مکانیسم اثر کشندگی برخی سویه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن بر کنه‌ی *ریپیسفالوس آنولاتوس*

خداداد پیرعلی‌خیرآبادی[1*]، امیر دهقانی‌سامانی[2]

چکیده

در سال‌های اخیر کنترل بیولوژیک انگل‌ها توسط قارچ‌های انتوموپاتوژن یکی از روش‌های جایگزین به جای سموم مختلف است. قارچ‌های انتوموپاتوژن به فراوانی در طبیعت یافت شده، به آسانی قابل جمع‌آوری و تکثیر بوده و برای دام‌ها و گیاهان غیر بیماری‌زا هستند. کنه‌ها انگل مهره‌داران می‌باشند که علاوه بر خسارات اقتصادی، تعدادی از اجرام بیماری زا را نیز منتقل می‌کنند. کنه‌ی *ریپیسفالوس آنولاتوس (Rhipicephalus annulatus)* در تمام دنیا یافت می‌شود و بر روی حیوانات تغذیه می‌کند و می‌تواند به آسانی از میزبان‌های غیر معمول خود مثل انسان نیز تغذیه کند. هدف این مطالعه بررسی مکانیسم اثر کشندگی برخی سویه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن(*متاریزیوم آنیزوپلیه*، *بواریا باسیانا* و *لکانیسیلیوم پسالیوته*) بر کنه *(ریپیسفالوس آنولاتوس)* بود. در این مطالعه پس از کشته شدن کنه‌ها توسط جدایه‌های قارچی، مکانیسم اثر کشندگی هر سویه‌ی قارچی بر کنه‌های کشته شده توسط میکروسکوپ نوری (لنز ۱۰۰×) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر سویه‌ی قارچی با روش خاص و متمایز از سایر سویه‌ها کوتیکول کنه را تحت تاثیر قرار داده و سپس در هموسل آن نفوذ می‌کند و با مکانیسمی متفاوت سبب کشتن کنه‌ها می‌شود. با استفاده از نتایج این مطالعه می‌توان مناسب‌ترین سویه‌ی قارچی برای کنترل بیولوژیک بندپایان و کنه‌ها را با توجه به ساختار و ترکیبات موجود در تگومنت آنها انتخاب کرد. برای اثبات این ادعا نیاز به مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: *مکانیسم اثر کشندگی، قارچ انتوموپاتوژن، کنه، ریپیسفالوس آنولاتوس*

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۰

مقدمه

قارچ‌های انتوموپاتوژن به فراوانی در طبیعت یافت شده (۵)، به آسانی قابل جمع‌آوری و تکثیر بوده و برای دام‌ها و گیاهان غیرپاتوژن هستند (۱۰). این قارچ‌ها شامل گروه منحصر به فردی از قارچ‌های پاتوژن حشرات هستند که بلع آنها توسط میزبانشان ضروری نبوده و عفونت‌زایی توسط نفوذ مستقیم در کوتیکول کنه‌ها هم امکان‌پذیر است(۱۶).

کنه‌ها انگل اجباری و خون خوار مهره داران به ویژه پستانداران و پرندگان می‌باشند که با گزش خود حیوانات اهلی را ضعیف و ناتوان کرده و موجب ضایعات ناشی از تروما، سوزش، التهاب و افزایش حساسیت در آنها می‌شوند (۷). تغذیه تعداد زیاد آنها حیوانات را به کم خونی مبتلا نموده و موجب کاهش تولید می‌شوند. ترشحات بزاقی برخی از گونه های کنه، حیوانات را دچار مسمومیت و فلجی نموده و عوامل مختلف بیماری‌زای ویروسی، ریکتزیایی، تک یاخته‌ای و باکتریایی را به حیوانات و انسان منتقل می‌کنند (۱۲).

در سال‌های اخیر کنترل بیولوژیک انگل‌ها از جمله بندپایان به عنوان یکی از روش‌های جایگزین دارو درمانی مورد استقبال تعداد کثیری از محققان انگل‌شناسی قرار گرفته است (۳). در حال حاضر یکی از مشکلات کنترل بندپایان انگلی، مقاومت آنها در برابر سموم است. کنترل شیمیایی و استفاده از ترکیبات ضدکنه‌ای ساده‌ترین و سهل‌الوصول‌ترین راهی بوده که دولت‌ها و تولیدکنندگان برای کنترل این آفت و کاهش زیان‌های وارده برگزیده‌اند (۱۱).

نفوذ ساختارهای قارچی به تگومنت سخت به واسطه فعالیت‌های مکانیکی و آنزیماتیک ساختارهای قارچی صورت می‌گیرد. برگشت غشاهای کوتیکول متعاقب نفوذ قارچ‌ها به طور مشخص نشان دهنده فشارهای مکانیکی و دخالت عوامل مکانیکی در نفوذ قارچ‌ها به داخل تگومنت تغییرات کوتیکول در طول سوراخ کردن و نفوذ قارچ‌ها می باشد (۱۸ و ۱۳).

۱*ـ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، متخصص انگل‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد ایران
khpirali@yahoo.com
۲ـ گروه علوم درمانگاهی، دانشجوی بورد تخصصی بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

قارچ‌های انتوموپاتوژن معمولا میزبان‌های خود را با اسپورهای اختصاصی آلوده می‌کنند و این اسپورها، به کوتیکول حمله کرده، رشد می‌کنند و با تولید انواع آنزیم های کیتیناز، پروتئاز و لیپاز و هم چنین ساختارهای قارچی کوتیکول را سوراخ می‌کنند (۱۵). کنیدیوم در داخل هموسل و بافت های نرم بدن میزبان تکثیر نموده و مرگ معمولا بین سه تا ده روز پس از عفونت به دلیل از دست رفتن آب بدن میزبان، محرومیت غذایی، صدمات مکانیکی شدید و تاثیر سموم قارچی اتفاق می‌افتد (۱۹). در شرایط مطلوب اسپورزایی قارچ‌ها روی لاشه میزبان توسعه می‌یابد و عفونت را در جمعیت میزبان تسهیل می‌کند و سیکل بیماری ادامه می یابد (۲۰).

در این مطالعه مکانیسم اثر کشندگی برخی سویه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن بر کنه *ریپیسفالوس آنولاتوس (R. Annulatus)* پس از کشته شدن کنه‌ها توسط جدایه‌های قارچی، در ساختارهای قارچی رشد کرده بر روی کنه‌های کشته شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و لنز ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت تا با دانستن مکانیسم عمل هر سویه بتوانیم بهترین سویه را برای کنترل بیولوژیک هر گروه از کنه‌ها و بندپایان با توجه به ساختار تگومنت و ویژگی‌های مورفولوژیک آنها انتخاب کنیم.

مواد و روش کار

تهیه ی کنه‌ها و سویه‌های قارچی

کنه‌های *ریپیسفالوس آنولاتوس* خونخورده مورد نیاز از مناطق شمالی کشور (استان مازندران) مستقیما از روی دام‌ها جمع‌آوری و در ظروف مخصوص با قابلیت تهویه و رطوبت مناسب (حدود ۲۵-۱۵ کنه در هر ظرف) به آزمایشگاه منتقل گردید. کنه‌های با وزن کم، جثه کوچک، خونخواری کم، خشک و تغییر رنگ داده حذف شدند. کنه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه در الکل اتیلیک ۷۰٪ ضد عفونی شدند. سالم بودن کنه‌های بالغ خون خورده مهم بود و در اسرع وقت پس از جمع آوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنه‌های سالم دارای حرکت بودند که برای ارزیابی آن، چنانچه کنه‌ها در زیر یک منبع نور قرار می‌گرفتند به سمت نور حرکت می‌کردند (۱٤).

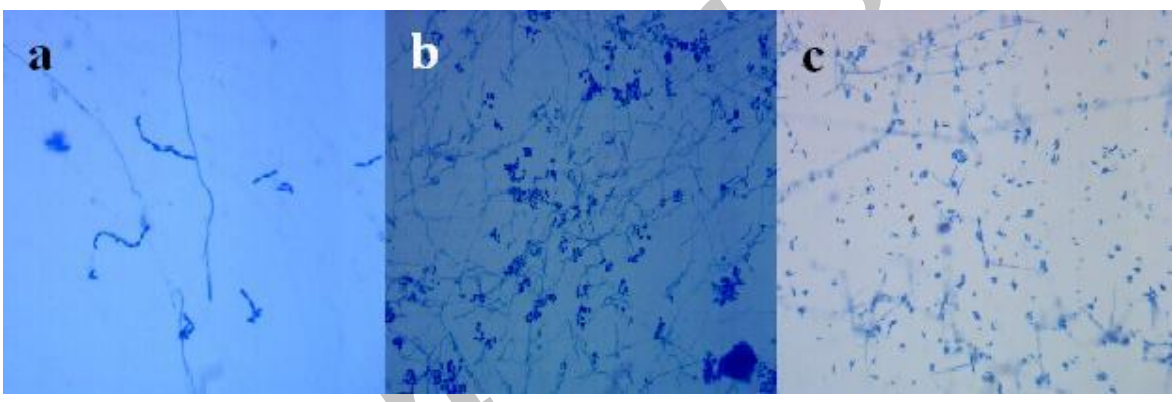
سه جدایه بومی از قارچ *متاریزیوم آنیزوپلیه(M.anisopliae)*، *بواریا باسیانا* ***(B. bassiana)*** و *لکانیسیلیوم پسالیوته* ***(L. psalliotae)*** از موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی تهیه گردید. مشخصات قارچ‌های مورد استفاده در نگاره ۱ آمده است. در این مطالعه ابتدا از قارچ‌های تهیه شده از موسسه تحقیقات آفات، بر روی محیط PDA به روش آگار بلاک و نقطه ای کشت انجام شد (نگاره ۱). در مرحله بعد جهت حذف میسلیوم‌های قارچی، پس از ۲۰ روز سطح محیطها با ۳ میلی لیتر آب مقطر به همراه ۲ میلی لیتر توئین ۸۰ (Tween 80) شسته شد و سوسپانسیون حاصل از هر کدام از جدایه‌ها بطور جداگانه از چند لایه گاز استریل شده گذرانده شد تا کونیدیوم ها خالص شوند. برای نگهداری طولانی مدت کونیدیوم ها آنها را در ویال های در پیچ دار با ظرفیت ۳سی‌سی حاوی حدود ۱/۵ سی سی آب مقطر استریل و اتوکلاو شده ریخته و در ٤ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

نگاره ۱- کلنی حاصل از ۳ جدایه مختلف قارچی. (a) *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN 437C ، (b) *بووریا* باسیانا IRAN 428C و (c) *لکانیسیلوم پسالیوته* IRAN 468C .

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه‌ی اسلاید کالچر

جهت تهیه اسلاید کالچر به ازاء هر جدایه قارچی، یکی از محیط‌های PDA تهیه شده در پلیت توسط اسکالپل به مربع‌های مساوی و کوچک تقسیم شد و دو عدد از این قطعات روی لامی قرار گرفت و این لام روی پیپت پاستور (U) شکل قرار گرفت، با استفاده از آنس با رعایت شرایط استریل در زیر هود و در کنار شعله از هر کدام از قارچ‌های کشت شده به طور جداگانه برداشت گردید و روی اضلاع قطعات فوق الذکر تلقیح گردید و در مرحله بعد لامل روی قطعات تلقیح شده با قارچ‌ها قرار گرفت و کمی روی محیط فشاروارد گردید و به مدت دو هفته در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس لامل ها به دقت از روی محیط‌ها جدا شدند و پس از آماده شدن، اقدام به مشاهده آنها در زیر میکروسکوپ گردید. این روش در واقع روش مطمئنی برای تشخیص قارچ‌های مختلف است چرا که بسیاری از قارچ‌ها را با توجه به شکل آنها در محیطهای کشت و رنگ کلنی و پرگنه‌ها نمی‌توان تشخیص داد. در این روش میسلیوم‌ها و نحوه قرار گرفتن کنیدیوم‌ها روی آنها برای تشخیص قطعی بسیار کمک کننده است. نگاره ۲ مشخصات میکروسکوپی هر سویه در اسلاید کالچر را به طور مجزا نشان می‌دهد (×٤٠٠).



نگاره ۲- نمای میکروسکوپیک از اسلاید کالچر حاصل از ۳ جدایه مختلف قارچی. (a) *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN 437C (کونیدیوم‌ها شکل رشته‌ای داشته و دنبال هم قرار دارند)، (b) *بووریا* باسیانا IRAN 428C (کونیدیوم‌ها حالت مجتمع و خوشه‌ای به خود گرفته‌اند) و (c) *لکانیسیلوم پسالیوته* IRAN 468C (کونیدیوم‌ها به صورت واحدهای منفرد قرار دارند).

آلوده کردن کنه‌ها به سویه‌های قارچی

کنه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه با شناور سازی ۵-۳ ثانیه ای در الکل متانول ۷۰ ٪ ضد عفونی شدند، تخم‌های گذاشته شده در طول زمان انتقال حذف گردید و آن دسته از کنه‌ها که تخم گذاری را شروع کرده بودند در آزمایش غوطه وری بالغین مورد استفاده قرارنگرفتند (۳). طول مدت غوطه ور سازی ۵-۳ ثانیه در نظر گرفته شد و کنه‌ها به شکل انفرادی با استفاده از پنس در سوسپانسیون‌ها غوطه ور گردیدند و پس از غوطه وری به پتری دیش‌هائی که حاوی کاغذ صافی (کاغذ واتمن) مرطوب بود منتقل شدند، سپس برای ١٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۰٪ در ژرمیناتور قرار گرفتند. لازم به ذکر است کاغذهای واتمن قبل از استفاده اتو کلاو گردیدند و هر روز چند قطره آب مقطر استریل به کف ظروف جهت تامین رطوبت اضافه گردید. برای تمام جدایه‌های قارچی یک گروه کنترل شامل۵ کنه خون خورده به همان روش فوق الذکر مورد مطالعه قرار گرفت به جز اینکه آنها را در آب مقطر استریل همراه باتوئین ۸۰ بدون اسپور غوطه ور کردیم.

www.SID.ir

پس از گذشت ۱٤ روز مطالعه بر روی کنه‌های کشته شده صورت گرفت.

آلوده کردن تخم کنه‌ها به سویه‌های قارچی

برای مطالعه بر روی تخم کنه‌ها، ابتدا تعدادی کنه ماده خون خورده (۳۰عدد) پس از ضدعفونی در الکل۷۰٪ خشک گردیدند و در گروه های ده تائی در پتری دیش هایی که کف آنها کاغذ واتمن اتو کلاو شده قرار داشت منتقل گردیدند و در رطوبت نسبی ۷۰ ٪ و دمای۲۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۰ روز نگهداری گردیدند. جهت تامین رطوبت بهتر، پتری دیش‌ها در دسیکاتور حاوی کلرور سدیم اشباع (٤۰۰ گرم نمک اشباع در ۱ لیتر آب) قرارگرفتند. پس از تخم گذاری کنه‌ها، کنه‌های مرده (لاشه کنه‌ها) از تخم‌ها جدا گردید تا در مرحله بعد این تخم‌ها با کنیدیوم‌های جدایه‌های قارچی مجاور شوند. ۱۰۰ میلی گرم از تخم‌ها وزن گردید و در لوله آزمایش استریل قرار گرفت و با ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون حاوی کونیدیوم قارچی برای هر سویه به صورت مجزا مجاور گردید. لوله‌ها در رطوبت مناسب ۷۰٪ و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ روز نگهداری گردیدند (۱۱). پس از گذشت این مدت تخم‌های کشته شده مورد مطالعه قرار گرفتند.

آلوده کردن لارو کنه‌ها به سویه‌های قارچی

در شرایط مطلوب پرورش کنه‌ها، اکثر گونه‌ها در عرض ۷-۲ روز تخم گذاری را شروع و به مدت ۱۵-۱۲ روز ادامه می دهند و بعد از ۲۸-۲۱ روز لاروها از تخم بیرون می آیند در مورد کنه *ریپی سفالوس آنولاتوس* ۲-۱ روز پس از قرار دادن در ژرمیناتور، کنه‌ها اقدام به تخم گذاری نموده وحدود یک ماه بعد به تدریج لاروها از تخم خارج شدند. برای مطالعه روی لاروها در روزهای اولیه پس از خروج از تخم، شناورسازی لاروها در سوسپانسیون قارچی و مطالعه بر روی آنها صورت گرفت. مطابق روش غوطه ور سازی کنه‌های بالغ، در مورد لاروها نیز طول مدت غوطه ور سازی ۵-۳ ثانیه در نظر گرفته شد و لاروها به شکل انفرادی با استفاده از پنس در سوسپانسیون ها غوطه ور گردیدند و پس از غوطه وری به پتری دیش هائی که حاوی کاغذ صافی (کاغذ واتمن) مرطوب بودمنتقل شدند، سپس برای ۱٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۰٪ در ژرمیناتور قرار گرفتند. پس از ۱٤ روز مطالعه روی لاروهای کشته شده صورت گرفت.

انجام مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی

به منظور انجام مطالعات ماکروسکوپی بر روی کنه‌های بالغ و نیز تخم‌های کشته شده، لاشه آنها در زیر لوپ به دقت مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت و نحوه و میزان نفوذ ساختارهای قارچی در تگومنت کنه‌های بالغ و نیز در جداره ی تخم‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور انجام مطالعات میکروسکوپیک نیز لاشه کنه‌های کشته شده به آزمایشگاه آسیب‌شناسی ارسال شد. و پس از انجام مراحل تثبیت و برش و رنگ‌آمیزی با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین، مطالعات میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری و با لنز ۱۰۰ بر روی اسلایدهای تهیه شده انجام شد و نحوه و میزان نفوذ و عملکرد سویه‌های مختلف به طور مجزی و دقیق مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

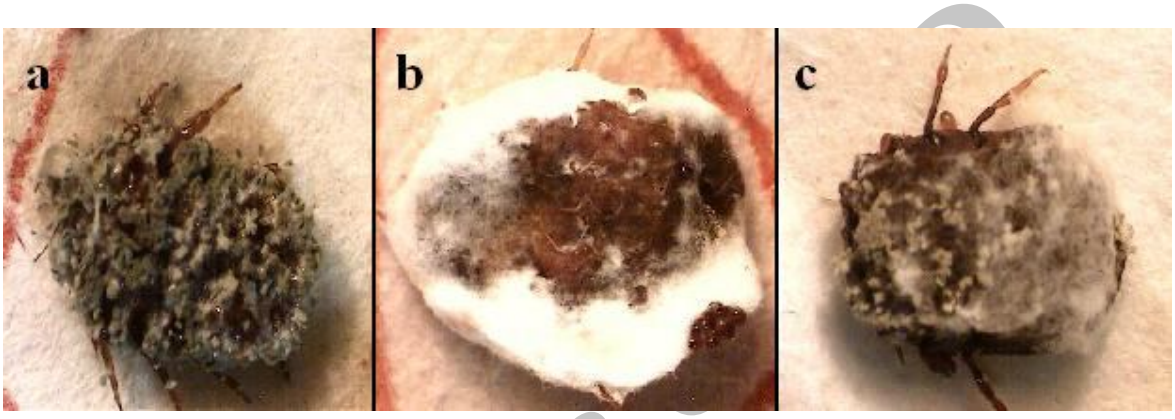
نتایج مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی روی لاشه‌ی کنه‌های بالغ کشته شده

مشاهدات ماکروسکوپی(نگاره ۳) و میکروسکوپی (نگاره ٤) نشان داد که کونیدیوم‌های جدایه‌های *متاریزیوم* با سوراخ کردن کوتیکول کنه‌ها از خود علائمی روی بدن به شکل لکه‌های مایل به زرد بر جای می‌گذارند و سپس در هموسل تکثیر کرده و با ایجاد هایف از منافذ و کوتیکول خارج می‌شوند و سطح بدن را می‌پوشانند و منجر به مرگ کنه‌ها می‌شوندو به عبارتی سبب متلاشی شدن ساختارهای پیکره کنه‌ها از داخل می‌شوند و مکانیسم اثر قارچ‌های متاریزیوم از طریق بلوکه کردن منافذ

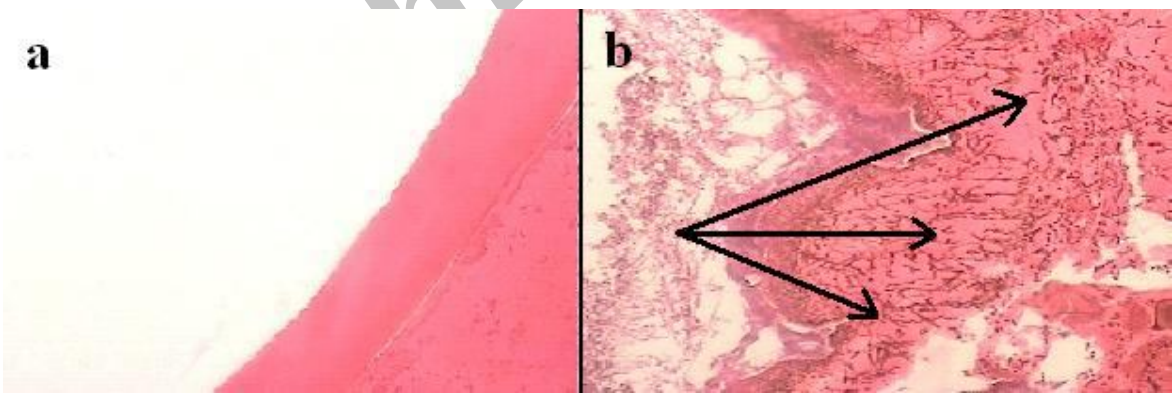
Archive of SID
www.SID.ir

موجود در سطح کوتیکول و در نتیجه خفه کردن کنه‌های بالغ نیست.

جدایه‌های *لکانیسیلیوم* و *بووریا* از طریق منافذی چون استیگما و منفذ تناسلی و دهان کنه وارد بدن شده و حتی در برخی موارد سبب انسداد در مجاری استیگما و دهان شده و چنین به نظر می‌رسد که سبب اختلال در امر تنفس و تغذیه در کنه‌ها شده و در نتیجه متعاقبا باعث خشک و چروکیده شدن کنه‌ها و مرگ آنها شده و تشکیل کنیدیوفورها و ساختارهای قارچی در هموسل اتفاق نمی‌افتد ولی در مقابل سطح کوتیکول و منافذ پیکره کنه‌ها با ساختارهای در هم تنیده قارچی پوشیده شده و چنین به نظر می‌رسد که با ایجاد اختلال در روند تنفس و تغذیه سبب مرگ کنه‌ها می‌شوند.



نگاره ۳- نمای ماکروسکوپیک از رشد وتکثیر ۳ جدایه مختلف قارچی بر روی کنه‌ها. (a) *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN 437C ، (b) *بووریا* باسیانا IRAN 428C و (c) *لکانیسیلیوم پسالیوته* IRAN 468C.

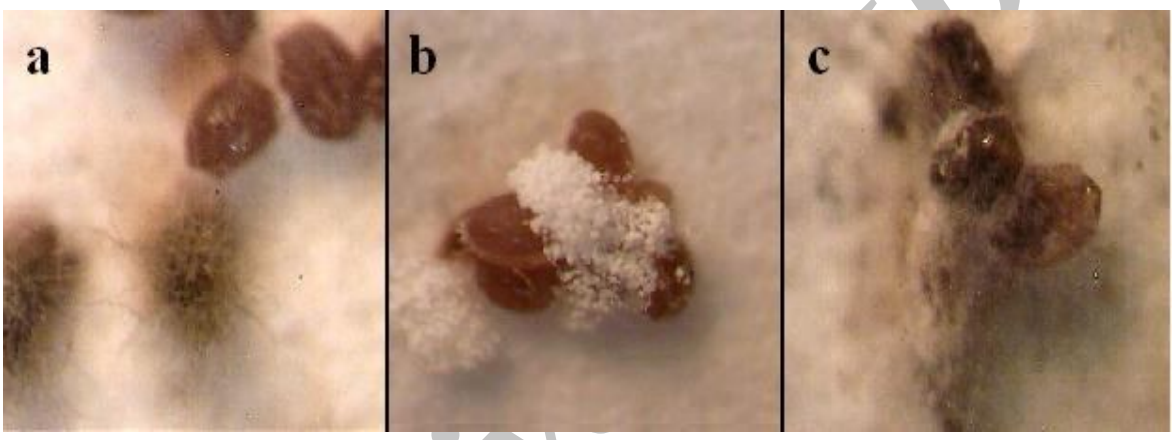


نگاره ٤ـ نمای میکروسکوپیک از رشد وتکثیر ۳ جدایه مختلف قارچی بر روی سطح کوتیکول کنه‌ها. (a) سطح کوتیکول سالم و (b) سطح کوتیکول در کنه‌های آلوده به سویه‌های قارچی پس از مرگ آنها را نشان می دهد. به حضور کونیدیوم‌ها و میسلیوم‌های قارچی که با پیکان در سطح کوتیکول کنه‌های آلوده مشخص شده است، توجه شود.

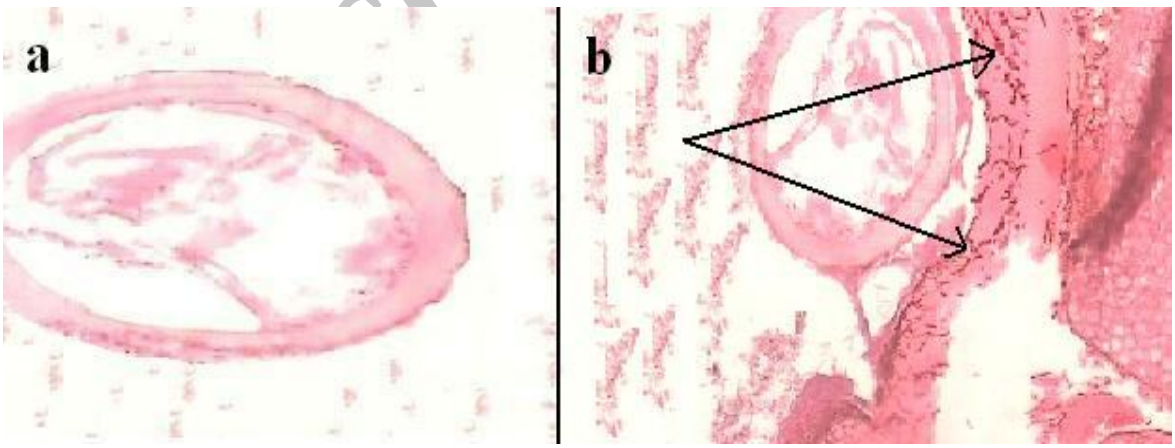
www.SID.ir

نتایج مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی روی تخم‌های کشته شده

مشاهدات ماکروسکوپی(نگاره۵) و میکروسکوپی (نگاره ٦) نشان داد که جدایه‌های *لکانیسیلیوم* و *بووریا* روی سطح تخم‌ها کلونیزه شده و مانع از تخم برآئی لاروها می‌گردند، در حالی که جدایه‌های *متاریزیوم* لایه کوریون تخم را سوراخ می‌کنند. نکته جالب این است که در مقایسه با تاثیر کمتر جدایه *لکانیسیلیوم پسالیوته* در مرگ و میر کنه‌های ماده خون خورده این جدایه‌ها در تاثیر بر تخم کنه‌ها موفق تر عمل می‌کند و تاثیر آن بر مرگ و میر لاروها نیز در مقایسه با مرگ و میر کنه‌های ماده خونخورده و بالغ چشمگیرتر است. بنابراین جدایه‌های *لکانیسیلیوم* تمام مراحل سیر تکاملی کنه *ریپیسفالوس آنولاتوس* را متاثر کرده و کفایت مناسبی برای کنترل مراحل سیر تکاملی دارد.



نگاره ۵- نمای ماکروسکوپیک از رشد ۳ جدایه مختلف قارچی بر روی تخم کنه‌ها. (a) *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN 437C ، (b) *بووریا* باسیانا IRAN 428C و (c) *لکانیسیلیوم پسالیوته* IRAN 468C.

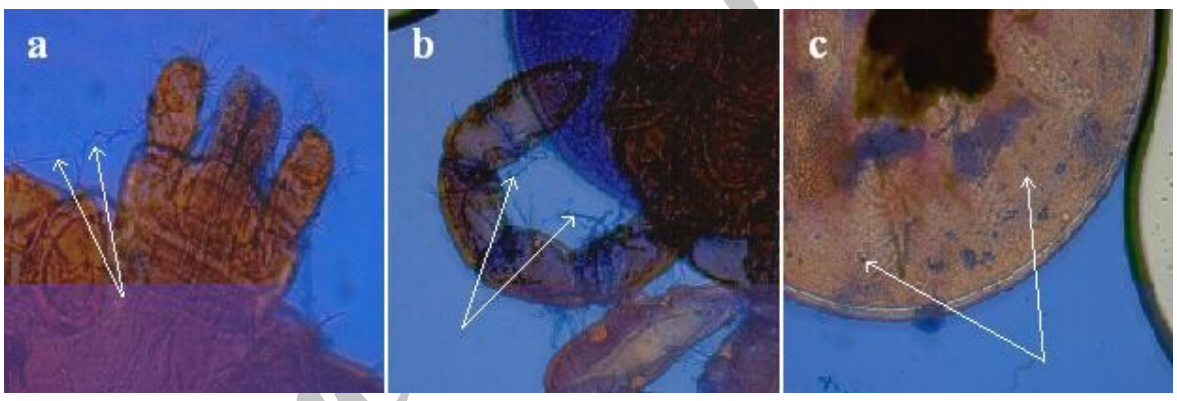


نگاره ٦ـ نمای میکروسکوپیک از رشد وتکثیر ۳ جدایه مختلف قارچی بر روی سطح خارجی تخم کنه‌ها. (a) سطح تخم سالم و (b) سطح تخم آلوده به سویه‌های قارچی پس از مرگ آنها را نشان می دهد. به حضور کونیدیوم‌ها و میسلیوم‌های قارچی که با پیکان در اطراف تخم‌های آلوده مشخص شده است، توجه شود.

www.SID.ir

نتـایج مشـاهدات ماکروسـکوپی و میکروسـکوپی روی لاروهای کشته شده

لاروهای آلوده به سویه‌های قارچی پس از مرگ تیره و بـی حرکت می‌شوند. مشاهدات ماکروسـکوپی و میکروسـکوپی (نگاره ۷) نشان داد که مشابه با اثر این جدایه‌ها بر کنه‌هـای بالغ، در مورد لاروها نیز کونیدیوم های جدایه‌های *متاریزیوم* با سوراخ کردن کوتیکول لاروها – که استحکام کمتری نسبت به کوتیکول سطح بدن کنه‌های بالغ دارد– سبب بروز علائمی به شکل لکه‌های مایـل بـه زرد بـر روی سـطوح بـدن لاروهـا می‌شوند، سپس در هموسل تکثیر کرده و با ایجاد هـایف از منافذ و کوتیکول خارج می‌شوند و سطح بدن را می پوشانند و منجر به مرگ لاروها می‌شوند و به عبارتی سبب متلاشـی شدن ساختارهای پیکره لاروها از داخل می‌شوند. اما در مورد سویه‌های *لکانیسیلیوم* و *بووریا* این سویه‌ها از طریق منافذی چون استیگما و منفذ تناسلی و دهان لاروها وارد بدن شده و حتی در برخی موارد سبب انسداد در مجاری استیگما و دهان شده و چنین به نظر می‌رسد که سبب اختلال در امر تنفس و تغذیه در لاروها همانند کنه‌ها شده و در نتیجه متعاقبا باعـث خشک و چروکیده شدن لاروها و مرگ آنها شده و تشـکیل کنیدیوفورها و ساختارهای قارچی در هموسل اتفاق نمی‌افتد ولی در مقابل سطح کوتیکول و منافـذ پیکـره ی لاروهـا بـا ساختارهای در هم تنیده قارچی پوشیده شده و چنین به نظر می‌رسد که با ایجاد اختلال در روند تنفس و تغذیه سبب مرگ و میر لاروها همانند کنه‌ها می‌شوند.



نگاره ۷- نمای ماکروسکوپیک از رشد وتکثیر ۳ جدایه مختلف قارچی بر روی کنه‌ها. (a) *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN 437C ، (b) *بووریا* باسیانا IRAN 428C و (c) *لکانیسیلوم پسالیوته* IRAN 468C.

بحث

وسعت و گستردگی خسارات ناشی از بند پایان در ابعاد اقتصادی و بهداشتی اهمیت مبارزه با آن را به خوبی مشخص می‌کند. تغییرات اکولوژیکی و بیماریهای نوپدید و دوباره پدید منتقله بوسیله بندپایان و نیز تشدید پدیده مقاومت دارویی در مقابل سموم و داروهای شیمیایی مصرفی علیه بندپایان نیز این اهمیت را مضاعف کرده است. در این میان کنه‌ها، بندپایان خونخوار اجباری هستند که احتمالا زیان آورترین انگل‌های خارجی حیوانات اهلی و وحشی بوده و ناقلین مهم عوامل بیماری‌زا به انسان هستند. لذا پاتوژن‌های متعددی برای کنترل کنه‌ها در دهه های گذشته شناخته شده است اما برنامه‌های کنترل بیولوژیک اندکی برای کنه‌ها توسعه پیدا کرده است (۳).

Archive of SID
www.SID.ir

گفته میشود دشمنان طبیعی برای کنترل بیولوژیک کنه‌ها کافی نیستند چرا که جمعییت کنه‌ها بسیار بزرگ است و این دشمنان پتانسیل کمی برای کنترل بیولوژیک کنه‌ها دارند، زیرا تولید مثل شکارگرها بسیار زیر سطح مورد نیاز پاسخ دهنده در برابر جمعییت انفجاری کنه‌هائی است که از شکل معینی از شرایط اقلیمی پیروی می‌کنند (۲). قارچ‌های انتوموپاتوژن به طور وسیعی برای کنترل آفات کشاورزی و جنگل‌ها استفاده گردیده است و کوشش‌های اندکی برای ارزیابی پتانسیل قارچ‌های انتوموپاتوژن در برابر کنه‌های ناقل عوامل بیماریزا به انسان و دام انجام گردیده است (۸). مطالعه حاظر جزء مطالعات جامع و اولیه در آشکار سازی حقایق اولیه در کنترل بیولوژیک کنه *ریپیسفالوس آنولاتوس* ـ که معظل بزرگی در مناطق شمالی کشور محسوب می‌گردد ـ می‌باشد و بی‌شک نتایج آن در انتخاب سویه مناسب برای کنترل بیولوژیک بندپایان و به خصوص کنه‌ها ضروری و راه گشا می‌باشد.

Kaaya و همکاران در سال ۲۰۰۰ در یک بررسی نشان دادند که *بواریا باسینا (B. Bassiana)* و *متاریزیوم آنیزوپلیه (M. Anisopliae)* سبب مرگ‌ومیر ۱۰۰-۸۰٪ در جمعیت کنه‌های *Rhipicephalus appendiculatus* و *Amblyomma variegatum* و حدود ۵۳٪ در جمعیت *Boophilus decoloratus* در مراحل مختلف رشد کنه شدند(۹).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط Onofree و همکاران اثرات ٤ جدایه قارچی انتوموپاتوژن در برابر *بوفیلوس میکروپلوس (B. Microplus)* بررسی گردید. در این مطالعه قارچ‌های انتوموپاتوژن *متاریزیوم فلاوویریده* و *متاریزیوم آنیزوپلیه* هر کدام دو جدایه در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که جدایه‌های *متاریزیوم آنیزوپلیه* و *متاریزیوم فلاوویریده* به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در برابر *بوفیلوس میکروپلوس* بوده و موثرترین قارچ، *متارزیوم فلاوویریده* جدایه CG291 معرفی گردید (۱۱).

Benjamin و همکاران در سال ۲۰۰۲ تاثیر قارچ *متاریزیوم آنیزوپلیه* روی کنه *Ixodes scapularis* را در آزمایشگاه و محیط بررسی کردند. آن‌ها در این مطالعه به پتانسیل‌های این قارچ برای استفاده عملی در فیلد توجه نمودند. در آزمایشگاه در حدود ۹٦٪ مرگ و میر در غلظت ٤×١٠^{٩} spore/ml و در محیط به صورت اسپری حدود ۵۳٪ موثر ارزیابی شده است. در نهایت تاکید شده که فعالیت آکاریسیدی *متاریزیوم آنیزوپلیه* برای استفاده در برنامه‌ی کنترل *Ixodes scapularis* موثر می‌باشد (۱).

در سال ۲۰۰۷ Hartelt و همکاران تاثیر قارچ‌های انتوموپاتوژن و نماتودها را روی مراحل مختلف رشد کنه *Ixodes ricinus* بررسی کرده و عنوان کردند تمامی قارچ‌های مورد آزمایش در برابر کنه *Ixodes ricinus* موثر بوده اما تاثیر متفاوتی دارند. در این مطالعه *متاریزیوم آنیزوپلیه* سویه ۹۷ موثرترین قارچ معرفی شده است (٦).

مطالعه روی *متاریزیوم آنیزوپلیه* توسط Legar و همکاران در سال ۱۹۸٦ نشان داد که تمام جدایه‌های حاد این گونه بیشترین میزان پروتئازها را تولید می‌کنند. از بین پروتئاز ها کیموالاستاز و یک آنزیم شبیه ترپسین بیشترین فعالیت را نشان می‌دهند. نقش این پروتئازها در نفوذ و سوراخ کردن کوتیکول با استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز در سطح کوتیکول که باعث تاخیر مشخص و قابل قبولی در مرگ و میر حشرات در مقایسه با گروه کنترل گردید مورد تائید قرار گرفته است (۱۷).

مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که کونیدیوم‌های جدایه‌های *متاریزیوم* با سوراخ کردن کوتیکول کنه‌ها از خود علائمی روی بدن به شکل لکه های مایل به زرد بر جای می‌گذارند و سپس در هموسل تکثیر کرده و با ایجاد هایف از منافذ و کوتیکول خارج می‌شوند و سطح بدن را می پوشانند و منجر به مرگ کنه‌ها می‌شوند. در مطالعه ای مشابه نیز ثابت شد که مکانیسم اثر قارچ‌های متاریزیوم از طریق بلوکه کردن منافذ موجود در سطح کوتیکول نیست (٤). جدایه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

لکانیسیلیوم و *بووریا* از طریق منافذی چون استیگما و منفذ تناسلی و دهان کنه وارد بدن شده و باعث خشک و چروکیده شدن کنه‌ها شده و تشکیل کنیدیوفورها کمتر اتفاق می‌افتد. بنابراین با این تفاوت در مکانیسم اثر ـ که امری نسبی است ـ طبیعی است که ویرولانس جدایه‌ها در از بین بردن کنه‌های بالغ متفاوت باشد و مرگ و میر در برخی جدایه‌ها با روند کندتری ادامه پیدا کند.

مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی تخم کنه‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌های *لکانیسیلیوم* و *بووریا* روی سطح تخم‌ها کلونیزه شده و مانع از تخم بر آئی لاروها می‌گردند، در حالی که جدایه‌های *متاریزیوم* لایه کوریون تخم را سوراخ می‌کنند و باعث تلف شدن تخم‌ها و عدم خروج لاروها شدند. نکته جالب این است که در مقایسه با تاثیر کمتر جدایه *لکانیسیلیوم پسالیوته* در مرگ و میر کنه‌های ماده خون خورده این جدایه‌ها در تاثیر بر تخم کنه‌ها موفق‌تر عمل می‌کند و تاثیر آن بر مرگ و میر لاروها نیز در مقایسه با مرگ و میر کنه‌های ماده خونخورده و بالغ چشمگیرتر است. بنابراین جدایه‌های *لکانیسیلیوم* تمام مراحل سیر تکاملی کنه *ریپیسفالوس آنولاتوس* را مختل کرده و تائید مناسبی بر کنترل مراحل سیر تکاملی دارد. علی‌رغم توانایی جدایه‌های قارچی تحت مطالعه برای کنترل مراحل سیر تکاملی کنه *ریپی سفالوس (بوفیلوس) آنولاتوس* در شرایط آزمایشگاهی، ارزیابی تاثیر آنها در شرایط فیلد ـ قبل از این که برای برنامه‌های مدیریت عملی کنه‌ها طراحی شوند ـ لازم بنظر می‌رسد.

REFERENCES

1. Benjamin, M.A., Zhioua, E., Ostfeld, R.S. (2000): Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari *Ixodidae)*. J. Med. Ento. 39: 723-728.
2. Cole, MM. (1965): Biological control of tiks by the use of hymenopterous parasites. world health organ. 43: 1-12.
3. FAO. (2002): Guid lines for resistance management and integrated parasite Control in ruminants. P: 2003.
4. Gindin, G., Samish, M. Zangi, G.. Mishoutchenko, A., Glazer,v I. (2002): The susceptibility of different spesies and stages of tick to Entomopathogenic fungi. Exp. App. Acaro. 28: 283-288.
5. Ginsberg, H.S., Lebrun, R.A., Heyer, K. (2002): Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). Envir. Entomology. 31: 1191–1196.
6. Hartelt, K., Wurst, E., Collatz, J. (2008): Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. J. Medical Microb. 298: 314-320.
7. Hoogstraal, H., Valdez, R. (1980): Tick from wild sheep and goats in iran and medical and veterinary impliccations. Fiel. ZooL Newser. 6: 1- 12.
8. Kaaya, G.P., Mwangi ,E.N., Ouna ,E.A. (1996): Prospects for biological control of livestock ticks , *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyoma variegatum*,using the entomogenus fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* . J. Invert. Path. 67: 15-20.
9. Kaaya, G.P., Hassan, S. (2000): Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp. Applied Acarology. 24: 913-926.
10. Norval, R.A.I., Perry, B.D., Young, A.S. (1992): The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press, London. P: 301–342.
11. Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Debarros, N.M. (2001): Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. Ame. J. Vet. Res. 62: 1478–1480.
12. Ostfeld, R.S., Price, A., Hornbostel, V.L. (2006): Controlling ticks and tick borne zoonoses with biological and chemical agents. Bioscience. 5: 383–394.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Pirali-kheirabadi, K.H., Jalil piran, M., Heidari-Nasirabadi, M. (2008): Biological control of adult stage of *Varroa jacobsoni* using two strains of entomopathogenic fungi (Abstract). 1st International Congress and Exhibition of Veterinary Pharmacology and Pharmaceutical Sciences. 109: 109.
14. Ranjbar Bahadori, Sh., Pirali Kheirabadi, Kh., Shemshadi, B. (2009): Arthropod borne disease 1st edition. Islamic Azad University of Garmsar, Garmsar. P: 7-43.
15. Ranjbar Bahadori, Sh., Pirali Kheirabadi, Kh. (2010): Biological control of parasites 1st edition. Islamic Azad University of Garmsar, Garmsar. P: 12-34.
16. Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I. (2004): Biological control of ticks. Parasitology. 129: 389–403.
17. ST leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. (1986): Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. J. Inver. Patho. 47: 167-177.
18. Vey, A., Vago, C. (1971): Reactions anticryptogamiques de type granulome chez Les Insectes. Ann. J. Insect. 121: 527- 532.
19. Weseloh, R.M., Andreadis, T.G. (1992): Epizootiology of the fungus *Entomophaga maimaiga* and its impact on gypsy moth populations. J. Invertebrate Patho. 59: 133-141.
20. Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W. (1997): Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J. Parasi. 83: 815–818.

Archive of SID

www.SID.ir