

جداسازی عوامل قارچی بیماریزای زنبور عسل در استان گیلان

ابراهیم رحیم آبادی^{۱*}، یداله اسدپور^۲ و پیمان سایه بان^۳

- ۱- مربی پژوهشی بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران
- ۲- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران
- ۳- کارشناس ارشد بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۹ آذر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

این بررسی به منظور جداسازی عوامل قارچی بیماریزای زنبور عسل در استان گیلان در سه فصل بهار، تابستان و پاییز انجام شد. بطور تصادفی پنج شهرستان در استان مذکور انتخاب و از هر شهرستان تعداد ۱۰ زنبورستان و در هر زنبورستان نیز تعداد ۴ کلنی از زنبور بالغ، لارو و شفیره، عسل و گرده، نمونه گیری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها در محیط سابرو- دکستروز آگار کشت داده شد. از کل ۱۴۶۹ نمونه مورد بررسی، ۷۶ مورد (۵/۱۷٪) عامل قارچی بیماریزا جدا گردید که قارچ عامل بیماری نوزاد گچی زنبور عسل، آسکوسفرا آپیس دو مورد (۱۴٪) و عوامل بیماری نوزاد سنگی (گونه‌های آسپرژیلوس) ۷۴ مورد (۵/۰۳٪) بود. میزان درصد آلودگی به ترتیب در نمونه‌های گرده (۲/۳۸٪)، زنبور (۲/۱۱٪)، لارو و شفیره (۰/۴۸٪) و عسل (۰/۲٪) بود. میزان آلودگی به عوامل بیماریزای قارچی در فصل تابستان بیشتر از سایر فصول مشاهده شد.

کلمات کلیدی: بیماری قارچی، زنبور عسل، استان گیلان

*نویسنده مسئول: ابراهیم رحیم آبادی

آدرس: رشت، کیلومتر ۱۰ جاده رشت- قزوین، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران. تلفن: ۰۱۳-۳۳۶۹۰۱۱۳
پست الکترونیک: com.Rahimabadie@yahoo

مقدمه

سابقه پرورش زنبور عسل در استان گیلان به واسطه برخورداری از آب و هوا، شرایط مناسب، میزان بارندگی مطلوب و پوشش گونه‌های مختلف گیاهی، به گذشته‌های بسیار دور مرتبط می‌باشد. استان گیلان دارای ۱۲۶۰۰۰ کندو می‌باشد که از این تعداد ۱۲۱۰۴۱ کندو مدرن و ۴۹۵۹ کندو بومی است. میزان تولید عسل استان ۳/۰۹۴/۲۲۲ کیلوگرم و رتبه چهارم تولید عسل در کشور را دارا می‌باشد (۱). عوامل بیماریزای قارچی زنبور عسل به محض ایجاد شرایط مناسب سریعاً در محیط اطراف و داخل کندو رشد کرده و علائم بیماری آشکار می‌شود. اسپوره‌های قارچ می‌توانند سال‌ها در شرایط نامناسب در گرده و عسل، روی قاب‌ها و دیواره‌های کندو بصورت غیرفعال زندگی کنند. سرما، رطوبت، تهویه نامناسب، زمستان‌های طولانی، عدم دسترسی به شهد و گرده کافی، گرمای شدید، ابتلا به سایر بیماری‌ها و مصرف داروها از جمله عوامل مهم رشد و تکثیر عوامل قارچی بیماریزا و شیوع بیماری از نظر اقتصادی و اکولوژیکی در یک منطقه می‌باشد (۳و۴).

در اکثر نقاط جهان دو بیماری مهم قارچی که خسارت و گاهی نیز تلفات شدیدی به زنبورداران وارد می‌کند، نوزاد گچی و نوزاد سنگی می‌باشد. نوزاد گچی تنها در نوزادان زنبور عسل باعث ایجاد بیماری شده و علیرغم ایجاد آلودگی در زنبوران بالغ، هیچگونه علائمی ایجاد نمی‌کند. عامل مسبب آن قارچ آسکوسفورا آپیس بوده که به علت رشد میسیلیوم در سطح بدن نوزاد به صورت توده ای کرکی یا پنبه ای درآمده و به دو رنگ مومیایی سفید (ناشی از تولید مثل غیرجنسی) و خاکستری متمایل به سیاه (ناشی از تولید مثل جنسی) مشاهده می‌شود (۳).

قارچ مسبب بیماری نوزاد سنگی، آسپرژیلوس فلاووس و در درجه بعد آسپرژیلوس فومیگاتوس است. علاوه بر نوزاد زنبور، زنبوران بالغ را نیز آلوده می‌نماید. اهمیت این بیماری بیشتر مربوط به سموم قارچی تولید شده از آسپرژیلوس‌ها بوده که باعث آلودگی کلنی‌های زنبور عسل شده و از نظر بهداشت انسانی نیز مهم می‌باشد (۴). با توجه به گزارشات شفاهی از مناطق مختلف استان و عدم تائید تشخیص آزمایشگاهی، این بررسی جهت مشخص نمودن وضعیت آلودگی کلنی‌های زنبور عسل در استان گیلان به عوامل قارچی بیماریزا انجام شد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از پنج شهرستان و از هر شهرستان ۱۰ زنبورستان و از هر زنبورستان ۴ کندو به روش خوشه ای در ۳ فصل بهار، تابستان و پاییز نمونه‌گیری شد. نمونه زنبور بالغ، لارو و شفیره، گرده و عسل از هر کندو اخذ گردید. نمونه زنبور شامل ۱۰ عدد زنبور بالغ، نمونه عسل ۵ گرم، لارو شفیره ۱۰ عدد و گرده حدود ۲ گرم بود. نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل و از نظر قارچی مورد بررسی دقیق قرار گرفت. با توجه به گزارشات سایر کشورها مبنی بر شیوع آلودگی حداکثر تا ۱۵٪ از فرمول زیر با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و دقت ۷٪ و با ضریب اصلاح ۲ در روش نمونه‌گیری خوشه ای استفاده گردید.

$$n = z1-a/2 \times p d2$$

بنابراین در مطالعه حاضر نمونه‌گیری از تعداد ۲۰۰ کلنی در هر فصل انجام گرفت. از محیط سابرو دکستروز آگار حاوی کلرآمفنیکل جهت رشد قارچ‌های موجود در نمونه‌ها و جلوگیری از رشد باکتری‌ها استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و قارچ‌های

نتایج

از تعداد کل ۱۴۶۹ نمونه، ۷۶ مورد (۵/۱۷٪) عامل قارچی بیماریزا جدا شد (جدول ۴). بیماری نوزاد گچی زنبور عسل (آسکوسفرا آپیس) ۲ مورد (۰/۱۴٪) و عامل بیماری نوزاد سنگی (آسپرژیلوس) ۷۴ مورد (۵/۰۳٪) بود (جدول ۴). میزان درصد آلودگی قارچ‌ها در فصول مختلف در نمونه‌های گرده (۲/۳۸٪)، زنبور (۲/۱۱٪)، لارو و شفیره (۰/۴۸٪) و عسل (۰/۲٪) مشاهده گردید. بیشترین آلودگی در نمونه‌های گرده و کمترین آلودگی در نمونه‌های عسل دیده شد. آلودگی به عوامل بیماریزای قارچی در فصل تابستان بیشتر از فصول دیگر بود (جدول ۴ تا ۱).

رشد یافته در سطح محیط کشت ثبت شدند. از محیط کشت سایر و دکستروز آگار حاوی کلرآمفینیکل و سیکلوهاگزامید برای رشد قارچ آسکوسفرا آپیس و جلوگیری از رشد قارچ‌های ساپروفیت و باکتری‌ها استفاده شد. محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در جاربوی هوایی و در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به انکوباتور ۲۵ درجه منتقل شده و رشد قارچ روزانه مورد مشاهده قرار گرفت. پلتهای تا ۳ هفته جهت حصول از وجود و یا عدم رشد قارچ در انکوباتور نگهداری شدند. از نمونه‌های قارچی لام میکروسکوپی تهیه و با کاتن بلورنگ آمیزی شد.

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ‌های بیماریزای جدا شده بر حسب نوع قارچ و نمونه در فصل بهار

نوع قارچ	اسکوسفرا آپیس		آسپرژیلوس		تعداد	درصد	مجموع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد			
زنبور بالغ	-	-	۱۰	۵/۷۵	۱۶۴	۹۴/۲۵	۱۷۴
لارو	-	-	۳	۴/۳۵	۶۶	۹۵/۶۵	۶۹
نمونه گرده	-	-	۹	۳/۵۷	۲۴۳	۹۶/۴۳	۲۵۲
عسل	-	-	۰	۰	۲۶	۱۰۰	۲۶
جمع	۰	۰	۲۲	۴/۲۲	۴۹۸	۹۵/۷۸	۵۲۰

جدول ۲: توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ‌های بیماریزای جدا شده بر حسب نوع قارچ و نمونه در فصل تابستان

نوع قارچ	اسکوسفرا آپیس		آسپرژیلوس		تعداد	درصد	مجموع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد			
زنبور بالغ	-	-	۱۳	۵/۶۵	۲۱۷	۹۴/۳۵	۲۳۰
لارو	-	-	۲	۲/۱۳	۹۲	۹۷/۸۷	۹۴
نمونه گرده	۲	۰/۸۲۶	۱۴	۵/۷۸	۲۲۶	۹۳/۳۸	۲۴۲
عسل	-	-	۲	۴/۱۷	۴۶	۹۵/۸۳	۴۸
جمع	۲	۰/۱۲۲	۳۱	۵/۰۵	۵۸۱	۹۴/۶۳	۶۱۴

جدول ۳: توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ‌های بیماریزای جدا شده بر حسب نوع قارچ و نمونه در فصل پاییز

نوع قارچ	اسکوسفرا آپیس		آسپرژیلوس		تعداد	درصد	مجموع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد			
زنبور بالغ	-	-	۹	۸/۳۳	۹۹	۹۱/۶۷	۱۰۸
لارو	-	-	۲	۴/۱۷	۴۶	۹۵/۸۳	۴۸
نمونه گرده	-	-	۹	۵/۶۶	۱۵۰	۹۴/۳۴	۱۵۹
عسل	-	-	۱	۵	۱۹	۹۵	۲۰
جمع	۰	۰	۲۱	۶/۲۶	۳۱۴	۹۳/۷۴	۳۳۵

جدول ۴: توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به قارچ‌های بیماریزای جدا شده از زنبورستان‌های استان گیلان بر حسب کلنی‌های نمونه‌برداری شده در سه فصل بهار، تابستان و پاییز

فصل	تعداد کلنی‌های بررسی شده	قارچ‌های بیماریزای جداسازی شده		کلنی‌های آلوده
		تعداد	درصد	
بهار	۵۲۰	اسکوسفورا آپیس		۰
		۲۲	۴/۲۲	آسپرژیلوس
تابستان	۶۱۴	اسکوسفورا آپیس		۰/۳۳
		۳۱	۵/۰۵	آسپرژیلوس
پاییز	۳۳۵	اسکوسفورا آپیس		۰
		۲۱	۶/۲۶	آسپرژیلوس
جمع	۱۴۶۹	۷۶	۵/۱۷	

بحث

بیماری نوزاد گچی یک بیماری است که در حال حاضر گسترش جهانی داشته و عامل مسبب بیماری قارچ *آسکوسفورا آپیس* بوده که با از بین بردن لاروها سبب کاهش تعداد زنبوران بالغ و در نهایت منجر به کاهش تولید عسل و گرده یک کلنی می‌شود اما بندرت می‌تواند یک کلنی را از پای در آورد. در یک کلنی که میزان آلودگی بیماری نوزاد گچی کمتر از ۱۲٪ باشد با روش‌های معمول بازدید، تشخیص امکان پذیر نیست. در صورت افزایش آلودگی، نوزادان بیمار شده، کلنی ضعیف و احتمال نابودی کلنی وجود دارد (۲). میزان جداسازی در مطالعه حاضر پایین بوده و می‌توان چنین بیان نمود که بیماری لارو گچی محدود به مناطق با آب و هوای معتدل و مرطوب نبوده و عوامل مستعدکننده داخل کندو در بروز بیماری نقش مهمی دارند. از مهمترین عوامل، چائیدن نوزادان سرپوشیده، رطوبت، تضعیف کلنی در اثر عوامل بیماریزای ویروسی، کنه *واروآ* یا *لوک* و کاهش نسبت زنبوران پرستار به نوزادان و رفتار بهداشتی ضعیف زنبوران کلنی می‌باشد (۴).

همکاران (۱۹۹۳) در کشور ترکیه برای اولین بار بیماری نوزاد گچی را شناسایی و ۲ ماه بعد در ۹ استان دیگر بیماری گزارش شد (۵). در اونتاریو کانادا از تعداد ۸۶۹۲ کلنی، ۲/۳۸ درصد بیماری نوزاد گچی گزارش گردید (۶).

Kimura و Yoshima (۲۰۱۰) با استفاده از روش‌های مولکولی واکنش زنجیره پلی مرزات توانستند از ۱۱۲ کلنی تعداد ۲۷ کلنی (۲۴/۱٪) قارچ *آسکوسفورا آپیس* را شناسایی نمایند (۷). در بررسی حاضر نیز میزان درصد بیماری نوزاد سنگی که توسط قارچ *آسپرژیلوس* ایجاد شد ۵/۰۳ درصد بود که البته تهیه نمونه‌ها با توجه به مشکلات جوی، کمبود وسیله نقلیه، عدم همکاری زنبورداران یا کوچ زودرس، عدم وجود گرده یا سفیره در کندو، به تعداد پیش بینی شده میسر نشد. اکثر نمونه‌های منفی مربوط به کشت عسل بوده چون عسل دارای خواص ضد میکروبی و آنتی بیوتیکی بوده و این خاصیت به نوع تغذیه گیاهی و استفاده از شکر بعنوان منبع تغذیه و حرارت، دارای شدت و ضعف می‌باشد در گزارشات مشابه نیز تأیید شده است (۲).

مرادی و محرمی (۱۳۹۰) میزان آلودگی کندوها را به قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (۱۷/۱۶٪) و قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* را (۶/۸۳٪) گزارش نمودند (۲). مطالعه حاضر نیز در تشابه با مطالعه قبلی، علیرغم

مرادی و محرمی (۱۳۹۰) طی نمونه برداری در سه فصل در استان آذربایجان غربی، هیچ موردی از قارچ *آسکوسفورا آپیس* را گزارش نکردند (۲). Ertag و

3. Bailey, L., Ball, B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London: 154-8.
4. Bailey, L. (1967). The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascosphaera apis*, for larvae of honey bee, *Apis mellifera*. In *Proceedings of the International Colloquium on Insect Pathology and Microbiology Control*, North-Holland, Amsterdam: 162-167.
5. Ertag, T., Salih, M., Ahmet, I., Bahri, Y. (1993). General situation of chalkbrood disease in honeybees in Turkey. *Turkey Entomology Derg*, 17: 65-8.
6. Omafra (2006). Provincial Apiarist. Annual Report, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
7. Yoshiyama, M., Kimura, K. (2010). Presence of *Ascosphaera apis*, the causative agent of chalkbrood disease, in honeybee *Apis mellifera* in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 46: 31-6.

آلودگی زنبورستان‌ها هیچ موردی از بیماری بصورت کلینیکی مشاهده نشد. چون قارچ‌های آسپیرژیلوس در محیط اطراف و روی وسایل زنبورداری و گیاهان به صورت ساپروفیت وجود داشته و از راه‌های مختلف وارد کلنی‌ها می‌شوند و زنبوران پرستار، لاروهای تلف شده را سریعاً برداشته و مانع گسترش بیماری به شکل کلینیکی می‌شوند (۶). با توجه به مخاطرات بهداشتی سم آفلاتوکسین برای انسان، نتایج این مطالعه هشدار است برای عرضه کنندگان عسل بسته بندی و مصرف کنندگان که جهت جلوگیری از ایجاد شرایط مساعد رشد قارچ‌ها در کلنی‌های زنبور عسل، اصول صحیح زنبورداری را پیش از پیش رعایت نمایند. همچنین توصیه می‌شود در مطالعات بعدی از روش مولکولی برای شناسائی بیماری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اداره کل دامپزشکی استان گیلان بخاطر فراهم آوردن امکانات، از بخش زنبور عسل موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی و شبکه دامپزشکی استان گیلان بخاطر کمک در عملیات آزمایشگاهی، از جناب آقای دکتر محرمی و مهندس افضلی بخاطر کمک‌های بی‌دریغ در اجرای طرح کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

۱. سالنامه آماری استان گیلان (۱۳۸۹). دفتر آمار و اطلاعات معاونت برنامه ریزی استانداری گیلان، صفحات ۲۶۱-۲۶۲.
۲. مرادی، م.، محرمی، م. (۱۳۹۰). جداسازی و شناسائی عوامل بیماری‌های قارچی زنبور عسل در استان آذربایجان غربی. نشریه پژوهش و سازندگی، جلد ۲۴، شماره ۲، صفحات ۵۹-۶۷.

Isolation of Honey Bee's Pathogenic fungal Agents in Guilan Province

Rahimabadi, E.^{1*}, Asadpour, Y.² & Sayehban, P.³

1. Researcher Fellow Department of Veterinary Medicine, Agricultural research, education and Natural Resources Center of Guilan, Rasht, Iran
2. Assistant Professor Department of Veterinary Medicine, Agricultural research, education and Natural Resources Research Center of Guilan, Rasht, Iran
3. Expert Department of Veterinary Medicine, Agricultural research, education and Natural Resources Research Center of Guilan, Rasht, Iran

Received Date: 21 April 2013

Accepted Date: 26 November 2013

Abstract: This study was conducted to isolate honey bee's pathogenic fungal agents in three seasons (spring, summer and autumn) in Guilan province apiaries. Randomly, we selected five regions and then ten apiaries from each region and four colonies of each apiaries sampled from adult honey bees, brood, honey and pollen and transported to the laboratory. All samples cultivated in SDA (Sabouraud Dextrose Agar) medium. Out of 1469 samples, 76 samples (5.17%) were positive to Honey bee disease fungal agents, 2 (0.14%) *Ascosphaera apis* causative agent of chalk brood disease and 74 (5%) *Aspergillus* spp. the causative agent of stone brood disease was isolated. Contamination percent rate in pollen (2.38%), adult honeybees (2.11%), brood (0.48%) and honey (0.2%) were reported. Contamination percent rate to the Honey bee pathogenic fungal agents in summer was reported more than the other seasons.

Keywords: Fungal disease, Honey bee, Guilan province

*Corresponding author: Rahimabadi, E.

Address: 10thkm, Rasht-Quzvin main road, Agriculture and Natural resources research center of Guilan

PO.Box: 416353394 Tel: 013-33690113

Email: Rahimabadie@yahoo.com