Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI:10.22034/vj.2016.106060

بررسی آزمایشگاهی حدت جدایه های قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه *(Metarhizium anisopliae)* در کنترل زیست شناختی نوچه هیالوما مارژیناتوم *(Hyalomma marginatum)*

• **شهلا ریواز (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **خداداد پیرعلی خیرآبادی**
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
• **محمد عبدی گودرزی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **غلامرضا کریمی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: مرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴
Emali: s.rivaz@rvsri.ac.ir

چکیده

با توجه به مقاومت به بعضی از سموم شیمیایی تمایل جهانی به استفاده از مواد سالم در محیط زیست رفته است. در کشور ما به دلیل دامداری سنتی و خسارات ناشی از کنه‌ها، کنترل زیست شناختی اهمیت زیادی دارد و لزوم مطالعه‌ای در خصوص کنترل زیست شناختی کنه‌ها به عنوان یک روش جایگزین یا همزمان با سموم شیمیایی ضروری است. این تحقیق به منظور بررسی حدت چهار جدایه قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه در کنترل زیست شناختی نوچه‌های هیالوما مارژیناتوم انجام شد. تعداد ۴۵۰ عدد نوچه کنه های پرورش یافته در شرایط آزمایشگاهی در گروه‌های تیمار و شاهد مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد جدایه های قارچی آزمایش شده حدت متفاوتی دارد. به طوری که جدایه متاریزیوم آنیزوپلیه M14 بیشترین حدت را داشت. بین گروه‌های تیمار و شاهد اختلاف معنی دار بود($p < ۰/۰۵$). با توجه به نتایج، توصیه به مطالعات تکمیلی در شرایط میدانی می شود تا بتوان برخی از جدایه های این قارچ را به عنوان یکی از عوامل کنترل زیست شناختی مراحل مختلف سیر تکاملی کنه هیالوما مارژیناتوم در سطح تجاری معرفی نمود.

کلمات کلیدی: متاریزیوم آنیزوپلیه، هیالوما مارژیناتوم، کنترل زیست شناختی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 45-55

A survey on virulence of different isolates of ***Metarhizium anisopliae*** for biological control of ***Hyalomma marginatum*** nymphal stage

By: Rivaz, Sh., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Pirali Kheirabadi, Kh., Shahrekord University, Faculaty of Veterinary Medicine, Shahrekord, Iran. Abdigoudarzi, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Karimi, Gh., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Received: July 2015 Accepted: November 2015

Emali: s.rivaz@rvsri.ac.ir

According to the development of resistant in different insects and tick vector against different chemical pesticides, there is a tendency using natural and healthy products as pesticides worldwide. Then the problem of tick control is an important matter so, there is a need to use biological control method as an alternative or as complementary method in control programs of ticks. This study was planned to use the effect of four different strains of *Metarhizium anisopliae* on nymphal stage of laboratory bred *Hyalomma marginatum* as biological control. Then, 450 nymphal stage have been used in test and control group. It was shown that different isolates of fungi (*Metarhizium anisopliae*) have had different virulence and M14 isolate was the most virulent isolates. There was a significant difference between data test and control groups ($P<0.05$). According to results complementary and field studies are proposed. So that some isolates of this fungus as a biological control agent against ticks of *Hyalomma marginatum* introduced on a commercial scale.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Hyalomma marginatum*, Biological control

مقدمه

کنه‌ها در در رده آراکنیدا یا شـــبه عنکبوتیان، راسته آکارینا، زیر راسته متااســـتیگماتا و فوق خانواده ایکســـودیدهآ قرار دارند که شـــامل خانواده ایکسودیده (کنه‌های سخت) و آرگازیده(کنه‌های نرم) می‌شود. کنه‌ها گروه مهمی از انگل های انســـان و حیوانات اهلی و وحشی به ویژه پستانداران و پرندگان می‌باشـــند که در تمام مراحل زیستی خود از خون و مایعات بین بافتی تغذیه می‌کنند(۳،۱). هیالوما مارژیناتوم در بیشتر استان‌ها و در اکثر فصول ســـال در ایران فعالیت دارد. این کنه می‌تواند به عنوان یک کنه دو میزبانه (چرخه زندگی ۱۰۱ روز) یا ســـه میزبانه (چرخه زندگی ۱۱۸ روز) رفتار کند (۵).

کنترل شـــیمیایی و استفاده از ترکیبات ضد کنه‌ای ساده‌ترین راهی بوده اســـت که دولت‌هـــا و تولیدکنندگان برای کنتـــرل این آفت و کاهش زیان‌های وارده برگزیده‌اند (۹،۱۰). روند روز افزون موارد مقاومت نســـبت به ســـموم و مواد شـــیمیایی و ثبت ۱۷۹۷ مورد از آن‌ها در همه گونه‌های بندپایان و همه سموم تا سال ۱۹۸۴ خوش بینی نسبت به سموم شیمیایی را با شکست مواجه ساخت (۱۱،۱۲). با توجه به افزایش مشکلات در کاربرد سموم شیمیایی و نگرانی عمومی در مورد باقی مانده‌های مواد شیمیایی در محصولات حیوانی، روش مبارزه زیســـتی را دارای جایگاهی خاص و ممتاز نموده اســـت. با توجه به معضلات فوق‌الذکر امکان دارد تمایل بیشـــتری نسبت به تولید انبوه محصولات کنترل زیستی برای کنترل کنه‌های حیوانات اهلی نشان دهند (۱۶،۱۵) .بررسی‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای، بسیاری از ارگانیسم‌ها از قبیل ویروس‌ها، باکتری‌ها، تک یاخته‌ها، نماتودها و جرب‌ها را به عنوان دشمنان طبیعی کنه‌های انگل حیوانات اهلی نشان داده است. از شروع قرن بیستم، از میان تمام عوامل کنترل زیستی، مهم‌ترین این عوامل را برخـــی از قارچها از جمله قارچ‌های متاریزیوم معرفی می‌نمایند و تاکنون چندین گونه قارچی در این مورد شناسایی شده‌اند (۲۶،۲۴).

قارچها ارگانیســـم‌های یوکاریوت هتروتروفی هســـتند که پراکندگی جهانی دارند و برای رشـــد، به مواد آلی از پیش ســـاخته نیـــاز دارند. این گروه از میکروارگانیســـم‌ها در طبقه‌بندی وایتاکر (Whittaker) در سلسله قارچها طبقه‌بندی شـــده‌اند (۲). قارچ‌های پاتوژن یا انگل بندپایان در گروه بزرگـــی با نزدیـــک به ۷۵۰ گونـــه از ۵۶ جنس قرار دارنـــد که فقط ۱۰ گونه از آن‌ها برای کنترل حشـــرات استفاده می‌شوند. دئوترومایکوتا شامل بسیاری از گونه‌های ساپروتروف، پاتوژن‌های گیاهی و هم چنین بسیاری از انتوموپاتوژن‌های مهم هستند که به طور گسترده‌ای برای کنترل بیولوژیک انگل‌ها استفاده می‌شوند و جنس‌های مهم آن شامل پاسیلومایسس، بواریا، متاریزیوم و ورتیسیلیوم هستند که دارای پراکندگی جهانی بوده و می‌توانند سریعا کلنی تولید کنند. بیش از ۱۵ مایکوپستی ساید (فرآورده‌های کشنده انگل‌ها) از این‌ها فرموله شده است و از لحاظ تجارتی برای کنترل و مدیریت طیفی از انگل‌ها از جمله ســـاس، سوسک، دوبالان و پشه‌ها با ارزش هستند (۲۵) .

www.SID.ir

Archive of SID

اسپورهای قارچ به صورت فیزیکی به کوتیکول کنه چسبیده و پس از برقراری اتصال قوی با کوتیکول به درون آن جوانه می‌زند (۶ تا ۲۴ ساعت پس از عفونت)، سپس لوله زایا تشکیل شده (۱ تا ۲ روز پس از عفونت) و به درون بدن نفوذ می‌کند (۲ تا ۵ روز پس از عفونت)، در ادامه، قارچ در درون بدن تکثیر می‌شود و میزبان را از بین می‌برد، در نهایت معمولاً (۴ تا ۹ روز پس از عفونت) شکوفا شده و اسپورهای جدید به وجود می‌آورد (۷ تا ۹ روز پس از عفونت (۲۳) . ظاهراً مرگ به علت رشد وسیع قارچ در همولنف اتفاق می‌افتد. در این هنگام آنزیم‌های پروتئاز و اسید اُگزالیک به درون همولنف رها و سبب انهدام اندام‌هایی مانند اپیدرم داخلی، احتمالاً قسمت عمده لوله‌های مالپیگی و پاره‌شدن جدار روده کنه می‌شود (۲۴).

در ایران تحقیقات مبارزه زیست شناختی از سال ۱۳۰۷با تاسیس موزه جانورشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران آغاز شد و در سال۱۹۱۲ با ورود کفشدوزک استرالیایی رودالیا کاردینالیس مبارزه با شپشک استرالیایی مرکبات، ایسریا پورکاسی در باغ های مرکبات شمال کشور آغاز شد (۶). در ارتباط با کنترل زیست شناختی کنه‌ها در مطالعه‌ای توسط پیرعلی خیرآبادی و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر ۱۱ جدایه قارچی انتوموپاتوژن با منشا داخلی و خارجی روی مراحل مختلف رشد کنه ریپی‌سفالوس آنولاتوس مورد ارزیابی قرار گرفت (۱). در بررسی دیگری توسط پیرعلی خیرآبادی و همکاران (۲۰۰۸) اثر دو جدایه قارچ انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه در شرایط مزرعه روی زنبورستان آلوده‌ای در شمال تهران انجام شد که با موفقیت همراه بود (۲۱). در سال ۲۰۰۸ توسلی و همکاران تاثیرات قارچ انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه را روی مراحل مختلف رشد کنه درمانیسوس گالینه بررسی کردند (۲۷). هدف از انجام این تحقیق، بررسی آزمایشگاهی حدت جدایه‌های قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه در کنترل زیست شناختی نوچه هیالوما مارژیناتوم بود.

مواد و روش کار

کنه‌ها

کنه‌های زنده مستقیما از روی ۱۰ راس گوسفند (نژاد فشندی) جمع آوری و در ظروف مخصوص با درپوش گازپنبه (حدود ۲۵-۱۵ کنه در هر ظرف) به آزمایشگاه منتقل شدند. اولین مرحله شناسایی جداسازی کنه‌های هیالوما مارژیناتوم با استفاده از کلید تشخیص بود (۴). به منظور تهیه کنه های یکسان و استرین مناسب برای بررسی اثرات قارچ، کنه ماده هیالوما مارژیناتوم سوش طالقان پرورش داده شد.

این کنه ها به مدت ۳ ثانیه در الکل ۷۰ درجه غوطه ور شدند تا استریل شده و از آلودگی بعدی جلوگیری شود. سپس در انکوباتور مخصوص پرورش کنه‌ها که مجهز به سیستم تامین رطوبت ۸۰-۷۵ درصد و سیستم نوردهی مناسب و درجه حرارت C ˚۲۸ نگهداری شدند. پس از تخمگذاری کنه ماده، نوزاد کنه‌ها با اتصال بر روی خرگوش سفید آزمایشگاهی خونخواری کردند. کنه‌های متصل به گوش خرگوش به مدت ۱۲-۱۰ روز مورد مراقبت روزانه قرار گرفت. پس از اتمام خون‌خواری و رهاشدن نوچه کنه‌ها از گوش خرگوش، به آزمایشگاه منتقل و در دستگاه انکوباتور گذاشته شدند.

روش تهیه جدایه های قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه

از ۱۰۰ میلی‌متر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار حاوی چهار جدایه بومی از قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه، از موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهادکشاورزی تهیه شد (جدول ۱). جهت کشت قارچها در شرایط استریل ابتدا سطح میز با پنبه الکل تمیز شد، سپس در کنار شعله به وسیله آنس فلزی مقداری از پرگنه‌های محیط منبع به محیط کشت منتقل شد. به این صورت از هر جدایه تعدادی کشت تهیه شد. کشت‌ها برای ۱۴ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و از نظر رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت کشت قارچها در شرایط استریل ابتدا سطح میز با پنبه الکل تمیز شد، سپس در کنار شعله به وسیله آنس فلزی مقداری از پرگنه‌های محیط منبع به محیط کشت منتقل شد. به این صورت از هر جدایه تعدادی کشت تهیه شد. کشت‌ها برای ۱۴ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، و از نظر رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تهیه سوسپانسیون کنیدیومی، سطح محیط‌های کشت توسط آب مقطر همراه با توئین ۸۰ با غلظت ۰/۰۱ درصد شستشو داده شد. سپس در کنار شعله مقدار کمی محلول توئین ۸۰ در یکی از پلیت‌ها ریخته و سطح محیط کشت با استفاده از پیپت پاستور استریل که با حرارت مجرای آن بسته شده بود تراشیده و شستشو گردید. سوسپانسیون حاصل را روی محیط دیگر ریخته و عمل تکرار شد. سوسپانسیون حاصله از ۴ لایه گاز استریل گذرانده شد تا میسلیوم‌ها جدا شوند. از محلول صاف شده با

جدول ۱- مشخصات جدایه های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه مورد استفاده در مطالعه

جدایه قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه	غلظت (کنیدی در میلی لیتر)			محل	میزبان
IRAN 437 C	۲/۴× ۱۰^۷	۲/۴× ۱۰^۹	۲/۴× ۱۰^۱۱	رشت	کرم ساقه خوار برنج
IRAN 715 C	۲/۴× ۱۰^۷	۲/۴× ۱۰^۹	۲/۴× ۱۰^۱۱	اهواز	ملخ
DEMI001	۲/۴× ۱۰^۷	۲/۴× ۱۰^۹	۲/۴× ۱۰^۱۱	سراوان	سوسک سرخرطومی حنایی خرما
M14	۲/۴× ۱۰^۷	۲/۴× ۱۰^۹	۲/۴× ۱۰^۱۱		

www.SID.ir

Archive of SID

اســـتفاده از سمپلر یا پیپت پاستور برداشت و با استفاده از لام هموسیتومتر (نئوبار) اقدام به شمارش اسپورها جهت تهیه ۳ غلظت ($۲/۴\times ۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتـــر)، ($۲/۴\times ۱۰^{۹}$ کنیـــدی در میلی‌لیتر) و ($۲/۴\times ۱۰^{۱۱}$ کنیدی در میلی‌لیتر) گردید.

آلوده کردن کنه‌ها با سوسپانسیون کنیدیوم قارچ به روش غوطه‌وری

نوچه‌ها ی خون خورده بلافاصله پس از برداشت از روی گوش خرگوش در الـــکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی شـــدند (۱). برای انجـــام آزمایش، سوسپانســـیونی حاوی $۲/۴\times ۱۰^{۷}$ کنیدیـــوم ، $۲/۴\times ۱۰^{۹}$ کنیدیوم و $۲/۴\times ۱۰^{۱۱}$ کنیدیـــوم در هر میلی لیتر از هـــر کدام از ۴ جدایه تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای هر جدایه قارچی سه گروه درمـــان از هر کنه‌ی مورد آزمایش، در غالب گروه‌های ۱۰ تایی کنه در نظر گرفته شد، هم چنین ۳۰ عدد کنه به عنوان گروه کنترل منفی در سه گروه ۱۰ تایی جای گرفتند که در مجموع ۳ بار تکرار تعداد ۴۵۰ کنه‌ی هیالوما مارژیناتوم مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲)(۷،۱).

در گروه‌های درمان، کنه‌ها به صورت انفرادی به وسیله‌ی پنس استریل ۵-۳ ثانیه در سوسپانســـیون قارچی مربوطه و در گـــروه کنترل منفی نیز کنه‌ها ۵-۳ ثانیه در آب مقطر اســـتریل همراه با توئین ۸۰ بدون اســـپور، غوطه‌ور شـــدند. پس از غوطه‌وری، کنه‌ها بـــه پتری‌دیش‌هایی حاوی کاغذ صافـــی (کاغذ واتمن) اتوکلاو شـــده مرطوب منتقل گردیدند. ســـپس در ژرمیناتـــور با دمای ۲۵ درجه ســـانتیگراد و رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفتند. تمامـــی گروه‌های مـــورد آزمایش به صورت روزانه، بـــه مدت ۲۰ روز مورد مشـــاهده و بازبینی قرار گرفتند. تعداد کنه تلف شـــده و رشد قارچ روزانه کنترل و ثبت شد.

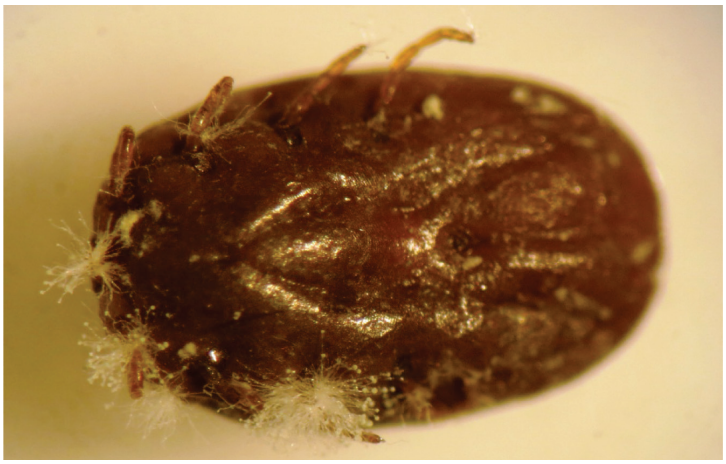
ارزیابی آماری

تمامی اطلاعات بدست آمده به صورت میانگین انحراف معیار (Mean ± SD) ارائه شده است.آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA تحلیل واریانس یک طرفه در ســـطح $p < ۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفـــت و در صورت وجود اختلاف معنی دار تســـت توکی (Tukey) جهت مقایسه میانگین‌ها در روزهای مختلف و در مجموع ۲۰ روز استفاده شد.

جدول ۲- گروه‌های تحت درمان در اثر کنیدیوم‌های مختلف قارچی

گونه	جدایه	هیالوما مارژیناتوم	
		تکرار	تعداد
متاریزیوم آنیزوپلیه	DEMI 001	۳	۹۰
	M14	۳	۹۰
	IRAN 437 C	۳	۹۰
	IRAN 715 C	۳	۹۰
کنترل	-	۳	۹۰
جمع کل		۱۵	۴۵۰

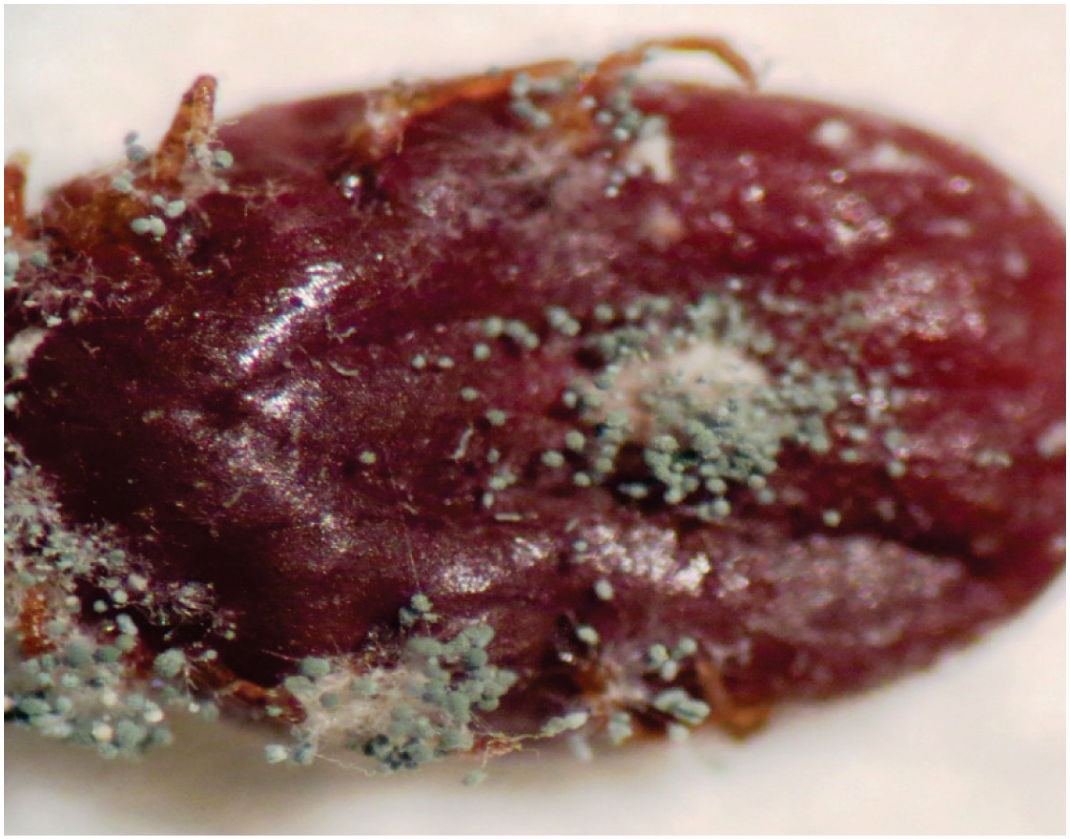
نتایج



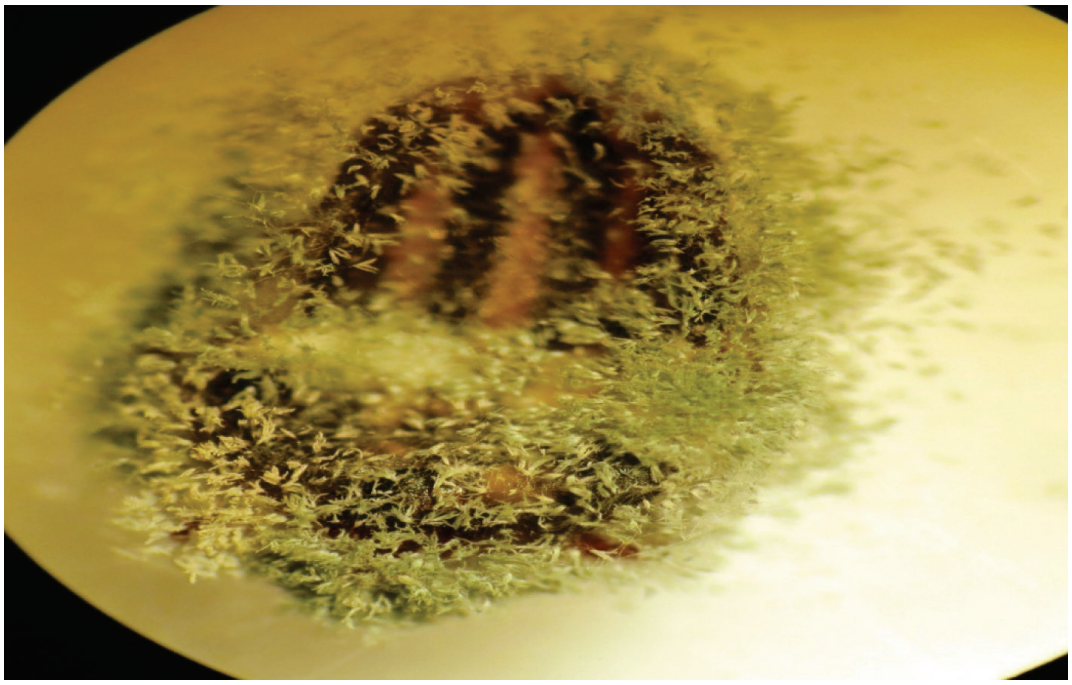
شکل۱- مشاهدات ماکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه IRAN 715 C روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم

www.SID.ir

Archive of SID



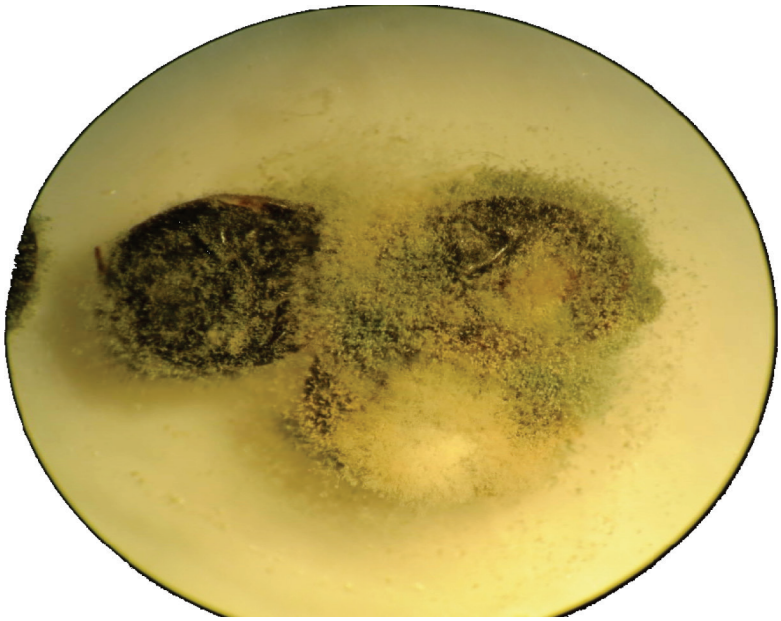
شکل ۲- مشاهدات ماکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه M14 روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم



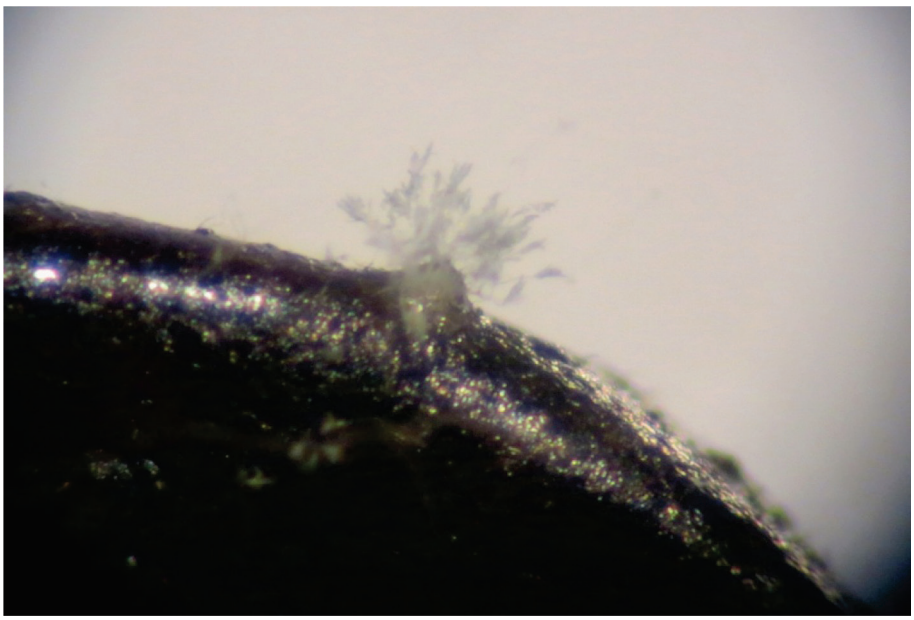
شکل۳- مشاهدات ماکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایهIRAN 437 C روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مشاهدات ماکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه DEMI 001 روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم



شکل۵- پاره شدن کوتیکول نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم توسط قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه M14

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به موقعیت جغرافیایی کشـــور ایـــران و قرار گرفتن در منطقه معتدله در اکثر فصول سال کنه‌ها در مناطق مختلف فعالیت دارند. کنه‌های جنس هیالوما در ایران و اغلب کشورهای خاورمیانه انتقال گونه‌های مختلف تـــک یاخته‌های بیماری‌زا مانند انواع تیلریا و بابزیا را در گاو و گوســـفند بر عهـــده دارند (۴). قارچ‌های انتوموپاتوژن نیز به طور وســـیعی برای کنترل آفات کشـــاورزی و جنگل‌ها اســـتفاده گردیده اســـت و کوشش‌های اندکی برای ارزیابی پتانســـیل قارچ‌های انتوموپاتوژن در برابر کنه‌های ناقل عوامل بیماری‌زا به انسان و دام انجام گردیده است (۱۸).

در مطالعـــه حاضر تاثیـــر چهار جدایـــه قارچی متاریزیـــوم آنیزوپلیه بر روی نوچه‌هـــای کنه هیالومـــا مارژیناتوم حدت‌های متفاوتی داشـــتند (۱۲,۱۳,۲۰,۲۳) و جدایـــه M۱۴ بیشـــترین تاثیر را بر روی نوچه‌های کنه داشت. اولین مورد مرگ و میر روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم مربوط به گروه‌های DEMI 001 و M 14 در روز چهارم و دو گروه دیگر IRAN 715 C و IRAN 437 C در روز ششم بود. اولین مورد مشاهده میسلیوم‌های قارچی روی این کنه‌ها مربوط به جدایه‌های IRAN 437 C و IRAN 715 C در روز ششـــم می باشد. از بین جدایه‌های تحت مطالعه جدایه متاریزیوم آنیزوپلیه M14 حادتریـــن جدایه بود که از ابتدا تا انتهای مطالعه در بالاترین ســـطح مرگ و میر و رشد میسلیوم های قارچی قرار داشت، با تفاوت اندک پس از آن DEMI 001 سپس IRAN 715 C و IRAN 437 C قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای Hallet و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر قارچ‌های انتوموپاتوژن و نماتودها را روی مراحل لارو و نوچه کنه ایکسودس ریسینوس بررسی کرده و عنوان کردند تمامی قارچ‌های مورد آزمایش در برابر این کنه موثر بوده اما تاثیر متفاوتی دارند. در این مطالعه بهترین LT۵۰ برای لارو های گرســـنه

جدول۳- درصد مرگ و میر نوچه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری کنه‌ها در سوسپانسیون قارچ های مختلف با غلظت $۱۰^{۷}$ ×۲/۴ کنیدی در میلی لیتر (میانگین ± انحراف معیار).

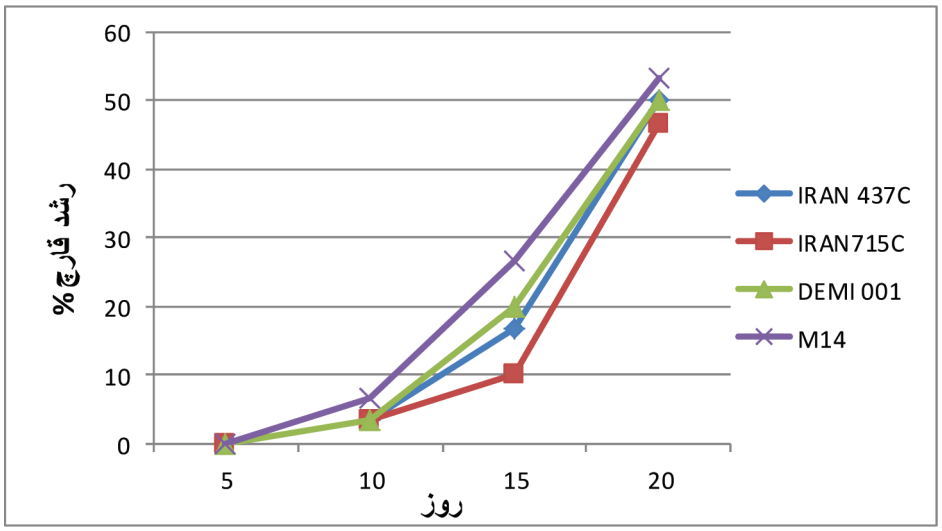
جدایه های متاریزیوم آنیزوپلیه	کنه تلف شده (٪، میانگین ± انحراف معیار)			
	روز۵	روز۱۰	روز۱۵	روز۲۰
IRAN 437 C	۰۰±۰/۰۵	۱۳/۰/۰۵ ±۳	۲۶/۶±۰/۰۵	۵۶/۶± ۰/۰۵
IRAN 715 C	۰۰±۰/۰۵	۰/۰۵ ±۱۰	۲۳/۳±۰/۰۵	۵۳/۳± ۰/۰۵
DEMI 001	۰۰±۰/۰۵	۰/۰۵ ±۱۳/۳	۳۰±۰/۰۵	۵۶/۶± ۰/۰۵
M 14	۰۰±۰/۰۵	۰/۰۵ ±۱۶/۶	۳۶/۶±۰/۰۵	۶۰± ۰/۰۵
شاهد	۰۰±۰/۰۵	۰/۰۵ ±۰۰	۰۰±۰/۰۵	۰۰± ۰/۰۵

جدول۴- درصد مرگ و میر نوچه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری در سوسپانسیون قارچ های مختلف با غلظت $۱۰^{۹}$ ×۲/۴ کنیدی در میلی لیتر (میانگین ± انحراف معیار).

جدایه های متاریزیوم آنیزوپلیه	کنه تلف شده (٪، میانگین ± انحراف معیار)			
	روز۵	روز۱۰	روز۱۵	روز۲۰
IRAN 437 C	۰۰±۰/۰۵	۳۳/۳±۰/۰۵	۶۳/۳±۰/۰۵	۸۶/۶±۰/۰۵
IRAN 715 C	۳/۳±۰/۰۵	۴۰±۰/۰۵	۷۰±۰/۰۵	۹۰±۰/۰۵
DEMI 001	۰۰±۰/۰۵	۲۳/۳±۰/۰۵	۶۶/۶±۰/۰۵	۸۳/۳±۰/۰۵
M 14	۶/۶±۰/۰۵	۴۳/۳±۰/۰۵	۸۶/۶±۰/۰۵	۱۰۰±۰/۰۵
شاهد	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID



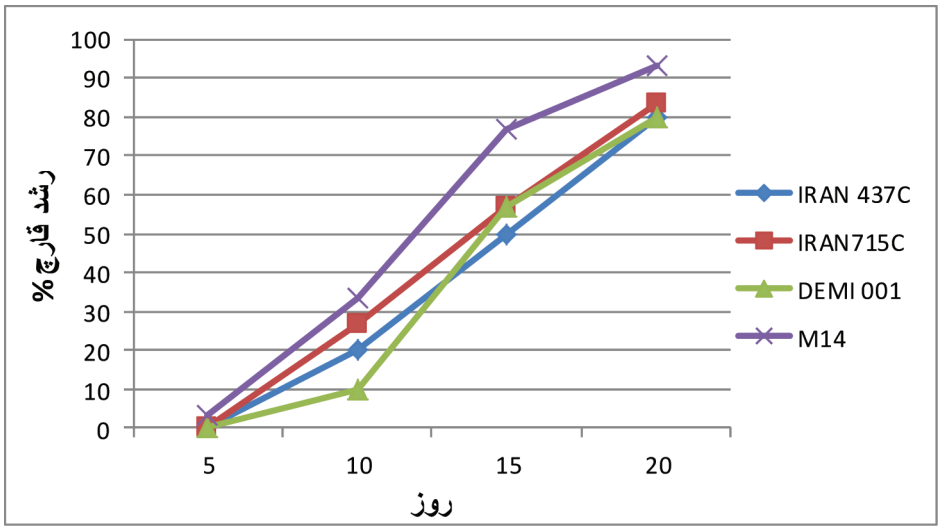
نمودار۱- مقایسه رشد میسلیوم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایههای قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی لیتر(میانگین ± انحراف معیار).

جدول۵-درصد مرگ و میر نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری کنه ها در سوسپانسیون قارچ های مختلف با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۱۱}$ کنیدی در میلی لیتر(میانگین ± انحراف معیار).

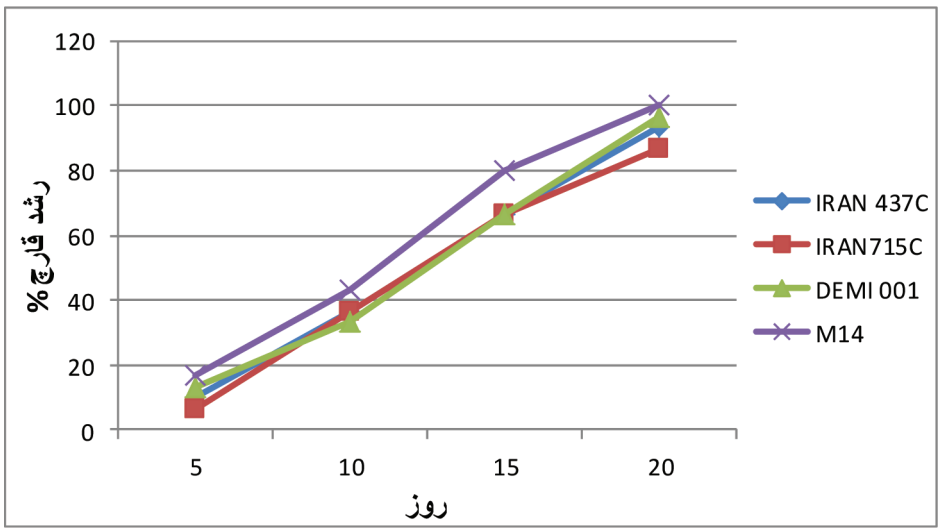
جدایه‌های متاریزیوم آنیزوپلیه	کنه مرده (٪، میانگین ± انحراف معیار)			
	روز۵	روز۱۰	روز۱۵	روز۲۰
IRAN 437 C	۱۳/۳±۰/۰۵	۴۰±۰/۰۵	۷۰±۰/۰۵	۶,۹۶±۰/۰۵
IRAN 715 C	۱۳/۳±۰/۰۵	۴۶/۶±۰/۰۵	۷۳/۳±۰/۰۵	۳,۹۳±۰/۰۵
DEMI 001	۲۳/۳±۰/۰۵	۳۶/۶±۰/۰۵	۷۶/۶±۰/۰۵	۱۰۰±۰/۰۵
M 14	۲۳/۳±۰/۰۵	۵۰±۰/۰۵	۸۰±۰/۰۵	۱۰۰±۰/۰۵
شاهد	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵	۰۰±۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲- مقایسه رشد میسلیوم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایه های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۹}$ کنیدی در هر میلی لیتر(میانگین ± انحراف معیار).



نمودار۳- مقایسه رشد میسلیوم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایه های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۱۱}$ کنیدی در میلی لیتر (میانگین ± انحراف معیار).

www.SID.ir

Archive of SID

۱۴ روز و برای نوچه‌های گرسنه ۲۱ روز مطرح شد. طی این تحقیق ۸۰ درصد مرگ و میر پس از ۳۰ روز در نوچه‌های گرسنه ثبت شد (۱۶). نتایج حاصله از تجربه فوق در مورد نوچه ها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. در مطالعه‌ای دیگر Kirkland و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی اثرات جدایه‌های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسیانا روی کنه‌های سخت شامل ریپی سفالوس سانگوئینوس پرداختند و عنوان کردند که متاریزیوم آنیزوپلیه پس از ۲۸ روز باعث ۵۰ تا ۷۰ درصد مرگ و میر در کنه‌ها شده است (۱۹) .

در تجربه‌های Zhioua و همکاران (۱۹۹۷) کنه‌های ماده ایکسودس اسکپولاریس با جدایه‌ای از متاریزیوم آنیزوپلیه تحت درمان قرار گرفتند که ۱۰۰ درصد مرگ و میر کنه ها پس از ۲۰ روز گزارش گردید (۲۸).

در مطالعه‌ای Benjamin و همکاران (۲۰۰۲) تاثیر قارچ های متاریزیوم آنیزوپلیه روی کنه ایکسودس اسکپولاریس را در آزمایشگاه و محیط بررسی کردند که در آزمایشگاه در حدود ۹۶ درصد و در محیط به صورت اسپری حدود ۵۳ درصد مرگ و میر در غلظت $10^9 \times 4$ spore/ml طی چهار هفته ثبت شد (۷).

در مطالعه‌ی Samish و همکاران (۲۰۰۱) تاثیر قارچهای انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه روی مراحل مختلف رشد جرب درمانیسوس گالینه بررسی شد که تاثیر خاصی در کنه‌های بالغ تا روز چهارم نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد اما از روز ششم مرگ و میر افزایش پیدا کرد (۲۳) .

در مطالعه‌ی تاثیر قارچهای متاریزیوم آنیزوپلیه روی نوچه کنه‌های ریپی سفالوس اپندیکولاتوس ۹۵-۸۰ درصد مرگ و میر مشاهده شد (۱۴) نتایج حاصله از تجربه فوق در مورد نوچه‌ها با نتایج این مطالعه همخوانی داشت.

در بررسی دیگری Camargo و همکاران (۲۰۱۲) اثرات قارچهای انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه (10^8 کنیدی در میلی‌لیتر) روی کنه ریپی سفالوس میکروپلوس ۱۰۰-۹۳ درصد مرگ و میر ۲۰ روز پس از درمان مشاهده شده است (۸).

در مطالعه‌ی Suleiman و همکاران (۲۰۱۳) قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه توانایی سوراخ کردن کوتیکول کنه هیالوما آناتولیکوم و عفونت داخل بافتی را داشت و کنیدی قارچ از بافت جدا گردید (۲۶).

در ایران Pourseyed و همکاران (۲۰۱۰) اثرات قارچهای انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه روی مراحل مختلف زندگی کنه آرگاس پرسیکوس مورد ارزیابی قرار گرفت و عنوان شد در بالاترین غلظت مورد آزمایش (10^7 کنیدی در میلی‌لیتر) حادترین جدایه قارچی بررسی شده ۱۸روز و بقیه جدایه‌ها ۲۱ روز پس از درمان باعث ۱۰۰ درصد مرگ و میر شده‌اند (۲۲).

نوچه‌های کنه هیالوما مارژیناتوم به صورت معنی‌داری نسبت به قارچهای انتوموپاتوژن مورد استفاده حساس بودند که این حساسیت در بین جدایه‌های مختلف قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه متفاوت بود. بر این اساس جدایه M 14 حادترین جدایه قارچی مورد آزمایش در این مطالعه بودند. نتایج حاصله در این تحقیق می‌تواند راه‌گشای تلاش‌های بیشتر به سوی کاربردهای عملی قارچهای انتوموپاتوژن بومی ایران به عنوان عوامل کنترل زیست شناختی کنه هیالوما آناتولیکوم باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران بخش انگل‌شناسی آقایان دکتر حبیب اله پایکاری، دکتر غلامرضا معتمدی، دکتر وحید نصیری، ابراهیم خدری و غفار الکائی نژاد و آقای نادر احمدی، کارشناس دانشگاه شهرکرد که ما را در اجرای این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. پیرعلی خیرآبادی خ. کنترل زیستی مراحل مختلف کنه ریپی سفالوس آنولاتوس توسط قارچهای انتوموپاتوژن در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی; دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،۱۳۸۴.

۲. رزاقی ابیانه م، شمس قهفرخی م. قارچ شناسی عمومی دامپزشکی. چاپ اول، انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی. تهران،۱۳۸۴: ۱۵-۳.

۳. رنجبر بهادری ش، پیرعلی خیرآبادی خ، شمشادی ب. بندپایان و بیماریهای ناشی از آنها. چاپ اول، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۸: ۹۵-۸۲.

۴. عبدی گودرزی م زیست شناسی کنه ها (آکاری: ایکسودیدا) به انضمام معرفی کنه های ایران (کلید شناسایی) ۱۳۹۲

۵. عبدی گودرزی م, ریواز ش پرورش طبیعی و مصنوعی کنه های سخت (ACARI: IXODIDAE) گونه *Hyalomma anatolicm anatolicum* و مطالعه جداول رشد مربوط به چرخه زندگی این کنه در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از میزبان اختصاصی دامپزشکی (پژوهش و سازندگی) بهار , دوره ۲۴ , شماره ۱ (پیاپی ۹۰) ۱۳۹۰: صفحه ۱۲-۱.

۶. یخچالی م. کنترل زیست شناختی نماتودهای سیاتوستومینه اسب آرتروبوتریس اولیگوسپورا و کاندیدا. پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی; دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۷۸.

7. Benjamin MA, Zhioua E, Ostfeld RS. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari Ixodidae). *Journal of Medical Entomology,* 2002; 39: 723-728.

8. Camargo MG1, Golo PS, Angelo IC, Perinotto WM, Sá FA, Quinelato S, Bittencourt VR. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control Rhipicephalus microplus ticks under laboratory conditions.*Veterinary Parasitology.* 2012; 188(1-2):140-7.

9. FAO. Guid lines for resistance management and integrated parasit Control in ruminants. 2002.

10. Georghiou GP, Lagunes –Tejadda A.The occurrence of resistance to Pesticide in arthropods, an index of cases reported through 1989. FAO, Roma 1991; 318.

11. Georghiou GP. The magnitude of the resistance problem in: pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington, D .C. 1986; 14-43.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Gindin G, Samish M, Alekseev E, et al. The susceptibility of *Boophilus annulatus* ticks to Entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology,* 2001; 11: 111-118.

13. Gindin G, Samish M, Zangi G. Mishoutchenko A, et al. The susceptibility of different spesies and stages of tick to Entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology,* 2002; 28: 283-288.

14. Godwin P.Kaaya, Shawgi H. Enomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 2002; 24: 913-926

15. Gronvold J, Henriksen SA, Nansen P. et al. Attempts to control infection with Ostertagia (trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the Nematod trapping fungus *Arthrobotris oligospora* to cow pats. *Journal of Helminthology*, 1989; 63: 115 -126.

16. Hartelt K, Wurst E, Collatz J, et al. Biological control of the tick Ixodes ricinus with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. *Journal of Medical Microbiology*, 2008; 298: 314-320.

17. Hoksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, et al. Dictionary of the fungi, 8th edition, CAB International, Wallingferd, UK 1995; 616.

18. Kaaya GP, Hassan S., Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology,* 2000; 24: 913-926.

19. Kirkland BH, Cho EM, Keyhani NO. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control,* 2004; 31: 414-421.

20. Onofre SB, Miniuk CM, Debarros NM, et al. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research 2001*, 62: 1478–1480.

21. Pirali-Kheirabadi Kh, *Teixeirada silva* J, Razzaghi-Abyaneh M, et al. A Field Experimental to assess the rate of infestation in Honey Bee population of Two *Metarhizium anisopliae* Isolates on Varroa destructor (Acari: Mesostigmata). *J Arthropod-Borne Dis,* 2013, 7(1): 15-22

22. Pourseyed SH, Tavassoli M, Bernousi I, et al. *Metarhizium anisopliae*: An effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus*. *Veterinary Parasitology,* 2010; 5339: 6.

23. Samish M, Gindin G, Alekseev E, et al. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Parasitology,* 2001; 87:1355–1359.

24. Samish, M., H. Ginsberg, and I. Glazer. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In AS Bowman and A. Nuttall (ed.), Tick biology, disease and control. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2008;447-469

25. Samson RA, Evans HC, Latge JP. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin, Germany 1988; 187.

26. Suleiman EA, Shigidi MT, Hassan SM. *Metarhizium anisopliae* as a biological control agent against *Hyalomma anatolicum* (Acari: Ixodidae). *Pakistan journal of biological sciences.* 2013; 16(24):1943-9

27. Tavassoli M, Ownag A, Pourseyed SH, et al. Laboratory evaluation of three strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling Dermanyssus gallinae. *Avian Pathology,* 2008; 37: 259–263.

28. Zhioua E, Browning M, Johnson PW, et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology.* 1997; 83: 815–818.

www.SID.ir