DOI: 10.22092/vj.2019.125220.1556
شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر عصاره‌های گیاهی کانسولیدا اورینتالیس، ماتریکا چامومیل و آدونیس ورنالیس در رشد قارچ متاریزیوم آنیزوپیله

• **موسی توسلی (نویسنده مسئول)**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **عبدالغفار اونق**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **سمانه علی احمدی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **جعفر ارجمند یامچی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۱-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۴-۱۵
Email: m.tavassoli@urmia.ac.ir

چکیده

حشره‌کش‌های بیولوژیک به دلیل سازگاری با طبیعت و ارزانی، تاثیر مناسب‌تری نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی دارند و مقاومت نسبت به آن‌ها کمتر ایجاد می‌شود. در این میان توجه زیادی به استفاده قارچ‌های آنتوموپاتوژن گردیده و قارچ Metarhizium anisopliae یکی از قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌باشد. در این مطالعه عصاره سه گیاه Matrica chamomile، Consolida orientalis و Adonis vernalis که قبلا اثر حشره‌کشی آنها ثابت شده بود انتخاب، و اثر آنها بر روی رشد و اسپورزایی Metarhizium anisopliae بررسی گردید تا در صورت عدم تاثیر مهاری این عصاره‌ها بر روی رشد این قارچ بتوان به شکل توام در مبارزه با بندپایان استفاده نمود. از عصاره‌های گیاهی شامل غلظت‌های ۰/۱ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد برای Consolida orientalis، ۰/۲ درصد، ۰/۵ درصد و دو درصد Matrica chamomile و یک درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد Adonis vernalis استفاده شد. عصاره Matrica chamomile، Consolida orientalis و Adonis vernalis روی میزان رشد میسیلیوم و درصد اسپورزایی Metarhizium anisopliae در مقایسه با شاهد (P<۰/۰۵) معنی‌دار است. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه مشخص گردید که عصاره‌ی Adonis vernalis در غلظت ۱ درصد و Matrica chamomile در غلظت ۰/۲ درصد کمترین اثر را روی رشد میسلیوم و اسپورزایی قارچ متاریزیوم انیزوپلیه داشت. با عنایت به تاثیر این عصاره‌ها در ازبین بردن بندپایان انگلی، می‌توان از ترکیب این عصاره‌ها و قارچ متاریزیوم در کنترل بیولوژیک بندپایان انگل استفاده نمود.

کلمات کلیدی: عصاره گیاهی، Metarhizium anisopliae ، Adonis vernalis ، Matrica chamomile ، Consolida orientalis

Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 108-115

The Effect of Plant Extracts of Consolida orientalis, Matricaria chamomilla and Adonis vernalis on The Growth of the Metarhizium anisopliae

By:Tavassoli, M., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Ownagh, A., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Aliahmadi, S., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. and Arjmand Yamchi, J., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 2019-02-04 **Accepted: 2019-07-06**

Email: m.tavassoli@urmia.ac.ir

Biological pesticides are natural, more environmental friendly, potentially less expensive, and more effective than chemical pesticides, as problems with resistance are less likely to occur. Among biocontrol agents entomopathogenic fungi received major attention in recent years. Several of these fungi cause mortality in the arthropod vectors transmitting diseases between human and animals. One of the most pathogenic fungal species examined for pathogenicity against pests was found to be Metarhizium anisopliae. M. anisopliae is one of major fungal pathogens of insects and its conidial viability may be affected by environmental factors. In this study we examined the effects of three plant extracts Consolida orientalis, Matricaria chamomilla and Adonis vernalis on growth and sporulation of the fungus M. anisopliae in laboratory condition. The extract concentration which was used in herbal formulation consists of 0.1%, 10% and 20% of C. orientalis, 0.2%, 0.5% and 2% of M. chamomilla and 1%, 10% and 20% of A. vernalis. The results showed that significant effect of extracts of 1% and 0.2% of A. vernalis and M. chamomilla on mycelium growth and sporulation of the fungus M. anisopliae respectively. Given the impact of these extracts in eliminating parasitic arthropods, it is possible to combine these extracts and metarazium mushrooms in the biological control of parasite arthropods.

Keyword: Plant extract, Consolida orientalis, Matricaria chamomilla, Adonis vernalis, Metarhizium anisopliae

مقدمه

موانع پیچیده‌ای مانند باقی مانده‌ی مواد شیمیایی در مواد غذایی و محیط و نیز گسترش مقاومت نسبت به آفت کش‌های شیمیایی استفاده از آن‌ها را محدود می‌کند (۸). قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله دشمنان طبیعی آفات هستند که قادرند میزبان خود را کنترل کنند. Metarhizium anisopliae یکی از این قارچ‌های بیمارگر است. یکی از ویژگی‌های مثبت قارچ‌های بیمارگر بویژه قارچ Metarhizium anisopliae سازگاری آن با آفت کش‌های مصنوعی و گیاهی می‌باشد (۴).

این قارچ اولین بار در سال ۱۸۷۸ توسط متچینکوف از نوعی سوسك به نام Anisoplia austriaca جدا شد و به همین دلیل به نام Metarhizium anisopliae نامگذاری شد. این قارچ به شدت برای کنه‌ها کشنده است و به همین علت، وی پیشنهاد نمود که این قارچ می‌تواند به عنوان یك عامل در مبارزه علیه کنه‌ها استفاده شود (۲).

میزان متابولیت‌های ثانویه سمی که توسط این قارچ در داخل بدن موجود زنده تولید می‌گردد، معمولاً بسیار کمتر از آن میزانی است که در محیط‌های مغذی مایع تولید می‌شود. بنابراین استفاده از این قارچ در کنترل بیولوژیك به هیچ وجه باعث آلودگی محیط نمی‌گردد. همچنین تاکنون گزارشی از بروز آلودگی با این قارچ در پستانداران مشاهده نشده است (۲ و ۳).

برخی از گیاهان اثرات دفع‌کننده و کشنده برای حشرات و آفات دارند که به کار بردن آن‌ها می‌تواند در جهت متفرق ساختن و معدوم کردن انگل‌های خارجی که عمدتا عامل انتقال بیماری‌های مختلف هستند، استفاده شود.

هدف از مطالعه حاضر این است که عصاره گیاهانی که قبلا تاثیر مثبت آن‌ها در ازبین بردن بند پایان مشخص گردیده است (۲۴) چه تاثیری روی رشد و اسپورزایی قارچ Metarhizium anisoplia دارند . درصورتی که ترکیبات فوق اثر بازدارنده معنی داری روی رشد و اسپورزایی این قارچ نداشته باشند می‌توان به شکل همزمان قارچ متاریزیوم و عصاره گیاه

مورد نظر را در برنامه‌های کنترل بیولوژیک بندپایان بیماری‌زا استفاده نمود.

مواد و روش‌کار

قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه

قارچ Metarhizium anisoplia سویه V۲۴۵ با منشأ سویه فنلاند و از دکتر طارق بات از دانشکده بیولوژی دانشگاه ولز (سوانسی) تهیه گردید و در محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شد. محیط‌ها به مدت دو هفته در محیط تاریك در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ درصد نگهداری شدند.

-جمع‌آوری و ذخیره اسپور قارچ: پس از رشد کافی قارچ‌ها و تولید اسپور، محیط‌های کشت از انکوباتور خارج شده و در کنار شعله و محیط عاری از آلودگی در زیر هود، اسپورها به کمك کاردك استریل از سطح محیط‌ها جمع‌آوری گردید.

- شمارش و ارزیابی اسپورها: با استفاده از لام نئوبار یا هموسیتومتر اسپورها شمارش شدند (۹).

عصاره‌گیری گیاهان

نمونه‌های گیاهی با بررسی منابع مختلف مبنی بر داشتن اثر حشره‌کشی انتخاب شدند. گیاهانی که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند شامل Matrica chamomile، Consolida orientalis و Adonis vernalis بود. گیاهان مورد استفاده، در زمان گل و میوه‌دهی (اردیبهشت و خرداد) از مراتع شهرستان ارومیه جمع‌آوری شدند. شناسایی علمی گیاهان توسط آقای دکتر شاهرخ کاظم‌پور، گروه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس، انجام گرفت و همچنین نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این مطالعه در هرباریوم گیاهان دارویی پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه بایگانی شدند. گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشك شده و با دستگاه خرد کن به شکل پودر درآمدند به منظور عصاره‌گیری، ۲۰ گرم از پودر گیاه درون دستگاه سوکسل قرار داده شد و در بالن دستگاه ۱۲۰ میلی‌متر استون + ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. عصاره استخراج شده توسط دستگاه تقطیر در خلا دوار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. عصاره تهیه شده درون ظروف شیشه‌ای تیره ریخته و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۴).

بررسی برهمکنش قارچ و هر یک از تیمارها

برای بررسی اثر سازگاری عصاره‌های استخراج شده از Consolida orientalis، Matrica chamomile و Adonis vernalis روی رشد میسیلیومی قارچ Metarhizium anisoplia به روش اختلاط عصاره با محیط کشت بررسی انجام شد. برای این منظور با اندازه‌گیری رشد رویش قارچ روی محیط کشت حاوی عصاره، ابتدا قارچ Metarhizium در چند پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. در مرحله‌ی بعد محیط کشت به همراه رقت‌های مختلف ۰/۱ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد Consolida orientalis، یک درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد Adonis

جدول ۱- اثرات عصاره های گیاهی بر روی رشد قارچ و درصد بازدارندگی از رشد قارچ

Extract	(%) Concentration	Average fungal colony diameter in three times (Cm)	Inhibition percentage of fungal growth in three times (%)
Control	-	۶/۶	-
Consolidaorientalis	۰/۱	۲/۷۳	۵۸/۶۳
	۱۰	۱/۷	۶۹/۶۹
	۲۰	۰/۹۵	۸۵/۶
Matricariachamomillia	۰/۲	۳/۸	۴۲/۴۲
	۰/۵	۲/۳	۶۵/۱۵
	۲	۱	۸۸/۸۴
Adonis vernalis	۱	۳/۴	۴۸/۴۸
	۱۰	۲/۷۳	۵۸/۶۳
	۲۰	۲/۲	۶۶/۶۶

vernalis و ۰/۲ درصد، ۰/۵ درصد و دو درصد Matrica chamomile به شکل ترکیب به عصاره‌ها طبق روش دی اولیویرا و نوس (۲۰۰۴) تهیه گردید و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت بوجود آید. محیط‌های حاصل درون ظروف پتری تقسیم و اجازه داده شد تا محیط ببندد. سپس دیسک‌های قارچی به قطر پنج میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های جوان قارچ Metarhizium anisoplia تهیه و یک دیسک قارچ در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. برای هر یک از آزمایشات سه تکرار و سه تکرار هم برای بدون عصاره (محیط کشت شاهد)، در نظر گرفته شد. پتری مایه‌زنی شده در انکوباتور در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰±۵ درصد قرار داده شدند. زمانی که محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ بطور کامل اشغال شد (پس از گذشت سه هفته) قطر رشد میسیلیومی هر یک از تیمارها اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با بهره‌گیری از فرمول ابوت $\{Ip = \frac{C-T}{C} \times 100\}$ تعیین گردید. IP درصد بازدارندگی، C میانگین قطر هاله قارچ دگروه شاهد، T میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر.

تاثیر عصاره‌ها در اسپور زایی قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه

درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ روی محیط کشت PDB بررسی شد. پس از تهیه محیط و سرد شدن آن عصاره‌های گیاهی در رقت‌های مختلف ۰/۱ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد Consolida orientalis، یک درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد Adonis vernalis و ۰/۲ درصد، ۰/۵ درصد و دو درصد Matrica chamomile طبق روش دی اولیویرا و نوس (۲۰۰۴) اضافه شد و اثر آن‌ها را روی قارچ بررسی شد و مقداری از محیط کشت PDB نیز بدون عصاره به عنوان کنترل نگه داشته شد(۴). جهت تهیه سوسپانسیون مشخصی از اسپورهای قارچ، ابتدا به وسیله یک میله سطح محیط کشت را خراش داده در ارلن ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول توین ۸۰، ۰/۰۲ درصد به آن افزوده و به هم زده شد تا سوسپانسیون یکنواختی درست شود. پتری دیش در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس به منظور توقف رشد کنیدی‌ها، به محیط کشت لاکتوفنل اضافه گردید. سپس سوسپانسیون حاصله از پارچه مخمل دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسیلیوم از آن جدا شوند. برای سهولت شمارش، به ظروف حاوی اسپور، چهار میلی‌لیتر دیگر آب مقطر استریل افزوده شد و به عنوان استوک اصلی مورد استفاده قرار گرفت و سپس با استفاده از لام نئوبار یا هموسیتومتر اسپورها شمارش شدند (۹) و درصد اسپورهای جوانه‌زده تعیین شد. با محاسبه میزان جوانه‌زنی اسپور قارچ در هر یک از تیمارها و مقایسه تیمارها با هم و با گروه شاهد، میزان بازدارندگی عصاره در جوانه‌زنی قارچ مشخص و با بدست آمدن تاثیر عصاره‌ها در بازدارندگی این دو پارامتر سازگاری قارچ و عصاره مشخص شد(۱۸).

ارزیابی آماری نتایج

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۳ تحت ویندوز جهت انجام آزمون تجزیه آماری واریانس یك طرفه (ANOVA)

جدول ۲- اثرات عصاره های گیاهی بر روی اسپورزایی قارچ و درصد بازدارندگی از اسپورزایی قارچ

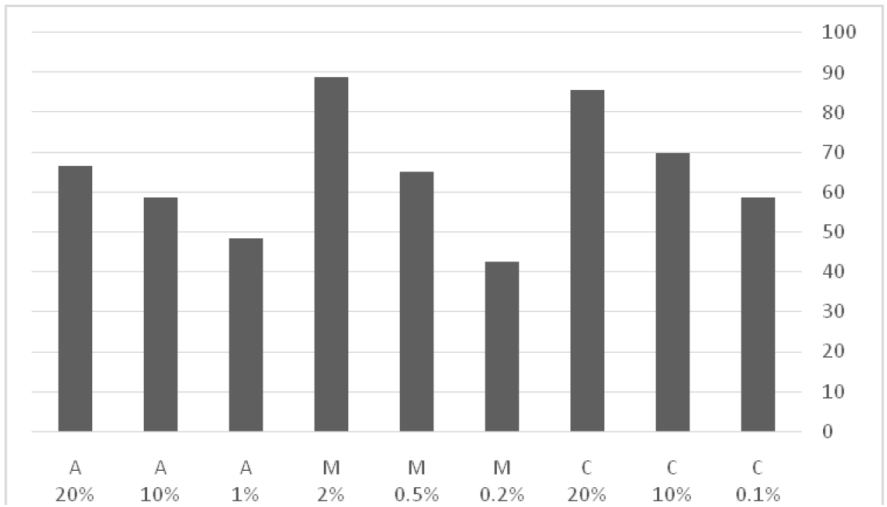
Extract	(٪) Concentration	Average number of spore in 1 ml (three times)	Inhibition percentage of fungal growth in three times (٪)
Control	-	۴/۴۸×۱۰^۶	-
Consolidaorientalis	۰/۱	۳/۷۹×۱۰^۶	۱۵/۴
	۱۰	۴/۴۸×۱۰^۶	۲۲/۳۲
	۲۰	۳/۱۲×۱۰^۶	۳۰/۳۵
Matricariachamomillia	۰/۲	۴/۰۲×۱۰^۶	۱۰/۲۶
	۰/۵	۳/۹۵×۱۰^۶	۱۱/۸۳
	۲	۳/۵×۱۰^۶	۲۱/۸۷
Adonis vernalis	۱	۴/۰۵×۱۰^۶	۹/۵۹
	۱۰	۳/۸۱×۱۰^۶	۱۴/۹۵
	۲۰	۳/۶×۱۰^۶	۱۹/۶۴

و توکی مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

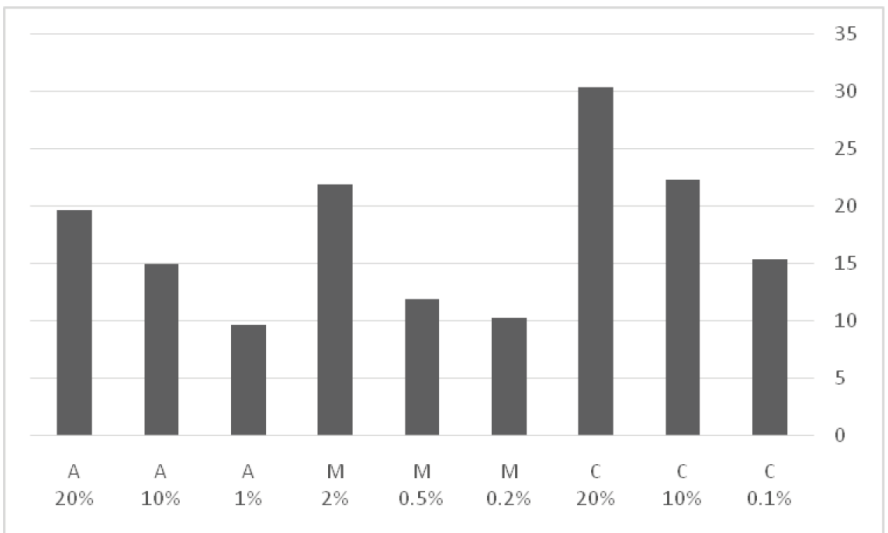
نتایج

نتایج نشان داد غلظت‌های مختلف عصاره Consolida orientalis، Matrica chamomile و Adonis vernalis بر روی رشد و اسپورزایی قارچ Metarhizium anisoplia در مقایسه با گروه کنترل تاثیر دارند (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از آزمون توکی نیز نشان داد که بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P <۰,۰۵).

اثر عصاره‌ها بر روی رشد رویشی میسیلیوم قارچ بیمارگر در نمودار یک آورده شده است، عصاره‌ی Adonis vernalis در غلظت یک درصد و Matrica chamomile در غلظت ۰/۲ درصد در یک گروه کمترین اثر



شکل ۱- درصد باز دارندگی رشد میسیلیومی قارچ (سه تکرار)



شکل ۲- درصد باز دارندگی اسپورزایی قارچ (سه تکرار)

را روی رشد رویشی قارچ داشت، در گروه میانه Consolida orientalis در غلظت ۰/۱ درصد و ۱۰ درصد، Matrica chamomile در غلظت ۰/۵ درصد و Adonis vernalis در غلظت ۱۰ درصد و ۲۰ درصد قرار داشتند و Consolida orientalis در غلظت ۲۰ درصد و Matrica chamomile در غلظت دو درصد در یک گروه دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر روی رشد رویشی میسیلیوم قارچ داشتند (جدول۱).

برای پارامتر اثر عصاره روی اسپورزایی قارچ بیمارگر، عصاره‌ی Adonis vernalis در غلظت یک درصد و Matrica chamomile در غلظت‌های ۰/۲ درصد و ۰/۵ درصد در یک گروه کمترین اثر را روی اسپورزایی قارچ داشتند، در گروه میانه Adonis vernalis ۱۰ درصد و ۲۰ درصد و Consolida orientalis ۰/۱ درصد قرار داشتند و در آخر Consolida orientalis در غلظت‌های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد و Matrica chamomile در غلظت دو درصد در یک گروه دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر روی اسپورزایی قارچ داشتند (جدول ۲). نتایج بدست آمده از بررسی سازگاری عصاره‌های مورد آزمایش روی رشد قارچ Metarhizium anisoplia نشان می‌دهد که به طور کلی عصاره Adonis vernalis دارای کمتر از ۶۶ درصد اثر بازدارندگی در رشد میسیلیوم و کمتر از ۲۰ درصد در اسپورزایی قارچ داشته و سازگاری بیشتری نشان داده و عصاره‌های Matrica chamomile و Consolida orientalis دارای بیشتر از ۸۸ درصد اثر بازدارندگی در رشد میسیلیومی قارچ و ۳۰ درصد در اسپورزایی قارچ بود و سازگاری کمتری نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲).

بحث

پژوهش‌های بسیاری در رابطه با کنترل بیولوژیکی آفات و استفاده از دشمنان طبیعی آن‌ها جهت از بین بردن و مبارزه با آن‌ها صورت گرفته است. امروزه استفاده از قارچ‌های پاتوژن بندپایان برای مبارزه با آفات رو به توسعه است و در حال حاضر تعدادی از این قارچ‌ها به صورت تجاری فراهم شده‌اند (۶ و ۷).

با توجه به نقش بیماری‌زایی بندپایان به ویژه کنه‌ها در دام‌ها و پرندگان و خسارات وارده به اقتصاد کشورها، مطالعه در مورد قارچ‌های پاتوژن بندپایان و توسعه تکنولوژی تولید انبوه این قارچ‌ها نیز بسیار ضروری و با اهمیت به نظر می‌رسد. در این راستا تحقیقات زیادی در حال انجام می‌باشد و نتایج قابل قبولی بدست آمده است. مصرف کنه کش‌های شیمیایی از گسترده‌ترین روش‌های کنترل جمعیت بندپایان در محیط و بر روی حیوانات می‌باشد. ولی مصرف بی‌رویه و مستمر حشره کش‌های شیمیایی علاوه بر تحمیل هزینه‌های گزاف مشکلاتی از جمله آلودگی محیطی، از بین بردن موجودات مفید، ایجاد بندپایان مقاوم به این مواد، آلودگی تولیدات دامی را به بار آورده است. این وضعیت مستلزم جایگزین نمودن روش‌های کنترلی سالم و یا مکمل همراه با خطرات کمتر به محیط زیست است. ترکیبات گیاهی فعال یک استراتژی امید بخش برای کنترل بندپایان مضر می‌باشد. در دهه‌های اخیر از عصاره‌ی گیاهان برای دفع آفت‌ها و از بین بردن شته‌ها، مگس و پشه استفاده شده است (۴).

در میان عوامل بیولوژیک، قارچ‌های بیمارگر حشرات از موقعیت ویژه‌ای برخوردار است از بین این عوامل قارچ Metarhizium anisoplia از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای شناخته شده در حشرات می‌باشد. قارچ‌های بیمارگر حشرات نمی‌توانند به عنوان یک عامل همه جانبه در مورد کنترل آفات به کار روند و به تنهایی در کنترل حشرات مفید واقع شوند. یکی از ویژگی‌های مثبت قارچ‌های بیمارگر بویژه قارچ Metarhizium anisoplia در سازگاری آن‌ها با آفت‌کش‌های مصنوعی و گیاهی می‌باشد، در این پژوهش سعی شد با کمک گرفتن از عصاره‌های گیاهی میزان سازگاری قارچ بیمارگر Metarhizium anisoplia بر روی این ترکیبات مشخص شود. در صورت سازگار بودن استفاده از این عصاره‌های گیاهی در کنترل آفات با توجه به بی‌خطر بودن آن‌ها نسبت به آفت کش‌های شیمیایی که وارد محیط زیست می‌شوند، می‌توان از خطرات زیست محیطی مواد شیمیایی جلوگیری کرد (۴).

در ایران مطالعات زیادی در زمینه قارچ‌های پاتوژن آفات و حشرات نیز انجام شده است. در یک مطالعه، مقایسه اثر سویه بومی قارچ ناقص Metarhizium anisoplia و یک فراورده حاوی اسپور این قارچ با نام تجاری Green muscle بر یکی از ملخ‌های زیان آور بومی کشور به نام Chrotogonus trachypterus مورد بررسی قرار گرفت(۱۵). از مطالعات انجام شده در زمینه مبارزه بیولوژیک کنه‌ها در ایران، می‌توان به بررسی اثر سه سویه قارچ Metarhizium anisoplia بر کنه Haemaphysalis punctata اشاره کرد. در این مطالعه، پاتوژنیسیته سه سویه این قارچ بر روی نوزادان Haemaphysalis punctata تحت شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد مرگ و میر نوزادان در ۱۰۰-۵۱/۹ درصد در گروه‌های مورد آزمایش بود. همچنین این سه سویه بر نوزادان کنه Hyalomma anatolicum anatolicum درصد کشندگی، ۷۲/۴-۳۷/۶ درصد در گروه‌های تحت آزمایش داشت (۱۹). توسلی و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای را بر روی میزان اثر سه سویه قارچ Metarhizium anisoplia در روی مراحل مختلف زندگی کنه Argas persicus تحت شرایط آزمایشگاهی موردارزیابی قرار دادند که درصد کشندگی در حدود ۱۰۰-۹۲ درصد در گروه‌های مورد آزمایش و ۷۳ درصد در گروه شاهد بود (۱۷). تجربیات مشابه در مورد اثرات کشندگی این قارچ بر روی کنه‌های Argas persicus، Ornithodoros lahorensis و مایت Dermanyssus انجام شده است(۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳). این بررسی‌ها نشان می‌دهد که قارچ انتوموپاتوژن Metarhizium anisoplia در می‌تواند به منظور کنترل بیولوژیک کنه‌های سخت دامپزشکی مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج لزوم بررسی بیشتر در جهت جدا نمودن قارچ‌های بیمارگر حشرات موجود در کشور و ارزیابی کارایی آن‌ها روی آفات و انگل‌های مهم در صنعت کشاورزی و دامی را نشان می‌دهد (۱۵).

از گیاه Consolida سابقا برای دفع آفات و از بین بردن شته‌ها، مبارزه با شپش و جرب استفاده شده است (۲۴). توسلی و همکاران (۲۰۱۲) مطالعه‌ای در مورد تاثیر عصاره Consolida را روی تخم و نوزاد کنه Hyalomma anatolicum و Rhipicephalus bursa انجام دادند، مشاهده کردند که تمامی غلظت‌های گیاه Consolida orientalis اثر ممانعت از هچ ۱۰۰ درصد روی تخم Hyalomma anatolicum بودند و به عنوان قوی‌ترین عصاره بر علیه نوزاد کنه Hyalomma با اثر کشندگی ۱۰۰ درصد در بالاترین غلظت بیان شد. در مورد Rhipicephalus بالاترین غلظت Consolida orientalis ۷۰ درصد ممانعت از هچ و ۹۹ درصد

تلفات نوزاد کنه را نشان داد.

گیاه دیگری که در این بررسی استفاده شده است Matrica chamomile بود. این گیاه سالیان طولانی است که در طب سنتی استفاده می‌شود (۲۵). در تحقیقی که توسط کیم و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شد، کنه کشی عصاره استخراج شده از گیاه Matrica chamomile با آزمایش علیه Dermanyssus gallinae (جرب قرمز) گزارش شد. مکیونی و همکاران در سال ۲۰۰۴ طی مطالعه‌ای، عصاره گیاه Matrica chamomile را علیه مایت Psoroptes cuniculi استفاده کردند و اثر کشندگی معنی‌داری را مشاهده نمودند(۱۳).

از مطالعات انجام شده در زمینه مبارزه‌ی دارویی-گیاهی کنه‌ها با گیاه Matrica chamomile در ایران می‌توان به بررسی اثر کشندگی عصاره این گیاه روی Rhipicephalus annulatus که توسط پیرعلی و رزاقی (۲۰۰۷) صورت گرفت اشاره نمود. در این مطالعه اثرات کشندگی از کم تا متوسط و به صورت وابسته به دوز گزارش گردید که بیشترین تاثیر را در ۲۴ ساعت اول و رقت هشت درصد (۵۶/۶۷ درصد کشندگی) نشان می‌داد. با نگرش کلی بر این نتایج این طور برداشت می‌شود که استفاده از عصاره Adonis vernalis همراه با قارچ بیمارگر حشرات در کنترل تلفیقی آفات می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد و عصاره‌های Matrica chamomile و Consolida orientalis اثر بازدارندگی بیشتری روی قارچ دارند.

با این حال بسیاری از تحقیقات انجام شده در مورد کنترل بیولوژیکی کنه‌ها هنوز در مراحل اولیه قرار دارد و در حال حاضر استفاده از کنه کش‌های شیمیایی به دلیل استعمال آسان، تاثیر سریع، قابلیت ذخیره‌سازی طولانی مدت در انبار و فراهم بودن این کنه کش‌ها در سطح گسترده در مقایسه با قارچ‌های پاتوژن و ترکیبات گیاهی رایج‌تر است. به علاوه کنه کش‌های شیمیایی در مقایسه با سایر عوامل کنترلی، درصد تاثیر بالاتری دارند. به عنوان مثال درصد تاثیر قارچ‌های پاتوژن علیه برخی از آفات ۸۸-۵۵ درصد گزارش شده (۵)، که این درصد قابل مقایسه با درصد کشندگی آفت‌کش‌های شیمیایی جدید که تاثیر ۱۰۰ درصدی دارند، نمی‌باشند.

یکی از دلایل عمده ضرورت استفاده از قارچ‌های کشنده آفات، ایجاد مقاومت دارویی به دنبال استفاده از مواد شیمیایی می‌باشد. این در حالی است که تا به امروز در استفاده‌های طولانی مدت از این قارچ‌ها، هیچ نوع مقاومت در آفات ثابت نشده است. قارچ‌های بیماری‌زا دارای سیستم‌های آنزیمی زنجیره‌ای می‌باشند که در مرحله‌ی نفوذ قارچ به کوتیکول بندپا موجب تجزیه و از بین رفتن پوشش خارجی می‌شوند (۱۸). یکی از راه‌های عمده ایجاد مقاومت بندپایان در مقابل آفت‌کش‌ها، جلوگیری از عملکرد آنزیم‌های مسئول نفوذ به کوتیکول می‌باشد. زنجیره‌ای بودن سیستم آنزیمی در قارچ‌های پاتوژن، امکان ایجاد مقاومت در بندپایان را به میزان زیادی کاهش می‌دهد، چون در سیستم‌های زنجیره‌ای در صورت مهار یک سیستم آنزیمی، سیستم دیگری به صورت جبرانی عمل خواهد کرد.

یکی از عوامل محدودکننده استفاده گسترده از قارچ‌های پاتوژن در مبارزه با آفات، این است که اسپور این قارچ‌ها باید در دمای پایین و در یخچال نگه‌داری شوند که فراهم کردن این شرایط، مستلزم صرف هزینه و وجود امکانات می‌باشد. اما اخیرا محققان از قارچ‌های انتوموپاتوژن اسپورهایی را بدست آوردند که در دمای اتاق به مدت حداقل هشت ماه قابلیت ذخیره‌سازی دارند (۱ و ۱۰). روش‌های کنترلی کنه‌ها زمانی مطلوب است که بدون حضور مواد شیمیایی کنه کش‌ها باشد. البته گاهی مواقع استفاده از مقادیر محدودی از کنه کش‌ها توام با سایر روش‌های کنترلی یا استفاده متناوب از کنه‌کش‌ها ضروری می‌باشد که در این صورت امکان ایجاد مقاومت دارویی در کنه‌ها به میزان زیادی کاهش می‌یابد (۱۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه مشخص گردید که عصاره‌ی Adonis vernalis در غلظت ۱ درصد و Matrica chamomile در غلظت ۰/۲ درصد کمترین اثر را روی رشد میسلیوم و اسپورزایی قارچ متاریزیوم انیزوپلیه داشت. با عنایت به تاثیر این عصاره‌ها در ازبین بردن بندپایان انگلی، می‌توان از ترکیب این عصاره‌ها و قارچ متاریزیوم در کنترل بیولوژیک بندپایان انگل استفاده نمود.

قدردانی

نگارندگان از همکاری و زحمات آقایان دکتر شاهرخ کاظم پور و آرمین بدلی تشکر می نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Alves, R. T. 1991. Development of myco-insecticide formulations and application techniques appropriate for pest control. Ph.D. thesis. University of London, U.K.

2. Charnley, A. K. 1984. Physiological aspects of pathogenesis in insects by fungi. pp. 229-271, In: J. M. Anderson, A. D. Rayner and D. Walton (ed.), Invertebrate-microbial interactions, British Mycological Society Symposium, University press, Cambridge. (Year?)

3. Clarkson, J. M., and A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4 (5): 197-203.

4. D, Oliveira, R. C.., and P. M. Neves. 2004. Compatibility of Beauveria bassiana with acaricides. *Neotropical Entomology* 33(3): 353-358.

5. Driesh, R. G. and T. S. Bellows. 1996. Biological control. pp. 7-20, In: 2nd Ed, Chapman and Hall International Thompson Publisher Co. London.

6. Ekesi, S. 1991. Variability of pathogenic activity of entomogenous fungi (Hyphomycetes) towards the legume flower Megalurothrips sjostedti and their potential for biological control. Ph.D. thesis. Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.

7. Ferron, P., J. Fargues and G. Riba. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. pp. 665-706, In: D. K. Arora, L. Aljello and K. G. Mukerji (ed), Handbook of Applied Mycology. Human, Animals and Insects, New York.

8. Garcia, F. G., P. Graf and G. H. Kemp. 2000. Bulletin of California Insect Survey. *California University Press* 48:82-92.

9. Goettel, M., and G. D. Inglis. 1997. Fungi: hyphomycetes, pp. 213-249, In: Lacey LA (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London.

10. Jenkins, N. E., and C. Prior. 1993. Growth and formation of true conidia by Metarhizium flavoviride in a simple liquid medium. *Mycology Research* 97: 1489-1494.

11. Kaaya, G. P., E. N. Mwangi and E. A. Ouna. 1996. Prospects for biological control of Livestock ticks, Rhipicephalus appendiculatus and Amblyoma variegatum using the entomogenous fungi Beaveria bassiana and Metarhizium anisopliae. *Journal Invertebrat Pathology* 67: 15-20.

12. Kim, H. P., K. H. Son, H. W. Chang and S. S. Kang. 2004. Anti inflammatoryplant flavonoids and cellular actionmechanisms. *Journal Pharmacological Science* 96:229-245.

13. Macchioni, F., S. Perrucci, F. Cecchi, P.L. Cioni, L. Morelli and S. Pampiglione. 2004. Acaricidalactivity of aqueous extracts of camomile flowers Matricaria chamomilla against the mite psoroptes cuniculi. *Medical and Veterinary Entomology* 18(2): 205-207.

14. Mahdavi Arab, N., R. Ebadi, B. Hatami and K. H. Talebi Jahromi. 2008. Insecticidal effects of some plants extracts on Callosobrochus maculates Funder laboratory conditions and Laphigma exigua H.in greenhouse. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 11(42):221-235. (Year?)

15. Mirshekar A., A. Kharazi, M. Ghazavi and Azmayeshfard P. 2004. Laboratory study of Pathogenicity of Metarhizium anisopliae on Chrotogonus trachypterus (Orth: pyrgomorphidae). In: proceeding of 16th Iranian Plant Protection Congress, University of Tabriz. p.74. (Year?)

16. Pirali, K., and M. Razzaghi. 2007. Biological activities of chamomile (Matricaria chamomile) flowers extract against the survival and egg laying of the cattle fever tick (Acari Ixodidae). *Journal Zhejiang University Science* 8(9): 693-696. (Year?)

17. Pourseyed, S. H., M. Tavassoli, I. Bernousi and K. Mardani. 2010. Metarhizium anisopliae (Ascomycota: Hypocreales): An effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick Argas persicus (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology* 172: 305-310.

18. St Leger, R. J., M. J. Bidochka and D.W. Roberts. 1994. Germination triggers of Metarhizium anisopliae conidia are related to host species. *Microbiology* 140: 1651-1660.

19. Tavassoli, M., A. Ownag, R. Meamari, S. Rahmani, K. Mardani and T.Butt. 2009. Laboratory evaluation of three strains of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae for controlling Hyalomma anatolicum anatolicum and Haemaphysalis punctate. *International Journal of Veterinary Research* 3(1):11-15.

20. Tavassoli, M., A. Ownag, S. H. Pourseyed, and K. Mardani. 2011a. Laboratory evaluation of three strains of entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae for controlling Dermanyssus gallinae. *Avian Pathology* 37(3):259-263.

21. Tavassoli, M., S. H. Pourseyed, A. Ownag, I. Bernouri and K. Mardani. 2011b. Biocontrol of Pigeon tick Argas reflexus(Acari:Argasidae) by entomophatogenic fungus Metarhizium anisopliae (ascomycota: Hypocreales). *Brasilian Journal of Microbiology* 42: 1445-1452.

22. Tavassoli, M., M. Allymehr, S. H. Pourseyed, A. Ownag, I. Bernouri, K. Mardani, M. Gorbanzadehgan and S. Shokrpour. 2011c. Field bioassay of Metarhizium anisopliae strains to control the poultry red mite Dermanyssus gallinae. *Veterinary Parasitology* 178: 374-378.

23. Tavassoli, M., F. Malekifard, A. Solemanzadeh, S. H. Pourseyed, I. Bernouri and K. Mardani. 2012a. Susceptibility of different life stages of Ornithodoros lahorensis to entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana. *Parasitology Resarch* 111(4):1779-1783.

24. Tavassoli, M., M. Mahan, A. Imani, Z. Rostami, A. Khezri and S. H. Pourseyed. 2012b. Evaluation of Consolida orientalis and Adonis vernalis extracts on eggs and larval of Hyalomma anatolicum anatolicum and Rhipicephalus bursa. *Journal of Medical Plants* 1(41):141-148.

25. Zargari, A. 1997. Medicinal Plants, Volume one, Seventh Edition, Tehran University Publications (In Farsi).