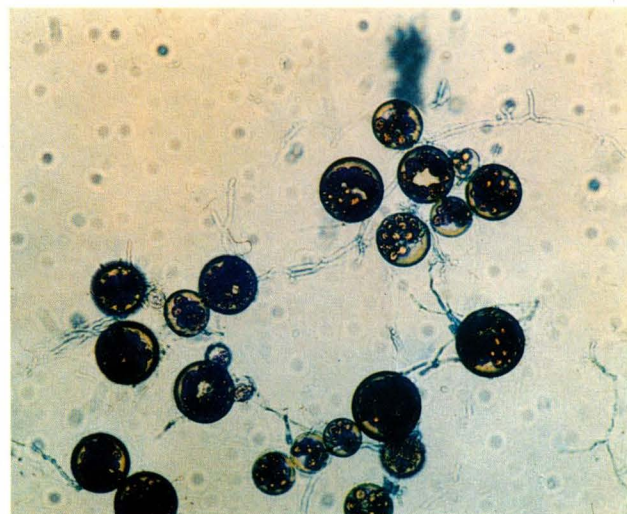


تصویر ۲- منظره میکروسکوپی قارچ



تصویر ۱- منظره میکروسکوپی قارچ

تشخیص و جداسازی عامل قارچی بیماریزای لارو زنبور عسل در ایران

دکتر مهین امامی تبریزی، سازمان دامپزشکی کشور

مقدمه

Chalk brood یا لاروگچی، بیماری است که فقط لاروهای زنبور عسل را مبتلا ساخته و از بین می‌برد. این بیماری بیشتر در شرایط آب و هوایی سرد و مرطوب شایع بوده و بدین لحاظ بیشتر در فصول بهار و اوایل تابستان به ویژه هنگامی که باران زیاد بوده و کندوها در مناطق نامناسب قرار گرفته باشند، ظهور خواهد کرد (۱).

عواملی که زمینه را برای ابتلا بیماری مساعد می‌سازند عبارتند از:

- ۱- سقوط درجه حرارت کندو از ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ۳۰ درجه و کمتر.
- ۲- زنبورانی که برای مدت طولانی دچار بدی و کمبود تغذیه شده باشند.
- ۳- ضعیف بودن کلنی‌ها
- ۴- عوامل ژنتیکی (۱۳).
- ۵- تهویه نامناسب و ناقص کندوها.
- ۶- مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها که فلور طبیعی روده را تغییر می‌دهند (۷).
- ۷- بعد از آلودگی کندو به بیماری باکتریایی مثل European Foul Brood و American Foul Brood

انگلی مثل نوزما (Nosema) و ویروسی مثل Sac Brood.

بیماری لاروگچی معمولاً باعث انهدام و از بین رفتن کندو نمی‌گردد ولی کندوها را ضعیف نموده و باعث خسارات اقتصادی می‌شود.

عامل بیماری

بیماری در اثر قارچی از جنس *Ascosphaera* و به نام *Ascosphaera apis* ایجاد می‌گردد که در سالهای ۱۹۱۳ و ۱۹۲۱ توسط Maasson و Claasson شناسایی و سپس در سال ۱۹۵۵ به وسیله Spiltoir و Olive دقیقاً بررسی و نامگذاری گردید (۱۴، ۱۵ و ۴). هاگ عامل این بیماری بسیار مقاوم بوده و حتی تا ۱۵ سال می‌تواند عفونت را باقی بماند (۱۵). هاگ و میسلیم قارچ هر دو برای لارو عفونت‌زا هستند (تصویر شماره ۱ و ۲).

عامل بیماری در داخل روده زنبور بالغ زنده مانده ولی قادر به تکثیر نمی‌باشد (۱۱).

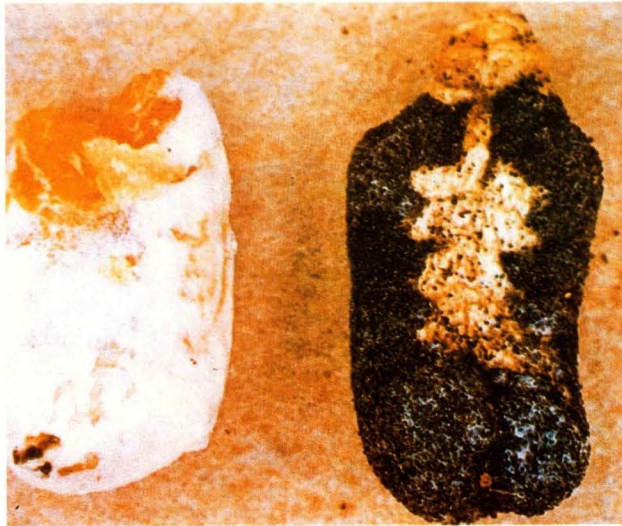
A. apis قارچی هتروتالیک (Heterothallic) است و هاگ آن وقتی ایجاد می‌شود که میسلیمهای

نر و ماده آن با هم جفت شوند. این دو میسلیم فاقد اندامهای جنسی بوده و از نظر شکل ظاهری فرقی با هم ندارند. هاگهای ایجاد شده در داخل محفظه‌ای گرد به نام Spore ball قرار دارند که آنها نیز به نوبه خود در داخل محفظه دیگری به نام اسپروسیت قرار می‌گیرند (شکل ۱).

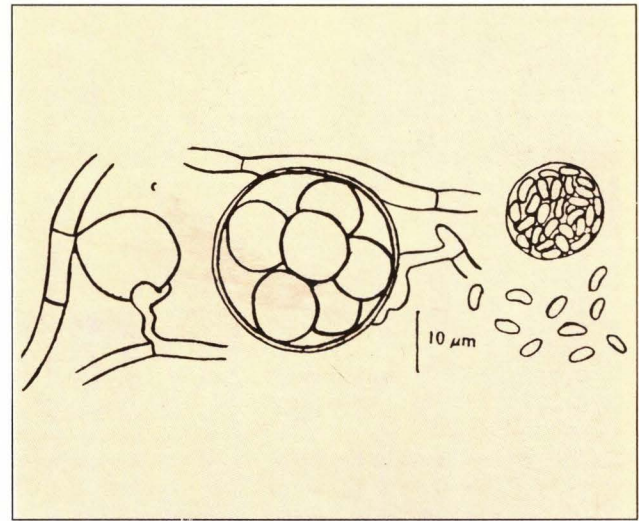
اسپروسیت را اصطلاحاً "اندام باردهی (Fruiting body) نیز می‌گویند. قارچ *A. apis* دارای دو سویه است.

۱- *A. apis minor* که قطر اسپورسیت آن ۹۹-۳۲ میکرومتر و به طور متوسط ۶۵/۸ میکرومتر می‌باشد. این سویه از بیشتر نقاط دنیا به عنوان عامل بیماری گزارش شده است.

۲- *A. apis major* که قطر اسپورسیت آن ۱۶۸-۸۸/۴ میکرومتر و به طور متوسط ۱۲۸/۴ میکرومتر بوده (۱۲) و این سویه کمتر گزارش شده است. معمولاً از کندوهایی که قبلاً به وسیله بیماری European Foul Brood ضعیف شده‌اند جدا می‌گردد، به نظر می‌رسد که سویه قارچ گندروی بوده و به عنوان عامل ثانویه باعث بیماری و مرگ لارو می‌شود (۲).



تصویر شماره ۳- داروهای قبلا، لارو سفید آلوده شده فقط به یک نوع میسلیوم، لارو سیاه آلوده به دو نوع میسلیوم و هاگ ایجاد شده روی لارو.



شکل ۱- نحوه قرارگیری هاگ *A. apis* در داخل Spore ball و اسپروسیت.

لارو به رنگ خاکستری یا سیاه دیده می شود.

تشخیص بیماری

حساسیت لارو نسبت به این بیماری بیشتر در سن ۳-۴ روزگی است (۱). لاروهای بیمار در حجرات در بسته یا باز هر دو دیده می شوند. مرگ لارو معمولا دو روز پس از بسته شدن در پوش حجرات اتفاق می افتد، در غیر این صورت لارو در حالت پیش شفیره ای خواهد بود. ابتدا لارو پفی (Fluffy) و متورم می شود و این تورم بقدری شدید است که لارو تمام فضای حجره را اشغال نموده و شکل شش گوش یا (Hexagon) حجره را به خود می گیرد و در موقع لمس حالت اسفنجی دارد، سپس جمع و خشک و سفت می شود. در این حالت درپوش حجرات به وسیله زنبوران بالغ به قصد بیرون آوردن لارو مرده باز می شود. رنگ لارو مرده همان طور که گفته شده مربوط به وجود هاگ و میسلیوم و یا فقط میسلیوم است. لاروها اغلب فقط آلوده به میسلیوم بوده و سفید رنگ هستند، به این مناسبت است که بیماری را لاروگچی یا (Chalk brood) نامیده اند (تصویر شماره ۳ و ۴).

ممکن است بیماری لاروگچی با آلودگی قارچی گردها که عامل آن *Betsia alvei* است، اشتباه شود. ولی عارضه دومی بیشتر در اوایل بهار دیده می شود. در ضمن گردهای آلوده برخلاف لارو مرده از بیماری لاروگچی به آسانی در دست خرد می شود (شکل ۲).

ظاهر شان در این بیماری تقریباً شبیه لوک آمریکایی و لوک اروپایی است. بدین معنی که در پوش حجرات تغییر رنگ داده و اغلب سوراخ شده

راههای سرایت بیماری

آلودگی به دو طریق انجام می گیرد: از راه تغذیه غذای آلوده به هاگ و یا آلودگی سطحی:

۱- جایگزینی هاگ قارچ در سطح شانها و داخل حجرات که تا زمان فراهم شدن شرایط مناسب در آنجا عفونت زاباقی می مانند.

۲- هاگ می تواند تا مدت ها در خاک عفونت زاباقی مانده و در صورت راه یابی به زنجیر غذایی زنبوران باعث آلودگی و بیماری و مرگ لارو شود (۸).

۳- گرده و عسل آلوده به هاگ قارچ نیز یکی از راههای مهم آلودگی به شمار می روند بنابراین برای پیشگیری از این بیماری از تغذیه زنبوران با عسل و گردهای که از کندوهای آلوده به دست آمده باید خودداری گردد.

۴- انتقال هاگ به وسیله زنبورداران به علت استفاده از وسایل و ظروف آلوده که باعث سرایت بیماری از یک کندو به کندوی دیگر است (۳).

۵- ملکه نیز می تواند آلودگی را انتقال دهد (۶).

۶- عامل بیماری در عسلدان زنبوران کارگر باقی مانده و هنگام مبادله غذایی موجب ابتلا لارو می گردند.

هاگهایی که همراه غذا وارد لوله گوارش لارو شده اند در آنجا به شکل فعال درآمده و میسلیوم آنها در داخل لوله گوارش لارو و بخصوص قسمت انتهایی آن شروع به رشد می نماید و بالاخره انتهای بدن لارو را پاره نموده از آن خارج شده و بدن لارو را احاطه می کند حال چنانچه عفونت لارو فقط از یک جنس قارچ باشد لارو فقط با آن میسلیوم احاطه شده و سفید رنگ و گچی شکل می باشد.

در صورتی که هر دو جنس میسلیوم وجود داشته باشد هاگها در خارج بدن لارو پدید آمده و

می باشند. حجرات در باز و در بسته نیز در آن دیده می شوند که منظره خاصی به شان می دهد. داخل حجرات لاروهای سفید و خاکستری دیده می شوند و باقی مانده های فلسی شکل ناشی از مرگ لارو وجود نداشته و بوی آن طبیعی می باشد.

لاروها به آسانی از حجرات خارج می شوند و حتی با تکان دادن شان می توان آنها را بیرون ریخت. لاروهای بیمار بیشتر در کناره های خارجی شان که محل استقرار لاروهای نر می باشند دیده می شوند. قبلا تصور می شد که لاروهای نر حساسیت بیشتری نسبت به بیماری دارند ولی اکنون مسلم شده است که زنبورانی که حرارت کندو را تنظیم می کنند چون قادر نیستند حرارت مناسبی را به کناره های شان برسانند بنابراین در نتیجه سرد بودن این نقاط که محل استقرار لاروهای نر است زمینه مساعدتری برای ایجاد بیماری فراهم می شود (۹).

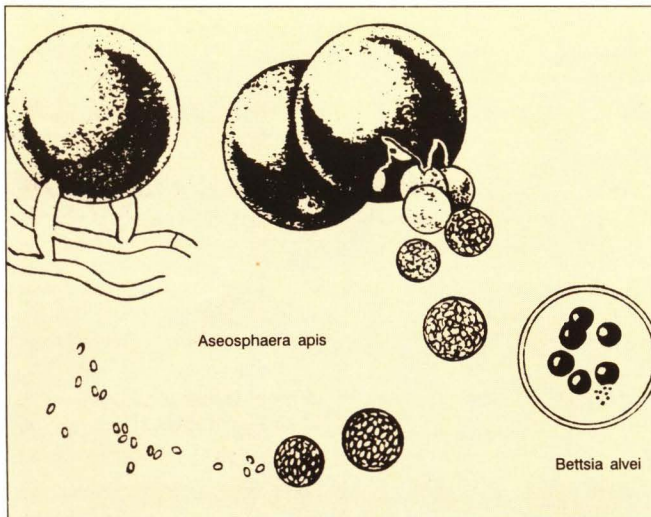
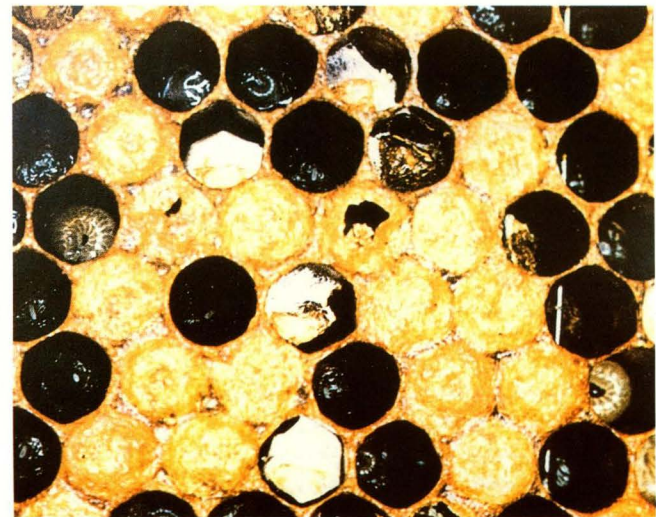
وقتی شدت بیماری زیاد شد لاروهای خشک شده را در جلوی کندو می توان مشاهده کرد که توسط زنبوران کارگر بیرون ریخته شده اند.

کشت و بررسی عامل بیماری

از محیط های زیر برای کشت و جداسازی و تشخیص عامل بیماری می توان استفاده کرد.

- 1- Potato dextrose agar + 0.4% yeast extract
- 2- Sabouraud dextrose agar + 2gr/li yeast extract
- 3- Malt agar

محیط سبب زمینی محیط مناسبی جهت کشت قارچ می باشد زیرا در این محیط مقدار زیادی اندام باردهی و میسلیومهای هوایی تولید می شود ولی

شکل ۲- آلودگی قارچی گرده‌ها بوسیله عامل *Bettisia alvei*.

تصویر ۴- منظره شان زنبور عسل و لاروهای مبتلا به بیماری Chalkbrood.

Fungal diseases of the honey bee (*Apis mellifera*) as study of some antimycotics, Bulletin Apicole 10:163-164.

8. Gochmauer, T.A. B. Furgala and H. Shimanuki, 1975. Diseases and enemies of the honey bee. In the hive and honey bee. Dadant and sons, Hamilton Illinois.

9. Gochmauer T.A. Furgala B. Shimanuki H. 1979, Diseases and enemies of the honey bee p.p. 648-649 from the hive and honey bees. Dadant and sons. Hamilton, Illinois.

10. Maassen A., 1913, Weiter Mitteilungen über der Seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen. (Further communication on the epidemic brood diseases of bees) Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Landforstwirtschaft 14-58.

11. Maurizio, A., 1934, Über die Kalkbrut (*Pericystis mykose*) der Bienen. (on the chalkbrood (*Pericystis mycosis*) of bees) Archiv für Bienenk, 15:165-193.

12. Maurizio, A. 1935, Beiträge zur Kenntnis der Pilzflora in Bienenstock. I. Die *Pericystis* Infektion der Bienenlarven. (Fungi in bee Colonies I. *pericystis* infection of bee larvae) Bericht der Schweizerischen botanischen Gesellschaft. 44:133-156.

13. Seal, D.W.A. 1967, Chalkbrood diseases of bees, New Zealand Journal of Agriculture 95:562.

14. Tumanoff C., 1951, Rev Fr. Apicult. 68, 1-325.

استانهای شمال و جنوبی ایران به علت رطوبت نسبی بالا کم و بیش وجود داشته باشد ولی به علت آن که برای زنبورداران زیان اقتصادی چندانی به بار نیاورده است به آن توجه نگردیده و بیماری را به مراکز دامپزشکی اطلاع نداده‌اند. فقط اخیراً وجود بیماری از استان هرمزگان گزارش شده است.

منابع مورد استفاده

1. Bailey L. 1967 C. In proceeding of the International Colloquium on insect pathology and microbial control, 162-167.
2. Bailey L. 1981, Honey bee pathology pp.40-44, Academic press Inc.
3. Barthel B. 1971, Derkalklerut auf der Spur (on the trail of chalk brood), Garten und Kleintierzucht. C. Imker 10(4):12-13.
4. Clausen P., 1921, Entwicklungserchichtliche Untersuchungen über den Erreges der als Kalkbrut bezeichneten Krankheit, der Bienen (Historical development of the researches concerning the cause of the disease of bees known as chalk brood). Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land und Forstwirtschaft 10:467-521.
5. Dallman H. 1966, Neue Weg bei der Bekämpfung der Kalkbrut in Bienenvölkern (New methods for the control of chalkbrood in bee colonies), Garten und Kleintierzucht C. Imker 5(9):10
6. Pe Jeng, D. and R.A. Morse, 1976, Chalkbrood; a new disease of honey bees in U.S., New York's food and life sciences.
7. Giaffert A. and Y.P. Talierico, 1967,

محیط مالت آگار برای انجام کارهای میکروسکوپی به آن ترجیح دارد، زیرا میسلیمهای هوایی کمتری رشد می‌کند.

اضافه نمودن آنتی بیوتیک به محیط کشت از رشد عوامل باکتریایی جلوگیری می‌کند. چون این قارچ شامل میسلیم و مراحل هاگی است بنابراین بهترین راه جهت تشخیص اسپروسیت است. برای بررسیهای دقیق آزمایشگاهی بهتر است از لاروهای تیره‌رنگ که حاوی هاگی باشند استفاده کرد. زیرا لاروهای سفید فقط دارای میسلیم می‌باشند.

روش کار

چند عدد لاروهای گچی تیره رنگ را پس از خرد نمودن در ده میلی لیتر آب مقطر خیسانده، به طوری که هاگهای آن در آب شناور گردند یک قطره از آن را بسین لام و لامل قرار داده اسپروسیت و اسپرپال و هاگها را زیر میکروسکپ می‌بینند.

جهت کشت نیز از محلول تهیه شده به روش فوق استفاده می‌شود و چند قطره از آن را در محیط تهیه شده در بوات کشت داده به مدت ۷-۵ روز در گرمخانه ۳۵ سانتی گراد قرار می‌دهند.

میسلیمها و مراحل هاگی قارچ به شکل کرک دار و خاکستری یا خاکستری تیره دیده می‌شوند. برای بررسیهای خیلی دقیق تر آزمایشگاهی از کشت به دست آمده Slide culture تهیه می‌شود. آزمایش تقسیم میکروسکوپی جهت تشخیص قارچ کافی است.

بیماری در ایران

برای اولین بار در سالهای ۱۳۶۸ و ۱۳۶۹ از زنبورستانهای اطراف تهران و دماوند عامل این بیماری باروش شرح داده شده جدا و تشخیص داده شد. قارچ جدا شده از نمونه‌های *A. apis minor* بوده گر چه تصور می‌رود این بیماری بایستی در