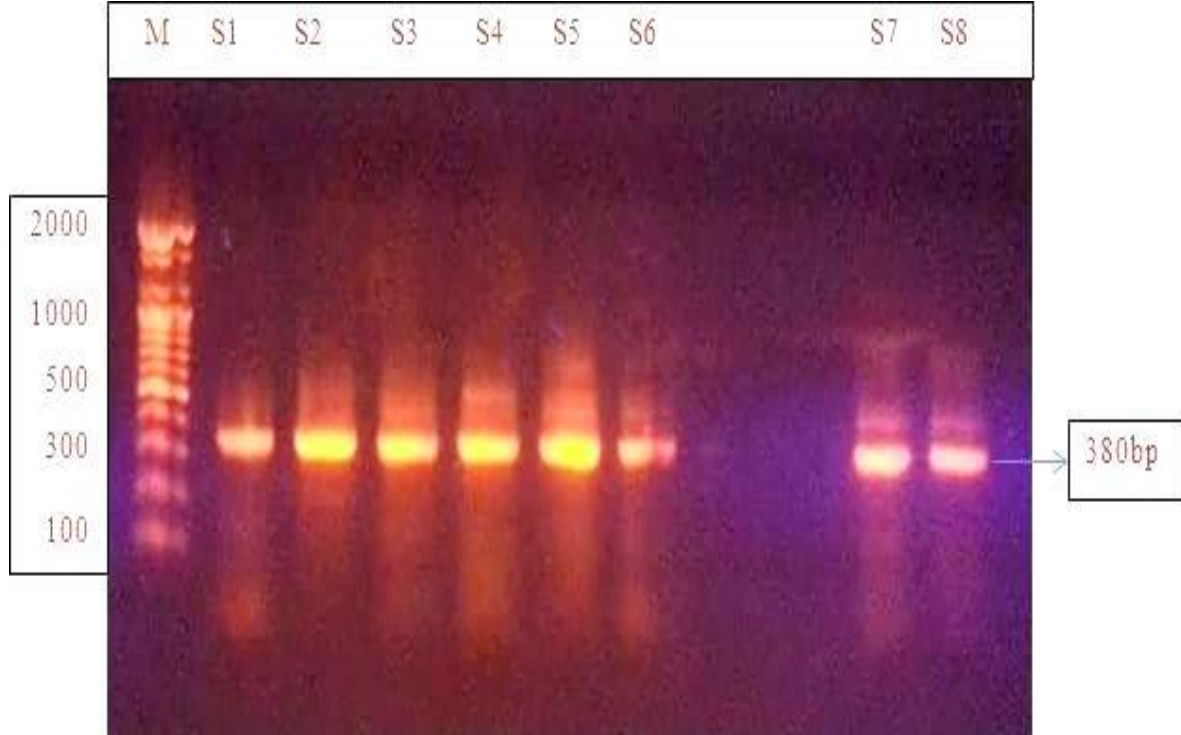
(Acetate Sodium Selective) فضلاً عن إنتاجها البروتينات المبيده للحشرات (ICP)، عند تصبيغها بصبغة (CBB) وذلك للكشف عن وجود جينات تشفر لهذه البروتينات البلورية (Cry proteins) بأستعمال تقنية (PCR) من خلال أستعمال بادى Primers متخصص بالجين cry المجهر من قبل شركة (Bioneer \ Korea) على وفق التسلسل المصمم من قبل (Nazemi وآخرون، 2013). مع إجراء بعض التحويلات على برنامج التفاعل فيما يتعلق بدرجة حرارة ارتباط البادى Anneling إذ أصبحت 52° م بدلاً من 53° م بالنسبة لبادى الجين 16S rDNA ثم تمت برمجة جهاز PCR كما موضح في الجدول (3-11). قد تم إستعمال الدنا القالب template DNA المستخلص بواسطة عدة الأستخلاص بأستخدام (Mini DNA Bacteria kit) المجهر من قبل شركة Bioneer وتم الكشف عن نواتج أستخلاص الدنا البكتيري عن طريق تقنية التحليل الكهربائي على هلام الأكاروز لبعض العزلات وأستخدم جهاز مقياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer لتحديد نقاوة المستخلص من العزلات و كما موضح في الجدول (3-4).

جدول (3-4): نقاوة وتركيز الدنا البكتيري المستخلص

Sample Type	نقاوة	Abs280	Abs260	Sample ID
	260/280			
dsDNA	1.86	0.171	0.319	5
dsDNA	1.98	0.124	0.246	10
dsDNA	2.01	0.120	0.242	12
dsDNA	1.23	0.130	0.169	17
dsDNA	1.20	0.207	0.250	20
dsDNA	1.89	0.177	0.336	24
dsDNA	1.22	0.199	0.244	26
dsDNA	2.01	0.074	0.149	28

4-3-1 الكشف عن البكتيريا *B.thuringiensis* على مستوى النوع والجنس
 رحل ناتج تفاعل البلمرة التسلسل الخاص بالجين 16 srDNA على هلام الأكاروز بتركيز 1% إذ لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع الحفر بالمستوى نفسه و ذلك بعد تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية كما في صورة رقم 19، مما يدل على إرتباط البادى مع التسلسل المكمل له على شريط القالب عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المجهر من قبل شركة (Bioneer \ Korea) ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية. جاءت أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع وهو (380bp) بالنسبة 16S rRNA وان طريقة 16s rDNA ribotyping واحد من الطرق

الموثوقة للتعرف على البكتيريا *B.thuringiensis* على مستوى النوع، وذلك عند مقارنتها مع النتائج التي توصل اليها (Greisen وآخرون، 1993). أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن جميع العزلات البيئية قيد الدراسة هي *B.thuringiensis* وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Çetinkaya, 2002).



صورة 18: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة PCR للكشف عن الجين 16S rDNA على هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 100 فولت مدة قدرها 45 دقيقة.

المسار رقم (1) : Marker 100-2000bp

المسار رقم (2) : عزلة 5 تربة زراعية (مقدادية) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (3) : عزلة 10 تربة زراعية (بعقوبة) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (4) : عزلة 12 تربة زراعية (خالص) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (5) : عزلة 17 تربة زراعية (بلدروز) تحتوي على جين 16S rDNA.

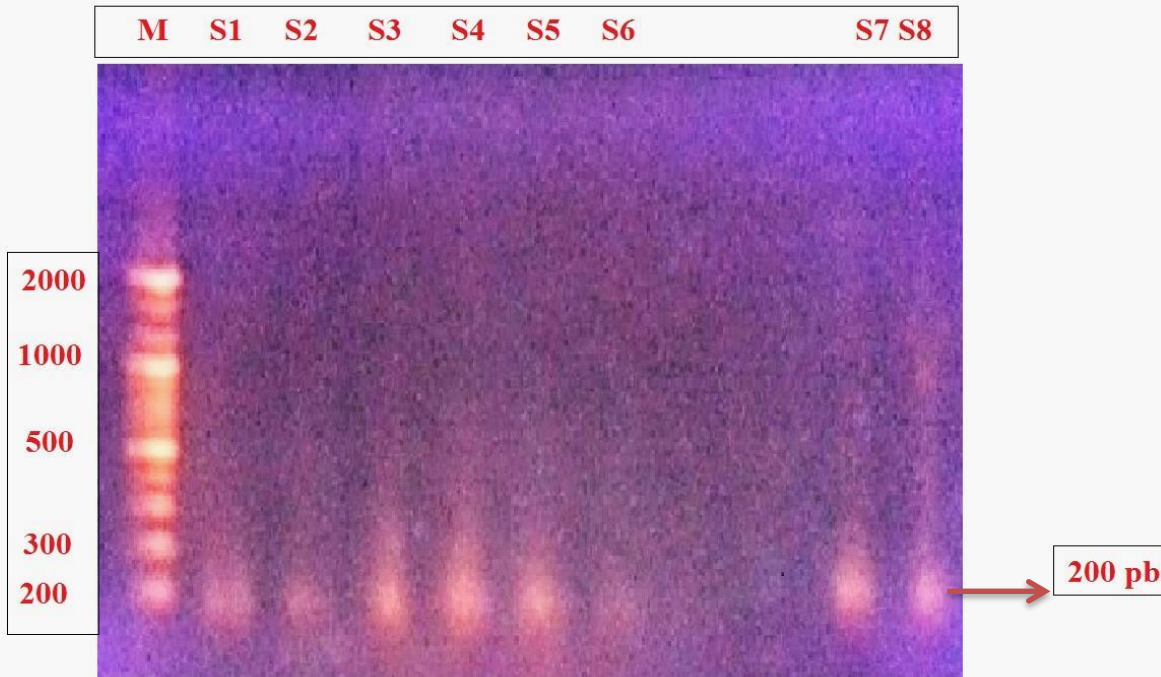
المسار رقم (6) : عزلة 20 تربة زراعية (خانقين) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (7) : عزلة 24 تربة غير زراعية (بعقوبة) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (8) : عزلة 26 ماء (المقدادية) تحتوي على جين 16S rDNA.

المسار رقم (9) : عزلة 28 ماء (بعقوبة) تحتوي على جين 16S rDNA.

رجل ناتج تفاعل البلمرة التسلسلي الخاص بالجين *cry* على هلام الأكاروز بتركيز 1% إذ لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع الحفر بالمستوى نفسه و ذلك بعد تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية كما في صورة رقم 20، مما يدل على إرتباط البادئ مع التسلسل المكمل له على شريط الدنا القالب عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المجهز من قبل شركة (Bioneer Korea \) ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية. وجاءت أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع وهو (200bp) بالنسبة للجين *cry* وذلك عند مقارنتها مع النتائج التي توصل اليها (Nazemi وآخرون، 2013). أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود نسبة عالية من العزلات تمتلك الجينات قيد الدراسة إذ أظهرت جميع العزلات من التربة والماء إمتلاكها للجين *cry* و بنسبة 100%.



صورة 10: الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة PCR للكشف عن الجين *cry*

على هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 100 فولت مدة قدرها 45 دقيقة .

المسار رقم (1) : Marker 100-2000bp

- المسار رقم (2) : عزلة 5 تربة زراعية (مقدادية) تحتوي على الجين *cry*
- المسار رقم (3) : عزلة 10 تربة زراعية (بعقوبة) تحتوي على الجين *cry*.
- المسار رقم (4) : عزلة 12 تربة زراعية (خالص) تحتوي على الجين *cry*.
- المسار رقم (5) : عزلة 17 تربة زراعية (بلدروز) تحتوي على الجين *cry*.
- المسار رقم (6) : عزلة 20 تربة زراعية (خانقين) تحتوي على الجين *cry* .
- المسار رقم (7) : عزلة 24 تربة غير زراعية (بعقوبة) تحتوي على الجين *cry* .
- المسار رقم (8) : عزلة 26 ماء (المقدادية) تحتوي على الجين *cry* .

المسار رقم (9): عزلة 28 ماء (بعقوبة) تحتوي على الجين *cry*.

4-4 إنتاج المستحضر الحيوي *B.thuringiensis*

أظهرت نتائج تقدير كثافة البكتيريا *B.thuringiensis* في الوسط التخمر المحضر من جريش الشعير إذ بلغت $10^6 \times 239$ وحدة تكوين المستعمرة /مل. وهذا يتفق مع ما توصل اليه الباحث (تويج، 2009) حيث بلغت كثافة البكتيريا *B.thuringiensis* في وسط منقوع الشعير $10^6 \times 232$ وحدة تكوين المستعمرة /مل، وان نمو البكتيريا في الوسط التخمر يرجع الى قدرة البكتيريا على استغلال محتويات البذور بكفاءة عالية تضمن للبكتيريا الحصول على متطلبات تغذيتها، ومتمثلة بالكربوهيدرات والدهون والبروتينات والمعادن فضلاً عن بعض الفيتامينات المهمة في نمو هذه البكتيريا (السدي، 1983). بينت نتائج اختبار المادة الحاملة المتمثلة بكاربونات الكالسيوم CaCO_3 ، انها ذات كفاءة عالية بكونها مادة حاملة للقاح البكتيري *B.thuringiensis* إذ بلغت كثافة البكتيريا في غرام واحد $10^6 \times 170$ وحدة تكوين المستعمرة /غم وهذا يتفق جزئياً مع ما توصل اليه الباحث (تويج، 2009). وقد تعود كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم الى كونها مادة طبيعية توفر وسطاً ملائماً لاستقرار الخلايا البكتيرية وابواغها على سطح جزيئات مادة كاربونات الكالسيوم إضافة إلى انها مادة تجعل من الوسط يميل الى القاعدية عند تحليلها المائي وهذا بدوره يشكل نقطة إيجابية لنمو البكتيريا *B.thuringiensis* (قاسم، 1998). في دراسة أجرتها حميد (2001) أكدت على نجاح هذه المادة في تحضير المنتج الحيوي من لقاح البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* حيث بلغت كثافة البكتيريا المحملة على هذه المادة $10^7 \times 2$ وحدة تكوين المستعمرة /غم.

5-4 اختبار فاعلية المستحضر الحيوي *B.thuringiensis* على أدوار ذبابة ثمار القرعيات

Dacus ciliatus

4-5-1 معاملة البيض بعمر (1-2) يوم:-

4-5-1-1 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة

من التربة في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* وبعمر (1-2) يوم .

توضح النتائج المبينة في جدول (4-4) وفي شكل (2-4) و (3-4) تأثير تراكيز المختلفة

من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في معدل فقس البيض لذبابة ثمار القرعيات

D. ciliates وبعمر (1-2) يوم كان معنوياً، إذ بلغ أعلى معدل فقس البيض (3) وبنسبة (89%) عند

تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل فقس البيض

(0.6) وبنسبة (19 %) عند تركيز 5,4غم/لتر من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* مقارنة

بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (95%) عند مستوى احتمال ($p=0.05$). لم يكن هناك فروقات معنوية

خلال المدة الزمنية (1-4) أيام. وهناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية (5-7) أيام فكانت أعلى

قيمة معدل فقس في الأيام هو اليوم السابع (3.4) وبنسبة (48.71%) من المعاملة وأقل قيمة معدل

فقس في اليوم الخامس من المعاملة (0.8) وبنسبة (11.4%). وهناك فروقات معنوية للتداخل بين

الأيام والتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* فكانت أعلى قيمة معدل فقس في

اليوم الخامس من المعاملة (1.3) وبنسبة (13%) عند تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي

لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (0.3) وبنسبة (3%) عند تركيز 4,5غم/لتر من

المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (1.6) وبنسبة (16%) ، وكانت أعلى قيمة معدل فقس

في اليوم السادس من المعاملة (2.3) وبنسبة (23%) عند تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي

لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (0.6) وبنسبة (6%) عند تركيز 4,5غم/لتر من

المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (2.0) وبنسبة (20%). وكانت أعلى قيمة معدل فقس

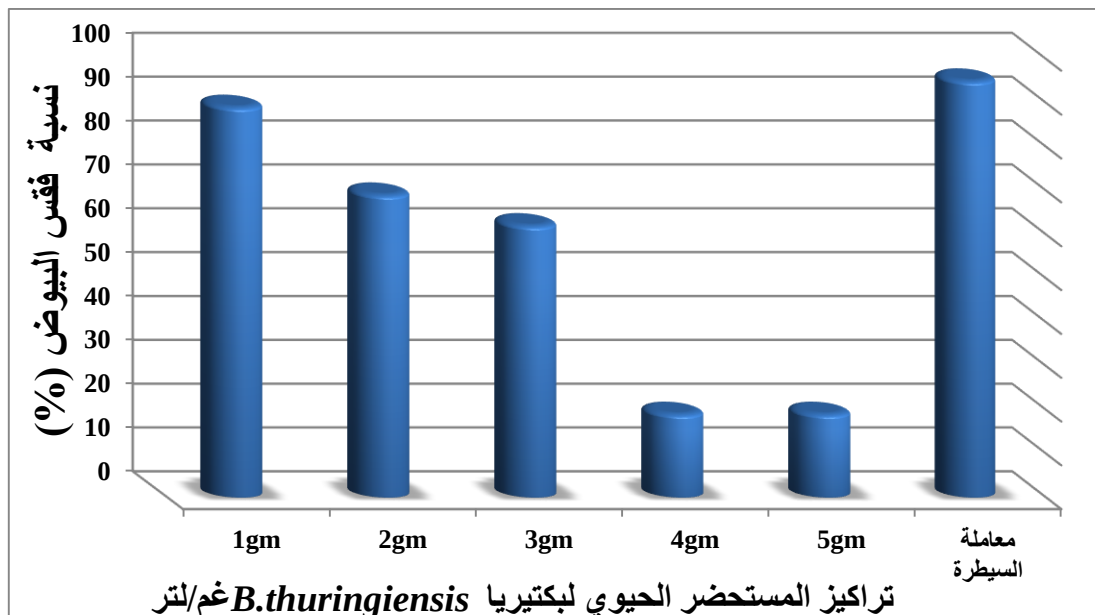
في اليوم السابع من المعاملة (5.3) وبنسبة (5.3%) عند تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي

لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (1.0) وبنسبة (10%) عند تركيز 4،5 غم/لتر من

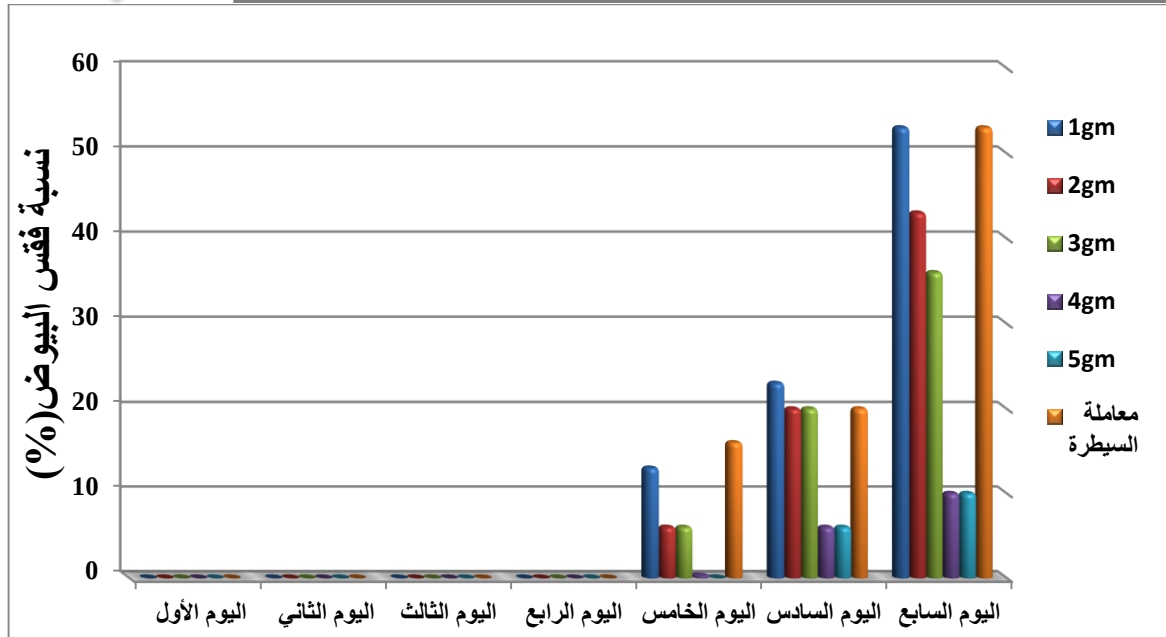
المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (5.3) وبنسبة (53%).

جدول (4-4): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* وبعمر (1-2) يوم

تأثير تركيز	معدلات فقس البيض بعمر(1-2)يوم			تركيز البكتيريا Bt غم /لتر
	الأيام			
	7	6	5	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
3±2.0	5.3±1.5	2.3±1.5	1.3±0.5	1
2.3±1.7	4.3±0.5	2±1.0	0.6±0.5	2
2.1±1.4	3.6±0.5	2±1.0	0.6±0.5	3
0.6±0.7	1±1	0.6±0.5	0.3±0.5	4
0.6±0.7	1±1	0.6±0.5	0.3±0.5	5
3.2±1.8	5.3±1.1	2.0±0.5	1.6±1.1	معاملة السيطرة
LSDالتركيز=2.301	1.022 (5%)			LSD = للتداخل بين التراكيز والأيام
	3.4±2.0	1.7±1.0	0.8±0.7	تأثير الأيام
	2.011 (5%)			LSDالأيام =



شكل (4-2): النسبة المئوية لمعدل فقس البيوض المعاملة بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (25 $\pm$ 2) °م و رطوبة نسبية.



شكل (3-4): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في النسبة المئوية لمعدل فقس البيض بعمر لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بعمر (1-2) يوم وبالأيام وبدرجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 5±65%

2-1-5-4 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* وبالعمر (1-2) يوم

توضح النتائج المبينة في جدول (4-5) وشكل (4-4) وشكل (4-5) تأثير تراكيز المختلفة من

المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في معدل فقس البيض لذبابة ثمار القرعيات

Dacus ciliates وبالعمر (1-2) لم يكن معنوياً، إذ بلغ أعلى معدل فقس البيض (3.1)

وبنسبة (92%) عند تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* وأقل معدل فقس

(2.1) وبنسبة 62% عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis*

مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%)، عند مستوى احتمال (p=0.05). لم يكن هناك

فروقات معنوية أيضاً خلال المدة الزمنية (1-4) أيام. وهناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية

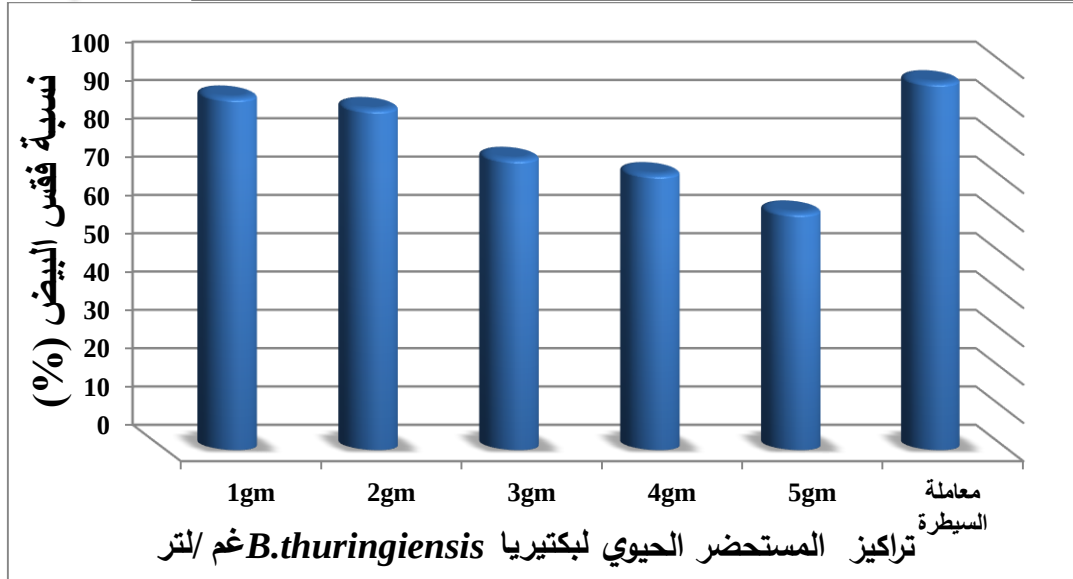
(5-7) أيام فكانت أعلى قيمة معدل فقس في الأيام هو اليوم السابع من المعاملة (4.8) وبنسبة

(68.57%) من المعاملة وأقل قيمة معدل فقس في اليوم الخامس من المعاملة (1.3) وبنسبة

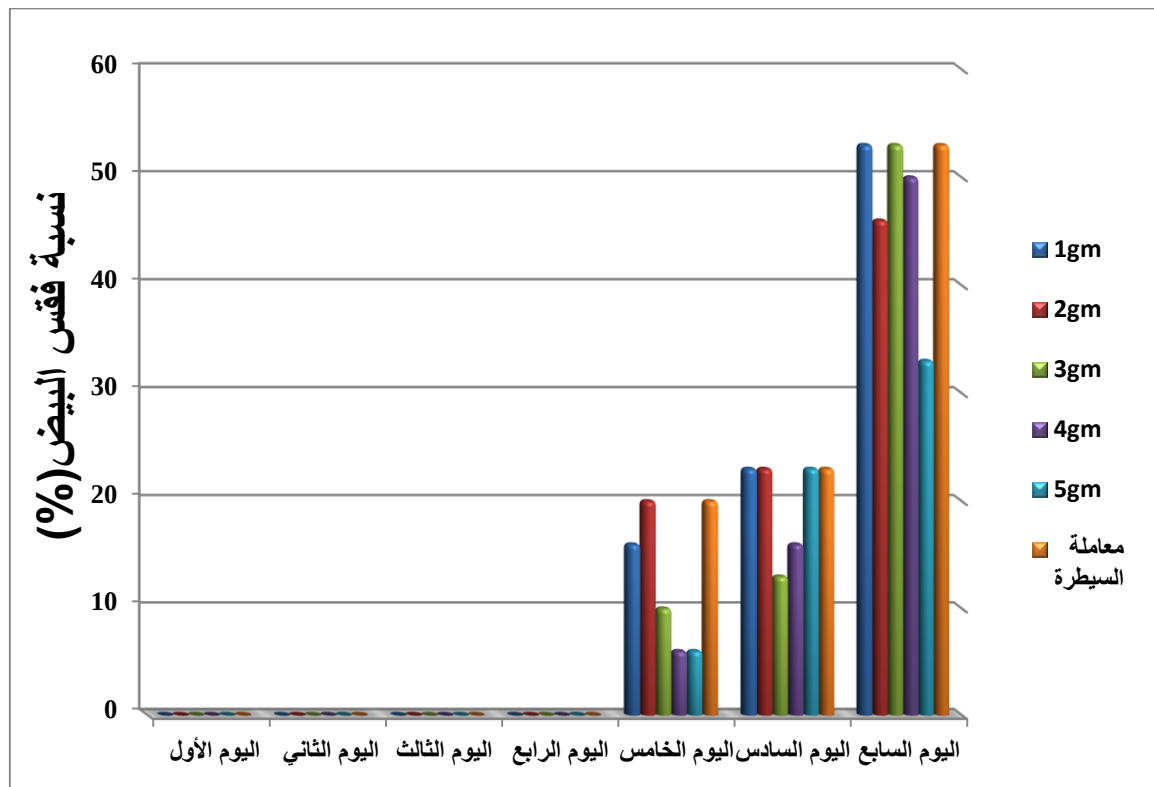
(18.5%) من المعاملة. وهناك فروقات معنوية للتداخل بين الأيام والتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* ايام فكانت أعلى قيمة معدل فقس في اليوم الخامس من المعاملة (1.6) وبنسبة (16%) عند تركيز 1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (0.6) وبنسبة (6%) عند تركيز 4،5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (2.0) وبنسبة (20%) . وكانت أعلى قيمة معدل فقس في اليوم السادس من المعاملة (2.3) وبنسبة (23%) عند تركيز 1،2غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (1.6) وبنسبة (16%) عند تركيز 4غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (2.3) وبنسبة (23%). وكانت أعلى قيمة معدل فقس في اليوم السابع من المعاملة (5.3) وبنسبة (53%) عند تركيز 3،1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة معدل فقس (3.3) وبنسبة (33%) عند تركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (5.3) وبنسبة (53%).

جدول (4-5): تأثير تراكيز مختلفة من البكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل فقس بيوض ذبابة ثمار *Dacus ciliatus* وبعمر (1-2) يوم.

تأثير تركيز	معدلات فقس البيض بعمر (1-2) يوم			تركيز البكتيريا غم /لتر
	7	6	5	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
3.1±1.8	5.3±0.5	2.3±0.5	1.6±1.1	1
3.0±1.5	4.6±0.5	2.3±0.5	2.0±1.7	2
2.5±2.1	5.3±0.5	1.3±0.5	1.0±1.0	3
2.4±2.0	5.0±1.0	1.6±0.5	0.6±0.5	4
2.1±1.4	3.3±1.1	2.3±1.1	0.6±0.5	5
3.2±2.2	5.3±1.1	2.3±2.5	2.0±1.7	معاملة السيطرة
3.704N.S=التركيز LSD	1.192 (5%)			LSD = للتداخل بين التراكيز والأيام
	4.8±1.0	2.0±1.1	1.3±1.1	تأثير الأيام
	1.244 (5%)			LSD = الأيام



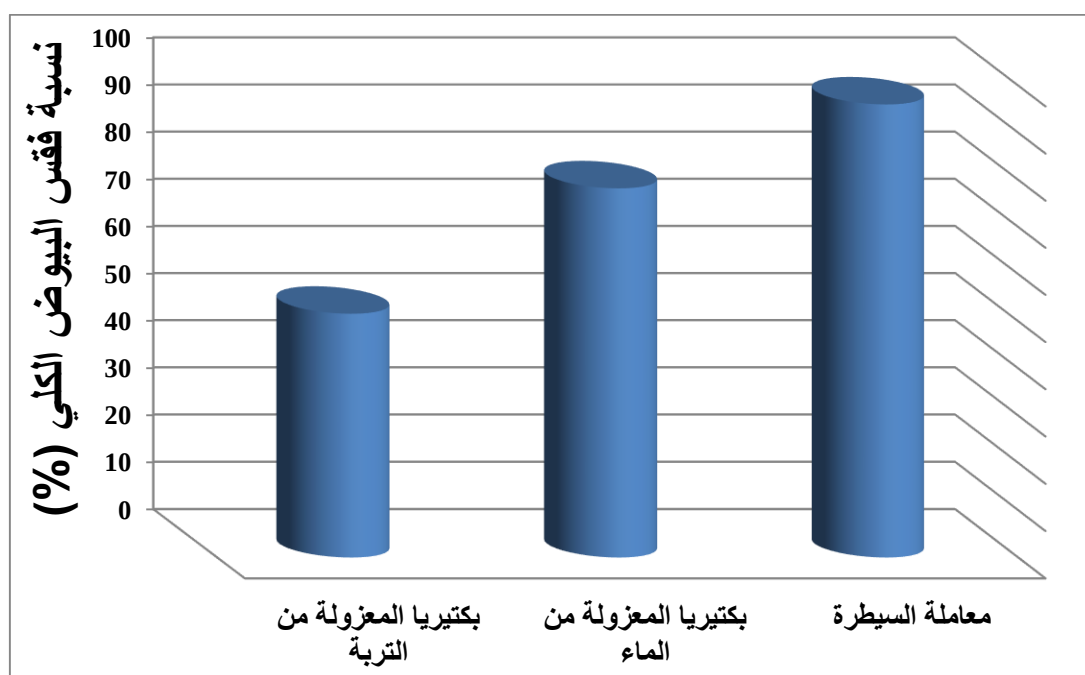
شكل (4-4): النسبة المئوية لمعدل فقس البيوض المعاملة بعمر (1-2) لذبابة القرعيات *Dacus ciliatus* يوم بالاستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء وبدرجة حرارة $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$ و رطوبة نسبية $65 \pm 5\%$



شكل (4-5): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء في النسبة المئوية لمعدل فقس البيض بعمر (1-2) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* وبالأيام وبدرجة حرارة $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$ و رطوبة نسبية $65 \pm 5\%$.

جدول (4-6): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* النسبة المئوية للمعدل الكلي لفقس البيض لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*

النسبة المئوية للمعدل الكلي لفقس البيض %	
51.6	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من التربة
78.2	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من الماء
96	معاملة السيطرة



شكل (4-6): النسبة المئوية للمعدل الكلي لفقس بيض لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* المعامل بعمر (1-2) يوم .

يلاحظ من جدول (4-6) وشكل (4-6) أن نسب فقس البيض باستخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من التربة (51.6 %) تزداد نسب فقس البيض في حالة استخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء (78.2%) وبفارق كبير نسبياً مقارنة مع معاملة السيطرة (96%) قد يعزى سبب ذلك الاختلاف في البروتينات البلورية (Cry) التي تنتجها البكتيريا *B.thuringiensis* خلال مرحلة الثبات Stationary phase، إذ أن كل بروتين بلوري له طيف قاتل للحشرات الخاصة به. وهذا يتفق مع أبو سعيد وآخرون (2009) إذ اشارت النتائج أن العزلة

البكتيرية *B. thuringiensis* التي تميزت بوجود الكريستال الكروي الشكل اثبتت فعالية ضد أدوار الحشرة ثنائية الأجنحة وبما فيها البيوض.

وقد يعزى سبب عدم فقس البيض عند استخدام البكتيريا *B. thuringiensis* إلى نفاذ السموم التي تنتجها البكتيريا إلى داخل البيوض، وبذلك تؤدي إلى إحداث خلل معين في الجنين يسبب الهلاك، وإن وجود البكتيريا قد أدى إلى منع حدوث فقس البيوض وخروج اليرقات منها، وذلك بفعل إحاطة تجمعات البكتيريا بالبيضة مؤدية إلى التأثير في نفاذية البيوض ومن ثم هلاكها. كما أشار Bone وآخرون (1987) إلى إن بكتيريا *B. thuringiensis israelensis* تؤثر في نفاذية بيوض الليماتودا بفعل سمومها.

تتفق هذه النتائج مع Mohamed وآخرون (2000) إذ أوضح أن البكتيريا *B. thuringiensis* خفضت من عدد البيوض الفاقسة لفراشة القطن، وفي بحث أجراه ألسلي وآخرون (2008) لمعرفة تأثير بعض المبيدات الحيوية في مكافحة دودة جوز القطن *Jreus insulana* ومنها بكتيريا *B. thuringiensis* التي أدت إلى انخفاض نسبة فقس البيض على موسمين هما 2005 و 2007 وكانت نسبة الفقس 11.7% و 13.40% على التوالي. وتتفق هذه النتائج مع أحمد (2007) الذي ذكر أن للبكتيريا *Bacillus cereus* تأثيراً واضحاً في بيوض فراشة اللهانة إذ تراوحت نسب الهلاك بين 5,13% إلى 30.6% عند التراكيز من 1×10^5 إلى 2×10^7 خلية/مل على التوالي. ولم تتفق هذه النتائج مع العزاوي (2006) إذ ذكرت أنه لم يكن للبكتيريا *Bacillus thuringiensis* أي تأثير على الجنين داخل البيضة.

4-5-2-1 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من

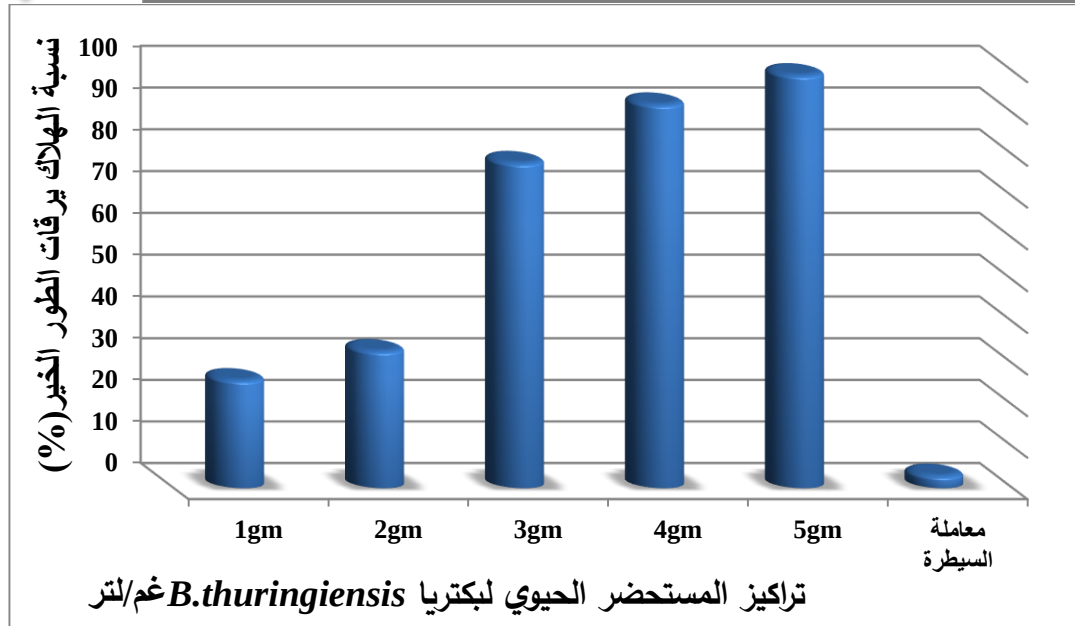
التربة في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

توضح النتائج المبينة في جدول (4-7) وشكل (4-7) و (4-8) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *D. ciliates* ، كان معنوياً ، إذ بلغت أعلى قيمة هلاك (2.0) وبنسبة (99%) عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (0.5) وبنسبة (26%) عند التركيز 1غم/لتر من مستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة (0.07) وبنسبة (3%) ، عند مستوى احتمال ($p=0.05$). لوحظ وجود فروقات معنوية بين الايام فكانت أعلى قيمة هلاك يرقات الطور الأخير في الأيام هو اليوم الخامس من المعاملة (2.8) وبنسبة (56%) وأقل قيمة هلاك يرقات الطور الأخير في اليوم الأول من المعاملة (0.3) وبنسبة (6%). ولوحظ وجود فروقات معنوية في التداخل بين الأيام والتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* ، أذ بلغ أعلى هلاك في اليوم الأول من المعاملة (1.0) وبنسبة (10%) عند التركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* و (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 4غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند تركيز 1،2غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%) . و أعلى قيمة هلاك في اليوم الثاني من المعاملة (1.3) وبنسبة (13%) عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1،2غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%) . و أعلى قيمة هلاك في اليوم الثالث من المعاملة (1.6) وبنسبة (16%) عند تركيز 4،5غم/لتر من المستحضر الحيوي وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1،2غم/لتر

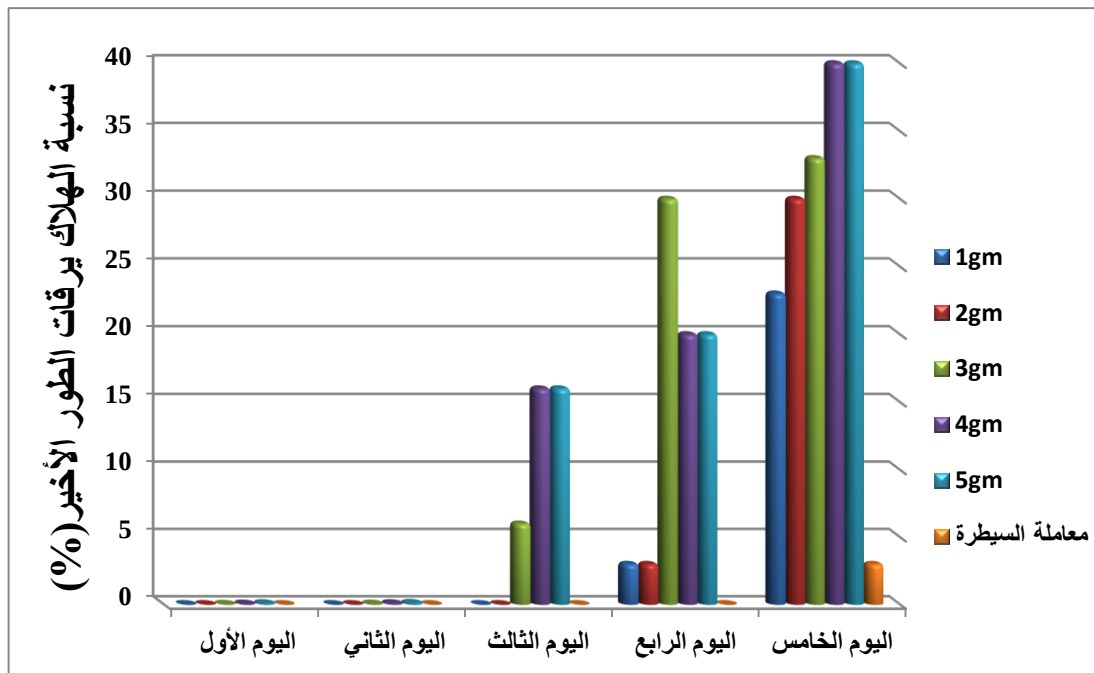
من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%). و أعلى قيمة هلاك في اليوم الرابع من المعاملة (3.0) وبنسبة (30%) عند تركيز 3 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 2،1 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%). و أعلى قيمة هلاك في اليوم الخامس من المعاملة (4.0) وبنسبة (40%) عند تركيز 4،5 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (2.3) وبنسبة (23%) عند التركيز 1 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.3) وبنسبة (3%).

جدول (4-7): تأثير تراكيز مختلفة من البكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

تأثير تركيز	معدلات هلاك الادور اليرقي الأخير					تركيز البكتيريا غم/لتر Bt
	الأيام					
	5	4	3	2	1	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
0.5±1.1	2.3±1.5	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1
0.6±1.5	.30±2.6	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2
1.6±1.8	3.3±2.8	3.0±1.0	0.6±0.5	0.6±0.5	0.3±0.5	3
2.0±1.4	4.0±1.0	2.0±2.0	1.6±0.5	1.0±1.0	0.6±0.5	4
2.0±1.4	4.0±1.7	2.0±1.0	1.6±1.1	1.3±0.5	1.0±1.0	5
0.07±0.2	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	معاملة السيطرة
1.944=لتركيزLSD	1.104					LSD للتداخل بين تركيز والأيام
	2.8±2.0	1.2±1.4	0.6±0.9	0.5±0.7	0.3±0.5	تأثير الأيام
	1.607					LSD الأيام=



شكل (4-7): النسبة المئوية لمعدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* والمعرضة الى تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* غم/لتر المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 5±65%



شكل (4-8): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* غم/لتر المعزولة من التربة في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالأيام و بدرجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 5±65% .

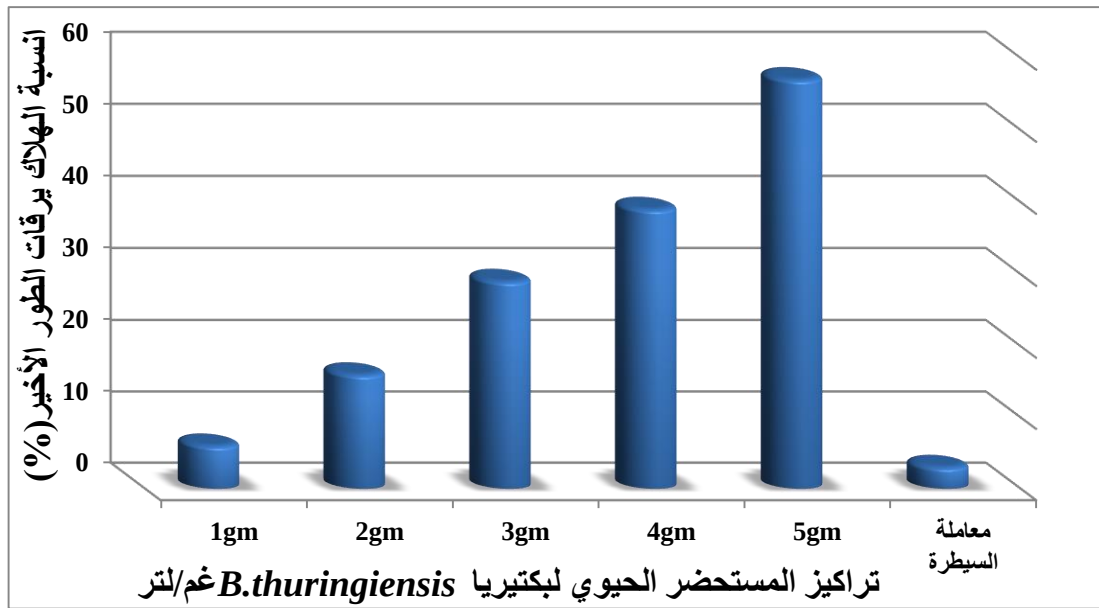
4-5-2 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

توضح النتائج المبينة في جدول (4-8) وشكل (4-9) و (4-10) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliates* ، كان معنوياً ، إذ بلغت أعلى قيمة هلاك (1.2) وبنسبة (57%) عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (1.0) وبنسبة (6%) عند التركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة (0.07) وبنسبة (3%) ، عند مستوى احتمال ($p=0.05$). لوحظ وجود فروقات معنوية بين الايام فكانت أعلى قيمة هلاك الطور اليرقي الأخير في الأيام هو اليوم الخامس (1.0) وبنسبة (20%) من المعاملة وأقل قيمة هلاك الطور اليرقي الأخير في اليوم الأول من المعاملة (0.06) وبنسبة (1.2%). ولوحظ وجود فروقات معنوية في التداخل بين الأيام وتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* ، إذ بلغ أعلى معدل في اليوم الأول من المعاملة (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1،2،3،4غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%) . و أعلى قيمة معدل في اليوم الثاني من المعاملة (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 4،5غم /لتر من المستحضر الحيوي وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1،2غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%). و أعلى قيمة معدل في اليوم الثالث من المعاملة (1.6) وبنسبة (16%) عند التركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي وأقل قيمة هلاك (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1،2غم /لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة

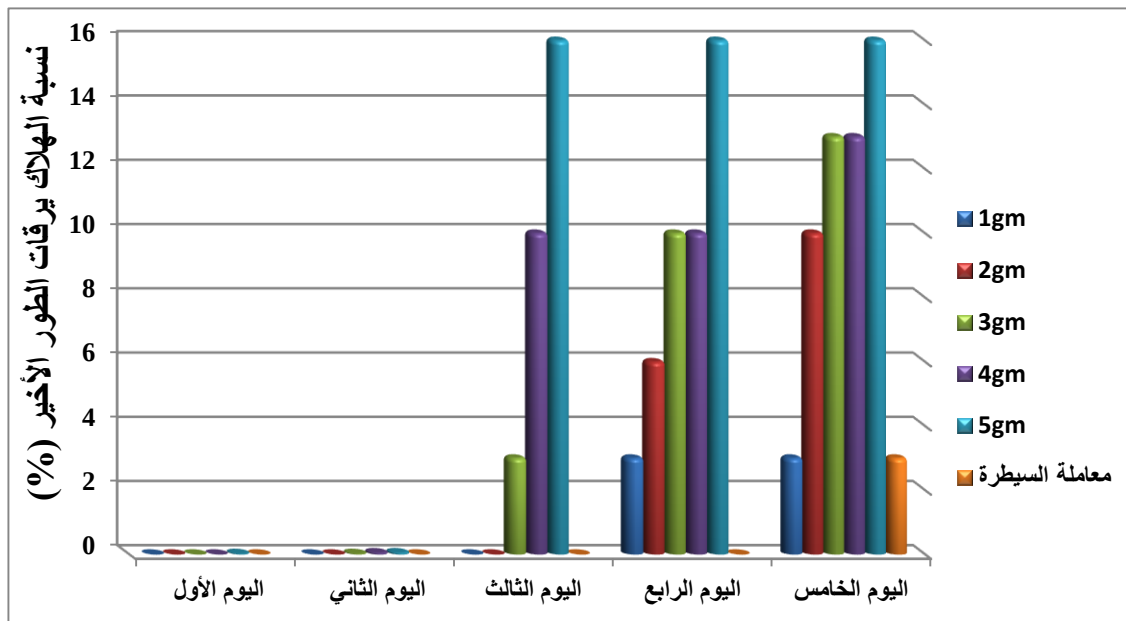
(0.0) وبنسبة (0%). و أعلى قيمة هلاك في اليوم الرابع من المعاملة (1.6) وبنسبة (16%) عند التركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة هلاك (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.0) وبنسبة (0%). و أعلى معدل هلاك في اليوم الخامس من المعاملة (1.6) وبنسبة (16%) عند التركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل هلاك (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.3) وبنسبة (3%).

جدول (4-8): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

تأثير تركيز	معدلات هلاك دور اليرقي الأخير					تركيز البكتيريا غم/لتر Bt
	الأيام					
	5	4	3	2	1	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
0.1±0.3	0.3±1.1	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1
0.3±0.9	1.0±1.7	0.6±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2
0.6±0.9	1.3±1.5	1.0±1.0	0.3±0.5	0.3±0.5	0.0±0.0	3
0.8±0.9	1.3±1.1	1.0±1.0	1.0±1.0	0.6±1.1	0.0±0.0	4
1.2±0.7	1.6±0.5	1.6±0.5	1.6±0.5	0.6±0.5	0.3±0.5	5
0.07±0.2	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	معاملة السيطرة
0.552=لتركيزLSD	0.451					LSD للتداخل بين تركيز والأيام
	1.0±1.0	0.7±0.8	0.5±0.7	0.2±0.5	0.06±0.2	تأثير الأيام
	0.590					LSD الأيام=



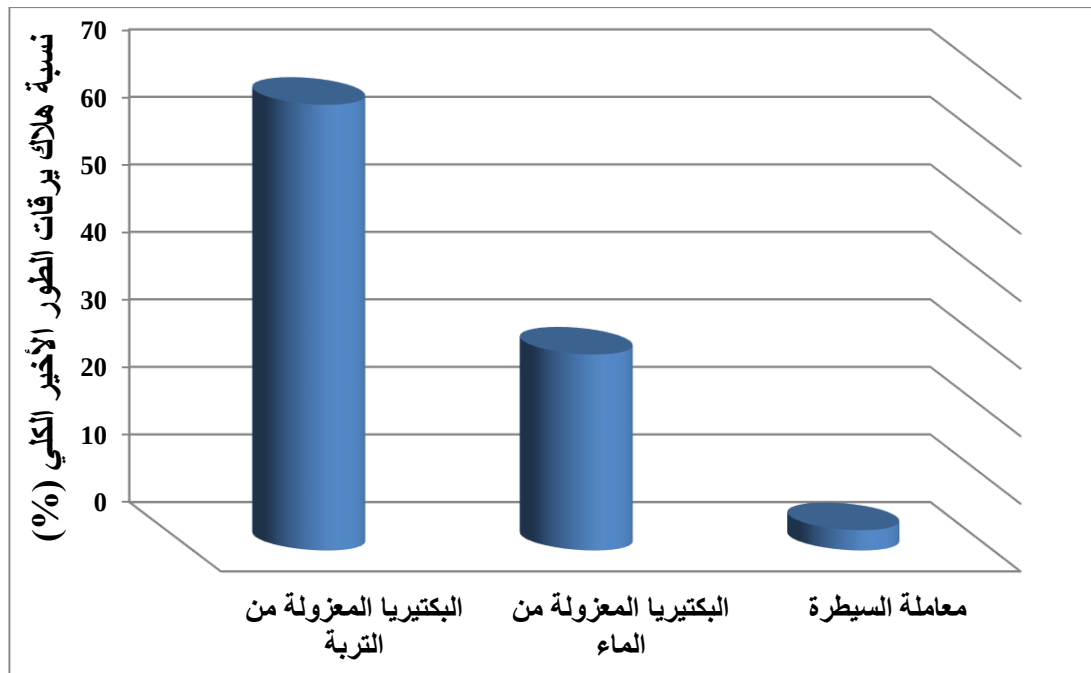
شكل (4-9): النسبة المئوية لمعدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* والمعرضة الى تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* غم/لتر المعزولة من التربة وبدرجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 65±5%



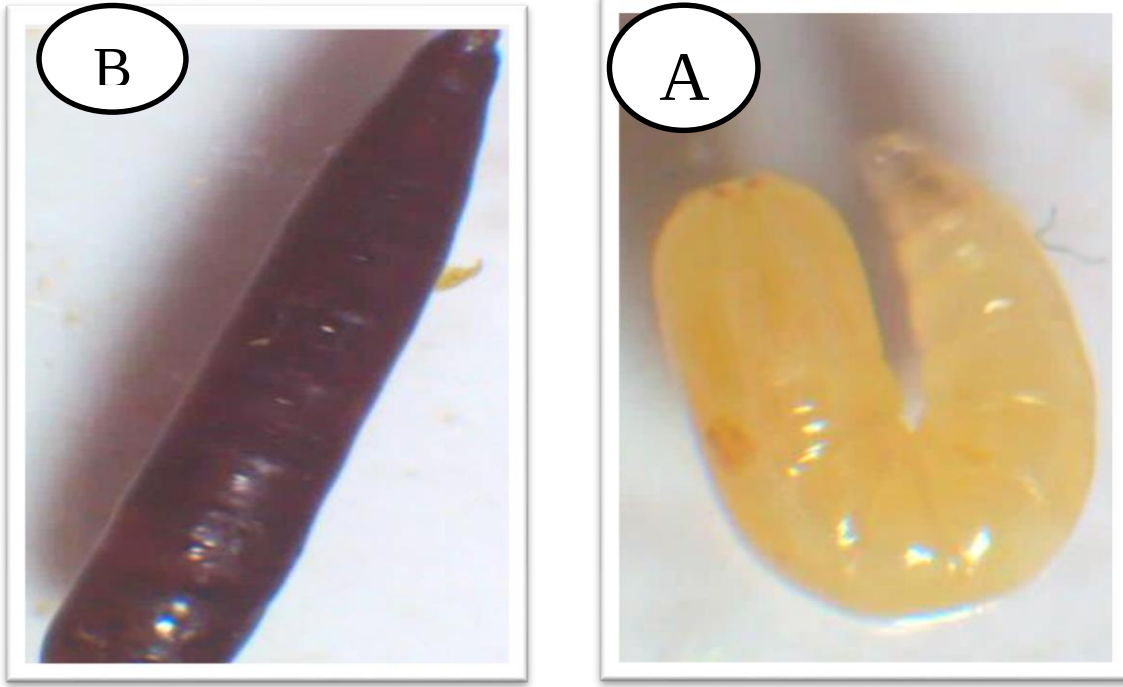
شكل (4-10): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* غم/لتر المعزولة من الماء في معدل هلاك يرقات الطور الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* وبالأيام وبدرجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 65±5% .

جدول (4-9): تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في النسبة المئوية لمعدل الهلاك الكلي لطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

النسبة المئوية لمعدل الهلاك الكلي ليرقات الطور الأخير %	
66	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من التربة
29	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من الماء
3	معاملة السيطرة



شكل (4-11): النسبة المئوية لمعدل الهلاك الكلي ليرقات الطور الأخير لذبابة القرعيات *Dacus ciliatus* المعرضة بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء والتربة.



الصورة 20 :تأثير المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* على يرقات الطور الأخير لذبابة القرعيات مصورة بوساطة مجهر ضوئي وبقوة تكبير 45X.

A:(قبل المعاملة) B : (بعد المعاملة)

يلاحظ من جدول (4-9) وشكل (4-11) أن نسب معدل هلاك الطور اليرقي الأخير باستخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من التربة تزداد عن نسب هلاك الطور اليرقي الأخير في حالة استخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء وبفارق كبير نسبياً أن المعدل الكلي لهلاك يرقات الطور الأخير المعامل بالبكتيريا المعزولة ومن التربة 66% ومن الماء 29% مقارنة مع معاملة السيطرة 6%، حيث أن عملية القتل لم تتم بالكفاءة نفسها للعزلتين، إضافة إلى أن عزلة الماء لم تستطع أحداث قتل عالي لليرقات. هناك العديد من الأسباب التي تفسر هذه الظاهرة، منها أن هذه العزلة قد تفقد سميتها نتيجة الزرع المتكرر لها في المختبر وهذا يتفق مع (السماك وعبدالله، 2010)، أو أن إنتاج السم القاتل لليرقات ليس ضرورياً لنموها وانتشارها في البيئة، أو قد تفقد البلورات المنتجة من قبل الجراثيم السمية عند إنتاجها مختبرياً وقد يعود إلى اختلاف ظروف التهوية والدالة الحامضية ودرجة الحرارة وغيرها (Bhattacharya وآخرون، 1993) .

بعد تغذي اليرقات على قطع من نبات القرع المعامل بالبكتريا تظهر عليها أعراض تغير في السلوك بعد مدة 24 ساعة من بدء التغذية, حيث يلاحظ أن اليرقات تتباطأ حركتها تدريجيا حتى تتوقف عن الحركة وتبدو منكشمة, ويمكن التأكد من حيويتها وذلك بمحاولة وخزها وحثها على الحركة. يبدأ لون اليرقة بالتغير نحو الاسوداد شيئا فشيئا وتتقطع عن الطعام وتموت كمافي صورة رقم 21. وهذا يتفق مع (Lacey وآخرون، 2004) الذين بينوا أن امتناع اليرقات المصابة عن الغذاء يعود الى تأثير البروتين البلوري السام Crystal protein الذي يتحلل في القناة الهضمية الوسطى لليرقات ويرتبط بالمستقبلات Receptors على الحافة الفرشائية Brush border لغشاء القناة الهضمية الوسطى فيدخل السم بداخل الغشاء مسبباً ضعف الخلايا الطلائية وانتفاخها ثم انحلالها محدثاً ثقباً في الغشاء مما يسهل انتقال السبورات الى السائل الدموي لليرقة ويتسبب عنه تسمم الدم Septicemia ثم تغير اللون الى البني ثم الاسود بعد الموت، أن هلاك اليرقات بفعل بكتريا *B.thuringiensis* قد يعود إلى أن البكتريا وجدت طريقها إلى داخل التجويف الدموي hemocoel لليرقات مسببة تسمم الدم septicemia, و مؤدية إلى اسوداد اليرقات وموتها بفعل السموم التي تفرزها هذه البكتريا, و مؤثرة في الجهاز العصبي لليرقات المصابة، أو أن سموم البكتريا قد أدت إلى حدوث خلل في الجهاز العصبي مؤدية إلى شلل في الأعضاء المسؤولة عن التغذية ومن ثم موت اليرقات من الجوع وهذا ويتفق مع ما أورده (العميدي, 1990) في أن معاملة يرقات فراشة اللهانة بالطورها الثالث ببكتريا *B.thuringiensis kurstaki* أدى إلى ظهور أعراض إصابة وهي بطؤ في الحركة, التوقف عن التغذية, الشلل العام, وتغير اللون إلى البني الغامق ثم الأسود.

نستنتج من نتائج هذه الدراسة أن نسبة هلاك الطور اليرقي الأخير لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* المعامل بسموم *Bt* المعزولة من التربة كانت 66% اما الطور اليرقي المعامل

بسموم *Bt* المعزولة من الماء كانت 29%. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج **Aboussaid وآخرون (2010)** من خلال دراستهم للسيطرة الحيوية الفعالة للسلاطات بكتيريا *Bacillus thuringiensis* على يرقات وبالغات ذبابة البحر المتوسط *Ceratitis capitata*، اذ بلغت نسبة هلاك يرقات الطور الثالث المعاملة بسموم سلالات *Bt* M- Ag21.6 و *Bt* A7 و 68% اما سلالة *Bt* A10 كانت 20%، وتتفق أيضا مع **تويج (2004)** الذي ذكر أن للمستحضر الحيوي *B.thuringiensis* اثر في جميع أطوار حشرة من الخوخ الأخضر (*Myzus persicae*(Sulzer)، إذ سبب نسبة هلاك كانت تتراوح بين (41,2-66%). في دراسة أجراها **جميل وحمد (2014)** تقييم كفاءة عزلات *Bacillus thuringiensis* المعزولة من ترب محلية في العراق على يرقات بعوضة *Cluex pipiens* حيث تفوقت عزلات محافظتي الانبار والسليمانية في نسبة القتل اذ بلغت نسبة القتل 96.6% عند تركيز 10×5^{-5} مل/بوغ عزلة محافظة ديالى بلغت نسبة القتل 91%.

وكما تبين أن النتائج أن نسبة هلاك اليرقات تزداد بزيادة تركيز المستحضر البكتيري *B. thuringiensis*، اذ وجد نسبة الهلاك لليرقات المعاملة بالعزلة البكتيرية المعزولة من التربة كانت تتراوح بين 26%-99%.

أما هلاك اليرقات المعاملة بالعزلة البكتيرية التي يكون مصدرها الماء تتراوح بين 6%-57% وهذا يتفق مع نتيجة الباحث **Huang وآخرون (2005)** الذي ذكر ان حساسية اليرقات تزداد بزيادة تركيز المبيد البكتيري الذي تعرضت له ، وتتفق النتائج أيضا مع **بلاسم وآخرون (2014)** اذ بين ان نسبة هلاك الأطوار اليرقية لحشرة عثة التين *Ephestia cautelal* تزداد بزيادة تركيز المبيد البكتيري *Bt* فكان أعلى معدل هلاك يرقات الطور الأول للعزلة المحلية عند التركيز $10^{-1} \times 5$ هو 72.8% في حين اقل معدل هلاك عند تركيز 10^{-3} هو 22.7%.

لوحظ من النتائج أيضاً أن لمدة المعاملة دور مهم في نسبة هلاك اليرقات إذ لوحظ أن نسبة هلاك يرقات الطور الأخير في اليوم الخامس والرابع أكثر من الأيام الأخرى، وهذا يتفق مع ما توصل إليه بلاسم (2014) الذي ذكر أن نسبة هلاك يرقات عثة التين في اليوم الثالث أكثر من اليومين الأول والثاني، وكما تتفق النتائج التي حصلنا عليها مع العزاوي (2006) من خلاك دراسته حول تأثير العزلة المحلية للبكتيرية *Bt* على الاطوار اليرقية الأولى لعثة درنات البطاطا أن أعلى نسبة قتل ليرقات الطور الأول بلغت 70% في اليوم الأول عند المعاملة بالتركيزين 10×46^{-5} , 10×46^{-6} في حين انخفضت إلى 60% للتركيز 10×46^{-7} . وفي اليوم الثاني تم الحصول على نسبة قتل 100% للتركيز 10×46^{-7} مما يوضح حساسية الطور اليرقي الأول لبكتريا *B.t* المعزلة محلياً، وتتفق النتائج أيضاً مع الجبوري (2003) إذا ذكر أن الاختلاف في سرعة موت اليرقات المعاملة قد يعود إلى جاهزية البكتريا وتكوين بعضها للبلورة البروتينية إذا يؤدي تحليلها إلى شلل القناة الهضمية وتحلل جدارها، ومن ثم سهولة غزو البكتريا لتجويف الدم وفساده بينما تحتاج السبورات البكتيرية وقتاً إضافياً لإنباتها داخل القناة الهضمية ليرقات الحشرة ثم تكوين السبورات و البلورة البروتينية لتؤدي دورها في القتل .

3-5-4 معاملة العذارى بعمر (6-7) يوم:-

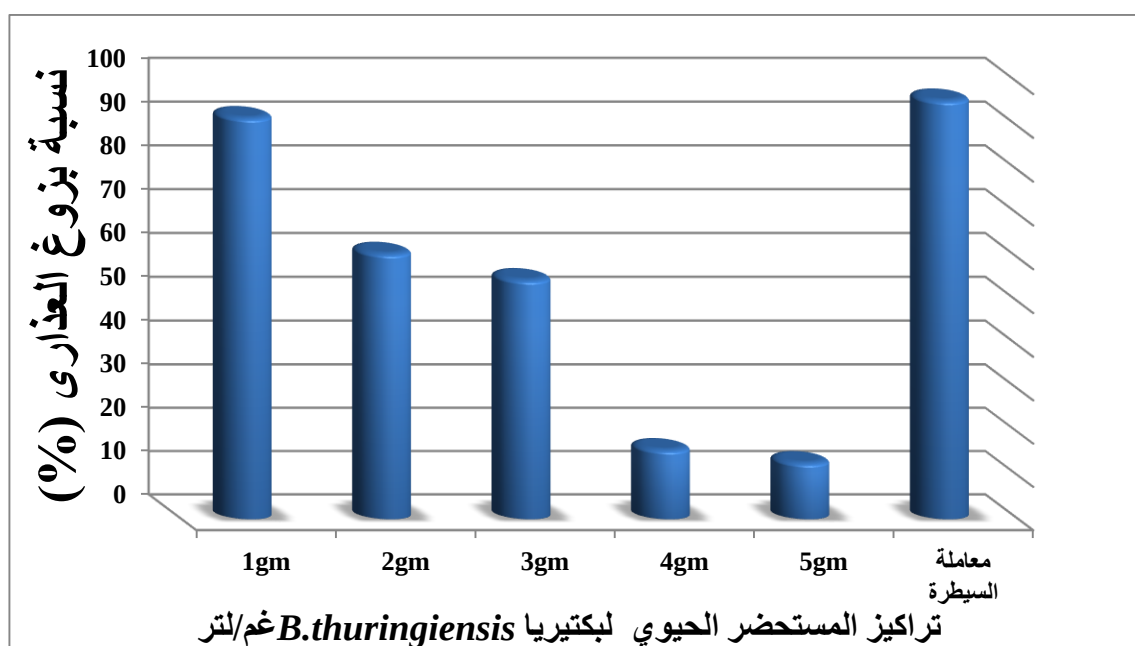
1-3-5-4 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

يوضح الجدول (4-10) وشكل (4-12) و (4-13) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) أيام لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* كان معنوياً، وذلك اعتماداً على معدل نسبة العذارى التي تنجح في التحول إلى حشرة بالغة، إذ بلغ أعلى معدل بزوغ العذارى (3.1) وبنسبة (92%) عند تركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل بزوغ العذارى (0.4) وبنسبة (13 %) عند التركيز 5غم/لتر

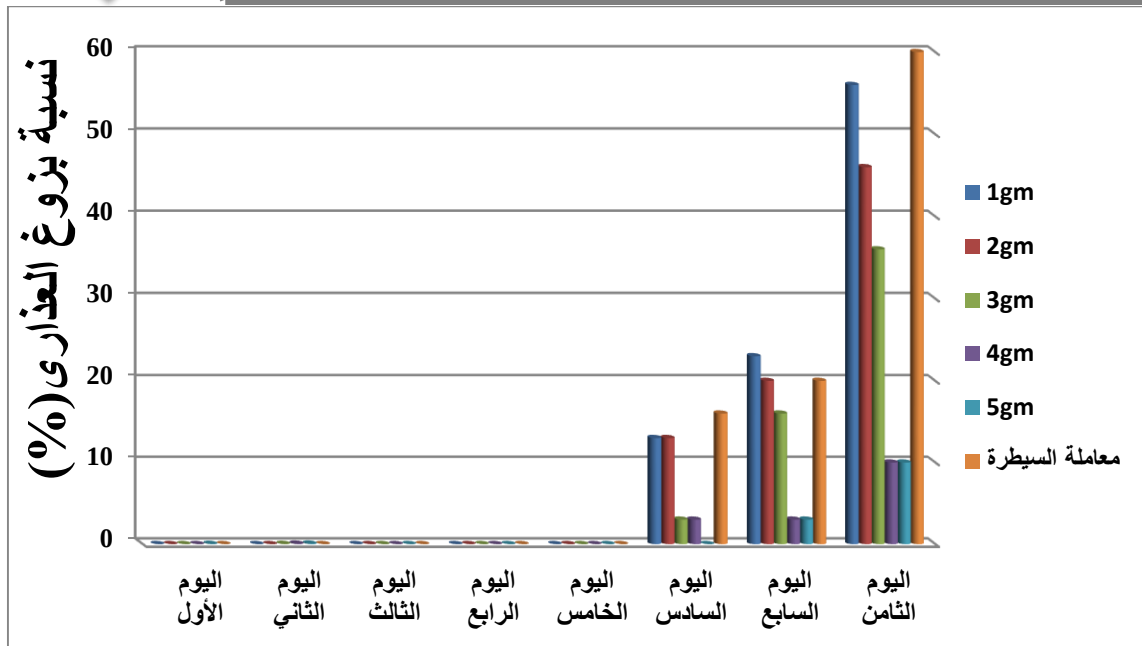
من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) وبنسبة (96%) عند مستوى احتمال ($p=0.05$). لم يكن هناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية (1-6) أيام. وهناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية (7-9) أيام فكانت أعلى قيمة معدل بزوغ العذارى في الأيام هو اليوم التاسع من المعاملة (3.2) وبنسبة (35.5%) وأقل قيمة بزوغ العذارى في اليوم السابع من المعاملة (1.0) وبنسبة (11.1%) ، وهناك فروقات معنوية في التداخل بين الأيام والتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* فكانت أعلى قيمة بزوغ العذارى في اليوم السابع من المعاملة (1.3) وبنسبة (13%) عند التركيز 1، 2 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة بزوغ العذارى (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 5 غم /لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (1.6) وبنسبة (16%) . وكانت أعلى قيمة بزوغ العذارى في اليوم الثامن من المعاملة (2.3) وبنسبة (23%) عند التركيز 5 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة بزوغ العذارى (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 5، 4 غم /لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (2.0) وبنسبة (20%). وكانت أعلى قيمة بزوغ العذارى في اليوم التاسع من المعاملة (5.6) وبنسبة (56%) عند التركيز 1 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* و (4.6) وبنسبة (46%) عند التركيز 2 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل قيمة بزوغ العذارى (1.0) وبنسبة (10%) عند التركيز 5، 4 غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (6.0) وبنسبة (60%)

جدول (10-4): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل بزوغ العذارى بعمر (7-6) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

تأثير التركيز	معدلات بزوغ عذارى بعمر(6-7) يوم			تركيز البكتيريا Bt غم /لتر
	الأيام			
	9	8	7	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
3.1±2.1	5.6±1.1	2.3±1.1	1.3±0.5	1
2.0±1.6	4.6±0.5	2.0±1.0	1.3±0.5	2
1.8±1.6	3.6±0.5	1.6±1.1	0.3±0.5	3
0.5±0.7	1.0±1.0	0.3±0.5	0.3±0.5	4
0.4±0.7	1.0±1.0	0.3±0.5	0.0±0.0	5
3.2±2.2	6.0±1.1	2.0±1.0	1.6±1.1	معاملة السيطرة
LSDالتركيز=2.704	1.081 (5%)			LSD =للتداخل بين التراكيز والأيام
	3.2±2.1	1.7±1.5	1.0±0.8	تأثير الأيام
	2.332 (5%)			LSD الأيام=



شكل (4-12): النسبة المئوية لمعدل بزوغ العذارى المعاملة بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة بدرجة حرارة (25 $\pm$ 2) °م و رطوبة نسبية 65 $\pm$ 5%



شكل (4-13): تأثير تركيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في النسبة المئوية لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذباب القرعيات *Dacus ciliatus* وبالأيام في درجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 5±65% .

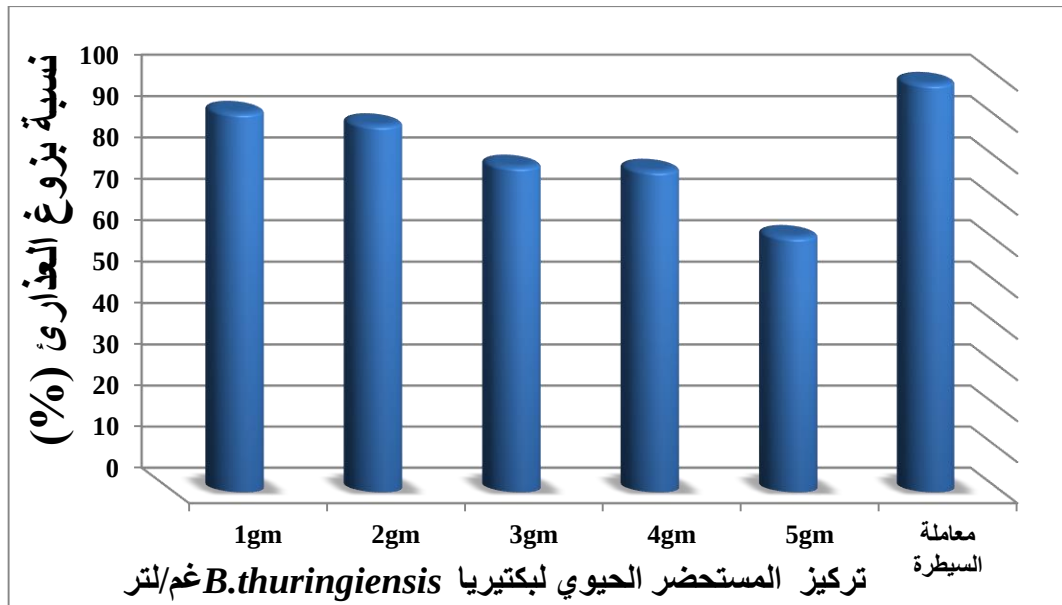
2-3-5-4 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذباب ثمار القرعيات *Dacus ciliates*.

يبين الجدول رقم (4-11) وشكل (4-12) و(4-13) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل بزوغ العذارى لذباب ثمار القرعيات *Dacus ciliates*. لم يكن معنوياً، وذلك اعتماداً على معدل نسبة العذارى التي تنجح في التحول إلى حشرة بالغة، إذ بلغ أعلى معدل بزوغ العذارى (3.1) ونسبة (92%) عند التركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل بزوغ العذارى (2.1) ونسبة (62%) عند التركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة (3.2) ونسبة (96%) عند مستوى احتمال (p=0.05). لم يكن هناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية (6-1) أيام. وهناك فروقات معنوية خلال المدة الزمنية (7-9) أيام إذ بلغ أعلى معدل بزوغ العذارى في الأيام هو يوم التاسع (4.9) ونسبة (54.4%) وأقل معدل بزوغ العذارى في اليوم السابع

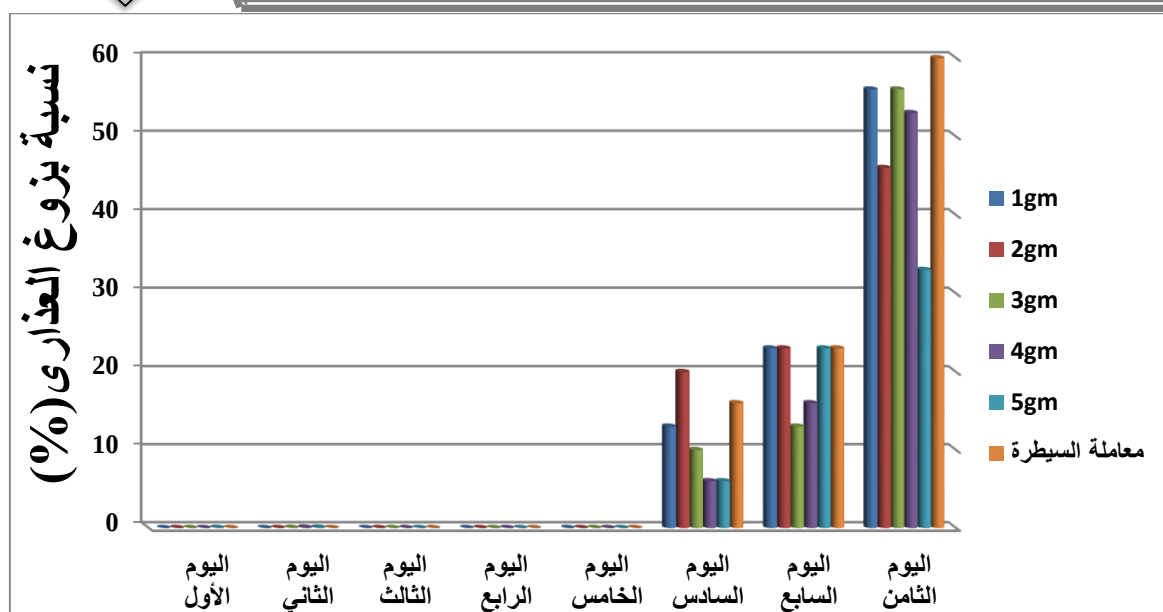
(0.8) وبنسبة (8.8 %) عند مستوى احتمال ($p=0.05$). ولوحظ فروقات معنوية في التداخل بين الأيام والتركيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* فكانت أعلى معدل بزوغ عذارى في اليوم السابع من المعاملة (2.0) وبنسبة (20%) عند التركيز 2غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل بزوغ عذارى (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 5،4غم /لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (1.6) وبنسبة (16%). وكانت أعلى معدل بزوغ عذارى في اليوم الثامن من المعاملة (2.3) وبنسبة (23%) عند التركيز 5،2،1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل بزوغ عذارى (1.3) وبنسبة (13%) عند التركيز 3غم /لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة (2.3) وبنسبة (23%). وكانت أعلى معدل بزوغ عذارى في اليوم التاسع من المعاملة (5.6) وبنسبة (56%) عند التركيز 3،1غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* و (5.3) وبنسبة (53%) عند التركيز 4غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل بزوغ عذارى (3.3) وبنسبة (33%) عند التركيز 5غم /لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (6.0) وبنسبة (60%).

جدول (4-11): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل بزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

تأثير تركيز	معدلات بزوغ العذارى بعمر (6-7) أيام			تركيز البكتيريا <i>Bt</i> غم /لتر
	الأيام			
	9	8	7	
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	
3.1±2.1	5.6±1.1	2.3±1.1	1.3±0.5	1
3.0±1.5	4.6±0.5	2.3±0.5	2.0±1.7	2
2.6±2.3	5.6±2.3	1.3±0.5	1.0±1.0	3
2.5±2.1	5.3±0.5	1.6±0.5	0.6±0.5	4
2.1±1.4	3.3±1.1	2.3±1.1	0.6±0.5	5
3.2±2.1	6.0±1.1	2.3±1.1	1.6±1.1	معاملة السيطرة
4.014 N.S =التركيزLSD	0.806 (5%)			LSD =للتداخل بين التراكيز والأيام
	4.9±1.1	2.3±1.1	0.8±0.3	تأثير الأيام
	2.223 (5%)			



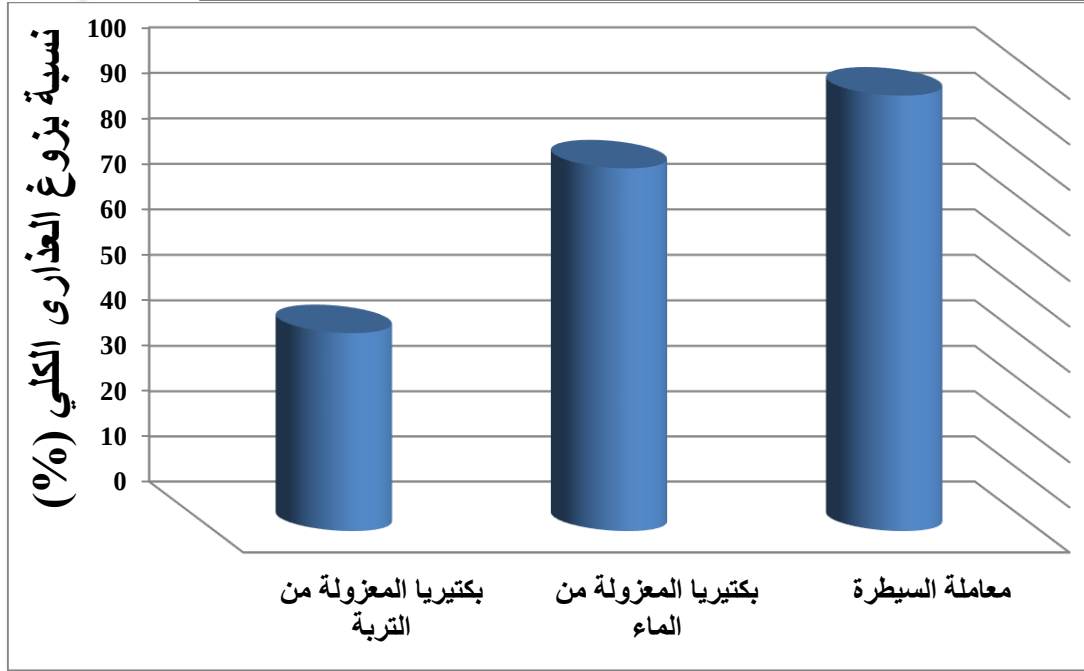
شكل (4-14): النسبة المئوية لمعدل بزوغ العذارى المعاملة بعمر (6-7) يوم لذبابة ثمار القرعيات *Dacus Ciliatus* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء بدرجة حرارة (25 $\pm$ 2) °م و رطوبة نسبية 65 $\pm$ 5%.



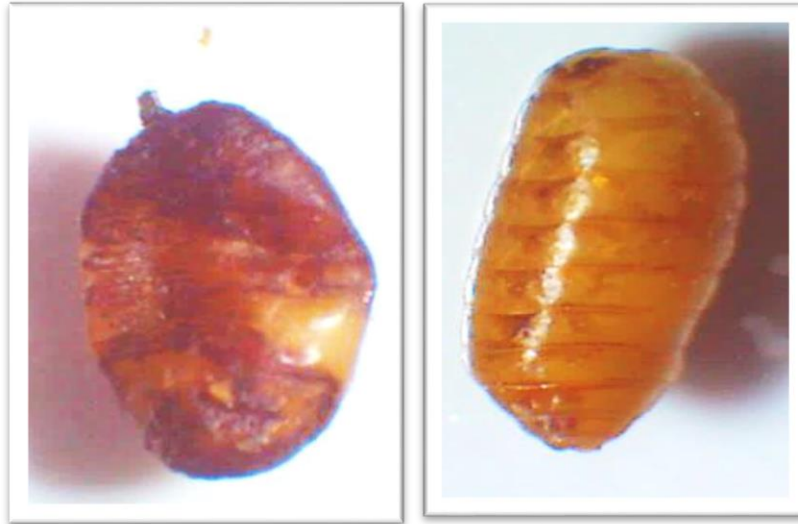
شكل (4-15): تأثير تركيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في نسبة المئوية لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذباب القرعيات *Dacus ciliatus* وبالأيام في درجة حرارة (25±2) °م و رطوبة نسبية 5±65%.

جدول (4-12): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي *B. thuringiensis* في المعدل الكلي لبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم لذباب ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

المعدل الكلي للبزوغ العذارى بعمر (6-7) يوم %	
43.8	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من التربة
80	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من الماء
96	معاملة السيطرة



شكل (4-16): النسبة المئوية للمعدل الكلي لبزوغ العذارى المعاملة بالمستحضر الحيوي للبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء والتربة لذبابة القرعيات *Dacus ciliatus*.



الصورة 21: عذارى ذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus* بعمر (6-7) يوم المعرضة الى المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* مصورة بوساطة مجهر ضوئي وبقوة تكبير 45X.

A: (قبل المعاملة) B: (بعد المعاملة)

يلاحظ من جدول (4-12) وشكل (4-16) أن نسب معدلات بزوغ العذارى باستخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من التربة (43.8%) اقل من عن نسب معدلات بزوغ عذارى في حالة استخدام البكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء (80%).

قد يعود السبب في هلاك عذارى ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* إلى تأثير السموم المفترزة من البكتيريا *Bt* التي تؤدي إلى قتل العذارى سواء عن طريق تأثيرها في الجهاز العصبي للحشرة المتعدرة أو عن طريق تأثيرها في هرمون الانسلاخ، مما يؤدي إلى فقدان العذارى القدرة على الانسلاخ والتحول إلى الطور البالغ وهذا يتفق مع أحمد (2007)، اوقد يكون السبب في فشل ظهور البالغات إلى التأثير السلبي للمبيد في الدور العذارى ومن ثم عدم وصولها إلى الدور البالغ أوقد تصل إلى هذا الدور لكنها لا تستطيع الخروج من غلاف العذارى وربما بسبب ما يحصل فيه تشوهات كما يكون المبيد البكتيري فعال في بداية التعذر بسبب رقة جدار العذارى. وتتفق النتائج التي حصلنا عليها مع الوائلي وآخرون (2014) الذي ذكر في دراسته تأثير بعض العوامل الاحيائية والكيميائية في مكافحة ذبابة القرعيات الكبرى على نبات البطيخ في البصر اذ بلغت نسبة هلاك العذارى بأستخدام المبيد البكتيري *Bt* 56.9 % .

4-5-4 تأثير معاملة غذاء البالغات:-

4-5-4-1 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في بالغات ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

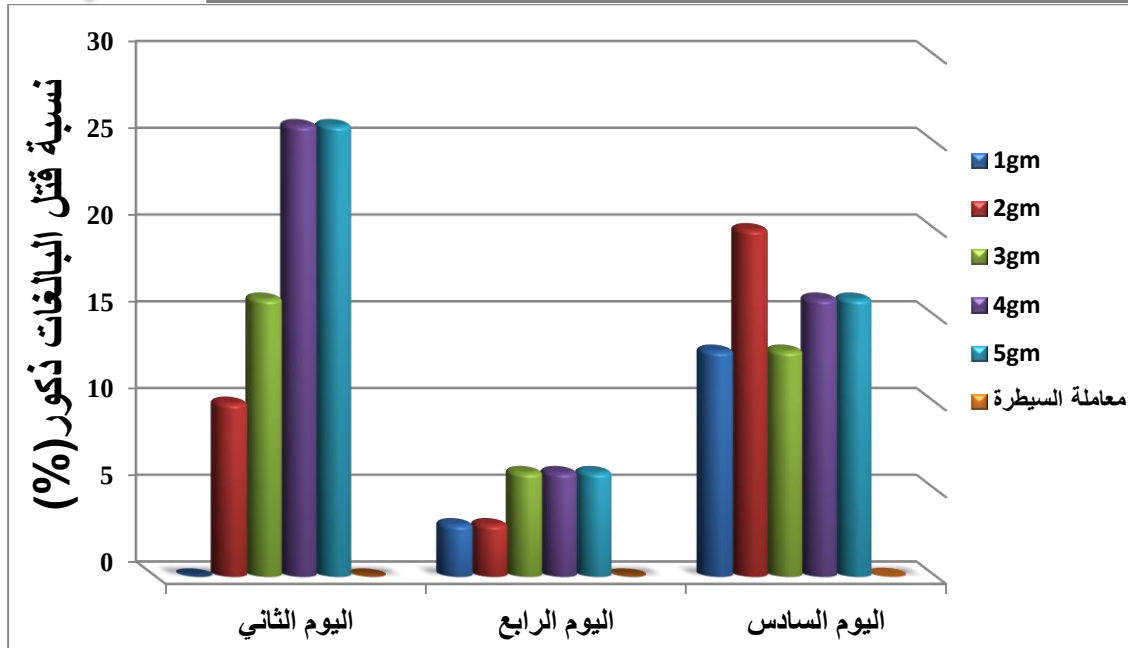
تبين نتائج جدول (4-13) وشكل (4-17) و (4-18) وشكل (4-19) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في بالغات ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliates* كان معنوياً، إذ بلغ أعلى معدل قتل للذكور (1.6) وبنسبة (32%) و أناث (1.5) وبنسبة (30%) عند تركيز 5،4غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل قتل للذكور (0.5) وبنسبة (10%) والأناث (0.4) وبنسبة (8%) عند التركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* ، مقارنة بمعاملة السيطرة للذكور (0.1) وبنسبة (2%) والأناث (0.1) وبنسبة (2%) عند مستوى دلالة (P=0.05) ، ولوحظ عدم وجود فروقات

معنوية في تأثير البكتريا في مدة عمر البالغات (اناثاً وذكوراً) في اليوم الأول من المعاملة ولكن لوحظ وجود فروقات معنوية في الأيام (2-6)، إذ بدأت البالغات المعاملة بالتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B.thuringiensis* بالموت في اليوم الثاني من المعاملة وكان أعلى معدل موت في الأيام هو اليوم السادس من المعاملة بالنسبة للذكور (1.4) وبنسبة (46.6%) إناث (1.0) وبنسبة (33.3%) وأقل معدل موت في الأيام الرابع من معاملة بالنسبة للذكور (0.5) وبنسبة (16.6%) إناث (0.5) وبنسبة (16.6%) عند مستوى دلالة ($P=0.05$). ولوحظ وجود فروقات معنوية في التداخل بين الأيام والتراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis*، فكانت أعلى نسبة موت في اليوم الثاني من المعاملة بالنسبة للذكور (2.6) وبنسبة (26%) وإناث (23) وبنسبة (23%) عند التركيز 4، 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت بالنسبة للذكور (0.0) وبنسبة (0%) إناث (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة بالنسبة للذكور وإناث (0.0) وبنسبة (0%)، وكان أعلى معدل موت في اليوم الرابع من المعاملة بالنسبة للذكور (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 3، 4، 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* إناث (1.0) وبنسبة (10%) عند التركيز 3 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت بالنسبة للذكور (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 1، 2 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis*، إناث (0.3) وبنسبة (3%) عند تركيز 1، 2، 4 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة بالنسبة للذكور وإناث (0.0) وبنسبة (0%). وكانت أعلى نسبة قتل في اليوم السادس من المعاملة بالنسبة للذكور (1.6) وبنسبة (16%) عند التركيز 4، 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* إناث (2.0) وبنسبة

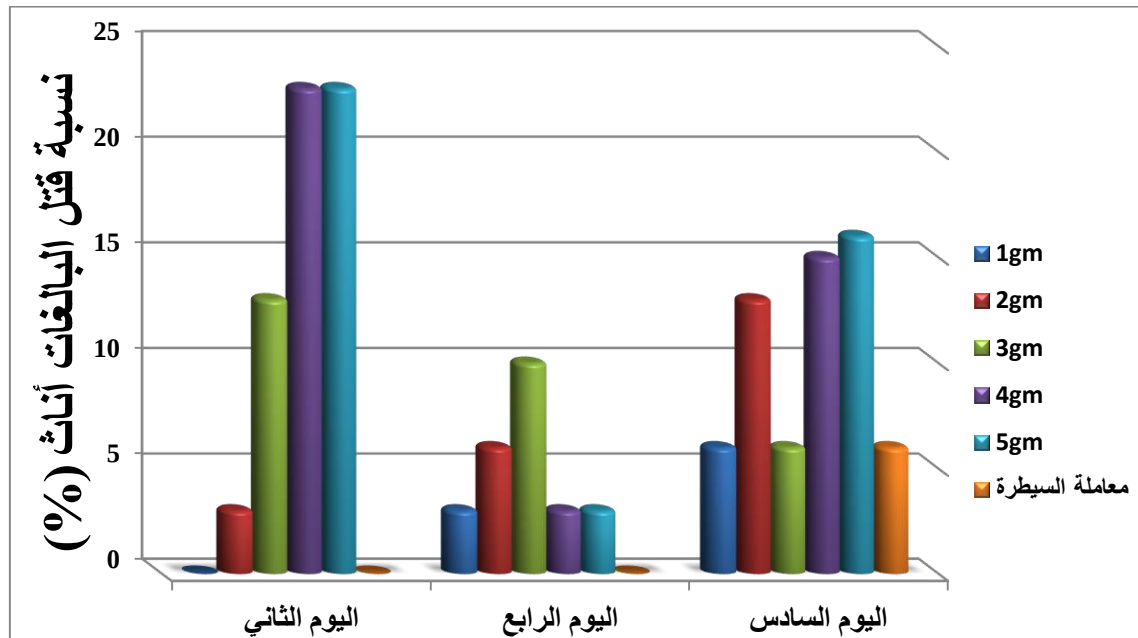
(20%) عند التركيز 2غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت بالنسبة للذكور (1.3) ونسبة (13%) عند التركيز 3،1 غم/لتر من المستحضر الحيوي أما الإناث (0.6) ونسبة (6%). عند التركيز 3 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة بالنسبة للذكور والإناث (0.3) ونسبة (3%).

جدول (4-13): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيري *B. thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة (2±25)°م و ورطوبة النسبية 65±0.5.

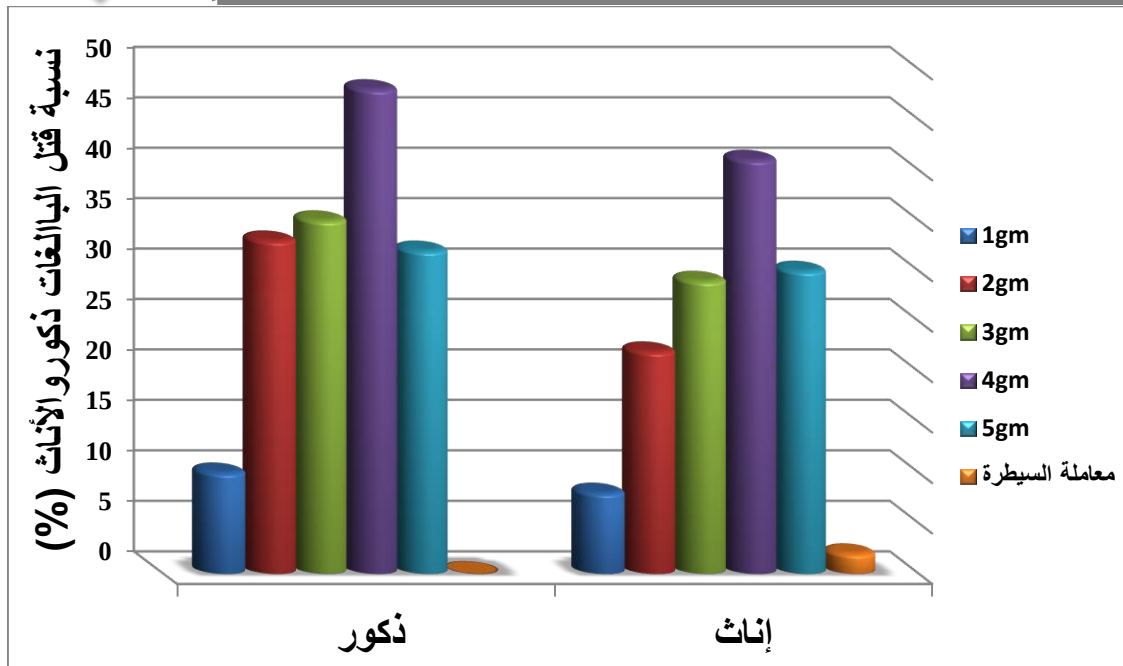
تأثير تركيز	معدلات قتل البالغات				تركيز البكتيريا Bt غم /لتر
	الأيام				
	6	4	2		
Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	Mean ±S.D	الجنس	
0.5±0.7	1.3±0.5	0.3±0.5	0.0±0.0	♂	1
0.4±0.7	1.0±1.0	0.3±0.5	0.0±0.0	♀	
1.1±0.9	2.0±0.5	0.3±0.5	1.0±1.0	♂	2
0.7±0.6	1.3±0.5	0.6±0.5	0.3±0.5	♀	
1.2±0.8	1.3±1.1	0.6±0.5	1.6±0.5	♂	3
1.6±0.7	0.6±0.5	1.0±1.0	1.3±0.5	♀	
1.6±1.0	1.6±0.5	0.6±0.5	2.6±0.5	♂	4
1.5±0.8	1.5±0.5	0.3±0.5	2.3±0.5	♀	
1.6±1.0	1.6±0.5	0.6±0.5	2.6±0.5	♂	5
1.5±0.8	1.6±0.5	0.6±0.5	2.3±0.5	♀	
0.1±0.4	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	♂	معاملة السيطرة
0.1±0.3	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	♀	
LSD التركيز=0.665	0.549 (5%)				LSD = للتداخل بين التراكيز والأيام
	1.4±0.7	0.5±0.5	1.4±1.2	♂	تأثير الأيام
	1.0±0.7	0.5±0.6	1.1±1.1	♀	
	0.772 (5%)				LSD للأيام=



شكل (4-17): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل قتل البالغات (ذكور) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالأيام و بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 65±5%.



شكل (4-18): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من التربة في قتل البالغات (الأنث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالأيام و بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 65±5%.



شكل (19-4) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة (25±2)°م ورطوبة نسبية 5±65% .

4-5-2 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل قتل بالغات ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

تبين النتائج الجدول (4-14) وشكل (4-20) و (4-21) وشكل (4-22) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء في بالغات ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliates* كان معنوياً، إذ بلغ أعلى معدل قتل للذكور (0.8) وبنسبة (25%) و الإناث (0.7) وبنسبة (22%) عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* وأقل معدل قتل للذكور (0.2) وبنسبة (6%) والإناث (0.2) وبنسبة (6%) عند التركيز 1غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* ، مقارنة بمعاملة السيطرة للذكور (0.1) وبنسبة (2%) والإناث (0.1) وبنسبة (2%) عند مستوى دلالة (P=0.05) ، ولوحظ عدم وجود فروقات معنوية في تأثير البكتيريا في مدة عمر البالغات (الإناث والذكور) في اليوم الأول للمعاملة ولكن لوحظ

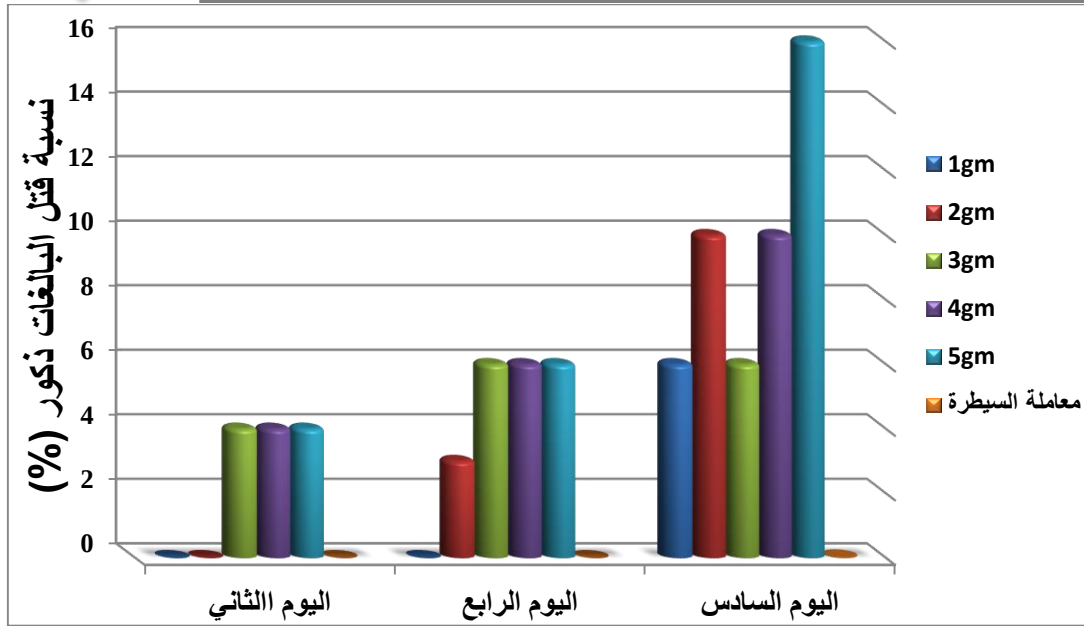
وجود فروقات معنوية في الأيام (2-6)، اذ بدأت البالغات المعاملة بتركيز المختلفة من المستحضر الحيوي *B.thuringiensis* بالموت في اليوم السادس من المعاملة وكان أعلى معدل موت في الأيام هو اليوم السادس من المعاملة بالنسبة للذكور (0.9) وبنسبة (15%) إِمابالنسبة للإناث (0.8) وبنسبة (13%) وأقل معدل موت في الأيام هو اليوم الثاني من معاملة بالنسبة للذكور (0.1) وبنسبة (3.3%) إِمابالنسبة للإناث (0.1) وبنسبة (3.3%) عند مستوى دلالة ($P=0.05$). ولوحظ وجود فروقات معنوية في التداخل بين الأيام والتركيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis*، فكانت أعلى نسبة موت في اليوم الثاني من المعاملة بالنسبة للذكور (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 3،4،5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وبالنسبة للإناث (0.3) وبنسبة (3%) عند التركيز 4،5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت بالنسبة للذكور (0.0) وبنسبة (0%) إِمابالنسبة للإناث (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 2،1 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة بالنسبة للذكور والإناث (0.0) وبنسبة (0%)، وكانت أعلى معدل موت في اليوم الرابع من المعاملة بالنسبة للذكور (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 5،3،4 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* إِمابالنسبة للإناث (0.6) وبنسبة (6%) عند التركيز 5،4،3 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت بالنسبة للذكور (0.0) وبنسبة (0%) وإِمابالنسبة للإناث (0.0) وبنسبة (0%) عند التركيز 1 غم/لتر من المستحضر الحيوي مقارنة مع معاملة السيطرة بالنسبة للذكور والإناث (0.0) وبنسبة (0%) وكانت أعلى نسبة قتل في اليوم السادس من المعاملة بالنسبة للذكور (1.6) وبنسبة (16%) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* أما أنث (1.3) وبنسبة (13%) عند التركيز 5 غم/لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* وأقل معدل موت

بالنسبة للذكور (0.6) وبنسبة (6%) وأما الإناث (0.6) وبنسبة (6%). عند التركيز 1 غم/لتر من

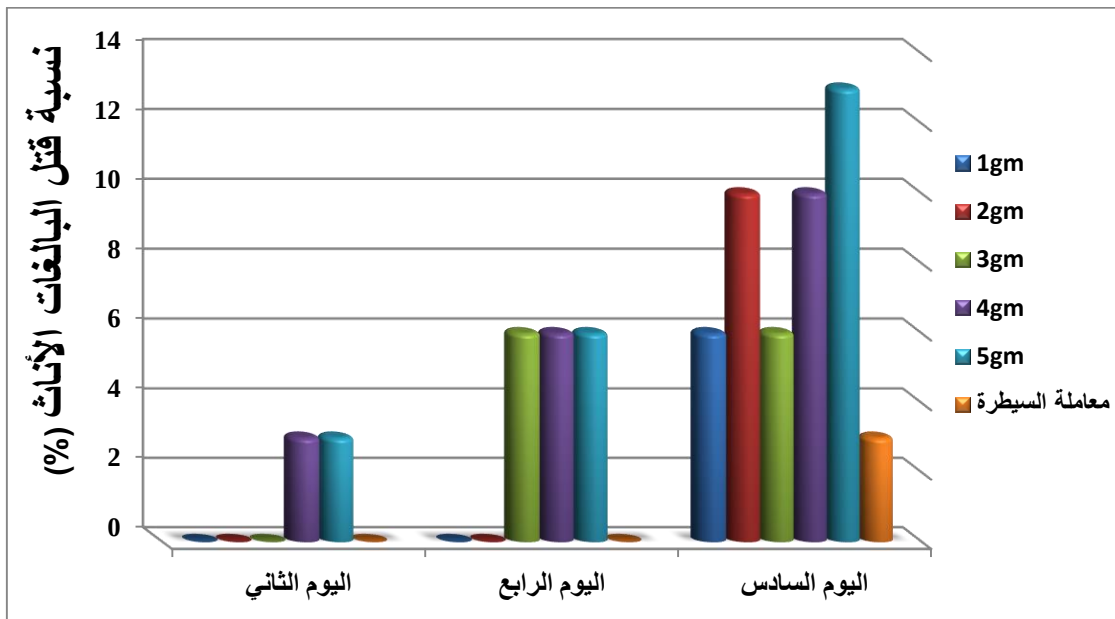
المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* مقارنة مع معاملة السيطرة (0.3) وبنسبة (3%).

جدول (14-4): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي *B.thuringiensis* المعزول من الماء في معدل قتل البالغات (ذكور وإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ و ورطوبة النسبية $5 \pm 65\%$.

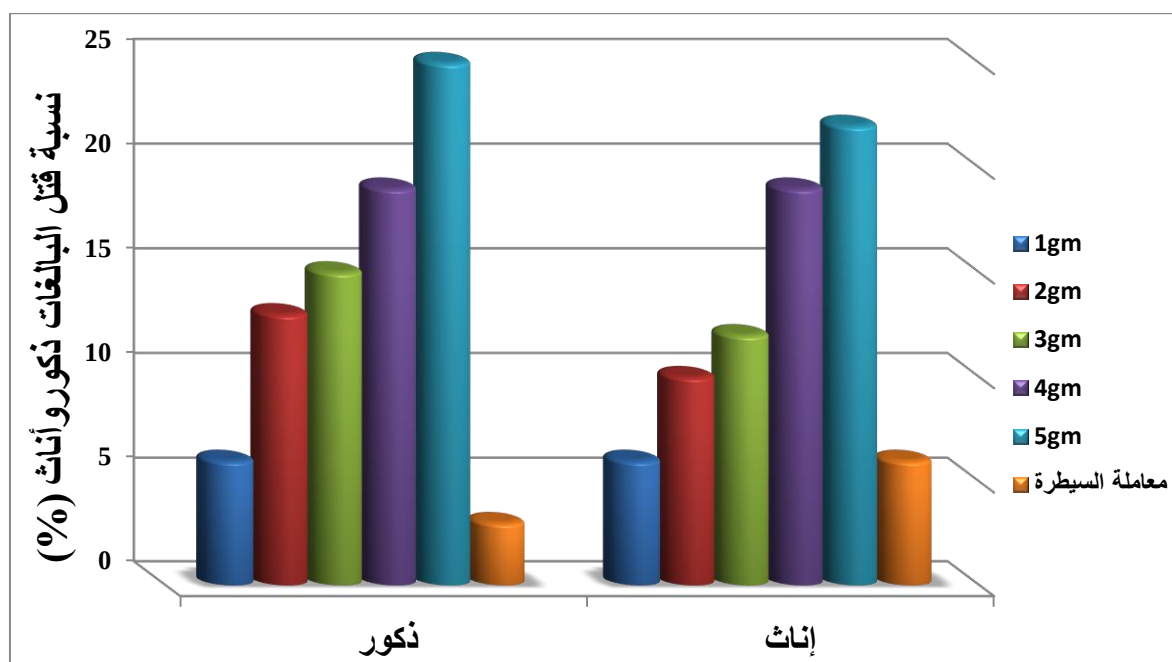
معدلات قتل البالغات	الأيام				تركيز البكتيريا <i>Bt</i> غم /لتر
	6	4	2	الجنس	
تأثير تركيز	Mean $\pm$ S.D	Mean $\pm$ S.D	Mean $\pm$ S.D	Mean $\pm$ S.D	
1	0.2 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	♂
2	0.2 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	♀
3	0.3 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	♂
4	0.4 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	♀
5	0.5 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.5	♂
6	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	♀
7	0.6 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.5	♂
8	0.6 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	♀
9	0.8 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.5	♂
10	0.7 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	♀
معاملة السيطرة	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	♂
	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	♀
LSD التركيز = 0.520	0.425 (5%)				LSD = للتداخل بين التراكيز والأيام
تأثير الأيام	0.9 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.3	♂	LSD للأيام =
	0.8 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.3	♀	
0.450 (5%)					



شكل (4-20): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من الماء في قتل البالغات (ذكور) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالأيام وبدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 65±5%.



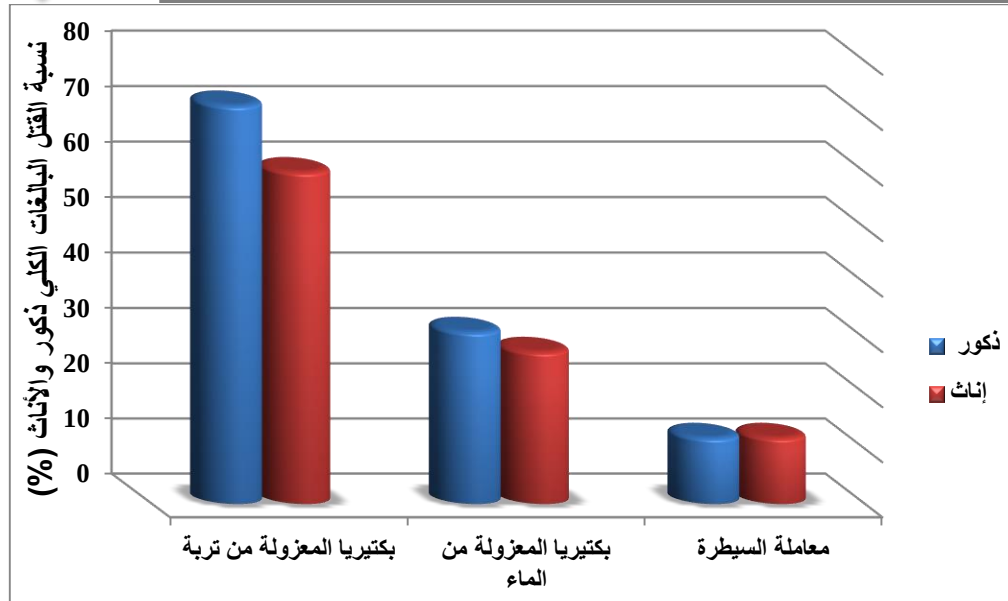
شكل (21-4): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل قتل البالغات (الإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بالأيام وبدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 65±5%.



شكل (4-22): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل قتل البالغات (ذكور والإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة (25±2)°م ورطوبة نسبية 5±65% .

جدول (4-15): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* في معدل الكلي لقتل البالغات (ذكور والإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

النسبة المئوية للمعدل الكلي لقتل البالغات		
72	♂	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من التربة
60	♀	
31.2	♂	بكتيريا <i>Bt</i> المعزولة من الماء
27.6	♀	
12	♂	معاملة السيطرة
12	♀	



شكل (4-23): النسبة المئوية لمعدل القتل الكلي البالغات (الذكور والإناث) لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* المعاملة بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء والتربة.

يلاحظ من جدول (4-15) وشكل (4-23) أن نسب القتل البالغات (الذكور و الإناث) باستخدام البكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من التربة بلغت (72%) للذكور (60%) للإناث وهذه تزداد عن نسب القتل في حالة استخدام البكتيريا *B. thuringiensis* المعزولة من الماء (31%) للذكور (28%) للإناث وبفارق كبير نسبياً ، وإن موت البالغات قد يعود سببه الى التأثير السمي في الجهاز الهضمي.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع الوائلي وآخرون (2014) إذ ذكر وجود فروقات معنوية بين المعاملات ومعاملة السيطرة، فقد حقق المعلق البكتيري *Bt* نسبة موت لبالغات ذبابة القرعيات الكبرى 63.33% *Dacus longistylu*.

وتتفق النتائج مع محمود وكريم (2012) الذي ذكر في دراسته تأثير المسببات المرضية الفطر *Beauveria bassiana* و البكتيريا *Bacillus thuringiensis* والنيما تودا *Steinernema*

Galleria mellonella carpocapsa في عمر ذكور وإناث بالغات دودة الشمع الكبرى

المعاملة فقد اعطت اقل معدل عمر بلغ 5.33 يوماً. وتتفق النتائج جزئياً مع محمد وآخرون (2013) الذي ذكر ان المبيد البكتيري *Bt* هو الأكثر فعالية في التأثير في حشرة حميرة النخيل وأعطى أعلى كفاءة بغلت 73%.

لا تتفق نتائجنا مع نتائج العزاوي (2007) التي بينت عدم تأثير البكتريا *Bacillus thuringiensis* في مدة عمر البالغات (اناثاً وذكوراً) اذ بدأت البالغات المعاملة بتخافيف البكتريا كذلك معاملة السيطرة بالموت الطبيعي في اليوم السابع.

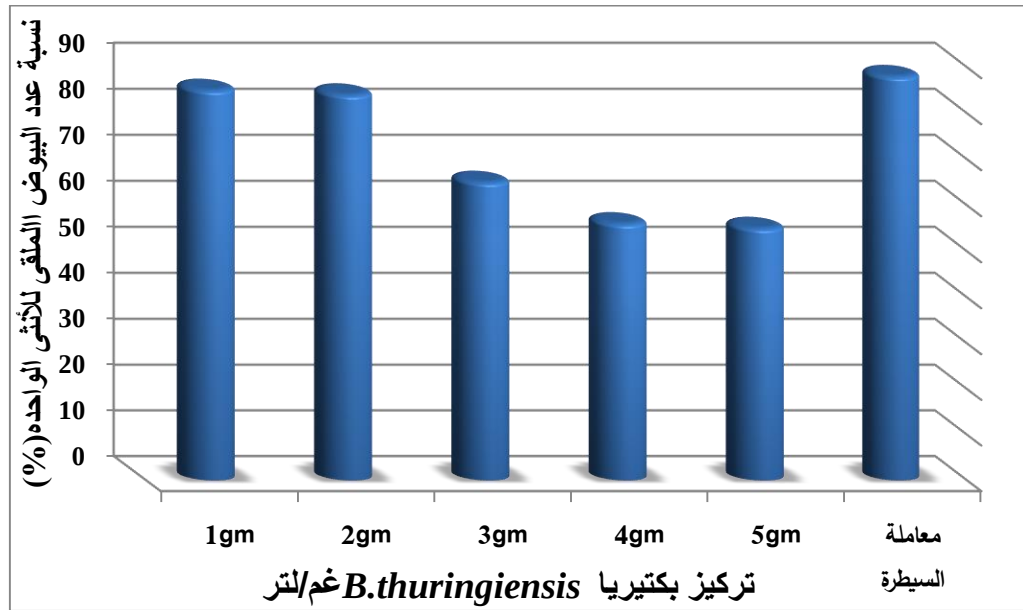
لا تتفق هذه النتائج مع نتائج الجبوري (2003) في عدم تأثير البكتريا على عمر البالغات بتراكيز 1.6×10^6 /مل و 3.2×10^6 /مل و 4.8×10^6 /مل.

4-5-5 تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء والتربة في معدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات *D.ciliatus*:

يوضح الجدول (4-16) وشكل (4-24) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل إنتاج البيض لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* كان معنوياً، أذ بلغ أعلى معدل إنتاج البيض 84.5 بيضة للأنثى الواحدة عند التركيز 1غم/لتر من المستحضر البكتيري *B.thuringiensis*، وأقل معدل إنتاجية البيض 54.5 بيضة للأنثى الواحدة عند التركيز 5غم/لتر من المستحضر البكتيري *B.thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة حيث بلغ معدل إنتاجية البيض 87.5 بيضة للأنثى الواحدة عند مستوى احتمال (P=0.05). ولوحظ أن هنالك علاقة عكسية بين تركيز البكتريا وإنتاجية الأنثى من البيض

جدول (4-16): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من التربة في إنتاجية البيض للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

معدلات إنتاجية بيض للأنثى الواحدة						تراكيز البكتيريا <i>Bt</i> غم/لتر
معاملة السيطرة	5	4	3	2	1	البكتيريا المعزولة من التربة
87.5	54.5	56	64.5	83.5	84.5	
5.417						LSD



شكل (4-24) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من التربة في معدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة (25±2)°م و رطوبة نسبية 5±65%.

يوضح الجدول (4-17) وشكل (4-25) تأثير بكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل إنتاج البيض لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* لم يكن معنوياً، إذ بلغ أعلى معدل إنتاج البيض (85%) بيضة للأنثى الواحدة عند تركيز 1غم/لتر من مستحضر البكتيري *B.thuringiensis*، وأقل معدل إنتاجية البيض (79.5%) بيضة للأنثى الواحدة عند تركيز 5غم/لتر من المستحضر البكتيري *B.thuringiensis* مقارنة بمعاملة السيطرة أذ بلغت معدل إنتاجية البيض

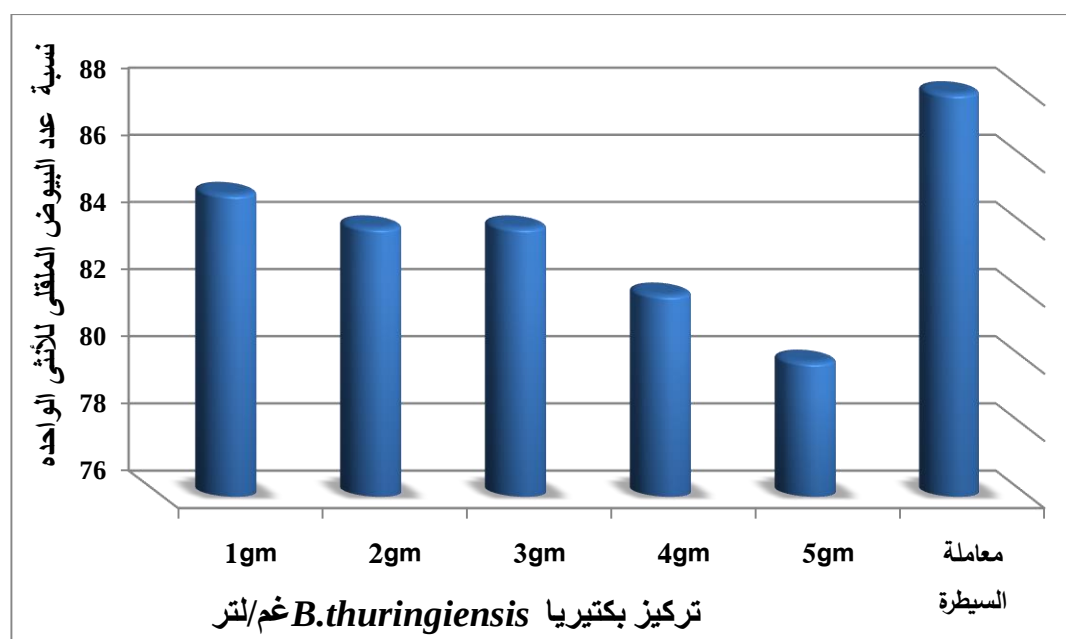
(85.5%) بيضة للأنثى الواحدة عند مستوى احتمال ($P=0.05$). ولوحظ أن هنالك علاقة عكسية بين

تركيز البكتيريا وإنتاجية الأنثى من البيض

جدول (4-17): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.thuringiensis* المعزولة

من الماء في إنتاجية البيض للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.

معدلات إنتاجية بيض للأنثى الواحدة						
تراكيز البكتيريا <i>Bt</i> غم/لتر	1	2	3	4	5	معاملة السيطرة
البكتيريا المعزولة من الماء	85	84	83.5	81.5	79.5	87.5
LSD	5.333 N.S					



شكل (4-25): تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من الماء في معدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحدة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* بدرجة حرارة (25 ± 2)°م و رطوبة نسبية $65 \pm 5\%$.

يلاحظ أن معدل إنتاجية البيض كانت أعلى في حالة استخدام البكتيريا *Bacillus*

thuringiensis المعزولة من الماء بلغت 82.7% من الإنتاجية في حالة استخدام البكتيريا

Bacillus thuringiensis المعزولة من التربة حيث بلغت 68.6 مقارنة مع معاملة السيطرة

87.5 قد يعود السبب إلى الضرر الحاصل في الجهاز التناسلي للبالغة، ويتفق مع نعمة وآخرون (1989) الذين اشاروا الى فعالية المستحضر التجاري Bactospein للبكتيريا *B.thuringiensis* على بالغات *spodoptera litoralis* وحشرة *S.exigua* وحشرة *A.grotis ipsilo* وبيوضها، فقد اختزلت أعمار البالغات وانخفضت أعداد البيض الناتجة عند تغذية هذه الحشرات.

تتفق هذه نتائج هذه الدراسة مع نتائج علي (2003) الذي ذكر ان بكتريا *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis* تؤثر في معدل عدد البيض الموضوع عند معاملة البالغات بتركيز $10^6 \times 12$ سبور /مل، بسبب أن السم الذي ينتجه هذا الضرب من البكتريا والذي يؤثر في تصنيع البروتينات اللازمة لعملية تكوين البيض واستكمال نمو الجنين.

لا تتفق النتائج مع نتائج محمود وكريم (2012) الذي بين ان المعلق البكتيري *B.thuringiensis* يؤثر في معدل عدد البيض الموضوع فقد أعطت ذكور معاملة مع إناث معاملة اقل معدل بلغ 96 بيضة.

لا تتفق النتائج مع العزاوي (2007) التي ذكرت ان بكتريا *Bacillus thuringiensis* لم تؤثر في معدل عدد البيض الملقى، و قد يكون نفس السبب في عدم تغذي البالغات على المحلول السكري لاكتفائها بالغذاء المخزون خلال الطور اليرقي .

الاستنتاجات -:Conclusions

1. لوحظ الوفرة والانتشار الطبيعي لبكتيريا *Bacillus thuringiensis* في جميع النظم البيئية المختلفة.
2. نسبة وجود البكتيريا *Bacillus thuringiensis* في التربة اعلى من نسبة وجودها في الماء وفي الترب الزراعية اعلى من نسبة وجودها في الترب الغير الزراعية
3. لوحظ هناك تقارب بين نتائج الفحص المظهري لوجود البروتينات البلورية خلال مرحلة التبوغ و طريقة الفحص الجزيئي باستخدام تقنية PCR للجين المشفر لألية عمل البروتينات البلورية Crystal proteins.
4. امتلاك جميع العزلات للجين *cry* المشفر للبروتينات بلورية القاتلة للحشرات.
5. إن البكتيريا *Bacillus thuringiensis* التي تم عزلها وتشخيصها قد أثبتت قدرتها الإمراضية على ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* عن طريق تأثيرها في بعض الجوانب الحياتية لهذه الحشرة .
6. اتضح ان عزلة التربة بمقارنة نتائجها مع عزلة الماء ذات تأثير معنوي اكثر عند مستوى دلالة $P=0.05$ في الادوار المختلفة لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus*.
7. لوحظ ان نسبة الهلاك للأدوار المختلفة تزداد طرديا بزيادة تركيز المستحضر البكتيري Bt غم/لتر.
8. إن موت يرقات ذبابة ثمار القرعيات بفعل بكتيريا *Bacillus thuringiensis* يبدأ بعد 24 ساعة من المعاملة.
9. لوحظ تأثير معنوي لتخافيف العزلة المحلية على عمر البالغات (ذكوراً واثناً) ومعدل عدد البيض الملقى للأنثى الواحد.

التوصيات -Recommendations-

1. إجراء دراسة حقلية للتأكد من تأثير البكتريا *B.thuringiensis* في الأدوار المختلفة لذبابة ثمار القرعيات في الظروف البيئية الطبيعية.
2. عزل بكتريا *Bacillus thuringiensis* من البيئة العراقية وتصنيعها على شكل منتجات تجارية حيوية من قبل الجهات المعنية.
3. إجراء دراسات جزيئية باستعمال تقنية الـ PCR للتحري عن الجينات *cry* الأخرى المشفرة للبروتينات بلورية القاتلة للحشرات .
4. اختبار إمراضية البكتيريا على الآفات الحشرية الأخرى.
5. خلط المستحضر الحيوي *Bt* مع المبيدات الحشرية الكيميائية مثل المبيد الكيماوي سفن 10% ودراسة تأثيرهما على الجوانب الحياتية لذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* .

أبو سعيد، هدى؛ س. الموسمي وخ. أوفيدو (2009). عزل ودراسة البكتيريا النافعة *Bacillus thuringiensis* واستخدامها في مكافحة الأحيائية لذبابة ثمار الفاكهة. مجلة وقاية نبات العربية، 27:188.

أحمد، هارون حسين (2007). الروز الحياتي للبكتريا *Bacillus cereus* Fr.&Fr على فراشة اللهانة *Pieris rapae* (L) ومقارنة النتائج مع المبيد الكيميائي Sevin. رسالة ماجستير. كلية علوم. جامعة بغداد: 51 ص.

ألسلي، محمد نايف؛ جمال عبد الله الحمادة و بدي العبد الله (2008). دور بعض عناصر مكافحة الحيوية لديدان جوز القطن في منطقة دير الزور/سورية. المؤتمر العربي الثاني لتطبيقات البيولوجية للآفات. القاهرة. جمهورية مصر العربية. 21:39 ص

بلاس، حزام صالح؛ الطويل، أحمد اياد وجاسم، مها اسماعيل (2014). اختبار فاعلية عزلات بكتريا *Bacillus thuringiensis* (Berliner) على الأطوار اليرقية لحشرة عثة التين *Ephestia cautella* (Walker). مجلة بغداد للعلوم. 11(2):943-951.

تويج، نبيل سليم سعيد (2009). دراسة إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus thuringiensis* لمكافحة حشرة من الخوخ الأخضر *Myzus persicae*. مجلة القادسية للعلوم الصرفة (فصيلة)، 14(2):1-11..

الجبوري، خالد اميري محمد عبيد. (2003). استعمال بكتيريا *Bacillus thuringiensis* (Berl) وبعض منظمات النمو الحشرية للسيطرة على عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella*. دبلوم عالي. كلية التقنية. قسم التقنيات الحياتية النباتية. هيئة التعليم التقني 78 ص.

جعفر، محمد عادل؛ القزاز، عبد الكريم عبد الرازق و محمد، علي صادق (2012). تنقية البلورات البروتينية المنتجة من بكتريا *Bacillus thuringiensis* باستخدام الانظمة ثنائية الطور المائية. المجلة العراقية للعلوم، 53(4): 799-806.

جعفر، محمد عادل؛ القزاز، عبد الكريم عبد الرازق و محمد، علي صادق (2013). دور البلازميدات في إنتاج البلورات البروتينية في بكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة محلياً المجلة العراقية للعلوم، 54 (2): 301-307.

جميل، جاسر محمد و حمد، حسام الدين عبدالله (2014). تقييم كفاءة عزلات بكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة من ترب محلية على بعض الآفات الحشرية في العراق. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 14(12):214-221.

جواد ، محمد مهدي ، (2012) . دراسة تصنيفية مظهرية ووراثية على حشرة ذبابة فاكهة البحر المتوسط (*Ceratitis capitata* (Wiedemann1824) (Diptera : Tephritidae) في بعض من محافظات وسط العراق ، أطروحة دكتوراه ، كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم ، جامعة بغداد ، العراق.

الجوراني، رضا صكب (2013). الوجود النسبي لذبابة ثمار القرعيات الكبرى *Dacus frontalis* Becke وذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* Loew على ثمار الخيار *Cucumis ssativuL.*

الحديثي ، هديل توفيق (1988). " اساسيات علم الاحياء المجهرية " , جامعة البصرة – كلية العلوم. مطبعة جامعة البصرة. 201 ص.

الحريري ، غازي (1978) . الحشرات الاقتصادية في سوريا والبلاد المجاورة، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، دمشق، سوريا: 260 صفحة.

حسني ، محمد محمود وعاصم ، محمود عبد الحليم ونصر ، السيد عبد النبي ، (1976) . الآفات الزراعية / الحشرات و الحيوانات، دار المعارف، القاهرة، مصر: 180 صفحة.

حماد ، شاكرواحمد لطفي عبد السلام ، (1977) . الحشرات الاقتصادية، دار المعارف، مصر: 351 صفحة.

حميد ، سميرة كاظم (2001). التقنية المستحدثة في إنتاج المبيد الحيوي من لقاح سلالة البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* CHAO. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الكوفة 66 ص

الخفاجي ، زهرة محمود , أبو المعالي ، حسن محمود (2013). تفاعلات الكوثرية و تصميم البوادي . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا . جامعة بغداد. 298 ص.

الراوي، خاشع محمود , عبد العزيز محمد خلف الله . (1980) تصميم تحليل التجارب الزراعية. مطبعة جامعة الموصل. العراق. 320 ص.

السعيدى ، محمد عبد عيسى (1923).تكنولوجيا الحبوب . مطابع وكالة التعليم العالي والبحث العلمي
515 صفحة.

السعيدى، محمد عبد عيسى (1923). تكنولوجيا الحبوب . مطابع وكارة التعليم العالي والبحث
العلمي جامعة بغداد : 212 صفحة.

السماك، اسراء غانم و عبدالله ، باسمه احمد (2010). فعالية القتل الحيوي لبعض السلالات التابعة
لنوعين *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* . مجلة تكريت للعلوم الصرفة. 1: 15.

شعبان ، عواد والملاح ، نزار مصطفى ، (1993) . المبيدات ، دار الكتب للطباعة والنشر ، وزارة
التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، العراق ، 520 صفحة

الصفار ،هناء هاني عبد الحسين(2011). دراسة تصنيفية لعائلة ذبابة الفاكهة Tephritidae من
رتبة ثنائية الأجنحة order: Diptera في بعض محافظات العراق. أطروحة دكتوراه، كلية
العلوم ، جامعة بغداد:181 ص.

الطويل، اياد احمد؛ الشمري ، احمد جاسم واحمد رعد فاضل (2005). تأثير أشعة جاما في بعض
السمات الحياتية لذبابة ثمار القرعيات (Diptera: Tephritidae). العلوم الزراعية، المجلد (32): 3.

العزاوي، علياء عبد العزيز حميد (2006) . دراسة تأثير بكتريا *Bacillus thuringiensis* في
السيطرة على عثة درنات البطاطا (*Phthorimaea operculella*)
(Lepidoptera: Gelechiidae)(zeller).رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات ،جامعة
بغداد:109 .

علي، جهينة ادريس محمد. (2003) . تشخيص ثلاث عزلات من *Bacillus thuringiensis*
ممرضة لدودة درنات البطاطا *Ph. operculella* . مجلة التربية والعلم. تحت النشر.

العميدي، بهاء حمدي(1990).أستخدام البكتريا *Bacillus cereus kurstaki* في مكافحة فراشة
اللهانة *pieris rapae* L.رسالة ماجستير في قسم علوم الحياة ،الأحياء المجهرية،كلية
علوم ،جامعة بغداد.76 ص

- قاسم، منال محمود(1998).دراسة كفاءة كاربونات الكالسيوم ومستخلص سلالة البكتيريا *Pseudomona fluorescens* pf-5s في حماية حاصل الذرة الصفار من الإصابة بالفطر *Aspergillus flavus* وتلوث بسموم الافلاتوكسينات B1 و B2 في المخزن.رسالة ماجستير ،كلية الزراعة، جامعة البصرة:58 صفحة.
- القره غولي، عمار أحمد سلطان (2013). دراسة وراثية خلوية لمجتمعات ذبابة ثمار القرعيات *Dacus ciliatus* (Loew)(Diptera : Tephritidae) المجموعة من مناطق مختلفة من العراق. اطروحة دكتوراه ،كلية التربية ،جامعة تكريت.173 ص.
- القناوي ،احمد(2011). البكتريا الممرضة للحشرات Entomopathogenic Bacteria *Bacillus thuringiensis* (B.t). الشبكة العراقية لنخلة التمر، المتوفر في <http://www.iraqi-datepalms.net> المقالة.6 ص
- الكتاب السنوي للإحصائيات الزراعية العربية (2008) . جامعة الدول العربية – المنظمة العربية للتنمية الزراعية ، المجلد 30 (28) : 59-65 .
- كريم ،حسنين طاهر ومحمد،عبدالجليل محمود(2012). تأثير الفطر *Beauveria bassiana* والبكتريا *Bacillus thuringiensis* والنيماتودا *Steinernema carpocapsa* في بالغات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae). مجلة الانبار للعلوم الزراعية،10 (2): 360-370.
- محمد، جاسم خلف ؛ الجصاني ،راضي فاضل ؛ علي ،عبد الستار عارف؛ ابو حسيني ،مصطفى (2013) كفاءة المبيدات الإحيائية *Spinosad* و *Bacillus thuringiensis* Berliner ضد حشرة الحميرة على النخيل. مجلة العلوم الزراعية العراقية،44(2):220-225.
- محمود، محمد عبد الجليل وكريم، حسنين طاهر(2012). تأثير الفطر *Beauveria bassiana* والبكتريا *Bacillus thuringiensis* والنيماتودا *Steinernema carpocapsa* في بالغات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) . مجلة الانبار للعلوم الزراعية،10:1.
- المعاضدي ، جبار فرحان والربيعي ، حسين فاضل (2000). إنتاج واستخدام مبيدات البكتيريا في مكافحة الحشرات . ورشة العمل القطرية الأولى في مكافحة الحيوية للآفات الزراعية . منظمة الطاقة الذرية العراقية. 25-26 تشرين الثاني.

مهدي ، حسن سليمان احمد (2000) . دراسات بيئية وحياتية لحشرة ذبابة ثمار القرعيات *Dacus* (*Ciliatus* (Loew) (Diptera : Tephritidae) وبعض طرق مكافحتها ، أطروحة دكتوراه ، كلي الزراعة ، جامعة بغداد ، العراق .

مهيار ، مایسة (2011). انتشار وتوزيع بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner في ترب النظم البيئية وزراعية مختلفة في سورية. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العليا المجلد(33) العدد (1)

الوائلي , ضياء سالم ؛ عبد القادر, أياد عبد الوهاب ومجدي, عبود خلف (2014). تأثير بعض العوامل الاحيائي و الكيميائي في مكافحة ذبابة القرعيات الكبرى *Dacus longistylus* (Tephritidae:Diptera) على نبات البطيخ في بصرة. مجلة علوم ذي قار، 4(2):37-44.

A

- Aboussaid** ,H. ; El-Aouame1,L.; El-Messoussi ,S.and Oufdou, K. (2010). Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) Strains on Larvae and Adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Journal of Environmental Protection, 1: 337-345.
- Adison**, T.A.(1993).Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil a review. Canadian Journal of Forest Research, 23: 2329- 2342.
- Agaisse**, H. and Lereclus, D. (1995). “How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?”. Journal of Bacteriology, 177: 6027-6032.
- Aldawood**, A.S.(2013). Comparative study of Cucurbit fly: *Dacus ciliatus* Loew (Diptera: Tephritidae) infestation on Zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) at Huraimila and Diraab, Riyadh Region, Saudi Arabia. Journal of Biological Science, 6(2): 91 – 96 .
- Angst**, B.D.; Marozzi, C. and Magee, A.J. (2001). “The Cadherin superfamily”. Journal of Cellular Science, 114: 625-626.
- Apaydin**, Ö. (2005). isolation and characterization of *bacillus thuringiensis*A strains from different grain habitats .M.Sc.Thesis, the Graduate School in Partial Fulfillment, Department of Biotechnology and Bioengineering, zmir Institute of Technology zmir, Turkey , 85pp.
- Aronson**, A. I. and Beckman, W. (1987). Transfer of chromosomal genes and plasmid in *Bacillus thuringiensis* . Applied and Environmental Microbiology, 53: 1525-1530.

- Assaeedi**, A. S. A; Osman, G. E. H. and Abulreesh.(2011). “ The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments,”Australian Journal of Crop Science, 5 (10):1185-1190.
- Azab**, A. K. ; EL-Nahal, A. K. M. and Swailem, S. M. (1970). The immature stages of melon fruit fly *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Bulltein of the Entomological Society of Egypt LIV, 243-247.
- Azab**, A. K. and Kira, M. T. (1954) . *Dacus ciliatus* (Leow) an important pest attacking cucurbitaceous plants in Upper-Egypt Bulltein Society of ouad Entomological.XXX VI, 379-382.
- B**
- Badii** , K.B. ;Billah , M.K. ; Nuamah , A-M.; Obeng-Ofori , O. and Naryko ,G. (2015).Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera-Tephridiae) in Africa. Journal Africa of Agricultural Research,10(12):1488-1498.
- Bajwa**, W. I. and Kogan, M. (2001). *Bacillus thuringiensis* based biological control of insect pests. Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis ,96pp.
- Baron**, E.J.; Pelerson, L. R.; and Finegold , S.M. (1994). Enterobacteriaceae . In : Baiely and Scott's Dagnostic Microbiology,(9th ed.) , Mosby – year book Inc ,USA ,458pp.
- Berliner**, E.(1915). uber die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella*, Zell.) ihren Erreger, *Bacillus thuringiensis* n. sp. Z. Angew. Enotomol. 2: 29- 56.
- Bhattacharya**, M.; Plantz, B.A.; Swanson, K. and Nickerson, K.W. (1993). Nonenzymatic glycosylation of lepidopteran-active *Bacillus*

thuringiensis protein crystals. Applied and Environmental Microbiology, 59(8): 2666 - 2672.

Bone, L.W., Bottjer, K.P. and Gill, S.S. (1987). Alteration of *Trichostrongylus colubriformis* egg permeability by *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin, Journal of Parasitology, 73(2):295-299.

Burnett, D. and Crocker, J. (2005). The Science of Laboratory Diagnosis. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium. England. UK, 444-448 .

C

Caroline, O.O. (2012). Biocontrol Potential of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil samples against Larva of Mosquito. B.Sc. thesis, Faculty of Natural Sciences, Caritas University, Department of microbiology and biotechnology, 49pp.

Castro, R. (2014). The development of postharvest Quarantine Treatments for pepper *Capsicum annum* L., and Melon *Cucumis melo* L., reticulates against fruit flies (*Ceratitis capitata* and *Dacus ciliates*). M.Sc. Thesis, faculty of Agricultural, university of Jerusalem, 66pp.

Charles, J.F., Delécluse A. and Nielsen-LeRoux, C. (2000). "Entomopathogenic Bacteria : From laboratory to field application", (Kluwer Academic) 524.

Chaudhary, F. K. (2013). Periodical Damage of Fruit Flies in North Gujarat. Life Sciences Leaflets, 1:1-5 <http://lifesciencesleaflets.ning.com/>.

Chen, M.L. & Tsen H.Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. Journal of Applied Microbiology. Vol.92, pp. 912–919.

Chilcott, C.N. and Wigley P .J. (1993). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. Journal of Invertebrate Pathology, 61 : 244- 247.

- Çinar, C.** (2005). isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* from Olive Terrell ated habitats. M.Sc. Thesis, the Graduate School of Engineering, Sciences of zmir Institute Technology in Partial Fulfillment,115pp.
- Clairmont, F. R., R. E. Milne, V. T. Pham, M. B. Carrière, and H. Kaplan.** (1998). Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 273:9292-929
- Clark , F.E.** 1965 .Agar – plats method for total microbial(C.F.black, 1965 methods of soilanalysis part 2 publisher madeson , wisconsin , USA 1572 pp.
- Cohen, S. ; Albeck , S. ; Ben-Dov, E.; Cahan, R. ; Firer, M.; Zaritsky, A. and Dym ,O.**(2011). Cyt1Aa Toxin: Crystal Structure Reveals Implications for Its Membrane-Perforating Function. Journal of Molecular Biology, 413: 804–814.
- Corre^a, R.F.T.; Ardisson-Arau' jo, D.M.P.; Monnerat, R.G. and Ribeiro, B.G.**(2012). Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* δ - Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. PLoS ONE Journal pone, 7(9): e46121.
- Cowan, S.T and Steel,K.J.** (2004). Edited and rev. by Barrow, G.I., and Feltham, R.K.A., Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition. Dock House, The water front, Cape Town 8001, South Africa.
- Crickmore, N.** (2000). "The Diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins, in Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application", edited by. Charles J.F; Delécluse, A., and Nielsen- LeRoux C. (Kluwer Academic, Dordrecht) , 65 – 79
- D**
- Dai, S-M. and Gill, S.** (1993). “In vitro and in vivo Proteolysis of the *Bacillus subsp. israelensis* CryIVD Protein by *Culex quinquefasciatus* Larval

Midgut Proteases. Insect Biochemistry and Molecular Biology ,23: 273-283.

De- Barjac, H., and Bonnefoi, A.(1962). "Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*". Entomophaga, 7: 5-31.

De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001). "How *Bacillus thuringiensis* has Evolved Specific Toxins to Colonize the Insect World," Trends in Genetics, 17: 193-199.

Delpoux, C. and Deguine , J.P. (2015). Implementing a Spinosad-Based Local Bait Station to Control *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in High Rainfall Areas of Reunion Island. Journal of Insect Science, (11)15. <http://jinsectscience.oxfordjournals.org>.

Dhillon, M.K. ; Singh ,R. ; . Naresh ,J.S and Sharma , H.C. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. Journal of Insect Science, (5)40. www.insectscience.org.

Dohary, K. L. (1983) . Bionomics of fruit flies *Dacus* spp. On some fruits. Indian, Journal Entomological, 45(4): 406-413.

Drew, R. A. I. (1987) . Behavioral strategies of fruit flies of the genus *Dacus* (Diptera: Tephritidae) Significant in mating and host-plant relationships. Bulltein Entomological. Reseach, 77: 73-81.

Dulmage, H. and Aizawa, K. (1982). "Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature". In: Kurstak E (ed) Microbial and Viral Pesticides, Marcel Dekker, Inc., New York: 209-237.

E

Ellis, R.T.; Stockhoff, B.A.; Stamp, L.; Schnepf, H.E.; Schwab, G.E.; Knuth, M.; Russell, J.; Cardineau, G.A. and Narva, K.E. (2002). "Novel *Bacillus*

thuringiensis Binary Insecticidal Crystal Proteins Active on Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte,” Applied and Environmental Microbiology. 68: 1137-1145.

EL-Nahal, A. K. M.; Azab, A. K. and Swailem, S. M. (1970) . Studies on the biology of the melon fruit fly *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Bulltein of the Entomological Society of Egypt. LIV, 231-244.

Entwistle, P.F.; Lory, J.S.; Baily, M.J. and Higgs, S. (1993). “*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide. (John Wiley, New York).

Estruch , J.; Warren, G.W.; Mullins, M.A.; Nye, G.J., Craig, J.A. and Koziel, H.G. (1996). “Vip3A, A Novel *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein with A Wide Spectrum of Activities Against Lepidopteran Insects.Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 5389-5394.

F

Fiuza, L.M.; Knaak, N.; Pires da Silva,R.F.; Henriques,J.A .(2013). Receptors and Lethal Effect of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). International Scholarly Research Notices, Article ID 940284, 7 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/940284>.

Flexner, J.L. and Belnavis, D.L.(1999). “Microbial insecticides”, in Biological and Biotechnological Control of Insect Pests, edited by J.E. Rechcigland N.A. Rechcigl .Lewis Publishers., 35-62 pp..

Forbes, B.A. ; Sahm , D.F. and Wessifeld , A.S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A., 1:509pp .

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld ,A.S.(1998). Bailey & Scott"s diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis, 503pp.

G

George, Z.O.(2011). Expression and genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* toxins for improved toxicity and development of a protocol for in vivo selection of toxin variants with improved activity. Ph.D. thesis, School of Life Scieces, University of Sussex, 259pp.

Gill, S.S.; Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. (1992). "The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins", Entomology - Annual Review of Entomology, 37: 615-636.

Gillani , W.A. ; Bashir T. and Ilyas M. (2002). Studies on population dynamics of fruit flies (Diptera : Tephritidae) in Guava and Nectrin orchards in Islamabad , Pakistan Journal Biological Sciences, 5(4): 452-454.

Gorashi, N.E.; Tripathi,M.; Kalia,V.and Gujar,G.T.(2014). Identification and characterization of the Sudanese *Bacillus thuringiensis* Strain for their efficacy against *Helicoverpa armigera* and *Tribolium castaneum*. India journal of experimental biology,52:637-649.

Greisen, K.; Loeffelholz, M.; Purohit, A. and Leong,` D.(1993). PCR Primers and Probes for the 16S rRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. Journal of Clinical Microbiology, 32(2): 335-351.

Guerchicoff, A.; Delecluse, A. and Rubinstein, CP., (2001). "The *Bacillus thuringiensis* cyt Genes for Haemolytic Endotoxins Constitute A Gene Family," Applied and Environmental Microbiology, 67: 1090-1096.

H

- Hakoori**, A.R. and Ahmad, M.S.(2013). Isolation, Molecular Characterization and Toxicity of cry1C Gene Harboring *Bacillus thuringiensis* From Different Habitats and Localities of Pakistan. Pakistan journal of zoology, 45(1): 261-271.
- Hancock**, D. L. (1986) . Classification of the Trypetinae (Diptera: Tephritidae) with a discussion of Afro tropical fauna, Journal of the Entomological Society of South Africa, 49: 275-305.
- Hancock**, D. L. (1989) . Pest status southern Africa . In: World crop pests 3(A). Fruit flies their biology, natural enemies and control (Ed. By Robinson, A.S.; Hooper, G.) Elsevier, Amsterdam, Netherlands. : 51-58.
- Harley**, J.P. & Prescott, L.M. (1996) . Laboratory Exercises in Microbiology. 3rded .McGraw –Hill publishing company . New York.555pp.
- Harris**. E. J.; Mitchell, W. C.; Baumhover, A. H. and Steiner, L. F. (1968) . Mutilation and survival of sterile Oriental fruit flies and Melon flies . Journal of Economic Entomology,61(2): 493-496.
- Heimpel**, A.M. (1954). “Investigations of the Mode of Action of Strains of *Bacillus cereus* Frankland and Frankland Pathogenic for the Larch Sawfly, Doctoral dissertation, (Queen’s University, Canada).
- Höfte**, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology Reviews Vol.53 pp. 242-255.
- Hoq**, M.MD ; Shishir ,A.; Akter, A.; Hassan,H .Md. ; Kibria, G.; Ilias ,M. and Khan,N. S.(2012). Characterization of locally isolated *Bacillus thuringiensis* for the Development of Eco-friendly Biopesticides in Bangladesh . Jurnal Biopest, 5: 216-222 .
- Huang**, F.; L.L. Buschman; and R.A. Higgins. (2005). Larval survival and development of susceptible and resistant *Ostrinia* (Lepidoptera:

Pyralidae) on diet containing *Bacillus thuringiensis* . Agricultural and Forest Entomology, 7 :2 -45.

Hugue, H. and Ahmed, CH. R. (1969) . Studies on the Control of *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera: Tephritidae) by Sterile male release technique . The International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 20: 791-795 .

I

Ibrahim, M. A.; Griko,N.; Junker, M. and Bulla, L. A.(2010). *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective . January February,1:1:31-50.

J

James, M. and Harwood, R. (1979) . Entomology in human and animal health, chapter 13, Myiasis, 296-318, (Macmillan, London), PP:548.

Jensen , M.A.; Webster, J.A. and Straus, N. (2003). “Rapid Identification of Bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-amplified Ribosomal DNA,” Applied and Environmental Microbiology, 59: 945-952.

Jeyasankar, A. (2009). Chemical Ecology of Fruit Fly Management. Journal of Basic and Applied Biology, 3(1 & 2): 1-5.

Jisha, V. N.; Smitha , R. B. and Benjamin ,S. (2013). An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. Advances in Microbiology, 3:462-472. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.35062>.

K

Kapoor , V.C. (2005).Taxonomy and Biology of Economically Important Fruit Flies of Indian Journal of Entomolog., 35-36: 459-4.

Kondo, S., Mizuki, E., Akao, T. and Ohba, M. (2002). “Screening of *Bacillus thuringiensis* Parasporal Inclusion Proteins for Antitrichomonal

Activity ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine ,3: 97-100.

Koni, J., P. A., and Ellar D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin cyt B from *Bacillus thuringiensis*.”, Journal of Moleculer Biology, 257: 129-152

L

Lacey, A.L.; E. Riga; and W. Snyder. (2004). The potential for using insect specific pathogens for control of insect pest of potato . Journal of potato progress, vol. IV. no.1.

Lacey. LA., Frutos, R., Kaya, H.K .& Vail, P. (2001)." Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?" Biological Control 21, 230–248.

Laridon, N.(2006). Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain from South African soils and the characterization of its cry gene sequence .M.Sc.Thesis, School of Molecular and Cell Biology, University of the Witwatersrand,135PP.

Leben, S . D . ; Wadi , J . A . and Easton ,G.D. (1987) . Effects of pseudomonas fluorescens on potato plant growth and control of Verticillum dahliae .Phytopathology,77:1592-1595.

Li, R.S., Jarrett, P. and Burges, H.D. (1987). “Importance of Spores, Crystals and δ - endotoxins in the Pathogenicity of Different Varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*,” Journal of Invertebrate Pathology, 50: 277-284.

M

Maher, A. (1957) . On bionomics on *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera: Tephritidae) . Bulltein of the Entomological Society of the Egypt, XLI: 527-533.

- Maniatis** , T.; Fritsch, E. F. and Samboork, J. (1982) . Molecular cloning : A laboratory Manual . Cold spring Harbor Laboratory . New York, 458pp.
- Maria**, I. E. P. (2010) . Biology studies and improvement of *Ceratitis capitata* (Wied.) mass trapping control technique . Ph.D. thesis, School of Agricultural and Forestry Engineering, University of Lleida, Spain, 21-24.
- Martin**, P.A.W. and Travers, R.S.(1989). Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. Appied and Environmental Microbiology., 55: 2436- 2442.
- McClintock**, J.T.; Schaffer, C.R. and Sjoblad, R.D. (1995). “A Comparative Review of the Mammalian Toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based Pesticides, Pesticide Science., 45: 95-105.
- Michaael** , J. L. and Burton E. P. (2005) ."A photographic Atlas for microbiology laboratory" . Morton Publishing Company , 3rd ed USA, 1-81.
- Moanas**, A. M. H. and Abdul-Rassoul, M. S. (1988) . First record of *Dacus ciliatus* (Loew) (Diptera: Tephritidae) as a pest of cucumber in Iraq . Bull. Iraq Nat. His. Mus., 8(2): 173-174.
- Mohammed**, A. M.; Salama, M. S.; El-Yassaki, W. M. and Hamed, M. S.(2000) The impact of entomopathogenic isolates of *Bacillus thuringiensis* on the fertility and reproductive system of the female mothe of cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisp). Ain Shams University; President of the university a representative of the African
- Mohd-Salleh**, M.B. and Lewis, L.C.(1982). “Feeding Deterrent Response of Corn Insects to β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*,”Journal of Invertebrate Pathology, (39) :323-328.

- Morris**, O.N.; Converse, E.V. and Kanagaratnam, P. (1998). Isolation characterization, and culture of *Bacillus thuringiensis* from Soil and Dust from Grain Storage Bins and their Toxicity for *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). Canadian Entomologist, 130(4): 515- 537.
- Mozgovaya** , I.N.; Byzov, B.A.; Ryabchenko. N.F.; Romanenko, N. D. and Zvyagintsev, D.G .(2002)." Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* in soil". Pedobiologia, 46: 558-572.
- Mushtaha**, R. M.(2013). Characterization and Bioassay of Different Commercial Products of *B. thuringiensis* Against Four Larval Stages and Adults of an Insect *Tuta absoluta* in Laboratory. M.Sc. thesis, Faculty of Science , Department of Biological Sciences ,The Islamic University – Gaza,110pp.

N

- Nazemi**, A.; Tohidi,F.; Toulami,S.; Tameshkel,F.S.; Nourani,N.; Seyedinasab,S.R.; Jafarpour,M. and Tolami,H.F.(2013). Isolation and molecular identification of cry gene in *Bacillus thuringiensis* .European Journal of Experimental Biology, 3(2):452-456.
- Nicholl** , D.S.T . (2008) . An introduction to genetic engineering . Third edition . Cambridge University press, 509pp.
- Norrbom**, A. L. (1994) . New genera of Tephritidae (Diptera) from Brazil and Dominican Amber with Phylogenetic analysis of the tribe Ortalotrypetini , Insecta Mundi, 8(1-2): 1-15.

Norrbom, A. L.; Carroll, L. E. and Freiberg, A. (1999) . Status of Knowledge . PP: 9-47 . In: Thompson, F. C. (ed.), (1998) . Fruit fly Expert Identification System and Systematic Information Database . Myia (1998) Q:Viix 524 PP. and Diptera Data Dissemination Disk 1 .

Norrbom, A. L.; Carroll, L. E.; Thompson, F. C.; White, I. M. and Friedberg, A. (1999a) . Systematic database of names . In: Thompson, F. C. (ed.), (1998) . Fruit fly Expert System and Systematic Information database , Diptera data dissemination disk , 65-252pp .

Q

Obeidat, M.; AL- Momani, F. and Saadoun, I.(2000). Diversity of *Bacillus thuringiensis* in different habitats of northern Jordan. Journal of Basic Microbiology, 40(5-6): 385- 388.

Obeidat, M.; Hassawi, D. and Ghabbeishi, I.(2004) Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller. African Journal of Biotechnology, 3(11): 622- 626.

Ohba, M. and Alzawa ,K. (1985). Distribution of *B. thuringiensis* in soils of Japan. Journal of Invertebrate Pathology, Vol. 47, , 277- 282.

P

Palma, L.; Muñoz ,D.; Berry, C.; Murillo, J. and Caballero ,P.(2014) *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity . Open Access Toxinology Journal, 6: 3296-3325 .

Petras, S. F. and Casida, L. E.(1985) .Survival of *B. thuringiensis* spores in the soil .Applied Enviornmental. Microbiology, 50 (1):1495- 1501.

Poncet, S.; Delecluse, A.; Anello, G.; Klier, A. and Rapoport, (1994). “Evaluation of Synergistic Interactions among CryIVA, CryIVB, and

CryIVD Toxic Components of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Crystals,” Journal of Invertebrate Pathology, 66: 131-135.

Porcar, M. and Juárez-Pérez ,V.(2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. Elsevier Science B.V, 5: 419-432.
www.fems-microbiology.org.

R

Ramírez-Lepe, M. and Ramírez-Suero M. (2012). Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis, Insecticides - Pest Engineering, Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN, 978-953307-895-3.

Rand, N.d.(2009) . Isolation of Entomopathogenic Gram Positive Spore Forming Bacteria Effective Against Coleoptera .ph.D thesis, Faculty of Science and Agriculture, University of KwaZulu-Natal,160pp.

Reddy, Y.C.(2001). Studies on *Bacillus thuringiensis* proteases involved in the production of insecticidal toxins from protoxins. Ph.D. thesis, University College of Science, Department of Biochemistry, Osmania University,172pp.

Royer , E. J. and Hancock, D.L. (2012). New distribution and lure records of Dacinae (Diptera: Tephritidae) from Gweenland. Asturalia and description of a new species of Dacus fabricius. Australian Journal of Entomology, 51:239-247.

S

Salama, H.S.; Foda ,M., Laki, F. and Ragaei, M.(1986). On the distribution of *B thuringiensis* and closely relaed *Bacillus cereus* in Egypton soils and their activity against cotton insects. Angewandte Zoologie, (3): 257-265.

- Sambrook**, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York, USA. 5.2-5.14, 8.2.
- Sanchis**, V. and Bourguet, D. (2008). *Bacillus thuringiensis* applications in agriculture and insect resistance management. An International Journal in Agriculture & Environment 28 :11–20.
- Schnepf**, E.; Crickmore, N.; Van-Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R.; and Dean, D. H. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its insecticidal proteins". Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 774-806.
- Schroeder**, W. J.; Chambers, D. L. and Miyabara, Y. (1973) . Reproduction of Melon fly , Mating activity and Mating compatibility of flies treated to function in sterile-release programs . Journal of Economic Entomology, 1-66: 661-663
- Schünemann**, R. ; Knaak, N. and Fiuza, L.M.(2014). Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. International Scholarly Research Notices Article ID 135675, 12 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135675>.
- Sela**, S., Schickler, H.; Chet, I. and Spiegel, Y. (1988). "Purification and Characterization of *Bacillus cereus* Collagenolytic/proteolytic Enzyme and Its Effect on *Meloidogyne javanica* Cuticular Proteins," European Journal of Plant Pathology, 104: 59-67.
- Soberón**, M.; Rodríguez-Almazán, C.; Muñoz-Garay, C.; Pardo-López, L. ; Porta, H. and Bravo, A.(2012). *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to

overcome insect resistance in the field. Pesticide Biochemistry and Physiology ,104(2):111–117 <http://www.elsevier.com/locate/pest> .

Srivastava, B. G.; Pant, N. C. and Chaudhry, H. S. (1983) . Effect of some antimicrobial artificial diet on the growth and development of *Dacus cucurbitae* (Coquillett) maggots . Indian Journal of Entomology, 45(4) : 384-386 .

Stahly, D.P.,Dingman, D. w.; Bulla, L. A.; and Aronson, A. I. (1978). Possible origin and function of the parasporal crystal in *Bacillus thuringiensis*. Biochem. and Biophysic. Research Communi, 84: 581-588.

Stephenson, F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology : A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition . Elsevier.USA. CH-2,18-34.

Subramaniam, S.; Fun Chai,p.; Rathinam,X.; Marimuthu,K .and Solayyapan,M.(2014). Soil enrichment and dominant occurrence of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* in a garden sprayed with *Bacillus thuringiensis* based biopesticide. Malaysian Journal of Microbiology, 10(4): 255-259.

T

Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983). “*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Crystal δ -endotoxin: Effects on Insect and Mammalian Cells in vitro and in vivo,” journal of Cell Science. 60; 181-197.

Travers, R.S.; Martin, P.A.W. and Reichelderfer, C.F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.*, Applied and Environmental Microbiology, 53: 1263-1266.

Travis, R.G. & Maureen, O.C. (2000) " *Bacillus thuringiensis* Biology, Ecology and Safety" John Wiley and Sons, New York.

W

Web (2005). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, 20/03/2005.
<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/index.html>.

WHO (2000). Environmental Health Criteria, *Bacillus thuringiensis* International Program on Chemical Safety, Switzerland.

Y

Youssef, N.A. and Hassan, G. M. (2013). Bioinsecticide activity of *Bacillus thuringiensis* isolates on tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) and their molecular identification. African Journal of Biotechnology, . 12(23), 3699-3709.

Yu, C-G.; Mullins, M.A.; Warren, G.W.; Koziel, M.G. and Estruch, J.J. (1997). "The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects," Applied and Environmental Microbiology. 63: 532-536.

Z

Zhang, H.Y.; Yu, Z.N. and Deng, W.X. (2000). "Isolation, Distribution and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Warehouses in China," Crop Protection. 19: 24.

Zi-Shan, Z. ; Su-juan, Y. ; Chang-long, S. ; Fu-ping, S. ; Xue-ping, S. and Jie, S. (2015). Comparison and Optimization of the method for Cry1Ac protoxin preparation in HD73 strain. Journal of Integrative Agriculture, 3 (14):60950-3119.

C

Çetinkaya, F. T. (2002). Isolation of *Bacillus thuringiensis* and Investigation of Its Crystal Protein Genes .thesis, Graduate School in Partial Fulfillment,

Department of Biotechnology and Bioengineering, İzmir Institute of Technology İzmir, Turkey:62.

Ø

Økstad, O. A. and Kolstø ,A. -B.(2011). Genomics of Bacillus Species. In: Wiedmann, M. and Zhang, W.(Eds.) . Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens. CBS Publishers, New Delhi, India:pp.29-37.

ملحق (1) أنواع البوداعى المستعملة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseoro,
Daedeok-gu, Daejeon, 306-220,
South Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8521
Fax: +82-42-930-8700
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: 1-877-264-4300
Fax: 1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerus.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
403 Room, Building 88, no. 887,
Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park,
PuDong New District, Shanghai 201203, China
Tel: +86-21-5080-0969
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sansu B/D, #66, Gangnam-daero
30-gil, Seocho-gu, Seoul, 137-130,
South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Bioneer Oligo Synthesis Report

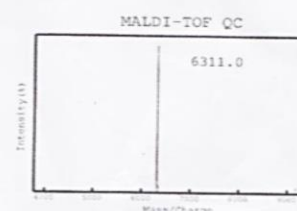
Dr. Hazim Saadoon

Order No. : A20141128-031

IDREES 16S rDNA-F

AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT

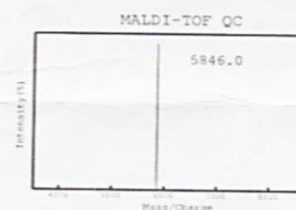
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	55.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6311.0 g/mole
Tm	55.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	95.1 ul



IDREES 16S rDNA-R

AGG AGG TGA TCC AAC CGC A

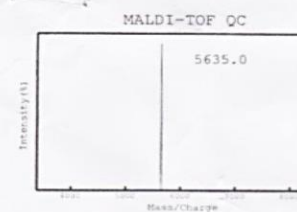
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	57.9 %
Length	19mer	Molecular Weight	5846.7 g/mole
Tm	57.3 C	Volume for 100 pmoles/ul	104.0 ul



IDREES CU-F

GGA TTG GAA TGG GAA ACA

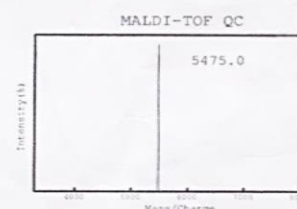
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	44.4 %
Length	18mer	Molecular Weight	5636.6 g/mole
Tm	49.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	104.1 ul



IDREES CU-R

AAA TAG CCG CAT TGA CAC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	44.4 %
Length	18mer	Molecular Weight	5476.5 g/mole
Tm	47.9 C	Volume for 100 pmoles/ul	111.2 ul



ملحق (2) الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة 100bp DNA Ladder

BIONEER
 Innovation • Value • Discovery

100 bp DNA Ladder

DNA Molecular Weight Markers

Headquarters

 49-2 Munpyeong-dong,
 Daedeok-gu, Daejeon 306-220,
 South Korea
 Tel: +82-42-930-8777
 Fax: +82-42-930-8688
 E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.

 1000 Atlantic Avenue
 Alameda, CA 94501 USA
 Toll free: 1-877-264-4300
 Fax: 1-510-865-0350
 E-mail: order.usa@bioneer.com

Seoul Office

 Sansu Building 2nd floor,
 6, Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul
 137-130, South Korea
 Tel: +82-2-598-1094
 Fax: +82-2-598-1096

Order

 Korea Market only: 1588-9788
 E-mail: order@bioneer.co.kr
 Website: www.bioneer.com

 [Cat. No.]
 D-1030

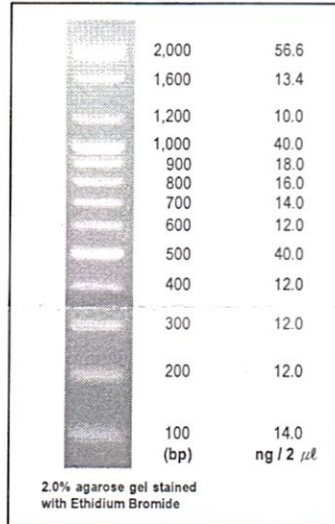
 [Lot No.]
 1103K

 [Volume]
 250 μL

 [Concentration]
 135 ng/ μL

• **Description** : 100 bp DNA Ladder is specially designed for determining the size of double strand DNA from 100 to 2,000 base pairs. The DNA Ladder consists of 13 double strand DNA fragments ranging in sizes from 100 to 1,000 bp in 100 bp increments, and additional fragments of 1,200, 1,600, 2,000 bp. The 500, 1,000 and 2,000 bp bands are two to three times brighter for easy identification

• **Application** : Size confirmation of DNA fragments.



• Features

- ready-to-use
- Recommended Loading : 1.5 - 2.0 μL /5 mm lane width
- Typical Loading Number of Lanes : 125 - 166 (5 mm lane width)
- Range (bp) : 100 - 2,000
- Number of Bands: 13

• Storage Buffer

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 2.5% Ficoll
- 0.005% Bromphenol Blue
- 0.005% Xylene Cyanol

• Storage Condition

This product is shipped on dry ice and should be stored at -20°C until use.

• **Quality control assay** : Agarose gel analysis shows that 13 bands are clearly distinguishable. The 500 bp, 1,000 bp and 2,000 bp band must be more intense than any other band.

• Note

- The DNA ladder can be applied directly onto an agarose gel.
- Do not heat before loading.
- Repeated freezing and thawing should be avoided.

• Ordering Information

[Related BIONEER DNA Molecular Weight Marker Products]

Cat. No.	Products	Cat. No.	Products
D-1010	10bp DNA Ladder, 100 μL	D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 μg
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 μL	D-1070	Lambda DNA / EcoR I + Hind III Markers, 100 μg
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 μL	D-2510	Lambda DNA, 250 μg
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 μL	D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 μL x 2
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 μL	D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 μL x 2
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 μg		

Note

For research use only. Not for Use in diagnostic or therapeutic procedures.

Bioneer shall not in any event be liable for incidental or special damage of any kind resulting from any use except on application(s).

ملحق (3) دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي لـ PCR

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseoro
Daedeok-gu, Daejeon 306-220
South Korea
Tel: (Korea) 1588 - 9788
(International) + 82 - 42 - 930 - 8777
Fax: + 82 - 42 - 930 - 8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: + 1- 877 - 264 - 4300
Fax: + 1 - 510 - 865 - 0350
E-mail: order.usa@bioneer.us.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
403 Room, Building 88, no. 887
Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park
PuDong New District, Shanghai 201203 China
Tel: + 86 - 21 - 5080 - 0969
Fax: + 86 - 21 - 5080 - 1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sansu B/D, #66, Gangnamdaero
30-gil, Seocho-gu, Seoul 137-130
South Korea
Tel: + 82 - 2 - 598 - 1094
Fax: + 82 - 2 - 598 - 1096

Order
Domestic only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
URL: www.bioneer.com

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.

Advantages

Speed

Substantial reduction in PCR setup time.

Stability

AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield

Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity

Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component	Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase		1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)		10 mM	10 mM
KCl		30 mM	30 mM
MgCl ₂		1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye			

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to AccuPower® PCR tube.

Concentration of template DNA and primer

	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 - 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole

- Add distilled water to AccuPower® PCR tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	50 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
		K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
	10 ul	K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
		K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
		K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
		K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix		K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

A complete product list appears on our web site at www.bioneer.com.

Summary

This study included the isolation of pathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* from different environmental sources in Diyala province, diagnosis biochemical and genetic partial ways, Mar 50 samples collected from different soils, namely, (agricultural soils and garden soils and non-agricultural soils) as well as from the water, from five districts in the province of Diyala (Baquba, Khalis, Muqdadiah, Khanaqin, Balad Ruz) for the period from 1 \ 9 \ 2014 to 20 \ 11 \ 2014. Showed the results of biochemical diagnosis and the presence of four samples and by percent 8% It was of a negative for transplantation bacterial and 46 sample growth by percent 92% It was of a growth positive for transplantation bacterial and found that 41 samples of which by percent 82% belong to the genus *Bacillus* and the species of *Bacillus thuringiensis* and the percentage of bacteria isolated of agricultural soils 94% and soils garden 93% and water 75%, and soils non-agricultural 44%. The pathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* of positive bacteria a gram dye and spore forming and The most of the natural habitat this bacterium is soil and it is capable of producing the diversified varieties of crystalline proteins with insecticide property. All isolates were tested for this bacteria that which were able growth on the media selective Acetate Sodium Selective and the production of insecticidal crystalline proteins (ICP) When staining by dye Coomassie brilliant blue (CBB) to conduct genetic partial diagnosis using several extraction (Mini gDNA Bacteria kit) processed by Bioneer company was the purity of DNA extracted ranging between (20.1–1.22) for all selected isolates, have been diagnosed with the bacteria at the level of genus and species Using the gene 16S rDNA with a molecular weight of 380 base pairs where the results showed polymerase chain reaction (PCR) that all isolates contain this gene and the same molecular weight which is 380 base pairs, also was diagnosed isolates containing the gene component crystalline proteins which cry a e molecular weight 200 base pairs using

primer a specialist for this gene in polymerase chain reaction showed the results of gene doubled that all isolates contained the gene and the same molecular weight of 200 base pairs. After making sure of pathogenic bacteria as belonging to the genus *Bacillus* and species *Bacillus thuringiensis* according to their chemical diagnostics biochemical and diagnostic genetic partial, attended different concentrations They (1,2,3,4,5) g/L Of the bio preparation for these bacteria to study their impact on the different roles of Cucurbits fruit fly *Daus ciliatus*.

Has been tested the effect of different concentrations of bio-preparation of these bacteria isolated from soil and water on the roles of this insect which eggs and larvae and pupa and Adults

The results of test the effect of bio-preparation of these bacteria on the eggs of age (1-2) Since the highest rate of hatchling (3.2) and by (89%) at a concentration of 1 g / l of bio- preparation and lowest hatchling (0.6) and by (19%) at a concentration of 5 g / L of bio- preparation comparison with control (3.2) and by (96%) for the isolated bacteria from soil Since the highest rate of hatchling (3.1) and by (92%) at a concentration 1 g / L of bio- preparation and lowest hatchling (2.1) and by (62%) at a concentration of 5 ,4 g / L of bio- preparation comparison with control (3.2) and by (96%) for isolated bacteria from water, and on The last larval phase, The highest the value of the rate of highest (2.0) and by (99%) at a concentration of 5 g / L of bio- preparation and The less the value of the rate of loss (0.5) and by (26%) at 1g / L of bio- preparation concentration compared with the control treatment (0.07) and by (%3) for isolated bacteria from soil .reached its highest value the loss rate (1.2) and by (57%) at a concentration of 5 g / L of bio- preparation and less the value of the loss rate (1.0) and by(6%) at a concentration 1 g / L of bio- preparation comparison with control (0.07) and by (3%) for the bacteria isolated from water and on pupa age(6-7) day, reaching the highest rate of emergence of pupa(3.2) and by (92%) at a concentration of 1 g / L of bio- preparation and less the emergence of pupa rate (0.4) and (13%) at a concentration of 5 g /L of bio- preparation comparison with control (3.2) and by 96% for

bacteria isolated from soil reaching the top of the emergence of pupa rate (3.1) and by (92%) at a concentration of 1 g / L of bio- preparation and less the emergence of pupa rate (2.1) and by (62%) at a concentration of 5 g / L of bio- preparation comparison with control (3.2) and by (96%) for bacteria isolated from water. and on kill adult, The highest killing rate for males (1.6) and by (32%) and females (1.5) and (30%) at a concentration of 5 g / l of bio- preparation and less killing of the male rate (0.5) and (10%) and females (0.4) and by (13%), comparison with control males (0.1) and by (2%) and females (0.1) and by (2%) for the isolated bacteria from soil. The highest kill the male rate (0.8) and by (32%) and females (0.7) and (30%) at a concentration of 5 g / L of bio- preparation ,and less killing of the male rate (0.2) and (4%) and females (0.4) and by (13%) at a concentration of 1 g / L of bio- preparation comparison with control males (0.1) and by (2%) and females (0.1) and by (2%)for the isolated bacteria from water and one female productivity of egg reached its highest production rate eggs 84.5 eggs per female at a concentration of 1 g / L of bio- preparation, and less egg production rate of 54.5 eggs per female at a concentration of 5 g / L of bio-preparation comparison with control eggs productivity rate of 87.5 egg female for isolated bacteria from soil reaching its highest egg production rate (85%) eggs per female at a concentration of 1 g / L of bio- preparation, and less egg production rate (79.5%) eggs per female at a concentration of 5 g / L of bio -preparation ,compared with treatment control productivity rate of whites (85.5%) eggs per female for isolated bacteria from the water

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences



Isolation and Characterization of bacteria
Bacillus thuringiensis and study their impact on
the living standards of some of the fruit fly
cucurbits *Dacus ciliatus* (Diptera : Tephritidae)

A Thesis submitted to the Council of
the College of Education for Pure Sciences / Diyala University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science In

Biology / Microbiology

By

Idriss saleh galeel

Supervised by

Professor *Dr. Adnan Neama Abdolreza*

Muharram 1436A.H

December 2015A.D