دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
جلد ۱۱، شماره ۲۱، سال ۱۳۹۹، (۲۷-۳۳)

شناسایی مولکولی ویروس سیاه شدن سلول ملکه و تک یاخته نوزما در زنبورستان‌های استان‌های البرز، تهران و مازندران

مجتبی محرمی[۱]

۱-استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۹۹ / **تاریخ پذیرش**: اسفندماه ۹۹
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/HBSJ.2021.356015.1107
رایانامه: MOJMOHARRAMI@YAHOO.COM

چکیده:

ویروس سیاه شدن سلول ملکه یک عامل بیماریزای ویروسی نوزادان ملکه در کلنی‌های زنبورعسل است که باعث ایجاد تلفات قابل توجه در نوزادان ملکه می‌شود. این ویروس سبب می‌شود دیواره سلول ملکه به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه تغییر رنگ دهد. در سلول‌ها، نوزاد ملکه در اثر ابتلا به بیماری و تکثیر ویروس در زمان شفیرگی و یا پیش‌شفیرگی می‌میرد.

هدف از این مطالعه تعیین میزان آلودگی زنبورستان‌های استان‌های البرز، تهران و مازندران از نظر ویروس سیاه شدن سلول ملکه و تک یاخته نوزما بود. نمونه‌برداری از ۱۵۴ زنبورستان در ۳ استان مذکور با همکاری سازمان دامپزشکی کشور انجام شد. از هر زنبورستان حدود ۱۰۰ عدد زنبور عسل بالغ نمونه‌گیری شده و به بخش تحقیقات زنبورعسل، کرم ابریشم و حیات وحش موسسه رازی ارسال گردید. نمونه‌ها ابتدا از نظر نوزما به طریقه میکروسکوپی بررسی شد و سپس

جهت بررسی آلودگی به ویروس سیاه شدن سلول ملکه، استخراج RNA و واکنش زنجیره پلیمراز معکوس (RT-PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گردید.

در این مطالعه از ۱۵۴ زنبورستان، در ۷۰ زنبورستان ۴۵/۴۵٪ (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد: برابر ۵۳/۶۶٪ - ۳۷/۴۲٪) ویروس سیاه شدن سلول ملکه، در ۲۵ زنبورستان ۲۳/۱۶٪ (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد: برابر ۲۳/۰۲٪ - ۱۰/۸٪) نوزما و در ۹ زنبورستان هر دو عامل ویروس سیاه شدن سلول ملکه و نوزما ۵/۸٪ (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد: برابر ۱۰/۸٪ - ۲/۷٪) شناسایی شد. بنابر این هر چند که زنبوران کارگر مخزن مهمی برای تجمع ویروس در کلنی‌های زنبور عسل بوده و می‌توانند تهدیدی بالقوه برای جمعیت نوزادان ملکه باشند ولی ارتباط معنی‌داری بین حضور نوزما و آلودگی به ویروس سیاه شدن سلول ملکه در این تحقیق مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: زنبورعسل، نوزما، ویروس سیاه شدن سلول ملکه، RT-PCR.

مقدمه

زنبور عسل حشره مفیدی است که تمام تولیدات آن اعم از عسل، گرده، ژله رویال و موم جنبه خوراکی داشته و در بهداشت، سلامت جسمی و روانی جامعه انسانی نقش مهمی دارد و از سوی دیگر در گرده‌افشانی مراتع، باغات و مزارع کشاورزی از اهمیت بسزایی برخوردار است. این حشره مانند سایر موجودات مورد تهاجم انگل‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قرار می‌گیرد. بیماری‌های ویروسی زنبورعسل، در زنبورداری‌ها از اهمیت خاصی برای زنبورداران برخوردار می‌باشند. اگرچه عفونت‌های ویروسی اغلب با علائم کلینیکی آشکاری همراه نیستند ولی تحت شرایط خاص می‌توانند باعث مرگ و میر و خسارات زیادی به زنبورداران گردند (Yue and Genersch, 2005). در حال حاضر از میان ویروس‌های شناسایی شده زنبور عسل، ویروس فلجی حاد زنبور عسل، ویروس سیاه شدن سلول ملکه، ویروس تغییر شکل بال، ویروس نوزاد کیسه‌ای، ویروس فلجی مزمن زنبور عسل و ویروس کشمیر زنبور عسل از اهمیت بیشتری برخوردار هستند، زیرا سبب ایجاد بیماری شدید در زنبوران عسل می‌شوند (Gisder and Genersch, 2015). از بین شش ویروس، ویروس سیاه شدن سلول ملکه یکی از رایجترین عوامل بیماریزای ویروسی است که باعث سیاه و تلف شدن لارو و شفیره ملکه می‌شود (Allen and Ball, 1999). ویروس سیاه شدن سلول ملکه اولین بار از لارو و پیش شفیره تلف شده ملکه‌ها جداسازی شد. (Bailey and Woods, 1997). در مراحل اولیه عفونت، لاروهای بیمار به رنگ زرد کمرنگ مشاهده می‌شوند و بدلیل کیسه‌ای شدن جدار خارجی لاروها، این طور به نظر می‌رسد که آنها در اثر ویروس نوزاد کیسه‌ای تلف شده‌اند. لارو یا شفیره‌های ملکه پس از بسته شدن درب سلول‌ها می‌میرند و لاروها یا شفیره‌های مرده و دیواره سلولی به رنگ قهوه‌ای-سیاه در می‌آیند (Ball and Bailey, 1997). ویروس سیاه شدن سلول ملکه، دارای RNA تک رشته‌ای مثبت و عضو راسته پیکورنا ویرال‌ها، خانواده دیسترووویریده و متعلق به جنس تریاتوویروس می‌باشد. (Spurny *et al*., 1997) ویروس توسط غذای آلوده و از طریق دهان به دستگاه گوارش نوزادان منتقل شده و در سیتوپلاسم سلول‌های اپیتلیال روده تکثیر می‌گردد. مطالعات حاضر نشان می‌دهد که آلودگی به ویروس در بالغین به میزان بالاتری نسبت به شفیرها دیده می‌شود. (Tentcheva *et al*., 2004) اپیدمیولوژی ویروس سیاه شدن سلول ملکه با عفونت نوزما که یک بیماری تک یاخته‌ای در زنبورها است همراه است: (Berényi *et al*., 2006; Ritter, 1996). اخیراً، به ویژه در مطالعات بین‌المللی گزارش شده است که ویروس‌های زنبور عسل در اکثر موارد در سندرم فروپاشی کلنی نقش دارند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که احتمال آلودگی همزمان عوامل بیماریزای ویروسی و انگلی، در کلنی‌هایی که دچار فروپاشی شده‌اند بیشتر است (Maramorosch and Shatkin., 2006). این مطالعه با هدف بررسی و شناسایی ویروس سیاه شدن سلول ملکه و ارتباط آن با شیوع نوزما در زنبوران عسل جمع‌آوری شده از ۳ استان ایران انجام شد.

مواد و روش کار

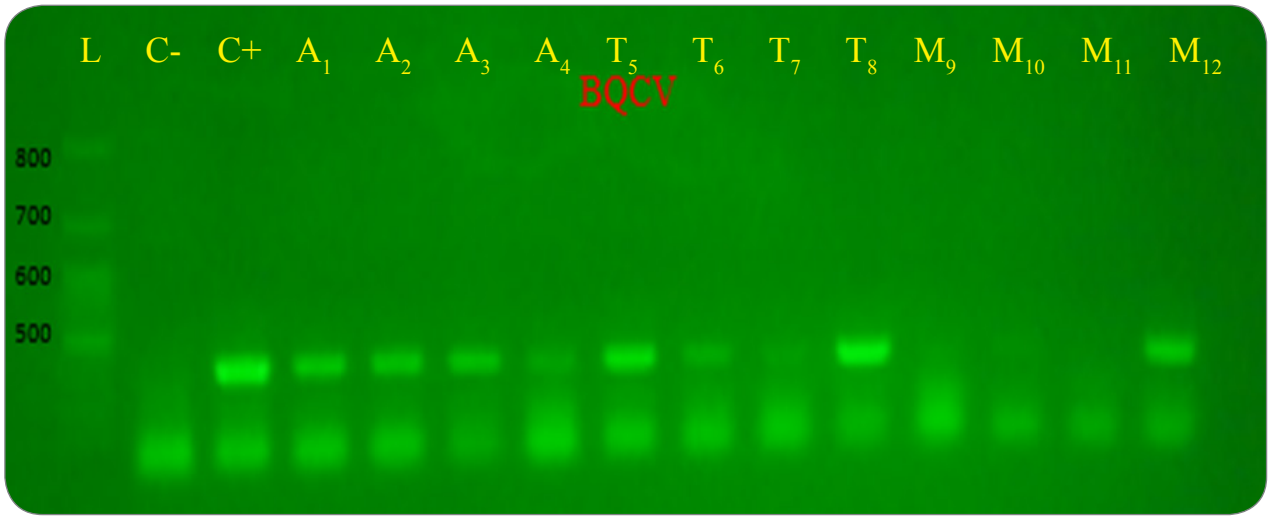
این مطالعه در استان‌های البرز، تهران و مازندران از کلنی‌هایی که دارای سابقه کاهش و ریزش جمعیت بودند با همکاری سازمان دامپزشکی کشور در فاصله زمانی ۱۳۹۶-۱۳۹۴ انجام شد. نمونه‌برداری از ۱۵۴ زنبورستان (۷۶ نمونه استان البرز، ۲۸ نمونه استان تهران و ۵۰ نمونه استان مازندران) و در هر زنبورستان از کلنی‌های مورد نظر حدود ۱۰۰ عدد زنبور عسل بالغ نمونه‌گیری شده و به بخش تحقیقات زنبورعسل، کرم ابریشم و حیات وحش موسسه رازی ارسال گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر C 20-

نگهداری شدند. جهت بررسی از نظر آلودگی به تک یاخته نوزما، تعداد ۲۰ عدد زنبور از هر نمونه انتخاب و دستگاه گوارش آنها جدا و در هاون چینی استریل قرار گرفت. به ازای هر زنبور ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و خوب هموژن شد و با استفاده از یک قیف که درون آن پارچه دولایه قرار داشت فیلتر گردید. در g ۸۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب با آب مقطر استریل به حالت هموژن در آمد و در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد (OIE, 2008). جهت آماده‌سازی نمونه برای استخراج RNA، از هر زنبورستان تعداد ۴۰ عدد زنبور بالغ، در هاون‌های چینی استریل قرار داده شد و به آن آب دپس اضافه و خوب همگن گردید. محلول همگن، در 20000g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای استخراج RNA جمع‌آوری گردید (Berényi *et al*., 2006). برای استخراج RNA از کیت QIA Amp-Viral RNA Mini و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. پرایمرهای بکار رفته شامل: F: AGT AGT TGC GAT GTA CTT CC و R: CTT AGT CTT ACT CGC CAC TT بودند که یک قطعه 477 bp را تکثیر می‌دهند (Berényi *et al*., 2006). RT-PCR به روش تک مرحله‌ای و با استفاده از کیت QIA amp-One Step RT-PCR انجام شد. مستر میکس در حجم ۲۰ میکرولیتر به ازای هر نمونه تهیه گردید که شامل: ۵ میکرولیتر از 5X One Step Buffer، ۱ میکرولیتر از dNTPs Mix، ۵ میکرولیتر از 5X Q-Solution، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر F و R با غلظت ۱۰ µM، ۱ میکرولیتر از Enzyme Mix، ۷ میکرولیتر از RNase-Free Water و سپس ۵ میکرولیتر از RNA به هر نمونه اضافه گردید (حجم نهایی هر نمونه ۲۵ میکرولیتر). برنامه PCR-RT شامل ۳۰ دقیقه در ۵۰°C برای RT و ۱۵ دقیقه در ۹۵°C و ۴۰ سیکل شامل: ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۵۰ ثانیه در ۵۵°C، ۱ دقیقه در ۷۲°C و سپس در پایان ۷ دقیقه در ۷۲°C اجرا گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، حاوی سیف استین الکتروفورز گردید. از لدر ۱۰۰ bp به عنوان استاندارد اندازه استفاده شد و روی دستگاه "یو- وی ترانس ایلومیناتور" باندها مشاهده و سپس از ژل عکس گرفته شد. جهت تأیید، از موارد مثبت ۶ نمونه برای تعیین توالی ارسال شد.

نتایج

در این مطالعه از ۱۵۴ زنبورستان، در ۷۰ زنبورستان (۴۵/۴۵ ٪ و فاصله اطمینان ۹۵ ٪ برابر ۵۳/۶۶ ٪ - ۳۷/۴۲ ٪) ویروس سیاه شدن سلول ملکه، در ۲۵ زنبورستان (۲۳/۱۶ ٪ و فاصله اطمینان ۹۵ ٪ برابر ۲۳/۰۲ ٪ - ۱۰/۸ ٪) نوزما و در ۹ زنبورستان هر دو (۵/۸ ٪ و فاصله اطمینان ۹۵ ٪ برابر ۱۰/۸ ٪ - ۲/۷ ٪) شناسایی شد. بر اساس نتایج میزان آلودگی به ویروس سیاه شدن سلول ملکه از نظر آماری اختلاف معنی داری با آلودگی به نوزما و آلودگی به هر دو عامل همزمان داشت ($P<0/05$). همچنین در سه استان از ۷۶ نمونه استان البرز ۹ مورد (۱۱/۸۴ ٪ و فاصله اطمینان ۹۵ ٪ برابر ۲۱/۳ ٪ - ۵/۵ ٪) از ۲۸ نمونه استان تهران ۲ مورد (۷/۱۴ ٪) و از ۵۰ نمونه استان مازندران ۱۴ مورد (۲۸ ٪) از نظر نوزما مثبت بودند. بر میزان آلودگی زنبورستان‌ها به ویروس سیاه شدن سلول ملکه در استان البرز ۳۶ مورد (۴۷/۳۷ ٪)، تهران ۱۸ مورد (۶۴/۲۹ ٪) و مازندران ۱۶ مورد (۳۲ ٪) بودند. همچنین مطالعه انجام شده حضور همزمان ویروس سیاه شدن سلول ملکه و نوزما را در نمونه‌های استان البرز ۴ مورد (۵/۲۶ ٪)، استان تهران ۱ مورد (۳/۵۷ ٪)، استان مازندران ۴ مورد (۸ ٪) بود.

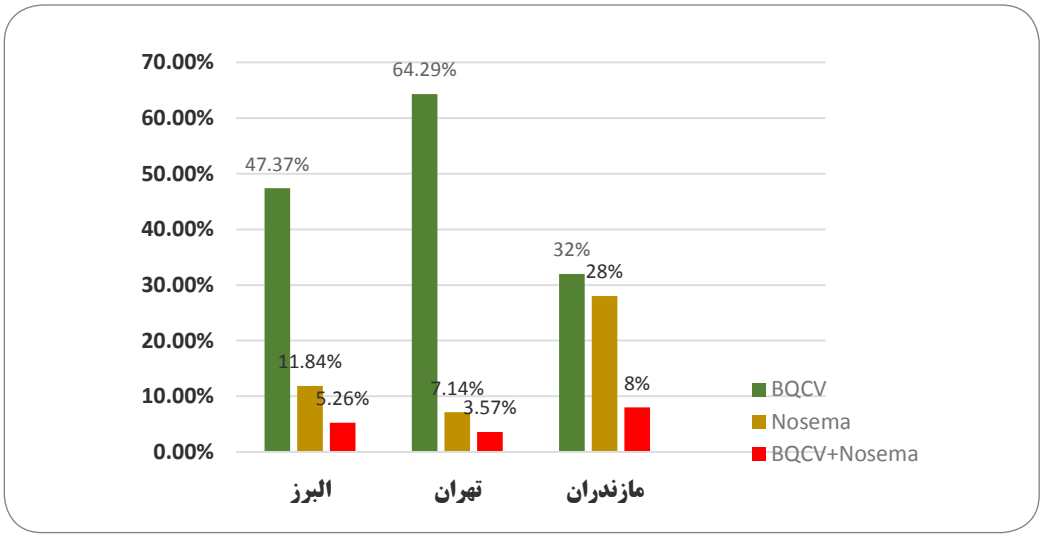
نتایج حاصل از RT-PCR برخی از نمونه‌ها در شکل ۱ و نتایج میزان آلودگی به تفکیک نوع عامل و استان در جدول ۱ و نمودار ۱ و نشان داده شده است.



شکل۱: نتایج حاصل از RT-PCR برخی از نمونه‌ها از سه استان بر روی ژل آگارز (۱/۵ %) در تصویر بالا قابل مشاهده می‌باشند. ستون ۱ مربوط به لدر ۱۰۰ bp، ستون ۲ مربوط به کنترل مثبت و ستون ۳ کنترل منفی و بقیه ستون‌ها نمونه‌های مورد آزمایش که با حروف اختصاری نشان داده شده‌اند (A برای البرز، T برای تهران و M برای مازندران).

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمایشات

استان	تعداد نمونه	BQCV +	نوزما +	نوزما + / + BQCV
البرز	۷۶	۳۶ (٪ ۴۷/۳۷)	۹ (٪ ۱۱/۸۴)	۴ (٪ ۵/۲۶)
تهران	۲۸	۱۸ (٪ ۶۴/۲۹)	۲ (٪ ۷/۱۴)	۱ (٪ ۳/۵۷)
مازندران	۵۰	۱۶ (٪ ۳۲)	۱۴ (٪ ۲۸)	۴ (٪ ۸)
جمع	۱۵۴	۷۰ (٪ ۴۵/۴۵)	۲۵ (٪ ۱۶/۲۳)	۹ (٪ ۵/۸۴)



نمودار ۱- درصد موارد مثبت از هر استان

بحث و نتیجه‌گیری

ویروس‌های زنبور عسل که در اوایل قرن بیستم شناسایی شدند به یکی از بزرگترین تهدیدهای سلامت زنبوران عسل تبدیل گردیده‌اند. از آن زمان تاکنون حدود ۲۴ ویروس آلوده کننده زنبورهای عسل در سراسر جهان گزارش شده است. گزارشات حاکی از آن است که ویروس سیاه شدن سلول ملکه تلفات قابل توجهی در ملکه‌ها ایجاد می‌کند. از این میان، گزارش شده است که ویروس سیاه شدن سلول ملکه تلفات قابل توجهی را در ملکه‌ها ایجاد می‌کند. تشخیص عفونت‌های ویروسی در زنبورعسل، به علت فقدان علائم بالینی و اثرات پاتولوژیك مشخص مشکل است. استفاده از RT-PCR روش قابل قبول و امیدوارکننده‌ای در تشخیص عفونت‌های ویروسی زنبور عسل بوجود آورده است. از آنجایی‌که ویروس سیاه شدن سلول ملکه هیچ‌گونه علائم قابل مشاهده‌ای از عفونت را در زنبوران بالغ برجای نمی‌گذارد، اطلاعات کمی در مورد برآورد خسارت‌های آن وجود دارد. گزارش‌هایی در فرانسه توسط زنبورداران در مورد مشکلات تخم‌گذاری ملکه‌ها و تلفات زمستان‌گذرانی آنها وجود دارد که ممکن است بعلت همزمان بودن عفونت ویروس سیاه شدن سلول ملکه و نوزما آپیس باشد (Tentcheva *et al*., 2004). ویروس سیاه شدن سلول ملکه در اروپا وجود داشته و با عفونت نوزما در جمعیت بالغین ارتباط نزدیک دارد. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده است که اثرات پاتوژنیک نوزما آپیس با دخالت این ویروس تشدید گردیده است و هر دو عامل نوزما آپیس و ویروس در مرگ کلنی‌ها نقش ایفا می‌نمایند. آلوده بودن بافت روده میانی به انگل نوزما باعث افزایش حساسیت به عفونت ویروس سیاه شدن سلول ملکه می‌شود. در واقع، یک ارتباط مهم بین بروز ویروس سیاه شدن سلول ملکه و نوزما آپیس در کلنی‌های زنبورعسل همراه با اوج عفونت در بهار و اوایل تابستان مشاهده شده است (Bailey *et al*., 1983). در مطالعات بیلی و بال در سال ۱۹۹۱ و همچنین تنچوا و همکاران در سال ۲۰۰۴ همبستگی مثبت بین اپیدمیولوژی این ویروس و عفونت نوزما وجود داشته است (Tentcheva *et al*., 2004 : Bailey and Ball., 1991).

در این تحقیق به بررسی آلودگی ویروس سیاه شدن سلول ملکه و ارتباط آن با تک یاخته نوزما در کلنی‌های دارای سابقه کاهش و ریزش جمعیت در زنبورستان‌های استان‌های البرز، تهران و مازندران پرداخته شد. مطالعه حاضر نشان داد که در این سه استان، ویروس به طور قابل ملاحظه‌ای در کلنی‌هایی‌که سابقه ریزش و تلفات داشته‌اند، وجود دارد. در حالیکه میزان آلودگی همزمان ویروس مذکور با نوزما بسیار کمتر است.

در مطالعه‌ای که توسط برنی و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد عفونت به نوزما آپیس در ۷۸٪ از نمونه‌ها تشخیص داده شد در حالیکه در همان زنبورها تراکم ویروس سیاه شدن سلول ملکه ۷۵٪ تعیین شد (Berényi *et al*., 2006). چاگاس و همکاران در سال ۲۰۲۰ در یک مطالعه، ۹۲ کلنی از ۱۷ زنبورستان در جنوب برزیل را از نظر عفونت به نوزما سرانه و ویروس سیاه شدن سلول ملکه مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که نوزما سرانه و ویروس سیاه شدن سلول ملکه در منطقه جنوبی کشور در حال گردش است که ممکن است این مسئله عامل از بین رفتن کلنی‌ها باشد. نوزما سرانه در ۵۳ کلنی (۵۷/۶٪) و ویروس سیاه شدن سلول ملکه در ۳۰کلنی (۳۲/۶٪) مشاهده شد. عفونت همزمان در ۲۳کلنی (۲۵٪) مشاهده شد. مسئله‌ای که پیشنهاد می‌شود این است که عملکرد هم‌افزایی عوامل بیماریزا با یکدیگر باعث کاهش طول‌عمر زنبوران عسل می‌شود (Chagas *et al*., 2020). در مطالعه‌ای که اوگاز و همکاران در سال ۲۰۱۷ برای تعیین شیوع انگل نوزما و ویروس سلول سیاه ملکه در زنبوران عسل آپیس میفرآ در استان وان ترکیه انجام دادند در مجموع ۲۶۰ زنبور عسل کارگر از ۲۶کلنی در ۵ زنبورستان جمع‌آوری شد. ۸کلنی از ۲۶کلنی (۳۲/۵٪) از نظر عفونت نوزما سرانه مثبت بودند اما آلودگی به نوزما آپیس در هیچ یک از نمونه ها مشاهده نشد. در ۲۳کلنی از ۲۶کلنی (۸۸/۵٪) آلودگی با ویروس سیاه شدن سلول ملکه مثبت ارزیابی شد (Oğuz *et al*., 2017). ابوکوبا و همکاران در سال ۲۰۱۸ وقوع ویروس‌های زنبور عسل و انگل نوزما را در پنج کلنی زنبور عسل که دچار کاهش جمعیت، بال‌های تغییر شکل یافته و دارای رنگ تیره بودند در شهر دمشق سوریه با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار دادند. ویروس سلول سیاه ملکه در ۲۹/۲٪ از نمونه‌ها و نوزما سرانه در دو نمونه (۸/۳٪) شناسایی شد. اگرچه در مطالعات قبلی همبستگی مثبت بین اپیدمیولوژی ویروس سیاه شدن سلول ملکه و عفونت نوزما وجود داشته است در مطالعه ابوکوبا و همکاران، تشخیص همزمان نوزما سرانه و با این ویروس مشاهده نشد .علاوه بر این شیوع نوزما سرانه نسبتاً کم بود (Abou Kubaa *et al*., 2018).

مقایسه نتایج به دست آمده از این پژوهش با مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر بیانگر این موضوع است که کلنی‌های زنبورعسل دارای کاهش و ریزش جمعیت در

ایران، مانند سایر کشورها می‌توانند آلوده به ویروس سیاه شدن سلول ملکه باشند. اما اینکه آیا بین آلودگی به نوزما و ویروس سیاه شدن سلول ملکه رابطه‌ای وجود دارد مبهم است. در مطالعه حاضر از تعدا ۱۵۴ نمونه تنها تعداد ۹ نمونه (۵/۸۴٪) هم از نظر آلودگی به نوزما و هم از نظر آلودگی به ویروس سیاه شدن سلول ملکه مثبت بودند و ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان آلودگی همزمان این دو عامل وجود ندارد. احتمالاً عفونت همزمان نوزما و ویروس سیاه شدن سلول ملکه علائم بالینی بیماری را سنگین‌تر می‌کند. دلایل مربوط به میزان پراکندگی این ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف چندان واضح نیست و احتمالاً عواملی مانند مدیریت زنبورستان‌ها و کیفیت مهارت‌های عملی زنبورداران، و از سوی دیگر حضور میزبانان و یا حاملین برای ویروس، در این مسئله می‌تواند نقش داشته باشد. از طرفی دیگر، برخی از تفاوت‌ها در میزان پراکندگی ویروس بدون تردید می‌تواند مربوط به نوع روش انتخاب شده برای نمونه‌گیری در زنبورستان‌ها، تعداد نمونه‌گیری‌ها و آنالیز نتایج باشد. در آینده لازم است که نقش مایت واروا در انتشار عوامل ویروسی از جمله BQCV و همچنین روابط بین عوامل موثر در مرگ ومیر زنبور عسل مورد بررسی قرار گیرد.

منبع ها:

Yue, C., and Genersch, E. 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in Honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). Journal of General Virology 86: 3419-3424.

Gisder, S., and Genersch, E. 2015. Special issue: honey bee viruses. Viruses7(10):5603-5608.

Allen, M., and Ball B. 1999. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee world 77(3): 141-162.

Ball, BV., and Bailey. 1997. Viruses, in: Morse, R. A. and Flottum, K. (Ed.), Honey bee pests, predators, & diseases. A.I. Root Company, Medina pp. 11-32.

Spurny, R., Antonín, P., Pálková, L., Kiem, H.K.T., de Miranda, J.R., and Plevkaa, P. 2017. Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honeybee Pathogen. Journal of Virology 91: 6 e02100-16.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, ME., and Bergoin, M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. Applied and Environmental Microbiology. 70 (12): 7185-7191.

Ritter, W. 1996. Diagnostik und Bekämpfung der Bienenkrankheiten Stuttgart, Germany: Fischer.

Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., and Nowotny, N. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. Appl. Environ. Microbiolgy 72 (4): 2414-2420.

Maramorosch, K., and Shatkin, A. 2007 Honey bee viruses. In: Ziebuhr J, editor. Advances in Virus Research. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier pp. 33-80.

OIE Terrestrial Manual, (2008) Chapter 2.2.4. *Nosemosis* of Honey bees.

Bailey, L., Ball, B.V., and Perry, J.N. 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. Annals of Applied Biology 103:13-20.

Bailey, L., Ball, B.V. 1991. Honey Bee Pathology. 2nd ed. London, UK: Academic Press.

Chagas, D. B., Monteiro, F. L., Barcelos, L. S., Frühauf, M. I., Ribeiro, L. C., Lima, M., Hübner, S and Fischer, G. 2020. Black queen cell virus and Nosema ceranae coinfection in Africanized honey bees from southern Brazil Pesquisa Veterinária Brasileira 40(11):892-897.

Oğuz, B., Karapinar., Z, Dincer., E and Değer, M. S. 2017. Molecular detection of *Nosema* spp. and black queen-cell virus in honeybees in Van Province, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 41(2): 221-227.

Abou Kubaa ,R., Molinatto, G., Khaled, B. S., Daher-Hjaij, N., Heinoun, K., Saponari, M. 2018. First detection of black queen cell virus, *Varroa destructor* macula-like virus, *Apis mellifera* filamentous virus and *Nosema* ceranae in Syrian honey bees *Apis mellifera* syriaca. Bulletin of Insectology 71 (2): 217-224.

Molecular detection of Black queen cell virus and Nosema in apiaries of Alborz, Tehran and Mazandaran provinces.

M. Moharrami[1]

1- Asistant Professor, Razi Vaccine And Serum Research Institue, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO)

DOI: 10.22092/HBSJ.2021.356015.1107

Abstract

Black queen cell virus (BQCV) is a viral pathogen in bees that causes significant losses in bees. The virus causes the cell wall of the queen to changes from dark brown to black. In the cells, the queen larva dies due to disease and the body fills with virus particles during pupation or pre-pupation. Sampling of 154 apiaries located in 3 provinces of the country were done in cooperation with the Veterinary Organization. About 100 adult bees were sampled from each apiary and sent to the Honey bee, Silkworm and Wildlife diseases Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute. Samples were first examined microscopically for Nosema and then RNA extraction and reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed. The PCR product was electrophoresed and bands with a length of 477 bp were observed. Out of 154 apiaries, in 70 apiaries (45.45% and 95% confidence interval equal to 53.66% - 37.42%) queen cell blackening virus, in 25 apiaries (23.16% and 95% confidence interval equal to 23.02% - 10.8%) and in 9 apiaries, both (5.8% and 95% confidence interval equal to 10.8% - 2.7%) were identified.Thus, according to the worker bees are important reservoirs for the virus accumulates in bee colonies and can be a potential threat to the queen neonatal population, but no significant relationship was observed between the presence of *Nosema* and BQCV infection in this study.

Key words: Honeybee, *Nosema*, BQCV, RT-PCR

Corresponding Author: M. Moharrami
Email: mojmoharrami@yahoo.com