

## 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

Email: 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 ( $p < 0.05$ ). 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

• 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, Faculty 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 درده آراکنیدا یا شبه عنکبوتیان، راسته آکارینا، زیر راسته متااستیگماتا و فوق خانواده ایکسودیده‌آ قرار دارند که شامل خانواده ایکسودیده (کنه‌های سخت) و آرگازیده (کنه‌های نرم) می‌شود. کنه‌ها گروه مهمی از انگل‌های انسان و حیوانات اهلی و وحشی به ویژه پستانداران و پرندگان می‌باشند که در تمام مراحل زیستی خود از خون و مایعات بین بافتی تغذیه می‌کنند (۱، ۳). هیالوما مارژیناتوم در بیشتر استان‌ها و در اکثر فصول سال در ایران فعالیت دارد. این کنه می‌تواند به عنوان یک کنه دو میزبانه (چرخه زندگی ۱۰۱ روز) یا سه میزبانه (چرخه زندگی ۱۱۸ روز) رفتار کند (۵).

کنترل شیمیایی و استفاده از ترکیبات ضد کنه‌های ساده‌ترین راهی بوده است که دولت‌ها و تولیدکنندگان برای کنترل این آفت و کاهش زیان‌های وارده برگزیده‌اند (۹، ۱۰). روند روز افزون موارد مقاومت نسبت به سموم و مواد شیمیایی 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 زیستی را دارای جایگاهی خاص و ممتاز نموده است. با توجه به معضلات فوق‌الذکر امکان دارد تمایل بیشتری نسبت به تولید انبوه محصولات کنترل زیستی برای کنترل کنه‌های حیوانات

اهلی نشان دهند (۱۶، ۱۵). بررسی‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای، بسیاری از ارگانسیم‌ها 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 برخی از قارچ‌ها از جمله قارچ‌های متاریزیوم معرفی می‌نمایند و تاکنون چندین گونه قارچی در این مورد شناسایی شده‌اند (۲۴، ۲۶).

قارچ‌ها ارگانسیم‌های یوکاریوت هتروتروفی هستند که پراکندگی جهانی دارند و برای رشد، به مواد آلی از پیش ساخته نیاز دارند. این گروه از میکروارگانسیم‌ها در طبقه‌بندی وایتاگر (Whittaker) در سلسله قارچ‌ها طبقه‌بندی شده‌اند (۲). قارچ‌های پاتوژن یا انگل بندپایان در گروه بزرگی با نزدیک به ۷۵۰ گونه از ۵۶ جنس قرار دارند که فقط ۱۰ گونه از آن‌ها برای کنترل حشرات 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، بویاریا، متاریزیوم و ورتیسیلیوم هستند که دارای پراکندگی جهانی بوده و می‌توانند سریعاً کلنی تولید کنند. بیش از ۱۵ مایکوپستی ساید (فرآورده‌های کشته‌اند انگل‌ها) از این‌ها فرموله شده است و از لحاظ تجارتي برای کنترل و مدیریت طیفی از انگل‌ها از جمله ساس، سوسک، دوبالان و پشه‌ها با ارزش هستند (۲۵).

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 کنه ها که مجهز به سیستم تامین رطوبت ۸۰-۷۵ درصد و سیستم نوردهی مناسب و درجه حرارت ۲۸°C نگهداری شدند. پس از تخمگذاری کنه ماده، نوزاد کنه ها با اتصال بر روی خرگوش سفید آزمایشگاهی خونخواری کردند. کنه های متصل به گوش خرگوش به مدت ۱۲-۱۰ روز مورد مراقبت روزانه قرار گرفت. پس از اتمام خون خواری و رهاشدن نوچه کنه ها از گوش خرگوش، به آزمایشگاه منتقل و در دستگاه انکوباتور گذاشته شدند.

### روش تهیه جدایه های قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه

از ۱۰۰ میلی متر محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار حاوی چهار جدایه بومی از قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه، از موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی تهیه شد (جدول ۱). جهت کشت قارچ ها در شرایط استریل ابتدا سطح میز با پنبه الکل تمیز شد، سپس در کنار شعله به وسیله آنس فلزی مقداری از پرگنه های محیط منبع به محیط کشت منتقل شد. به این صورت از هر جدایه تعدادی کشت تهیه شد. کشت ها برای ۱۴ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و از نظر رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت کشت قارچ ها در شرایط استریل ابتدا سطح میز با پنبه الکل تمیز شد، سپس در کنار شعله به وسیله آنس فلزی مقداری از پرگنه های محیط منبع به محیط کشت منتقل شد. به این صورت از هر جدایه تعدادی کشت تهیه شد. کشت ها 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 محیط های 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 پلیت ها ریخته و سطح محیط کشت با استفاده از پیمپت 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 میسلیم ها جدا شوند. از محلول صاف شده با

اسپورهای قارچ به صورت فیزیکی به کوتیکول کنه چسبیده و پس از برقراری اتصال قوی با کوتیکول به درون آن جوانه می زند (۶ تا ۲۴ ساعت پس از عفونت)، سپس لوله زا یا تشکیل شده (۱ تا ۲ روز پس از عفونت) و به درون بدن نفوذ می کند (۲ تا ۵ روز پس از عفونت)، در ادامه، قارچ در درون بدن تکثیر می شود و میزبان را از بین می برد، در نهایت معمولاً (۴ تا ۹ روز پس از عفونت) شکوفا شده و اسپورهای جدید به وجود می آورد (۷ تا ۹ روز پس از عفونت (۲۳). ظاهراً مرگ به علت رشد وسیع قارچ در همولنف اتفاق می افتد. در این هنگام آنزیم های پروتئاز و اسید اگزالیک به درون همولنف رها و سبب انهدام اندام هایی مانند اپیدرم داخلی، احتمالاً قسمت عمده لوله های مالپیگی و پاره شدن جدار روده کنه می شود (۲۴).

در ایران تحقیقات مبارزه زیست شناختی از سال ۱۳۰۷ با تاسیس موزه جانورشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران آغاز شد و در سال ۱۹۱۲ 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 کنه ها در مطالعه ای توسط پیرعلی خیرآبادی و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر ۱۱ جدایه قارچی انتوموپاتوژن با منشأ داخلی و خارجی روی مراحل مختلف رشد کنه ریپی سفالوس آنولانوس 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 آلوده ای در شمال تهران انجام شد که با موفقیت همراه بود (۲۱). در سال ۲۰۰۸ توسط 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 جدایه های قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه در کنترل زیست شناختی نوچه هیالوما مارژیناتوم بود.

### مواد و روش کار کنه ها

کنه های زنده مستقیماً 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 کنه های هیالوما مارژیناتوم با استفاده از کلید تشخیص بود (۴). به منظور

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 <sup>۹</sup>     | رشت    | کرم ساقه خوار برنج       |
| IRAN 715 C                     | ۲/۴ × ۱۰ <sup>۹</sup>     | اهواز  | ملخ                      |
| DEMI001                        | ۲/۴ × ۱۰ <sup>۹</sup>     | سراوان | سوسک سرخرطومی حنایی خرما |
| M14                            | ۲/۴ × ۱۰ <sup>۹</sup>     |        |                          |

در گروه‌های درمان، کنه‌ها به صورت انفرادی به وسیله‌ی پنس استریل ۳-۵ ثانیه در سوسپانسیون قارچی مربوطه و در گروه کنترل منفی نیز کنه‌ها ۳-۵ ثانیه در آب مقطر استریل همراه با توئین ۸۰ بدون اسپور، غوطه‌ور شدند. پس از غوطه‌وری، کنه‌ها به پتری‌دیش‌هایی حاوی کاغذ صافی (کاغذ واتمن) اتوکلاو شده مرطوب منتقل گردیدند. سپس در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفتند. تمامی گروه‌های مورد آزمایش به صورت روزانه، به مدت ۲۰ روز مورد مشاهده و بازبینی قرار گرفتند. تعداد کنه تلف شده و رشد قارچ روزانه کنترل و ثبت شد.

### ارزیابی آماری

تمامی اطلاعات بدست آمده به صورت میانگین انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) ارائه شده است. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA تحلیل واریانس یک طرفه در سطح  $p < 0.05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در صورت وجود اختلاف معنی دار تست توکی (Tukey) جهت مقایسه میانگین‌ها در روزهای مختلف و در مجموع ۲۰ روز استفاده شد.

استفاده از سمپلر یا پیپت پاستور برداشت و با استفاده از لام هموسیتومتر (نئوبار) اقدام به شمارش اسپورها جهت تهیه ۳ غلظت ( $10^7 \times 2/4$  کنیدی در میلی‌لیتر)، ( $10^9 \times 2/4$  کنیدی در میلی‌لیتر) و ( $10^{11} \times 2/4$  کنیدی در میلی‌لیتر) گردید.

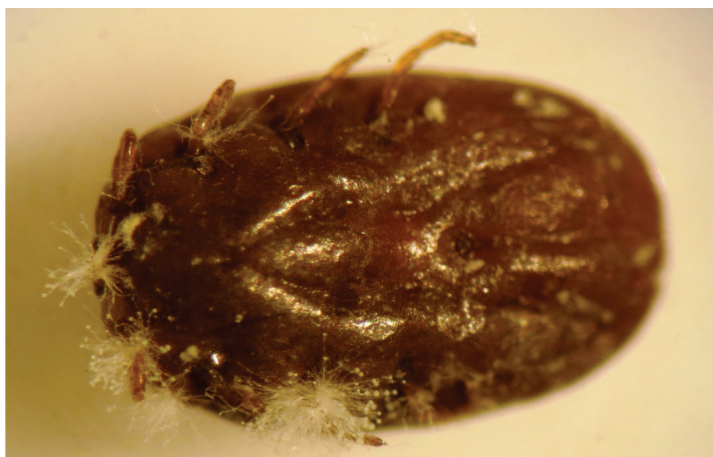
### آلوده کردن کنه‌ها با سوسپانسیون کنیدیوم قارچ به روش غوطه‌وری

نوپه‌های خون خورده بلافاصله پس از برداشت از روی گوش خرگوش در الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی شدند (۱). برای انجام آزمایش، سوسپانسیونی حاوی  $10^7 \times 2/4$  کنیدیوم،  $10^9 \times 2/4$  کنیدیوم و  $10^{11} \times 2/4$  کنیدیوم در هر میلی‌لیتر از هر کدام از ۴ جدایه تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای هر جدایه قارچی سه گروه درمان 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).

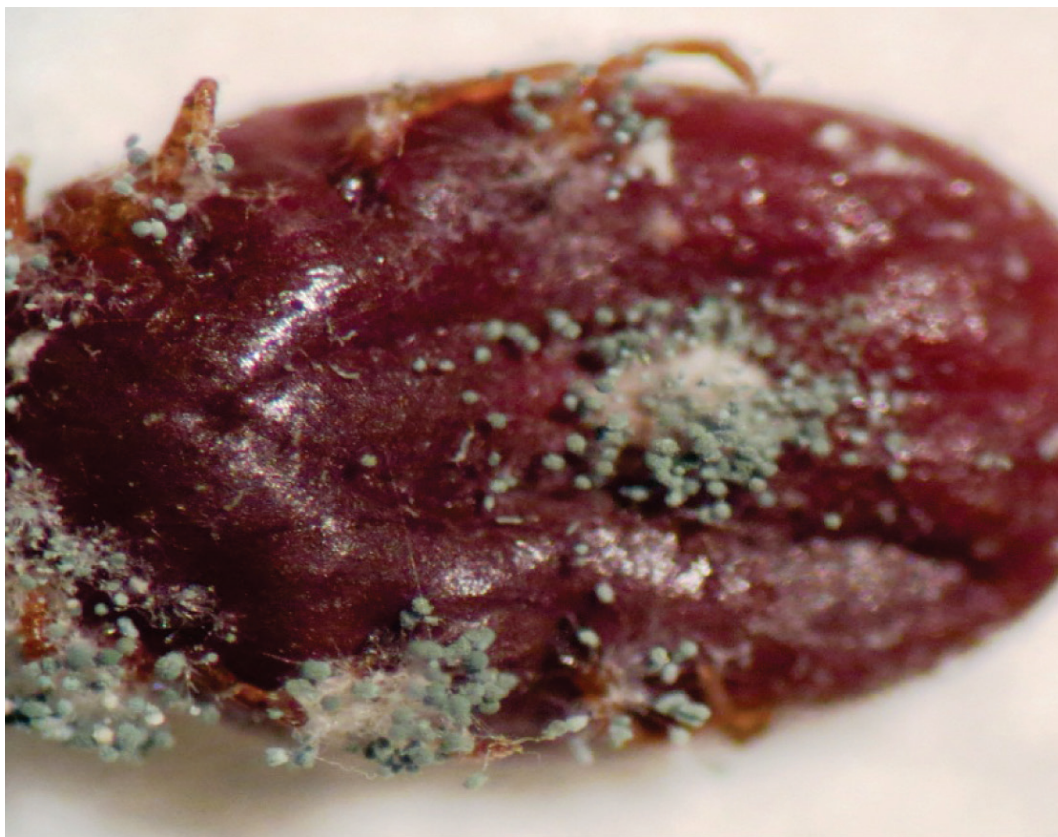
جدول ۲- گروه‌های تحت درمان در اثر کنیدیوم‌های مختلف قارچی

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

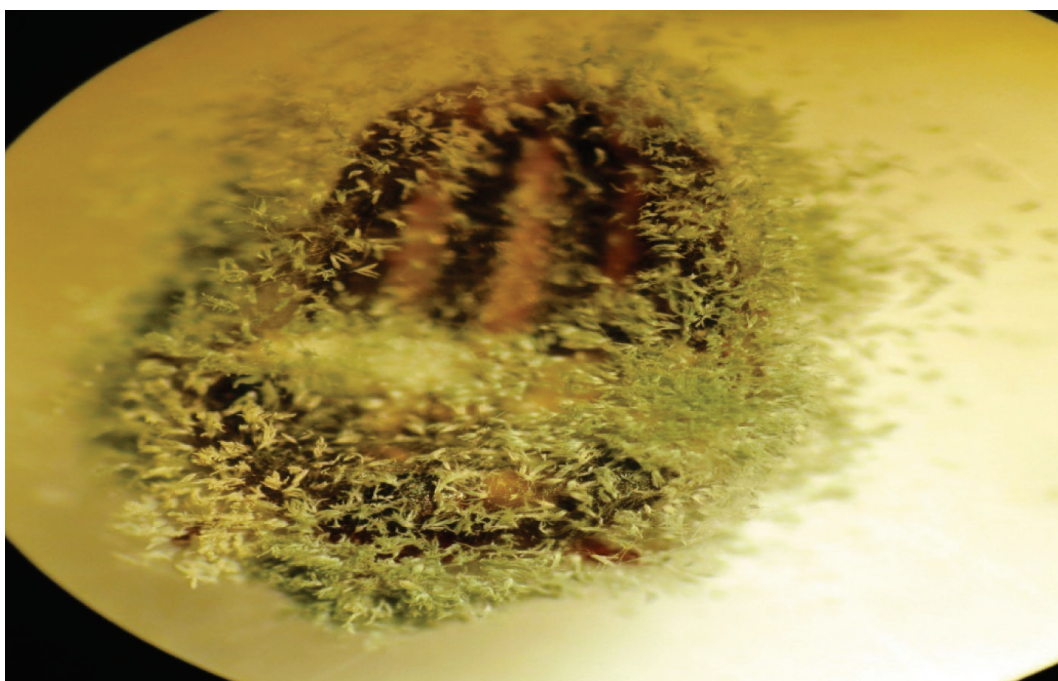
### نتایج



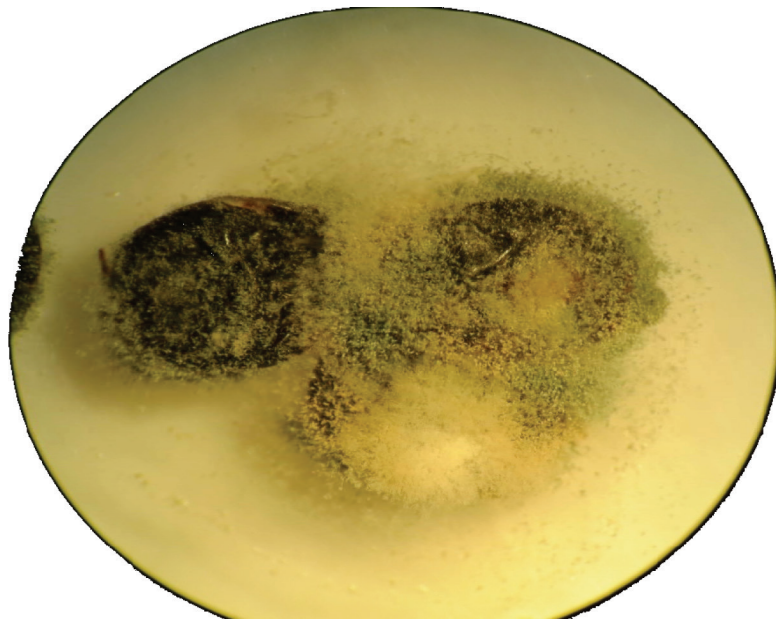
شکل ۱- مشاهدات ماکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه IRAN 715 C روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم



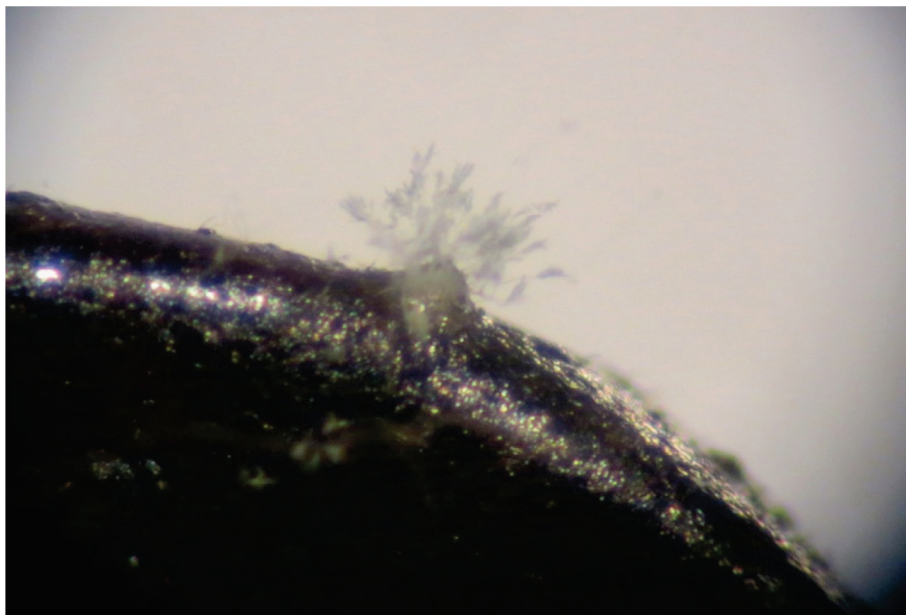
شکل ۲- مشاهدات میکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه M14 روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم



شکل ۳- مشاهدات میکروسکوپی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه C 437 IRAN روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم



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



شکل ۵- پاره شدن کوتیکول نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم توسط قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه جدایه M14

### بحث

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 میسلیم‌های قارچی روی این کنه‌ها مربوط به جدایه‌های IRAN 437 C و IRAN 715 C در روز ششم می باشد. از بین جدایه‌های تحت مطالعه جدایه متاریزیوم آنیزوپلیه M14 حادث‌ترین جدایه بود که از ابتدا تا انتهای مطالعه در بالاترین سطح مرگ و میر و رشد میسلیم‌های قارچی قرار داشت، با تفاوت اندک پس از آن DEMI 001 سپس IRAN 715 C و IRAN 437 C قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای Hallett و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر قارچ‌های انتومپاتوزن 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 LT<sub>50</sub> برای لارو های گرسنه

با توجه به موقعیت جغرافیایی کشور ایران 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 تک یاخته‌های بیماری‌زا مانند انواع تیلریا و بابزیا را در گاو و گوسفند بر عهده دارند (۴). قارچ‌های انتومپاتوزن نیز به طور وسیعی برای کنترل آفات کشاورزی و جنگل‌ها استفاده گردیده است و کوشش‌های اندکی برای ارزیابی پتانسیل قارچ‌های انتومپاتوزن در برابر کنه‌های ناقل عوامل بیماری‌زا به انسان و دام انجام گردیده است (۱۸).

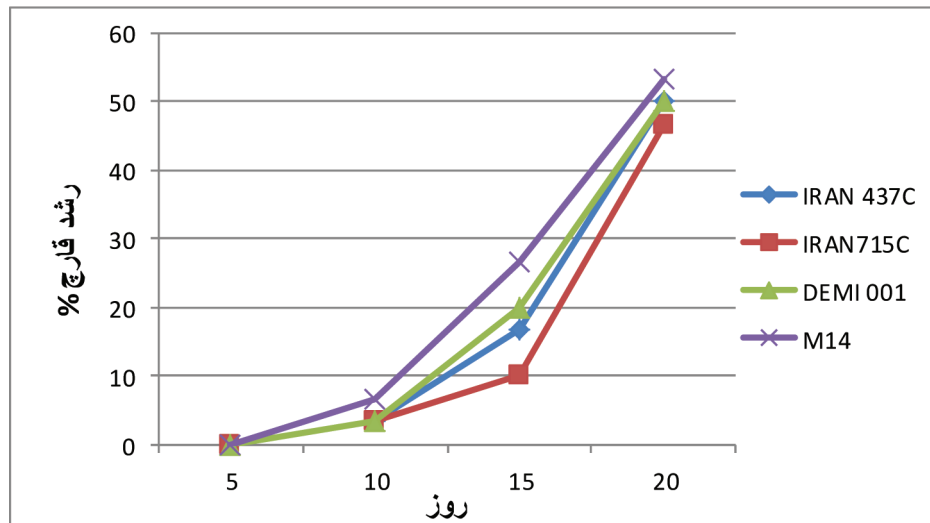
در مطالعه حاضر تاثیر چهار جدایه قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه بر روی نوچه‌های کنه هیالوما مارژیناتوم حدت‌های متفاوتی داشتند (۱۲،۱۳،۲۰،۲۳) و جدایه M14 بیشترین تاثیر را بر روی نوچه‌های کنه

جدول ۳- درصد مرگ و میر نوچه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری کنه‌ها در سوسپانسیون قارچ‌های مختلف با غلظت  $10^7 \times 2/4$  کنیدی در میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

| کنه تلف شده<br>(٪، میانگین $\pm$ انحراف معیار) |                 |                 |               | جدایه های متاریزیوم آنیزوپلیه |
|--|-----------------|-----------------|---------------|-------------------------------|
| روز ۲۰   | روز ۱۵          | روز ۱۰          | روز ۵         |                               |
| $56/6 \pm 0/05$                                | $26/6 \pm 0/05$ | $13/0/05 \pm 3$ | $00 \pm 0/05$ | IRAN 437 C                    |
| $53/3 \pm 0/05$                                | $23/3 \pm 0/05$ | $0/05 \pm 10$   | $00 \pm 0/05$ | IRAN 715 C                    |
| $56/6 \pm 0/05$                                | $30 \pm 0/05$   | $0/05 \pm 13/3$ | $00 \pm 0/05$ | DEMI 001                      |
| $60 \pm 0/05$                                  | $36/6 \pm 0/05$ | $0/05 \pm 16/6$ | $00 \pm 0/05$ | M 14                          |
| $00 \pm 0/05$                                  | $00 \pm 0/05$   | $0/05 \pm 00$   | $00 \pm 0/05$ | شاهد                          |

جدول ۴- درصد مرگ و میر نوچه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری در سوسپانسیون قارچ‌های مختلف با غلظت  $10^9 \times 2/4$  کنیدی در میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

| کنه تلف شده<br>(٪، میانگین $\pm$ انحراف معیار) |                 |                 |                | جدایه های متاریزیوم آنیزوپلیه |
|--|-----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| روز ۲۰   | روز ۱۵          | روز ۱۰          | روز ۵          |                               |
| $86/6 \pm 0/05$                                | $63/3 \pm 0/05$ | $33/3 \pm 0/05$ | $00 \pm 0/05$  | IRAN 437 C                    |
| $90 \pm 0/05$                                  | $70 \pm 0/05$   | $40 \pm 0/05$   | $3/3 \pm 0/05$ | IRAN 715 C                    |
| $83/3 \pm 0/05$                                | $66/6 \pm 0/05$ | $23/3 \pm 0/05$ | $00 \pm 0/05$  | DEMI 001                      |
| $100 \pm 0/05$                                 | $86/6 \pm 0/05$ | $43/3 \pm 0/05$ | $6/6 \pm 0/05$ | M 14                          |
| $00 \pm 0/05$                                  | $00 \pm 0/05$   | $00 \pm 0/05$   | $00 \pm 0/05$  | شاهد                          |

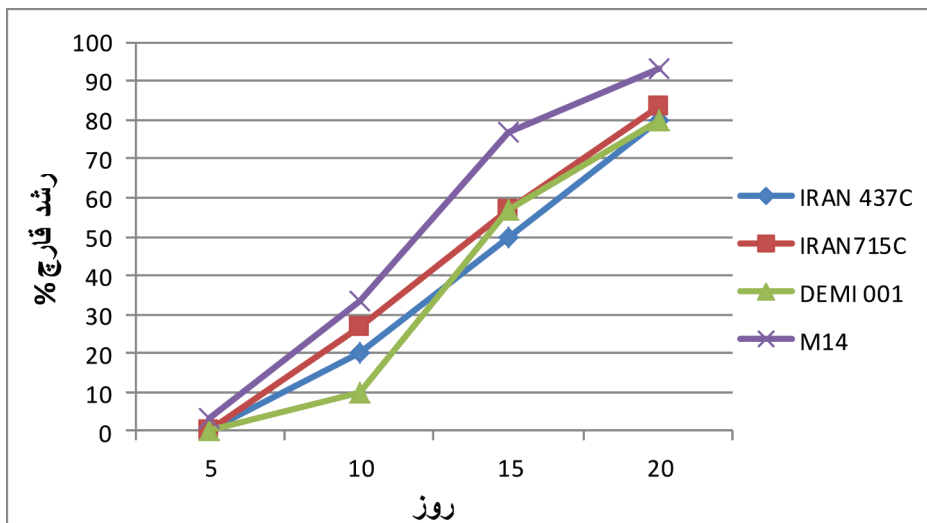


نمودار ۱- مقایسه رشد میسلیموم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایه‌های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت  $10^7 \times 2/4$  کنیدی در میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

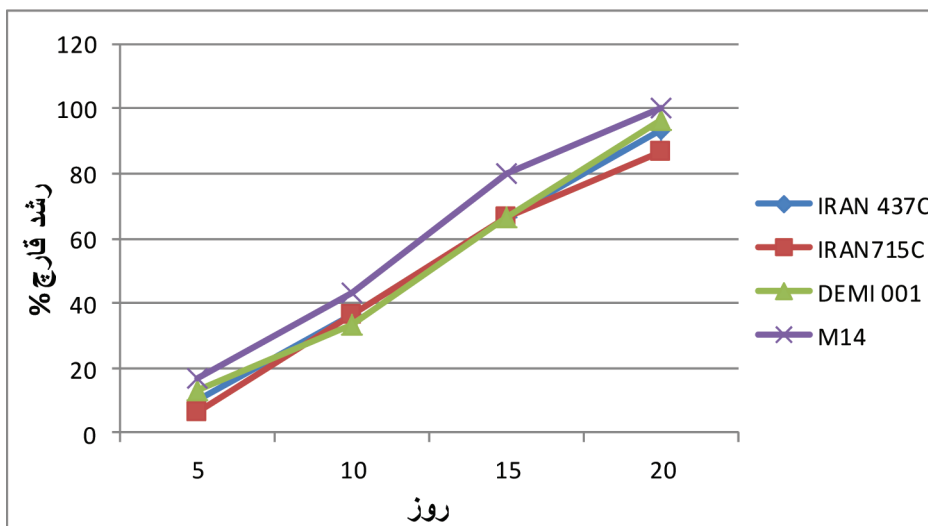
جدول ۵- درصد مرگ و میر نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم بر اساس نوع جدایه قارچی تا ۲۰ روز پس از غوطه وری کنه ها در سوسپانسیون قارچ های مختلف با غلظت  $10^{11} \times 2/4$  کنیدی در میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

| کنه مرده<br>(% میانگین $\pm$ انحراف معیار) |                 |                 |                 | جدایه‌های متاریزیوم آنیزوپلیه |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| روز ۲۰                                     | روز ۱۵          | روز ۱۰          | روز ۵           |                               |
| ۶,۹۶ $\pm$ ۰/۰۵                            | ۷۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۴۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۱۳/۳ $\pm$ ۰/۰۵ | IRAN 437 C                    |
| ۳,۹۳ $\pm$ ۰/۰۵                            | ۷۳/۳ $\pm$ ۰/۰۵ | ۴۶/۶ $\pm$ ۰/۰۵ | ۱۳/۳ $\pm$ ۰/۰۵ | IRAN 715 C                    |
| ۱۰۰ $\pm$ ۰/۰۵                             | ۷۶/۶ $\pm$ ۰/۰۵ | ۳۶/۶ $\pm$ ۰/۰۵ | ۲۳/۳ $\pm$ ۰/۰۵ | DEMI 001                      |
| ۱۰۰ $\pm$ ۰/۰۵                             | ۸۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۵۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۲۳/۳ $\pm$ ۰/۰۵ | M 14                          |
| ۰۰ $\pm$ ۰/۰۵                              | ۰۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۰۰ $\pm$ ۰/۰۵   | ۰۰ $\pm$ ۰/۰۵   | شاهد                          |





نمودار ۲- مقایسه رشد میسلیموم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایه های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت  $10^9 \times 2/4$  کنیدی در هر میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).



نمودار ۳- مقایسه رشد میسلیموم های قارچی روی نوچه کنه هیالوما مارژیناتوم در اثر جدایه های قارچی متاریزیوم آنیزوپلیه طی روزهای مختلف با غلظت  $10^{11} \times 2/4$  کنیدی در میلی لیتر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

## 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 انتوموپاتوزن در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه دکتری تخصصی انگل شناسی؛ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴.
۲. رزاقی ایبانه 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، ربوای ش پرورش طبیعی و مصنوعی کنه های سخت (ACARI: IXODIDAE) گونه *Hyalomma anatolicum 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 parasite 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.

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 نوچه‌ها 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 سانگوییپنوس 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 ایکسوسدس اسکپولاریس با جدایه‌ای از متاریزیوم آنیزوپلیه تحت درمان قرار گرفتند که ۱۰۰ درصد مرگ و میر کنه‌ها پس از ۲۰ روز گزارش گردید (۲۸). در مطالعه‌ای Benjamin و همکاران (۲۰۰۲) تاثیر قارچ‌های متاریزیوم آنیزوپلیه روی کنه ایکسوسدس 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 انتوموپاتوزن 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 اپنیدیکولاتوس 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 انتوموپاتوزن متاریزیوم آنیزوپلیه (۱۰<sup>۸</sup> 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 آتاتولیکوم و عفونت داخل بافتی را داشت و کنیدی قارچ از بافت جدا گردید (۲۶).

در ایران Pourseyed و همکاران (۲۰۱۰) اثرات قارچ‌های انتوموپاتوزن متاریزیوم آنیزوپلیه روی مراحل مختلف زندگی کنه آرگاس پرسسیکوس مورد ارزیابی قرار گرفت و عنوان شد در بالاترین غلظت مورد آزمایش (۱۰<sup>۷</sup> کنیدی در میلی‌لیتر) حادترین جدایه قارچی بررسی شده ۱۸ روز 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 انتوموپاتوزن 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 انتوموپاتوزن بومی ایران به عنوان عوامل کنترل زیست شناختی کنه هیالوما آتاتولیکوم باشد.

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 species and stages of tick to Entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 2002; 28: 283-288.
14. Godwin P, Kaaya S, Shawgi H. Entomogenous 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 Nematode 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. Hoxworth DL, Kirk PM, Sutton BC, et al. Dictionary of the fungi, 8th edition, CAB International, Wallingford, 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, Teixeira 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* (Deuteromyces) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*. 1997; 83: 815-818.

