

الكفاءة الحقلية لثلاث عزلات من بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner لمكافحة نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb على برتقال أبو صرة

أحمد السيد إسماعيل ومحمد فاضل
المركز القومي للبحوث، الدقى، ص. ب. 12311، القاهرة، مصر

الملخص

إسماعيل، أحمد السيد ومحمد فاضل. 2004. الكفاءة الحقلية لثلاث عزلات من بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner لمكافحة نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb على برتقال أبو صرة. مجلة وقاية النبات العربية. 22: 29-34. تناول هذا البحث تقييم فاعلية ثلاث عزلات مصرية (*B.t. NRC60*, *B.t. NRC63*, *B.t. VF41*) من بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner وذلك كوسيلة للمكافحة الحيوية لنيماتودا التدهور البطيء في الموالح *Tylenchulus semipenetrans* Cobb في محطة بحوث البساتين بمحافظة الشرقية، مصر. تم تحضير هذه العزلات بطريقة التخمير على الحالة الصلبة (SSF)؛ وثلاثة معدلات هي 6، 9 و 12 غرام لكل شجرة (تعدل 1، 1.5 و 2 كيلو غرام لكل 4200 م²)، تم وضعها عند منطقة نقاط الري وذلك بعد إضافة 100 مل من الماء إلى كل جرعة فتكون درجة الأس الهيدروجيني (pH) = 10.5، ثم تترك لمدة 30 دقيقة يكمل بعدها إلى لتر لتصبح قيمة الأس الهيدروجيني = 7.8. أظهرت النتائج أن جميع جرعات العزلات الثلاثة للبكتيريا المختبرة نجحت في تقليل أعداد نيماتودا التدهور البطيء في الموالح بدرجة معنوية مقارنة مع الشاهد، كما وجدت اختلافات معنوية في أعداد النيماتودا بين عزلات البكتيريا الثلاثة وأيضاً داخل جرعات العزلة الواحدة. تبين من النتائج وجود علاقة ارتباط (تلازم) موجبة بين النسب المئوية لتخفيض أعداد النيماتودا وبين جرعات العزلات الثلاثة للبكتيريا؛ كما اتضح من تقييم العزلات الثلاثة للبكتيريا وفقاً للنسبة المئوية للفاعلية أن الجرعة المتوسطة (1.5 كيلو غرام / 4200 م²) من العزلة *B.t. NRC 63* كانت أكثر فاعلية (تفوق) في خفض أعداد النيماتودا وذلك خلال أربعة شهور متتالية (أب/أغسطس - تشرين الثاني/نوفمبر) ابتداء من الشهر الثاني بعد إضافة البكتيريا في الحقل؛ في حين تفوقت الجرعة العالية (2.0 كيلو غرام / 4200 م²) من العزلتين *B.t. NRC60* و *B.t. VF41* في إنقاص أعداد النيماتودا وذلك خلال خمسة شهور متتالية (تموز/يوليو - تشرين الثاني/نوفمبر) من بعد إضافة البكتيريا.

كلمات مفتاحية: بكتيريا *Bacillus thuringiensis*، مكافحة إحيائية، نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات، *Tylenchulus semipenetrans*، مصر.

المقدمة

سجلت نيماتودا الموالح/الحمضيات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913 كإحدى الآفات النيماتودية المنتشرة عالمياً في بساتين الموالح / الحمضيات في مناطق عديدة من العالم خاصة في الأراضي الرملية حديثة الاستصلاح (7). ومن المحتمل أن تكون أكثر من 50% من المساحات المنتجة للموالح مصابة بهذه النيماتودا (25)، مسببة ضرراً اقتصادياً ونقصاً في المحصول تراوح من 7.7-14.2% (20). خلال الفترة الماضية قام عدد من العلماء في مصر بعدة دراسات عن نيماتودا التدهور البطيء في الموالح (2، 3، 13، 17). أشارت عدة دراسات تم إجراؤها تحت ظروف المختبر أو الدقيقة (البيوت الزجاجية) أن بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner لها تأثير مثبط معنوي في خفض عدد من أجناس النيماتودا إضافة إلى تحسين نمو النباتات تحت الدراسة دون إحداث آثار جانبية على الإنسان والحيوان وعناصر البيئة الأخرى (1، 5، 11، 12، 14). لهذا أجرى هذا البحث لتقييم فاعلية ثلاث عزلات من بكتيريا *B. thuringiensis* لمعرفة قدرتها في مكافحة نيماتودا التدهور البطيء في الموالح *T. semipenetrans* التي تصيب برتقال أبو صرة صنف واشنطن "Washington Navel" تحت ظروف الحقل.

مواد البحث وطرائقه

تجهيز اللقاح البكتيري

تم الحصول على ثلاث عزلات من بكتيريا *B. thuringiensis* هي: *B.t. NRC63*، *B.t. VF 41* و *B.t. NRC 60*، من مختبر الكيمياء الميكروبية بالمركز القومي للبحوث، القاهرة، مصر. عزلت جميع العزلات من البيئة المصرية. تم إعداد اللقاح البكتيري في دوارق مخروطية سعة 500 مل تحتوي على 50 مل من بيئة معقمة مكونة من المواد الآتية (بالغرام/لتر): 1.5 غ مستخلص اللحم، 3.0 غ مستخلص الخميرة، 6.0 غ بيببتون و 1.0 غ جلوكوز. تم تلقیح الدوارق بمزارع البكتيريا المحفوظة على بيئة آجار مغذى؛ ثم حضنت على جهاز هزاز دوار بواقع 180 دورة/دقيقة لمدة 48 ساعة عند درجة حرارة 28 س.

إكثار المزارع البكتيرية

استخدمت المزارع البكتيرية السابقة في تلقیح (عدوى) دوارق دائرية ذات قاع مسطح سعة 10 لتر مزودة بهزاز مغناطيسي وعحتوية على 5 لتر من البيئة المعقمة الآتية (بالغرام/ لتر): 40.0 غ خميرة خبازي، 2.0 غ بوتاسيوم ثنائي الأيدروجين فوسفات و 0.5 غ سلفات ماغنسيوم. تم تحضير الدوارق على هزاز مغناطيسي عند درجة حرارة 28 س لمدة 4 أيام، ثم استخدمت المزرعة الفعالة كلقاح.

التخمير على الحالة الصلبة (SSF) Solid State Fermentation

استخدمت المزارع البكتيرية السابقة كل على حدة في تلقيح خليط 5 كيلو غرام بنسبة 3:2 (وزن: وزن) مكون من مخلفات صناعة البن (واردة من شركة مصر للبن، مدينة العاشر من رمضان، مصر) وخميرة الخبازي (واردة من شركة السكر والصناعات التكاملية، مدينة الحوامدية، مصر). ترك الخليط فترة 5 أيام للتخمير ثم جفف باستخدام فرن هوائي عند درجة حرارة 28 س وذلك للحصول على سموم الأبواغ البكتيرية. مزج المنتج الجاف بخليط مكون من 1% هيدروكسيد كالسيوم (وزن: وزن)؛ 1% مولاس (وزن: وزن) بالإضافة إلى 0.01 غ من مادة توين 80 "Tween 80" كمادة ناشرة ثم خزن المنتج لحين استخدامه في الحقل.

التطبيق الحقل

تم اختيار بستان برتقال أبو صرة صنف "Washington Navel" أشجاره بعمر 7 سنوات مزروعة على مسافات 5x5 متر وبمعدل 168 شجرة/4200 م² ويروى بنظام الري بالتقطيط. تربة البستان رملية طميية (85% رمل، 5% سيلت و 10% طمي) حديثة الاستصلاح ملوثة طبيعياً وبكثافة عالية بالنيماتودا المسببة لمرض التدهور البطيء في الموالح / الحمضيات وأجناس نيماتودية أخرى قليلة العدد والأهمية. ويقع البستان بمركز بحوث البساتين، مدينة القصاصين، محافظة الشرقية، مصر.

جهزت التحضيرات Formulations على صورة بودرة من العزلات البكتيرية المحتوية على خليط من السموم والأبواغ البكتيرية حيث أضيفت بمعدل 1، 1.5 و 2.0 كيلو غرام/4200 م² (تعادل 6، 9 و 12 غرام/ شجرة) من كل عزلة بكتيرية وكل عزلة على حدة. قبل التطبيق تمت إذابة بودرة العزلات البكتيرية في 100 مل ماء صلبور فكانت درجة حموضته (pH) = 10.5 ثم تركت لفترة 30 دقيقة، بعدها أكمل المعلق إلى لتر من ماء الصلبور لتعديل درجة الحموضة إلى 7.8 وذلك لإتاحة ذوبان الكريستالات البروتينية للبكتيريا في وسط قلوي (24). تمت إضافة المعلق البكتيري على سطح التربة بمنطقة حجر (ظل) الشجرة حول نقاط الري مع خلطها وتغطيتها بالتربة ثم تم ري الحقل مباشرة. تم إجراء معاملات التطبيق في شهر حزيران/يونيو، 1998. صممت التجربة بنظام الشرائح المشقة بواقع 7 شجرات لكل معاملة بالإضافة إلى معاملة الشاهد.

استخلاص وتقدير الكثافة العددية للنيماتودا

تم جمع عينات تربة وعينات جذور مغذية (شعيرات جذرية) من عمق 20 سم أسفل حجر الشجرة كلاً على حدة من أشجار البرتقال أبو صرة لكل معاملة قبل تطبيق المعاملات البكتيرية مباشرة وذلك لاستخلاص وتقدير الكثافة العددية الأولية (Initial population) للنيماتودا المسببة لمرض التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات. كما جمعت عينات مماثلة شهرياً بعد التطبيق وذلك خلال الفترة من

تموز/يوليو - تشرين الثاني/نوفمبر. تم استخلاص يرقات الطور الثاني وذكور النيماتودا من 250 غرام تربة باستخدام طريقة المصافي والترويق (4). أما عينات الجذور فقد غسلت جيداً من التربة العالقة ومن ثم استخلصت منها النيماتودا (يرقات الطور الثاني حديثة الفقس) من حوالي 5 غرامات جذور بإتباع طريقة التحضين لمدة 7 أيام عند درجة حرارة 25±5 س باستخدام أطباق برمان (23). ووفقاً للأعداد الأولية والنهائية (قبل وبعد التطبيق) لنيماتودا التدهور البطيء في الموالح وأعدادها في معاملة الشاهد (غير المعاملة) تم تقييم فاعلية الجرعات المختلفة لعزلات البكتيريا الثلاثة وذلك بحساب النسبة المئوية للفاعلية حسب المعادلة التالية (18):

[1- (أعداد النيماتودا في الأشجار المعاملة بعد التطبيق) / أعداد النيماتودا في الأشجار المعاملة قبل التطبيق) × (أعداد النيماتودا في الأشجار الشاهد قبل التطبيق) / أعداد النيماتودا في الأشجار الشاهد بعد التطبيق] × 100

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام طريقة أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمال 1% و 5%، وتم أيضاً استخدام تحليل علاقة الارتباط (التلازم) Correlation's analyses وتقدير معامل الارتباط (r) لتحديد العلاقة بين جرعات عزلات البكتيريا الثلاثة ونسبة الخفض في الكثافة العددية للنيماتودا.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج التجربة الموضحة في الجدولين 1 و 2 أن العزلات الثلاثة المختبرة للبكتيريا *B. thuringiensis* قللت أعداد نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات بدرجة معنوية (P=0.01) "مع قليل من الاستثناءات" سواء الموجودة بالتربة أو بالجذور طوال فترة التجربة وذلك عند مقارنتها بمعاملة الشاهد. كما أوضحت النتائج وجود فروقات معنوية (P=0.05) بين عزلات البكتيريا في الكثافة العددية للنيماتودا بين بعض المعاملات، وبين جرعات العزلة البكتيرية الواحدة. في حين لا توجد فروق جوهرية "مع قليل من الاستثناءات" بين أعداد النيماتودا لكل جرعة من عزلات البكتيريا الثلاثة المختبرة خلال الشهور الخمسة بعد التطبيق (تموز/ يوليو - تشرين الثاني/نوفمبر) (الجدولين 1 و 2). كما وجدت علاقة ارتباط موجبة معنوية بين النسب المئوية لخفض أعداد النيماتودا طوال الشهور الخمسة بعد التطبيق وبين جرعات العزلات الثلاثة للبكتيريا إذ بلغت قيمة معامل الارتباط (r) = 1.00، 0.88، 1.00، 0.91 و 1.00 لأعداد النيماتودا الموجودة في عينات التربة، و 0.94، 0.94، 1.00، 0.94 بالنسبة لأعداد النيماتودا الموجودة في عينات الجذور، للأشهر تموز/ يوليو، آب/ أغسطس، أيلول/ سبتمبر، تشرين الأول/ أكتوبر و تشرين الثاني/ نوفمبر، على التوالي.

يبين جدول 3 أن الجرعة العالية (2 كغ/4200 م²) من عزلة البكتيريا B.t. NRC 63 تفوقت (أي أعطت أعلى نسبة مئوية للفاعلية) على المعاملات الأخرى مرة واحدة خلال شهور التجربة الخمسة (في

شهر تموز/ يوليو) أي بعد شهر واحد فقط من التطبيق في خفض الكثافة العددية للنيماطودا سواء بالتربة أو بالجذور. في حين أن الجرعة المتوسطة (1.5 كغ/4200 م²) من نفس العزلة تفوقت 4 مرات خلال الفترة من شهر آب/أغسطس إلى شهر تشرين الثاني/نوفمبر. كما أن الجرعة العالية (2 كغ/4200 م²) من كل من العزلتين B.t. VF 41 و B.T. NRC 60 تفوقت خمس مرات متتالية في إنقاص أعداد النيماطودا أي من شهر تموز/يوليو إلى شهر تشرين الثاني/نوفمبر. وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراسات سابقة (1, 11, 12). إذ وجد في دراسة سابقة أن تطبيق بكتيريا *B. thuringiensis* تحت ظروف المختبر أو البيوت الزجاجية (الدفينة) أدى إلى تثبيط سلوك وتقليل الكثافة العددية لأنواع النيماطودا *Helicotylenchus exallus*.

جدول 1. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner في الكثافة العددية لنيماطودا التدهور البطيء *Tylenchulus semipenetrans* Cobb في 250 غرام تربة برتقال أبو صرة صنف "واشنطن".

Table 1. Effect of three *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates on population of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb in soils of Washington Navel orange orchards.

أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 1% LSD at 1%	أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at 5%	الكثافة العددية للنيماطودا في التربة بعد التطبيق* Nematode population in soil after periods of application*					الكثافة العددية الأولية للنيماطودا قبل إضافة البكتيريا Nematode population before the application of B.t. product	العزلات والجرعات Isolates and doses
		150 يوم 150 days	120 يوم 120 days	90 يوم 90 days	60 يوم 60 days	30 يوم 30 days		
765	559	360 (75)	127 (89.3)	264 (88.2)	100 (79.6)	548 (79.1)	1309	B.t. NRC63 1.0 كغ/4200 م ² 1 كغ/4200 م ²
1446	1056	66 (97.1)	93 (95)	193 (94.5)	98 (87)	209 (94.9)	2060	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 كغ/4200 م ²
178	130	39 (85.2)	29 (86)	46 (88.3)	32 (64.7)	29 (94)	225	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 كغ/4200 م ²
613	448	1254 (68-)	697 (13.9)	412 (63.9)	184 (28.9)	213 (84)	673	B.t. NRC60 1.0 كغ/4200 م ² 1 كغ/4200 م ²
427	312	338 (69.8)	250 (73)	66 (96.1)	134 (65.4)	179 (91)	1007	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 كغ/4200 م ²
924	673	148 (93.4)	200 (89)	59 (98.3)	52 (93.3)	119 (97)	2010	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 كغ/4200 م ²
1120	818	654 (79.2)	135 (77.7)	474 (82.2)	413 (71.1)	692 (60.4)	1572	B.t. VF41 1.0 كغ/4200 م ² 1 كغ/4200 م ²
195	142	234 (61.6)	33 (69)	32 (93.2)	384 (52.5)	312 (1.4-)	277	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 كغ/4200 م ²
970	708	176 (92.2)	32 (92.6)	32 (98.3)	111 (89.1)	61 (95.1)	1121	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 كغ/4200 م ²
1710	1249	1519	1239	2301	534	2732	1362	الشاهد (غير المعاملة) Untreated trees
		845	346	792	100	352		أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at 5%
		1138	465	1067	135	473		أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 1% LSD at 1%

* Values are means of seven replicates

* القيم هي متوسطات 7 مكررات.

تشير القيم بين الأقواس على النسبة المئوية لخفض أعداد النيماطودا في التربة حسب النسبة المئوية للفاعلية وفقاً لمعادلة Henderson and Tilton (18).

Figures in parenthesis indicate percentages of nematode reduction in soil based on % efficiency according to Handerson and Tilton (18).

جدول 2. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Berliner في الكثافة العددية لنيماتودا التدهور البطيء *Tylenchulus semipenetrans* Cobb في 5 غرام جذور برتقال أبو صرة صنف " واشنطن".

Table 2. Effect of three *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates on population of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb in Washington Navel orange tree roots (5 gram).

أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 1% LSD at 1%	أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at 5%	الكثافة العددية للنيماتودا في الجذور بعد التطبيق* Nematode population in roots after periods of application*					الكثافة العددية الأولية للنيماتودا قبل إضافة البكتيريا Nematode population before the application of B.t. product	العزلات والجرعات Isolates and doses
		150 يوم 150 days	120 يوم 120 days	90 يوم 90 days	60 يوم 60 days	30 يوم 30 days		
								B.t. NRC63
504	368	583 (5.2-)	121 (82)	239 (73.7)	142 (74.7)	414 (31)	449	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
331	242	152 (75.1)	84 (87.4)	122 (89.1)	43 (92.1)	291 (51.1)	446	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
40	30	29 (86.9)	31 (87.2)	28 (93.1)	30 (84.8)	32 (85.2)	162	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²
								B.t. NRC60
1010	738	2101 (78.6-)	646 (49.6)	767 (64.3)	336 (67.9)	365 (68.1)	859	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
305	223	405 (2)	208 (54)	101 (86.6)	202 (45.2)	205 (60)	302	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
587	429	312 (72.2)	43 (96.6)	93 (95.5)	145 (85.5)	147 (89.4)	820	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²
								B.t. VF41
469	342	649 (16.1-)	384 (36.9)	262 (74.3)	588 (18.2)	268 (50.1)	408	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
291	211	39 (91)	206 (56.2)	31 (96.1)	114 (70.3)	171 (59.3)	315	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
254	185	36 (92.1)	74 (85.1)	30 (96.4)	89 (78.1)	112 (74.8)	333	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²
1508	1102	1500	1631	2737	1330	1455	1092	الشاهد (غير المعاملة) Untreated trees
		378	297	732	228	280		أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at 5%
		509	400	987	308	377		أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 1% LSD at 1%

* Values are means of seven replicates

** القيم هي متوسطات 7 مكررات.

تشير القيم بين الأقواس على النسبة المئوية لإنقاص النيماتودا في الجذور حسب النسبة المئوية للفاعلية وفقاً لمعادلة (18) Henderson and Tilton.

Figures in parenthesis indicate percentages of nematode reduction in roots calculated according to Henderson and Tilton (18).

كما أوضح Burges (6) أن طريقة تأثير هذه البكتيريا في المسببات المرضية ناتجة من أنها تنتج أكثر من مادة سامة، ومن المحتمل أن تفاعلها مع هذه المسببات قد يحدث السمية. كذلك وجد أن هذه البكتيريا ليست "سم" بالملازمة بل يجب أن يبتلعها الكائن المستهدف وتهضم داخله فتقوم البكتيريا بتنشيط التمثيل الحيوي للحمض النووي RNA Polymerase (21).

في دراسة أخرى قام بها Sebesta وآخرون (22) وجد أن طريقة تأثير البكتيريا تتمثل في تنشيط التمثيل الحيوي لكل من البروتين والحمض النووي إذ أن الفاعلية العامة تشير على أن السموم البكتيرية لها مدى واسع من الفاعلية ضد عديد من الكائنات الدقيقة. كما وجد العديد من العلماء أن بر وتينات البكتيريا *B. thuringiensis* لها فاعلية

كما وجد في دراسة أخرى (9) أن استخدام مخلفات صناعة البن بخلطها مع 40% خميرة الخبازي وتطبيقها باستخدام طريقة التخمير على الحالة الصلبة (SSF) يعتبر من العمليات الاقتصادية إذ أنها تعطي عدداً كبيراً من البكتيريا (B.t.) بقدر حوالي 35×10⁷ لكل غرام تحتوي على 93.5% (أبواغ بكتيرية). أيضاً أثبت هذا البحث فعالية استخدام بكتيريا *B. thuringiensis* المنخصرة على الحالة الصلبة مع مخلفات البن المخلوطة بخميرة الخبازي في خفض الكثافة العددية لنيماتودا التدهور البطيء في الحمضيات/الموايح مما يشير إلى اقتصادية هذه العملية في إنتاج بكتيريا *B. thuringiensis* في الدول النامية.

المنتجة للسموم يمكن أن يعطى حماية بيولوجية ضد غزو جذور اليرتقال بيرقات نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات وربما غيرها من الأجناس النيماتودية، مما ينعكس في النهاية على إعطاء محصول جيد من حيث الكم والكيف خالي (نظيف) من التلوث الكيماوي قابل للاستهلاك أو التصدير.

ضد عديد من يرقات رتبة الحشرات ذات الجناحين، غمديه وحرشفية الأجنحة، والمسببات المرضية كالبروتوزوا والنيماتودا والأكاروسات (8، 9، 10، 16، 19).
يشير عموماً هذا البحث بقوة إلى أن معالجة التربة - الملوثة بكثافة عالية من نيماتودا التدهور البطيء في الموالح/الحمضيات - بخلطها بالعزلات المحلية التي تمت دراستها من البكتيريا *Bacillus*

جدول 3. النسبة المئوية الكلية لتقليل أعداد النيماتودا *Tylenchulus semipenetrans* Berliner باستخدام بكتيريا *Bacillus thuringiensis* Cobb.
Table 3. Population reduction of *Tylenchulus semipenetrans* Berliner following treatments with *Bacillus thuringiensis* Cobb.

عدد تفوق المعاملات** No. of successful treatments**	النسبة المئوية الكلية لنقص النيماتود بعدا* * Total nematode reduction (%) after					العزلات والجرعات Isolates and doses
	150 يوم 150 days	120 يوم 120 days	90 يوم 90 days	60 يوم 60 days	30 يوم 30 days	
						B.t. NRC63
0	56.6	87.9	86.0	82.1	67.8	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
4	93.0	93.9	93.8	92.7	88.0	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
1	85.8	86.7	90.6	79.2	91.0	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²
						B.t. NRC60
0	80 -	24.6	62.3	55.9	77.7	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
0	54	69.9	93.9	66.6	82.7	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
5	86.8	92.6	97.4	91.0	94.5	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²
						B.t. VF41
0	45.1	65.4	81.8	52.5	72.5	1.0 كغ/4200 م ² 1 Kg/4200 m ²
0	52.0	14.3	94.8	67.7	59.6	1.5 كغ/4200 م ² 1.5 Kg/4200 m ²
5	94.6	89.1	97.9	89.2	88.3	2.0 كغ/4200 م ² 2.0 Kg/4200 m ²

*النسبة المئوية الكلية للنقص الذي حسب وفقا لأعداد النيماتودا في كل من التربة و الجذر تبعا لمعادلة Henderson and Tilton (18) وتحسب بنفس الطريقة كما في التربة و الجذور كل على حدة.
** عدد مرات تفوق معاملات البكتيريا.

*Percentage population reduction, calculated on the basis of soil and root populations, estimated by Handerson and Tilton formula (18).

** Most successful treatments were those in connection with *B. thuringiensis* isolates and their doses.

Abstract

Ismail, A.E. and M. Fadel. 2004. Field Efficacy of Three Isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner Against the Citrus Nematode, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb on Navel Orange. Arab J. Pl. Prot. 22: 29-34.

Three isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner i.e. NRC 63, NRC 60 and VF 41 were produced in laboratory formulations and tested as biocides at 6.0, 9.0 and 12.0 g / tree (equivalent 1.0, 1.5 and 2.0 kg /4200 m²) for the control of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb on navel orange under field conditions. All doses of the *B.t.* isolates significantly ($P \leq 0.01$) reduced the nematode populations either in soil or roots as compared to untreated control. Statistical differences in nematode populations were also found between responses to different doses of the same isolate. There were positive significant correlations between reduction in the nematode populations and doses of the three tested isolates. The intermediate dose (1.5 kg/4200 m²) of *B. t.* NRC 63 isolate was superior in four periods (August - November) for reducing the nematode populations, whereas the higher doses (2.0 kg/4200 m²) of *B.t.* NRC 60 or *B.t.* VF 41 were superior in five periods (July - November) for reducing *T. semipenetrans* populations.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, citrus nematode, nematode biocontrol, *Tylenchulus semipenetrans*.

Corresponding author: A.E. Ismail, National Research Centre, Dukkī, P.O. Box 12311, Cairo, Egypt.

References

1. Abd-Elgawad, M.M. 1995. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and plant extracts for control of phytonematodes. Egyptian Journal of Applied Science, 10: 1-5.
2. Abd-Elgawad, M.M., M.M.A.Youssef and M.M. Shamselden. 1994. Observations on the population fluctuations of the citrus nematode on calamondin orange in Egypt. Pakistan Journal of Nematology, 12: 87-94.
3. Abou El-Naga, M.M., A.M. Metwally and S.A. Montasser. 1984. New records of nematodes associated with citrus fields in Egypt. Agricultural Research Review, 62: 271-275.
4. Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays. Pages 19-35. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. K.R. Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser (Editors). Vol. II, North Carolina State University.
5. Borgonie, G., M. Claeys, F. Leyns, G. Arnaut, D.D.E. Wael and A. Coomans. 1996. Effect of a nematocidal *Bacillus thuringiensis* strain on free-living nematodes. 3. Characterization of the intoxication process. Fundamental and Applied Nematology, 19: 523-528.
6. Burges, H.D. 1982. Control of insects by bacteria. Parasitology, 84: 79 - 117.
7. Duncan, L.W. and E. Cohn. 1990. Nematode parasites of citrus. Pages 321-346. In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge (Editors), Wallingford, C.A.B. International UK.
8. Ellar, D.J., W.E. Thomas, B.H. Knowles, S. Ward, J. Tod, F.A. Drobniowski, J. Lewis, T. Sawyer, D. Last and C. Nichols. 1985. Biochemistry, genetics and mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Pages 230-240. In: Molecular biology of microbial differentiation. J. Hoch and P. Setlow (Editors), American Society for Microbiology Washington, D.C., USA.
9. Fadel, M. and M. Sabour. 1998. Utilization of coffee waste for the production of bioinsecticide under solid state fermentation. Journal of Union Arab Biologists, 6: 295-305.
10. Feitelson, J.S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Biotechnology, 10: 271-276.
11. Ignoffo, C.M. and V.H. Dropkin. 1977. Deleterious effects of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil inhabiting, myceliophage and plant-parasitic nematodes. Journal of Kansas Entomological Society, 50: 394-398.
12. Ismail, A.E. and M. Fadel. 1997. Suppressive effects of some native isolates of *Bacillus* spp. on *Helicotylenchus exallus*, *Meloidogyne incognita* and *Tylenchulus semipenetrans*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 7: 53-60.
13. Ismail, A.E., M.H. Ghali, F.G. Nakhla and H.Z. Aboul-Eid. 1997. Effect of soil solarization by polyethylene sheets on growth of navel orange and control of citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Pakistan Journal of Nematology, 15: 71-87.
14. Kazuhiko, O., L. Zhong-Xun, F. Keike, L. Yin, I. Yuzuru, T. Haruo and O. Satoshi. 1988. Screening for new nematocidal substances of microbial origin by a new method using the pine wood nematode. The Journal of Antibiotics, 41: 573-575.
15. Lee, M.A., E. Curtiss, E. Alcantara and D.H. Dean. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins. Applied and Environmental Microbiology, 62: 583-586.
16. Lidia, M.F., N.L. Christina, G. Eric, F. Roger and F.C. Jean. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry I toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of Shared Binding Sites. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1544-1549.
17. Nakhla, F.G., A.E. Ismail and H.Z. Aboul-Eid. 1998. Effect of some organic and inorganic nitrogen fertilizers on growth and productivity of balady orange trees in relation to infection of citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Pakistan Journal of Nematology, 16: 111-126.
18. Puntener, W. 1981. Manual for Field Trials in Plant Protection. Edited and published by Werner Puntener, Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited, Basle, Switzerland, 205 pp.
19. Salama, H.S., F.N. Zaki, S. Salem and M. Ragaie. 1995. The use of *Bacillus thuringiensis* to control two lepidopterous insect pests (*Agrostis ypsilon* and *Spodoptera littoralis*). Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, 68: 15-17.
20. Sasser, J.N. 1989. Plant-Parasitic Nematodes: The Farmer's Hidden Enemy. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 115pp.
21. Sebesta, K. and K. Horska. 1968. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. gelechiae. Biochimica et Biophysica Acta, 169: 281-282.
22. Sebesta, K., K. Horska and J. Vankova. 1969. Inhibition of de novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. gelechiae. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 34: 1786-1791.
23. Southey, J.F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Technical Bulletin No. 2, 148 pp. HMSO, London, New York and San Francisco.
24. Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta - endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Journal of Cell Science, 60: 181-197.
25. Van Gundy, D.S. 1986. Plant-parasitic nematodes that attack citrus. Pages 20-31. In: Plant parasitic nematodes of bananas, citrus, coffee, grapes and tobacco. Union Carbide Agricultural Products Company, U.S.A.

Received: July 11, 2002; Accepted: August 13, 2003

تاريخ الاستلام: 2002/7/11؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2003/8/13