

تولید پشه‌های بالغ *Culex pipiens* (Dip.: Culicidae) آلوده به نماتود انگل *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) جهت کنترل

به شیوه خود انتشاری

هانا حاجی اللهوردی پور^۱، رضا طلائی حسلوبی^{۱*}، جواد کریمی برنگ^۲، ایی ونگ^۳ و رندی گاگلر^۳

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد و ۳- گروه حشره‌شناسی، دانشگاه رانگرز، نیوجرسی، آمریکا

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rtalaei@ut.ac.ir

چکیده

کنترل زیستی پشه‌های ناقل با استفاده از نماتودهای انگل حشرات به دلیل ماهیت ایمن و کم خطر روش، اهمیت خاصی در مدیریت تلفیقی پشه‌ها دارد. نماتود انگل *Strelkovimermis spiculatus* به‌طور طبیعی مراحل لاروی *Culex pipiens* را پارازیت می‌کند و در طبیعت به ندرت حشرات کامل *Culex* آلوده به این نماتود هستند. این پدیده کمیاب به عنوان راهی برای انتقال نماتود تصور می‌شود. پیش فرض مطالعه حاضر این بود که پشه‌های بالغ آلوده به نماتود را از طریق دست‌کاری‌های آزمایشگاهی می‌توان تولید کرد. سن میزبان و نسبت میزبان: انگل دو فاکتور اصلی مورد بررسی بودند. برای تعیین مرحله لاروی مناسب، لاروهای اواخر سن سه، اوایل و اواخر سن چهار و هم‌چنین برای برآورد نسبت بهینه میزبان: انگل، نسبت‌های ۵:۱ - ۱۰:۱ - ۲۰:۱ - ۴۰:۱ از لحاظ درصد استحصال پشه‌های بالغ آلوده باهم مقایسه شدند. میانگین زمان خروج نماتودها از حشرات کامل به منظور تعیین زمان مناسب رهاسازی اندازه‌گیری شد. برای کنترل کیفی، نسبت جنسی، تعداد و طول پسانگل‌های خارج شده از حشرات کامل نیز محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفتند. در نسبت ۵:۱ تنها لاروهای اواخر سن چهار به بالغین آلوده تبدیل شدند و حداکثر درصد بالغین آلوده ۱۷/۳۹ درصد از کل بالغین بود. نسبت ۱۰:۱ به عنوان نسبت آلوده‌سازی مرجع انتخاب شد ($P=0/87$). میانگین دوره زمانی از آلوده سازی تا خروج نماتودها از حشرات کامل، $7/37 \pm 0/51$ روز به‌دست آمد. نسبت افراد ماده به کل در نماتودهای خارج شده از حشرات کامل برابر با ۰/۴:۱ بود و تفاوت معنی‌داری بین طول نماتودهای حاصل از حشرات کامل و لاروها وجود نداشت ($P=0/14$). آلوده ساختن انفرادی لاروهای اواخر سن چهار با نسبت آلوده‌سازی ۱۰:۱ در آبگونه‌ای از سوسپانسیون نماتود و رهاسازی بالغین هر هفت روز پس از آلوده‌سازی، راهکاری عملی و مناسب برای کاربرد این نماتود در طبیعت است.

واژگان کلیدی: نماتود انگل حشرات، *Culex pipiens*، کنترل، خود انتشاری، *Strelkovimermis spiculatus*

Production of *Culex pipiens* (Dip.: Culicidae) adults infected by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in autodissemination control strategy Hana Haji Allahverdipour^{1&3}, Reza Talaei-Hassanloui^{1&*}, Javad Karimi Berang², Yi Wang³ & Randy Gaugler³

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Karaj, 2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad & 3- Department of Entomology, Rutgers University, NJ, USA

*Corresponding Author, E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

Abstract

Biological Control of mosquito vectors with insect parasitic nematodes is of importance in Integrated Mosquito Management (IMM) due to its benign nature. The mosquito parasitic mermithid *Strelkovimermis spiculatus* normally parasitizes larval stages of *Culex pipiens* and rarely do adults of *Culex* get infected by

this nematode in wild. This infrequent phenomenon is assumed as the way of nematode dispersal. We hypothesized that infected mosquito adults can be obtained through laboratory manipulations. Parasite: host ratio and host stage were two main parameters to consider. To determine the optimal larval instar and parasite: host ratio, late third, early fourth, late fourth instar larvae and 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 ratios were compared and the percentage of infected adult mosquitoes obtained recorded. Average nematode emergence time was measured to estimate the proper release time of the mosquitoes in larval habitats. The sex ratio, number and length of postparasites emerged from adults were also calculated and compared in quality control process. Only late fourth instars infected adult host at 5:1 with a maximum proportion of infected adults of 17.39%. The ratio of 10:1 was chosen as standard infection ratio ($P=0.87$). The average duration between infection and nematode emergence was 7.37 ± 0.51 (days). The proportion of females to total emerged nematodes from adults was 0.4:1 which is an acceptable ratio for nematodes' colonization in water bodies. There was no statistical difference between the length of nematodes emerged from mosquito adults and larvae ($P=0.14$). Infecting late fourth instars individually at 10:1 infection ratio in an aliquot of nematode suspension and release of infected males seven days post-infection is a feasible strategy for application of this nematode in wild.

Keywords: insect parasitic nematodes, *Culex pipiens*, control, autodissemination approach, *Strelkovinermis spiculatus*

Received: 14 March 2017, Accepted: 27 May 2017

مقدمه

اهمیت بسیاری از پشه‌های خانواده Culicidae فقط در رفتار خونخواری‌شان نیست بلکه در نقش آنها به‌عنوان ناقلین عوامل بیماری‌گر جانوران (پروتوزوآها، ویروس‌ها و نماتودها) از نقطه نظر سلامت عمومی است. یکی از گونه‌های متعلق به این خانواده، پشه معمولی خانگی *Culex pipiens* Linnaeus است که ناقل بیماری‌های انسانی مانند ویروس نیل غربی، آنسفالیت سنت لوئی و ژاپنی، مننژیت، فیلاریوز و ویروس تب ریفت ولی (Rift Valley Fever Virus) است (Vinogradova, 2000). حداقل ۲ میلیون نفر سالانه از بیماری‌هایی که به‌وسیله پشه‌ها منتقل می‌شوند، در دنیا می‌میرند و کنترل پشه‌ها یکی از موضوع‌های مهم سلامت انسان‌ها در قرن بیست‌ویکم است. حشره‌کش‌های قوی، زه‌کشی باتلاق‌ها، مرداب‌ها و توری‌های حفاظتی در بعضی از مناطق راه‌گشا بوده‌اند اما با این وجود، زادوولد و عادت‌های تغذیه‌ای پشه‌ها کماکان شکست‌ناپذیر و گزینه‌های کنترل آنها محدود است (Anonymous, 2013). با این‌که کاربرد حشره‌کش‌های پایرتروئید، فسفره و کاربامات در هنگام طغیان بیماری‌ها، مساله را تا اندازه‌ای مرتفع می‌سازد اما این کاربرد علاوه بر هزینه بالا و پایداری غیریکنواخت، به‌خاطر اثرات زیان‌بار بر انسانها و محیط‌زیست‌شان دردسرساز شده‌است.

چندین سویه از باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* Berliner Meyer & Neide *Lysinibacillus sphaericus* و *Clostridium bifermentans* Weinberg & Seguin وجود دارند که عمدتاً برای دوبالان‌کشدگی دارند. اما کاربرد موفقیت‌آمیز باکتری‌ها علیه سه جنس مهم پشه‌ها *Culex*، *Anopheles* و *Aedes* عمدتاً به مناطق معتدله دنیا که پشه‌ها فقط آزاردهنده هستند، محدود است. موارد قابل بحث دیگر دامنه میزبانی محدود و ناپایداری آنها در مناطق تغذیه لاروها هستند (Porter et al., 1993). استفاده از فرآورده‌های براساس باکتری‌ها هم‌چنین نگرانی‌هایی را درمورد ایجاد گونه‌های مقاوم به‌دنبال دارد به طوری که سطوح بالای مقاومت هم گزارش شده است (Silva-Filha et al., 2014). راهبرد دیگر در کنترل زیستی پشه‌ها استفاده از باکتری همزیست، *Wolbachia* است. با این وجود، بسیاری از ناقل‌های مهم از نظر پزشکی و گونه‌های مهم از نظر کشاورزی قابل آلوده‌سازی نیستند یا با سویه‌هایی از *Wolbachia* آلوده می‌شوند که فنوتیپ‌های مطلوب برای کنترل بیماری یا آفت را ایجاد نمی‌کنند (Hughes et al., 2014). این مشکلات نیاز به توسعه سریع یک جایگزین برای کنترل پشه‌ها را برجسته می‌سازد.

در بین دشمنان طبیعی پشه‌های ناقل، نماتودهای خانواده Mermithidae عوامل خوش‌آبیه‌ای هستند. نماتودهای عموماً طویل، باریک و سفید شفاف هستند که طول آنها از ده تا صد میلی‌متر متفاوت است و انگل شاخه بندپایان هستند. مرمیتیدهای انگل پشه‌ها علیرغم قرار گرفتن در سایه توسعه تجاری حشره‌کش زیستی مبتنی بر باکتری *B. thuringiensis* var. *israelensis* در مواردی که روش کنترل بیولوژیک تلقیحی مد نظر است، نقش ایفا می‌کنند (Shamseldeen et al., 2007). محققان ویژگی‌های مطلوبی مانند سهولت کاربرد، ایمنی زیستی، تخصص میزبانی، دست‌کاری آزمایشگاهی زیست‌شناسی، کشندگی، تولید انبوه در محیط زنده و توانایی ذاتی برای تکثیر طولانی‌مدت در محیط‌زیست را برای مرمیتیدها برشمرده‌اند. همچنین برای تعداد زیادی از میزبان‌های غیرهدف شامل گونه‌هایی از Copepoda, Dytiscidae, Corixidae, Anisoptera, Zygoptera, Ephydriidae, Chaoboridae, Chironomidae نیست و در آنها رشد نمی‌کند. تولید انبوه این نماتودها در کشورهایی مانند چین و هند یک راهبرد معمول و امکان‌پذیر برای کنترل پشه‌های ناقل است (Platzer 2007). مرمیتیدهای انگل پشه‌ها علیه اعضای زیرخانواده Culicinae و در انواع زیستگاه‌های پشه‌ها شامل مخازن آبی موقت و دائمی آزمون شده‌اند. رهاسازی‌های موفق زیادی برای مرمیتیدهای انگل پشه‌ها گزارش شده است، اگرچه رهاسازی ناکارآمد در طبیعت نیز به‌ندرت دیده شده است. در گزارشی، Wiedemann *Anopheles albimanus* و *Anopheles punctipennis* Say با کاهش ۱۷ برابری در تعداد لاروها به‌طور موفقیت‌آمیزی کنترل شده است (Petersen et al., 1978). این اولین تلاش موفق در مقیاس بزرگ برای کنترل پشه‌ها با یک انگل بوده است. بیش از ۸۰ درصد پارازیتسم از رهاسازی گونه *Strelkovimermis peterseni* Nickle بعد از ۵ سال گزارش شد (Peterson & Willis, 1974). در عملیات کنترل *Anopheles* spp در استان‌های فارس و سیستان و بلوچستان، استقرار *R. culicivora* را گزارش شد ولی این استقرار کاهش ناچیز جمعیت پشه‌ها را در پی داشت (Zaim et al., 1988).

در میان مرمیتیدها، *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino به‌واسطه دامنه میزبانی وسیع، ظرفیت پرورش آزمایشگاهی با *C. pipiens pipiens* و تحمل به خشکی، آتیه خوبی را برای کنترل زیستی نشان می‌دهد (Platzer, 2007). این گونه تحمل بیشتری به سطوح بالای آلودگی‌های آلی و یون‌های محلول نسبت به بقیه مرمیتیدها دارد (Camino & Garcia, 1991) و بنابراین برای واردسازی به‌عنوان عامل کنترل پشه‌ها در زیستگاه‌های موردحمله پشه‌ها مدنظر است. همه گونه‌های پشه‌های دارای اهمیت پزشکی مانند *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* و *Toxorhynchites* حساسیت نسبی به *S. spiculatus* دارند. این نماتود انگل پشه معمول خانگی *C. pipiens* است. چرخه زندگی این مرمیتید عموماً با لارو سن دوم (پیش‌انگل) آغاز می‌شود که به سن دوم لارو پشه حمله می‌کند. بعد از رشد و نمو درون میزبان، نماتود به صورت پسانگل (لارو سن سوم) از لارو سن چهارم پشه خارج می‌شود. تکامل بیشتر به مرحله بالغ و تولیدمثل در خارج از میزبان و در محیط‌زیست آن انجام می‌گیرد (Poinar & Otieno, 1974). فقط لاروهای پشه در چرخه طبیعی زندگی انگلی این مرمیتید درگیر هستند.

موارد بسیاری از پارازیتسم حشرات کامل پشه با مرمیتیدهایی که بالغ شدن آنها عمدتاً در لاروها صورت می‌گیرد شناخته شده است. به‌عنوان مثال می‌توان رخداد پایین آلودگی در حشرات کامل *Aedes sierrensis* Ludlow توسط مرمیتید *Octomyomermis troglodytis* Poinar & Sanders (Washburn et al., 1986) یا جمع‌آوری گاه‌گاه حشرات کامل *Culex dolosus* Lynch پارازیت با *S. spiculatus* (García et al., 1994) را ذکر کرد. در مطالعه پارازیتسم طبیعی *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* Macquart توسط *S. spiculatus* مشاهده شد که درصد بالغین پارازیته بین دو جمعیت مورد مقایسه از ۵/۷ تا ۱۴/۲ درصد متغیر بوده است (Campos & Sy, 2003). پشه‌های بالغ *C. pipiens* آلوده به گونه *S. spiculatus* نیز به‌ندرت در طبیعت مشاهده می‌شود که دلایل حضور این درصد پایین از بالغین آلوده از نظر تکاملی هنوز کاملاً شناخته شده نیست. تصور می‌شود توانایی پرواز پشه‌های بالغ و قابلیت انتقال نماتودها از یک مخزن

آبی به مخزن آبی دیگر، راهی برای جابجایی و پراکنش نماتودها باشد و به نوعی سازش تکاملی انگل باشد. به نظر می‌رسد که نماتود انگل از پشه‌های بالغ به‌عنوان ناقل و حمل‌کننده استفاده می‌کند (Haji Allahverdipour, unpublished data). این پدیده نادر، محرک اولیه برای انجام پژوهش حاضر بود. مشخص نیست که آیا حضور مرمیتیدها در حشرات کامل پشه، پاسخی به تاخیر زمانی در رشدونمو آنها و به سود گسترش و پراکنش آنها است یا این‌که تبعات آلودگی در سنین بالاتر لاروی است؛ ولی در هر حال یکی از مهم‌ترین ابعاد پارازیتسم حشرات کامل توسط مرمیتیدها، توانایی بالقوه پشه بالغ در پراکنش مرمیتید به مخازن آبی دیگر است که مهاجرت به زیستگاه‌های جدید را امکان‌پذیر می‌سازد. هم‌چنین ثابت شده است که پارازیت‌شدن پشه‌های ماده بالغ *Ae. albifasciatus* با *S. spiculatus* تاثیر معنی‌داری در بقا (طول عمر) آنها ندارد (Di Battista et al., 2015). به‌علاوه نشان داده شده است که پشه‌های بالغ پارازیت‌گرایش بیشتری به سوی آب برای رهاسازی نماتودها در آب دارند تا خون پرنده (خونخواری)، که مزیتی برای استفاده از آنها در کنترل بیولوژیک پشه‌ها به حساب می‌آید (Haji Allahverdipour, unpublished data).

یکی از شیوه‌های کنترل بیولوژیک آفات، خود انتشاری (Autodissemination) است. در این شیوه، از حشرات میزبان آلوده به بیمارگرها به‌منظور توزیع و انتشار بیمارگر یا انگل استفاده می‌شود (Keller et al., 1997). استحصال پشه‌های بالغ آلوده به نماتود که توانایی پرواز و پراکنش نماتودها را در مخازن آبی محدود زیستگاه پشه معمولی خانگی یا دیگر گونه‌های پشه‌ها را داشته باشند، هدف اصلی و محوری این تحقیق است که می‌تواند راهکاری جدید و ایمن برای کنترل پشه‌ها باشد. با بدست آوردن یک پروتکل مناسب برای تولید تعداد کافی از پشه‌های بالغ آلوده به نماتود و رهاسازی آنها در مجاورت زیستگاه‌های لاروی می‌توان مرمیتیدها را در قالب راهبرد رهاسازی تلقیحی برای کنترل پشه‌ها به‌کار برد.

مواد و روش‌ها

پرورش پشه میزبان *Culex pipiens pipiens*

برای جمع‌آوری دستجات تخم در طبیعت از جاذب‌های تخم‌گذاری (Gaugler et al., 2017) استفاده شد و پس از تفریح تخم‌ها و خروج لاروهای سنین بالاتر، زیرگونه *C. pipiens pipiens* تایید شد. لاروها در سینی‌های لعابی حاوی آب فاقد کلر در درجه حرارت 26°C و رطوبت ۶۵ درصد و دوره روشنایی (L:D) ۱۶:۸ نگهداری و با گرانول‌های عصاره مخمر تغذیه شدند. شفیره‌ها به ظروف آب در قفس مخصوص بالغین جوان حاوی محلول شکر انتقال یافتند. جهت گرفتن دستجات تخم بیشتر، هر دو هفته یک بار بالغین مسن با خون بلدرچین زنده که میزبان مرجح این گونه است تغذیه شدند.

پرورش نماتود انگل *Strelkovimermis spiculatus*

برای تولید این نماتود از میزبان زنده که لاروهای خانواده Culicidae هستند، استفاده شد. ابتدا به جعبه‌های ماسه حاوی تخم‌های نماتود آب دیونیزه اضافه می‌شد تا تخم‌ها تفریح شوند. ۱۶-۱۲ ساعت بعد آب روی ش‌ها برداشته و پیش‌انگل‌های تازه ظهور کرده با میکروسکوپ نوری دوچشمی شمارش و غلظت سوسپانسیون نماتود مشخص می‌گردید. لاروهای سن دوم پشه *C. pipiens* با نسبت آلوده‌سازی ۳:۱ (سه نماتود به‌ازای هر لارو پشه) به مدت یک شبانه‌روز در معرض پیش‌انگل‌ها قرار می‌گرفتند. بعد لاروها با آب شستشو و با مخلوط غذای ماهی و عصاره مخمر

تغذیه می‌شدند. وقتی لاروها به سن چهار می‌رسیدند برای جداسازی پسانگل‌ها از لاروهای پشه، به سینی‌های مش‌دار انتقال داده می‌شدند. وقتی پسانگل‌ها بالغ شده و تشکیل ساختارهای کلاف مانند را دادند به جعبه‌های ماسه منتقل می‌شدند تا تخم‌گذاری و دوره زندگی دیگر از سر گرفته شود. بنابراین دوره زندگی انگلی این نماتود از لارو سن دوم پشه آغاز و به لارو سن چهارم آن خاتمه می‌یابد و پشه بالغ در آن دخیل نیست. اما برای انجام این پژوهش نیاز به تولید پشه‌های بالغ آلوده به این گونه از نماتود بود. بدین ترتیب، پروتکل تولید پشه‌های بالغ آلوده به نماتود در دو سرفصل کلی الف- مرحله و سن مناسب میزبان برای آلوده سازی ب- نسبت بهینه آلوده سازی (میزبان: انگل) تعریف شد.

الف- مرحله و سن مناسب میزبان برای آلوده سازی

پیش فرض مطالعه حاضر این بود که برای راه یافتن نماتودها به حشره کامل پشه، لازم است آلوده‌سازی از سنین لاروی بالاتری نسبت به سن طبیعی آلودگی (سن دوم) صورت گیرد. بدین منظور سه مرحله لاروی مختلف پشه به عنوان تیمارها انتخاب شدند:

۱. اواخر سن سه
۲. اوایل سن چهار
۳. اواخر سن چهار

سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد و ۱۰ لارو در هر تکرار به نسبت آلوده سازی ۳:۱ (میزبان: انگل) به همان شیوه ذکر شده در قسمت پرورش نماتود، آلوده شدند. لاروها در درجه حرارت 24°C و رطوبت ۷۸ درصد نگهداری شدند. درصد بالغین پارازیته برای هر تیمار مشخص شد.

ب- نسبت آلوده سازی (میزبان: انگل) بهینه

ابتدا آزمایش مقدماتی نسبت آلوده سازی با تیمارهای ۵:۱ - ۱۰:۱ - ۲۰:۱ - ۴۰:۱ روی لاروهای آخر سن چهار انجام گرفت. شمارش بالغین پارازیته و لاروها و شفیره‌های مرده تا استحصال همه بالغین انجام گرفت تا در آزمایش‌های بعدی بهترین نسبت میزبان: انگل مشخص شود.

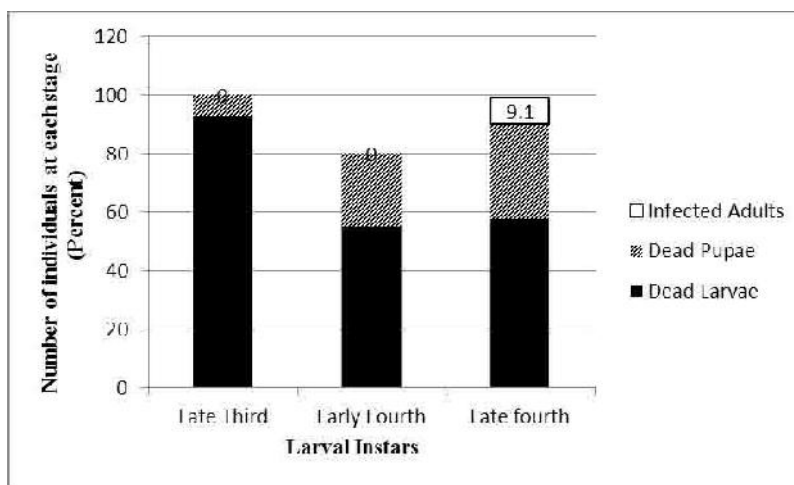
آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین دو تیمار منتخب ۱۰:۱ و ۱۵:۱ با آزمون t و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت.

۵۰۰ لارو به صورت انفرادی هرکدام درون یک فنجان کوچک یک‌بار مصرف حاوی آب‌گونه‌ای (aliquot) از سوسپانسیون نماتود آلوده شدند. فنجان‌ها درون سینی‌های حاوی آب و واجد روکش به منظور جلوگیری از تبخیر آب در درجه حرارت 24°C و رطوبت نسبی ۷۸ درصد قرار گرفتند. روز بعد همه لاروها با آب شستشو و به یک ظرف حاوی آب و کمی عصاره مخمر انتقال یافتند. شفیره‌ها روزانه به طور جداگانه به ظروف چند چاهکی در بسته منتقل و تا تبدیل شدن به حشرات کامل و خروج نماتودها پایش شدند. تعداد نماتودهای خارج شده و جنسیت و طول آنها جهت بررسی کیفی نماتودهای خارج شده از بالغین مشخص شد.

در تمام مراحل آزمایش از آب فوق‌خالص (Synergy® water purification system, EMD Millipore) دیونیزه و فاقد کلر استفاده شد.

نتایج

مقایسه مراحل مختلف لاروی نشان داد که در نسبت ۵:۱ تنها لاروهای اواخر سن چهار *C. pipiens pipiens* قادر به تبدیل به بالغین آلوده و انتقال آلودگی به حشرات کامل هستند (شکل ۱). با توجه به اینکه میانگین استحصال بالغین آلوده در تیمارهای اواخر سن سه و اوایل سن چهار، صفر به دست آمد، نیازی به تجزیه واریانس داده‌ها نبود و لاروهای اواخر سن چهار برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.



شکل ۱- میانگین درصد استحصال پشه بالغ *Culex pipiens pipiens* آلوده به انگل *Strelkovimermis spiculatus* هنگام آلوده سازی سه مرحله مختلف لاروی در نسبت ۳:۱

Fig. 2. The average of obtained *Culex pipiens pipiens* mosquito adults infected by *Strelkovimermis spiculatus* regarding infection of three different larval instars at 3:1 ratio

میانگین درصد بالغین آلوده (شکل ۲) در نسبت های ۵:۱، ۱۰:۱، ۲۰:۱ و ۴۰:۱ به ترتیب ۴/۳۵، ۱۰، ۱/۷ و ۱/۷ بود. نتایج آزمایش‌های مقدماتی نشان داد که هیچ‌کدام از نسبت‌های آلوده‌سازی بالا و پایین برای کسب بالغین آلوده مناسب نیستند و بنابراین نسبت‌های میانی شامل ۱۰:۱ و ۱۵:۱ برای ارزیابی بیشتر انتخاب شدند. مقایسه دو نسبت ۱۰:۱ و ۱۵:۱ با آزمون t نشان داد که این دو اختلاف معنی‌داری از لحاظ نرخ آلودگی ندارند ($P=0/87$) و می‌توان نسبت ۱۰:۱ را به عنوان نسبت آلوده‌سازی مرجع در نظر گرفت (شکل ۳). حداکثر درصد بالغین آلوده به دست آمده ۱۷/۳۹ درصد از کل بالغین بود که نمایانگر نیاز به آلوده‌سازی تعداد زیادی از لاروهای سن آخر به منظور رهاسازی است. میانگین تعداد نماتودها در حشرات کامل، ۲/۶۶ و ۶/۵ عدد به ترتیب برای غلظت‌های ۱۰:۱ و ۱۵:۱ به دست آمد و این مقادیر برای لاروها مساوی ۵/۵ و ۸/۸۳ عدد بود. تعداد نماتودهای خارج شده از پشه‌های بالغ دامنه‌ای بین ۱ تا ۱۳ داشت.

مشاهده یک لارو آخر سن چهار در معرض ۵ پیش‌انگل با میکروسکوپ نوری دوچشمی نشان داد لارو پشه با حرکات دفاعی بسیار شدید و گریز سریع اجازه نزدیک شدن نماتودها را نداد و با ضرباتی محکم پیش‌انگل‌ها را دور

راند و پس از مدتی پیش‌انگل‌ها تمایلی به آلوده‌سازی پشه نشان ندادند. تصور می‌شود خودداری پیش‌انگل‌ها از آلوده سازی لاروهای سنین بالاتر پشه فقط مربوط به سختی و غیرقابل نفوذی کوتیکول آنها نیست بلکه لاروهای سنین بالا رفتارهای دفاعی قوی‌تری نیز دارند. بنابراین محصور ساختن لارو در یک قطره کوچک آب که حرکات لارو پشه را محدود کند نفوذ پیش‌انگل‌ها را تسهیل می‌سازد. همچنین آلوده‌سازی جداگانه و انفرادی لاروها با تعداد محدودی از پیش‌انگل‌ها در مقابل آلوده‌سازی دسته‌جمعی آنها در ۲۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون، علاوه بر این که حرکات دفاعی لارو در مقابله با نفوذ نماتودها را کاهش می‌دهد بلکه مانع از بارگذاری (overload) بیش از حد نماتودها در لاروها می‌شود که برای بقای لارو ضروری است.



شکل ۲- پشه *Culex pipiens pipiens* آلوده به نماتود *Strelkovimermis spiculatus*
Fig. 2. *Culex pipiens pipiens* mosquito infected by the nematode *Strelkovimermis spiculatus*

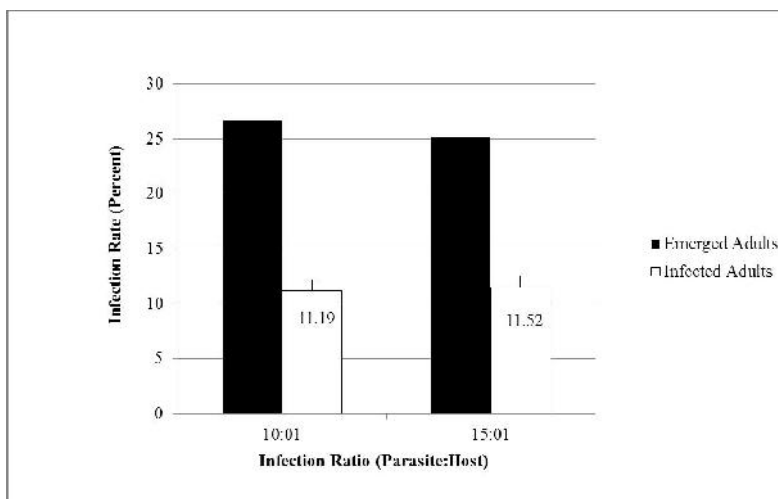
میانگین دوره زمانی از آلوده‌سازی لاروهای آخر سن چهار تا خروج نماتودها از حشرات کامل، $7/37 \pm 0/51$ روز به دست آمد. (Mean \pm SD)

نسبت افراد ماده به کل در نماتودهای خارج شده از حشرات کامل در غلظت ۱۰:۱ برابر با ۰/۴:۱ بود که نسبت قابل قبولی برای تداوم دوره زندگی نماتود در مخازن آبی است؛ درحالی‌که این نسبت در غلظت ۱۵:۱ برابر با ۰/۲۵:۱ بود که تعداد بالای افراد نر در این حالت مطلوب نیست. با توجه به این که شرایط محیطی در تعیین جنسیت این نماتودها نقش بسزایی دارد، فقدان مواد غذایی کافی و شرایط نامساعد در سطوح پارازیتیسم بالاتر، نرزیایی را بالا می‌برد. میانگین طول پسانگل‌های خارج شده از حشرات کامل ($2/45 \mu\text{m}$) بود که با میانگین طول پسانگل‌های خارج شده از لاروها ($2/75 \mu\text{m}$) تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/14$). این یافته بر رشد برابر این دو گروه از پسانگل‌ها علی‌رغم شرایط رشدی متفاوت آنها دلالت دارد و از نقطه نظر کنترل کیفی آنها اهمیت دارد.

بحث

مطالعه‌ها نمایانگر آن است که سنین مختلف لاروی جنس *Culex* از جمله سنین سه و چهار قابلیت آلوده شدن با مریمتیدها را دارند (Achinelly & Camino, 2005; Gajanana *et al.*, 1978) اما پاسخی به این سوال نمی‌دهند که آیا لاروهای آلوده به مرحله حشره کامل راه می‌یابند یا نه؟ در مطالعه حاضر ثابت شد آخر سن چهار لاروی زمان مناسبی

برای آلوده‌سازی برای کسب حشرات کامل آلوده است ولی لاروهای سن سه یا اوایل سن چهار در نسبت ۱:۵ تبدیل به حشره کامل نمی‌شوند و در مرحله لاروی یا شفیرگی از بین می‌روند. همان‌گونه که در مطالعه آلوده‌سازی لاروهای سن چهار *C. pipiens* با *R. culicivora*، احتمال مشاهده پارازیتسم حشرات کامل برای لاروهای مسن‌تر (۴ روز پس از پوست‌اندازی) وجود داشت اما برای لاروهای جوان‌تر (۳ روز پس از پوست‌اندازی)، پارازیتسم حشرات کامل مشاهده نشد (Kurihara & Maeda, 1980).



شکل ۳- مقایسه میانگین استحصال پشه بالغ *Culex pipiens pipiens* ظاهر شده و آلوده به انگل *Strelkovimermis spiculatus* در دو نسبت آلوده‌سازی مختلف

Fig. 3. Mean comparison for obtained *Culex pipiens pipiens* mosquito adults emerged and infected by *Strelkovimermis spiculatus* in two different infection ratios

به نظر می‌رسد که نوعی تعادلی در تعداد پیش‌انگل‌های لازم برای به‌دست آوردن پشه‌های بالغ آلوده لازم است؛ به گونه‌ای که اگر لاروهای پشه در معرض تعداد پایین پیش‌انگل (نسبت ۵:۱) قرار بگیرند، احتمال نفوذ آنها به لارو پشه (آلودگی) کم خواهد بود و در صورتی که در معرض تعداد بالای پیش‌انگل (نسبت ۱:۲۰) قرار بگیرند احتمال انتقال آنها به مرحله بالغ کمتر خواهد بود. در مطالعه‌ای روی بهینه‌سازی تولید آزمایشگاهی *S. spiculatus* به‌منظور رهاسازی خود نماتودها و نه پشه‌های آلوده به نماتود، نسبت ۱۰:۱ پیش‌انگل در لارو پشه بیشترین محصول پسانگل، بیشترین تعداد پسانگل به‌ازای هر لارو و بیشترین فراوانی پارازیتسم به‌دست آمد اما نرزیایی بالاتری مشاهده شد. متعاقباً نسبت‌های پایین‌تر (بین ۱:۵ تا ۸:۱) برای غلبه بر مشکل نرزیایی بالا توصیه شد (Achinelly & Micieli, 2011) که برای نیل به هدف این تحقیق، قابل اجرا نبود چون امکان آلوده‌سازی لاروهای سن چهار و انتقال آلودگی به حشرات کامل در این نسبت‌های پایین وجود نداشت. تعداد پایین‌تر مرمیتدها در حشرات کامل نسبت به لاروها به افزایش بقای پشه در سطح پایین‌تر پارازیتسم نسبت داده می‌شود (Di Battista *et al.*, 2015). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در ارتباط با میانگین تعداد نماتودها در حشرات کامل و لاروها نیز موکد همین مطلب است.

فاکتور زمان خروج اولین نماتودها از حشرات کامل اهمیت زیادی در زمان رهاسازی آنها دارد. طبق این مطالعه، میانگین مدت زمان آلوده‌سازی تا خروج نماتودها ۷ روز برآورد شد. این مدت زمان بسته به گونه نماتود بین یک تا سه

هفته متغیر است (Blackmore 1994)؛ به طور مثال، برای رابطه انگلی *R. culicivora* و لاروهای سن چهار *C. pipiens* بین ۹ تا ۱۳ روز گزارش شده است (Kurihara & Maeda, 1980).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آلوده ساختن انفرادی لاروهای اواخر سن چهار *C. pipiens pipiens* با نسبت آلوده سازی ۱۰:۱ در آبگونه‌ای از سوسپانسیون نematod *S. spiculatus*، راهکاری مناسب برای تولید بالغین نر آلوده به نematod به منظور رهاسازی آنها در طبیعت است. افراد نر پشه به هیچ وجه قادر به نیش زدن و انتقال بیماری‌ها نیستند، بنابراین رهاسازی آنها در طبیعت روشی کاملاً ایمن و بی‌خطر است. پسانگل‌های خارج‌شده از بالغین، نسبت جنسی و رشد قابل قبولی داشته و قادر به تکمیل دوره‌های زندگی بعدی و آلوده‌سازی لاروها هستند. هم‌چنین زمان خروج اولین نematodها از حشرات کامل که میانگینی برابر با ۷/۳۷ روز پس از آلوده‌سازی لاروها دارد، باید در کاربرد بالغین آلوده در نظر گرفته شود. پیشنهاد می‌شود به منظور برآورد قدرت پرواز پشه‌های آلوده به نematod، زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی انجام گیرد و مطالعه‌های ارزیابی کارآیی این فرآورده زنده در زیستگاه‌های لاروی توصیه می‌شود.

References

- Achinelly, F. M. & Camino, N. B.** (2005) Evaluation of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) as alternative hosts for laboratory mass-rearing of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Nematology* 7(2), 281-284.
- Achinelly, F. M. & Micieli, V. M.** (2011) Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) with a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. *Biological Control* 57, 31-36.
- Anonymous** (2013) 10 Genetically Modified Mosquitoes to Reduce Disease Threat. Available from: <http://www.summit.clevelandclinic.org> (accessed 14 June 2016).
- Blackmore, M. S.** (1994) Mermithid parasitism of adult mosquitoes in Sweden. *The American Midland Naturalist* 132(1), 192-198.
- Camino, N. B. & Garcia, J. J.** (1991) Influencia de la salinidad y el pH en el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens* Wied. (Diptera: Culicidae). *Neotropica* 37(98), 107-112. [In Spanish with English abstract].
- Campos, R. E. & Sy, V. E.** (2003) Mortality in immatures of the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and effects of parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Buenos Aires province, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(2), 199-208.
- Di Battista, C. M., Fischer, S. & Campos, R. E.** (2015) Prevalence of parasitism and adult survival time of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) parasitized by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Journal of Vector Ecology* 40(2), 393-397.
- Gajanana, A., Kazmi, S. J., Bheema Rao, U. S., Suguna, S. G. & Chandras, R. K.** (1978) Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae in Pondicherry. *Indian Journal of Medical Research* 68, 242-247.
- García, J. J., Campos, R. E. & Maciá, A.** (1994) Prospección de enemigos naturales de culicidae (Diptera) de la selva marginal de punta lara (Prov. de Buenos Aires, República Argentina). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 19, 209-215.
- Gaugler, R., Wang, Y., Chandel, K. & Suman, D. S.** (2017) Collapsible stackable disposable inexpensive pesticide free traps and attractant for surveillance and control of *Aedes* container breeding mosquitos and other container breeding insects. United States Patent 20170000101. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/y2017/0000101.html>.

- Hughes, G. L. & Rasgon, J. L.** (2014) Transinfection: a method to investigate Wolbachia-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect Molecular Biology* 23(2), 141-151.
- Keller, S., Schweizer, C., Keller, E. & Brenner, H.** (1997) Control of white grubs (*Melolontha melolontha* L.) by treating adults with the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 7, 105-116.
- Kurihara, T. & Maeda, R.** (1980) Observations on the development of the nematode parasite *Romanomermis culicivorax* in pupal and adult, *Culex pipiens molestus* mosquitoes. *Mosquito News* 40, 643- 645.
- Petersen, J. J., Chapman, H. C., Willis, O. R. & Fukuda, T.** (1978) Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador II. Application of the nematode. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27(6), 1268-1273.
- Petersen J. J., & Willis, O. R.** (1974) *Diximermis peterseni* (Nematoda: Mermithidae): A potential biocontrol agent of *Anopheles* mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 24(1), 20-23.
- Platzer, E. G.** (2007) Mermithid nematodes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7, 58- 64.
- Poinar, G. O. & Otieno, W. A.** (1974) Evidence of four molts in the Mermithidae. *Nematologica* 20, 370-371.
- Porter, A. G., Davidson, E. W. & Liu, J. W.** (1993) Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57(4), 838-861.
- Shamseldean M. M., Platzer, E. G. & Gaugler, R.** (2007) Role of the surface coat of *Romanomermis culicivorax* in immune evasion. *Nematology* 9, 17-24.
- Silva-Filha, M. H. N. L., Berry, C. & Regis, L.** (2014) *Lysinibacillus sphaericus*: toxins and mode of action, applications for mosquito control and resistance management. In: T. S. Dhadialla and S. S. Gill, ed. *Advances in Insect Physiology: insect midgut and insecticidal proteins* 47, 89-176.
- Vinogradova, E. B.** (2000) Mosquitoes *Culex pipiens*: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics and control. PenSoft Press, Sofia, 1st ed., 4-44.
- Washburn, J. O., Anderson, J. R. & Egerter, D. E.** (1986) Distribution and prevalence of *Octomyomermis troglodytis* (Nematoda: Mermithidae), a parasite of the western tree hole mosquito, *Aedes sierrensis*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2, 341-346.
- Zaim, M., Ladonni, H., Ershadi, M. R. Y., Manouchehri, A. V., Sahabi, Z., Nazari, M. & Shahmohammadi, H.** (1988) Field application of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) to control anopheline larvae in southern Iran. *Journal of the American Mosquito Control Association* 4(3), 351-355.