DOI: 10.22092/vj.2018.111055.1393 شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تعیین فراوانی ویروس تغییر شکل دهنده بال در شفیره‌های زنبورعسل به روش واکنش زنجیره‌ی پلیمراز نسخه‌برداری معکوس

• **مجتبی محرمی (نویسنده مسئول)**

بخش تحقیقات زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **حسین مدیرروستا**

بخش تحقیقات زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **مریم ترکمن**

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

• **بهزاد همتی**

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

• **محمد شجاعی**

بخش تحقیقات زنبورعسل، کرم ابریشم، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۰۸-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۹-۰۲-۱۳۹۷

Email: mojmoharrami@yahoo.com

چکیده

ویروس تغییر شکل دهنده بال (Deformed Wing Virus)(DWV)، یک عامل بیماریزای ویروسی در زنبورعسل است که معمولاً سبب ایجاد عفونت پنهان در زنبورعسل می‌شود. اما زمانی‌که به وسیله جربواروآ منتقل می‌شود می‌تواند سبب بدشکل شدن بال و اندام زنبورعسل گردد. این ویروس نقش عمده‌ای در فروپاشی کلنی بازی می‌کند. در این مطالعه که از نوع مشاهده‌ای مقطعی می‌باشد، وجود این ویروس در شفیره‌های زنبورعسل و زنبوران بالغ با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ی پلیمراز نسخه‌برداری معکوس مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از ۱۵۶ زنبورستان، در۲۳ استان کشور، طی فاصله زمانی فروردین تاخرداد ۱۳۹۵ با همکاری سازمان دامپزشکی کشور انجام شد. از هر زنبورستان تعداد ۵۰ عدد زنبور بالغ و تعداد ۲۰ عدد شفیره زنبورعسل جمع‌آوری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که از مجموع ۱۵۶ زنبورستان نمونه‌گیری شده، تعداد ۳۶ زنبورستان (۲۳/۰۸ درصد) به ویروس دفرمه‌کننده آلوده بودند. از مجموع ۳۶ زنبورستان آلوده، در ۳۰ زنبورستان، ویروس دفرمه‌کننده هم از نمونه‌های زنبور بالغ و هم از نمونه‌های شفیره، در ۴ زنبورستان فقط از نمونه‌های زنبور بالغ و در ۲ زنبورستان، فقط از نمونه‌های شفیره شناسائی شد. در این تحقیق، برای اولین‌بار، این ویروس در کلنی‌های زنبورعسل ایران که دارای سابقه مرگ و میر، کاهش و ریزش جمعیت و ابتلا به مایت واروآ بودند، شناسایی گردید. پراکندگی واروآ دستراکتور نقش مهمی در افزایش چشمگیر شیوع این ویروس و خسارت‌های ناشی از آن دارد.

کلمات کلیدی: زنبورعسل، مایت وآروا، ویروس، تغییر شکل بال‌ها

● Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 26-33

Identification of deformed wing virus (DWV) in honeybee pupae by RT-PCR

By: Moharrami, M. (Corresponding Author), Department of Honey Bee, Silk Worm and Wildlife Reseach, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Modirrusta, H., Department of Honey Bee, Silk Worm and Wildlife Reseach, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.Torkaman, M., Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran and Hemmati, B., Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran., Hemmati B., Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran and Hemmati, B., Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran. Shojaei, M., Department of Honey Bee, Silk Worm and Wildlife Reseach, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2017-11-29 Accepted: 2018-05-19

Email: mojmoharrami@yahoo.com

The virus is widely distributed and prevalent in colonies infested by the mite. Using RT-PCR based assays, the virus infections in honey bees can be detected and quantified in a rapid and accurate manner. Infected honeybees from colonies suffering with symptoms of depopulation, sudden collapse, paralysis, and varroa infestation, used in this study, originated from 23 provinces of Iran. Bee samples were collected between July - September 2011 and 2012. Altogether, samples from 156 apiaries were collected and submitted for virus screening. From each apiary, 100-500 adult worker bees were sampled. RNA extraction and RT-PCR were performed with QIAGEN kits. The primers lead to a fragment of 434 bp. The PCR products were electrophoresed in a 1.2 % agarose gel (stained with ethidium bromide). Following the RT-PCR reaction with the specific primers, out of the 156 apiaries examined, 34 (21.8 %) were infected with DWV. This is the first study of DWV detection in Iranian apiaries. We have looked into the occurrence of the DWV and identified differences in the distribution of the virus in the collected samples from different geographic regions of Iran. The spread of V. destructor has been implicated in a dramatic increase in the prevalence of DWV and it is likely that this virus will become predominant in infested areas. The role of V. destructor in DWV transmission and the appearance of wing deformities in newly emerged bees also deserve more intensive investigation.

Key words: Honeybee,deformed wing virus,RT-PCR,Varoa mite

مقدمه

زنبورعسل یکی از حشرات مفید است و علاوه براین که تمام تولیدات آن شامل عسل، گرده، ژله‌رویال و موم جنبه خوراکی دارد، تمام این محصولات دارای خاصیت درمانی نیز می‌باشند. از طرفی، این حشره، نقش مهمی را در گرده‌افشانی داشته که به این ترتیب در کشاورزی نقش مهمی را ایفا می‌کند. این حشره نیز مانند سایر موجودات، مورد تهاجم انواع انگل‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قرار می‌گیرد که در این میان، بیمارهای ویروسی یکی از عوامل مهم در تلفات زنبورعسل است (۱۶).

بیماری‌های ویروسی زنبور عسل، در زنبورداری‌های کشورهای مختلف، از اهمیت ویژه‌ای برای زنبورداران برخوردار می‌باشد. اگرچه عفونت‌های ویروسی معمولاً با علائم کلینیکی آشکاری همراه نیستند ولی باعث خسارات سنگین اقتصادی به زنبورداران می‌گردند.

تعداد ۱۸ویروس، پتانسیل آلوده کردن زنبورعسل را دارند که در این میان ویروس تغییر شکل دهنده بال (Deformed Wing Virus، DWV) یک ویروس بسیار رایج و شناخته شده، در زنبورعسل، است (۱۰). این ویروس، یک ویروس RNAدار تک رشته‌ای با مفهوم مثبت و عضو راسته Picornavirales، خانواده Iflaviridae و متعلق به جنس Iflavirus می‌باشد (۱۲). این ویروس به طور معمول منجر به ایجاد عفونت بدون علائم بالینی در زنبورعسل می‌گردد، ولی می‌تواند با ایجاد ناهنجاریهای ریخت‌شناسی و حتی مرگ، زمانی‌که توسط جرب واروآ منتقل می‌شود، اثرات مخربی بر روی زنبورعسل داشته باشد (۱۱). علائم عمومی در یک زنبور آلوده، شامل بال‌های مچاله، شکم باد کرده، فلجی و کاهش شدید طول عمر است(۳). شدت علائم با مقدارویروس در ارتباط است و با افزایش تیتر ویروس، شدت علائم افزایش می‌یابد. برای مدت‌ها این تصور وجود داشت که این علائم ناشی از تغذیه مایت واروآ از زنبور است در حالی‌که نشان داده شده است که زنبوران با بال تغییر شکل‌یافته در کندوهائی که آلودگی به جرب واروآ (Varroa) را ندارند، نیز، یافت می‌شود(۱). یک کلنی بدون علائم بالینی می‌تواند تحت شرایط استرس‌زا مانند کمبود مواد غذایی در طول ماه‌های زمستان به یک کلنی علامت‌دار تبدیل گردد. کمبود مواد غذایی سبب پیشرفت بیماری، بروز علائم بالینی، کاهش عملکرد زنبورهای کارگر شده و در نهایت سبب فروپاشی کلنی می‌گردد (۵, ۸, ۱۴, ۱۸).

این ویروس، می‌تواند به دو صورت افقی و عمودی بین زنبوران

در یک کلنی منتقل گردد. انتقال افقی از طریق مایت واروآ و همچنین تماس لاروهای جوان با زنبوران پرستار صورت می‌گیرد (۴, ۶, ۷, ۱۳). انتقال عمودی از طریق زنبوران نر و ملکه رخ می‌دهد که این نوع انتقال معمولاً منجر به ایجاد عفونت پنهان شده و علائم بیماری ظاهر نمی‌شود (۹, ۱۳).

وقوع ناهنجاری در بال، بوسیله انتقال ویروس تغییر شکل‌دهنده بال توسط جرب واروآ در مراحل شفیرگی حاصل می‌شود. به همین دلیل عفونت با DWV به آسیب شناسی مایت واروآ اضافه می‌شود و نقش عمده‌ای در فروپاشی کلنی در بیماری واروازیس (Varroasis) بازی می‌کند (۱۹). بنابراین با توجه به این‌که این ویروس در دوران جنینی زنبور باعث ایجاد اختلال در تکوین اندام بال زنبور و در نتیجه ایجاد زنبوران ناقص و تلف شده و وارد آمدن خسارات شدید می‌گردد، بررسی و شناسائی آن حائز اهمیت است. همچنین توانایی در جداسازی DWV در شفیره‌ها این امکان را فراهم می‌آورد که در مواقعی که زنبوردارها با پدیده فروپاشی کلنی مواجه می‌شوند و به یک باره جمعیت زنبوران کلنی از دست می‌رود با بررسی لاروها و شفیره‌های باقی‌مانده در کندو می‌توان دریافت که آیا DWV در بروز این مسئله نقش داشته است یا نه؟ عوامل دیگری نیز ممکن است سبب بدشکل شدن بال گردد و این مسئله که آیا بدشکل شدن بال ناشی از عفونت ویروسی است یا نه، فقط با تست‌های آزمایشگاهی امکان‌پذیر می‌باشد.

هدف از اجرای این تحقیق، تعیین فراوانی ویروس تغییرشکل دهنده بال در شفیره‌های زنبور عسل به روش RT-PCR و راه‌اندازی این روش می‌باشد. قابل ذکر است که تاکنون مطالعات مولکولی در این زمینه در سطح کشور انجام نشده است

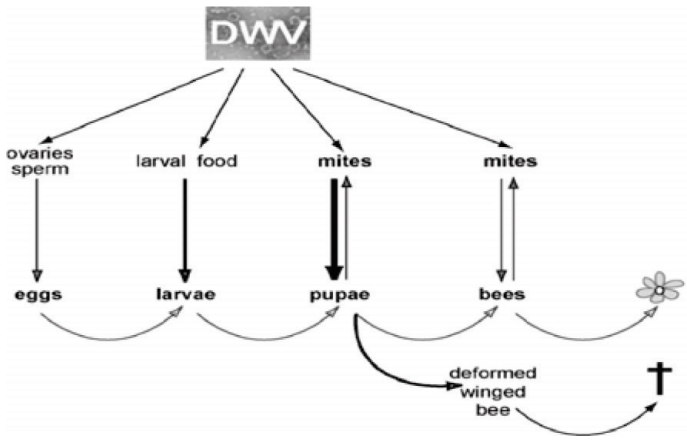
مواد و روش کار

نمونه‌برداری از زنبورستان‌های استان‌های مختلف کشور که دارای سابقه کاهش و ریزش جمعیت و ابتلا به بیماری انگلی واروآزیس بودند انجام شد. برای این منظور نمونه‌های زنبورعسل در دو گروه زنبور بالغ و شفیره از ۲۳ استان با شرایط جغرافیایی متفاوت شامل: آب و هوای خزری، کوهستانی، بیابانی و نیمه بیابانی با هماهنگی سازمان دامپزشکی کشور جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت

در مجموع از ۱۵۶ زنبورستان مختلف، از دو گروه زنبور بالغ و شفیره نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌گیری در هر زنبورستان به این صورت انجام می‌شد که، تعداد ۵۰ عدد زنبور بالغ و ۲۰ عدد شفیره زنبورعسل جداسازی شده و به بخش تحقیقات زنبورعسل، کرم ابریشم و حیات وحش موسسه رازی ارسال صورت می‌گرفت سپس نمونه‌ها کدبندی گردید و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر نمونه، تعداد ۴۰ عدد زنبور بالغ و ۲۰ عدد شفیره، به‌طور جداگانه در هاون‌های چینی استریل قرار داده شد. به ازای هر نمونه، نیم میلی لیتر آب تیمار شده با Diethyl pyrocarbonate (DEPC) اضافه و له گردید تا یک محلول هموژن تهیه گردد. محلول همگن، در g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای استخراج RNA استفاده گردید (۵).

استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از QIA Amp -Viral RNA Mini kit بر طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. RNA استخراج شده برای RT–PCR استفاده گردید.

یک جفت پرایمر ′۵ ATT GTG CCA GAT TGG ACT ′۳DWVf ′۵ AC ′۳ DWVr ′AGA TGC AAT GGA GGA TAC AG از شرکت سیناژن تهیه گردید. این جفت پرایمر یک قطعه bp۴۳۴ را تکثیر می‌دهد(۵).



شکل ۱-۱۰ - مسیرهای انتقال DWV درسطح زنبورعسل فردی در کلنی‌ها. بردار انتقال DWV بصورت تجربی ثابت شده است.مدارک و شواهد برای مسیرهای افقی اضافی بین زنبوران پرستار و لارو از طریق مواد غذایی لارو نیز ارائه شده است. بهترین مسیر انتقال برای DWV بردار انتقال از طریق جرب واروآ می‌باشد. DWV به وسیله جرب به شفیره‌ها و در فاز phoretic به زنبوران بالغ منتقل می‌شود. جرب‌ها در حین تغذیه از شفیره‌ها و زنبوران بالغ DWV را منتقل می‌کنند. تغییر شکل بال به عنوان برجسته ترین نشانه بالینی تنها زمانی رخ می‌دهد که DWV از طریق جرب به شفیره منتقل گردد (۳).

RT-PCR با استفاده از QIA amp - One Step RT-PCR kit صورت گرفت به این صورت که به ازای هر نمونه، ۲۰ میکرولیتر Master mix شامل (۵ میکرولیتر ۵ X One Step Buffer، ۱ میکرولیتر dNTPs Mix، ۵ میکرولیتر ۵ X Q-Solution، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F – Primer (۱۰ µM) و R – Primer (۱۰ µM)، ۱ میکرولیتر Enzyme Mix و ۷ میکرولیتر RNase-Free Water) و ۵ میکرولیتر از RNA هر نمونه در میکروتیوپ‌های ۰/۵ ml به خوبی ترکیب شده و میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد (حجم نهایی هر نمونه ۲۵ میکرولیتر). برنامه RT-PCR شامل ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای RT و ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ سیکل (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در درجه سانتی‌گراد ۵۵، ا دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در پایان ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد اجرا گردید. در نهایت محصول واکنش بر روی ژل ۱/۵درصد الکتروفورز گردید (۵).

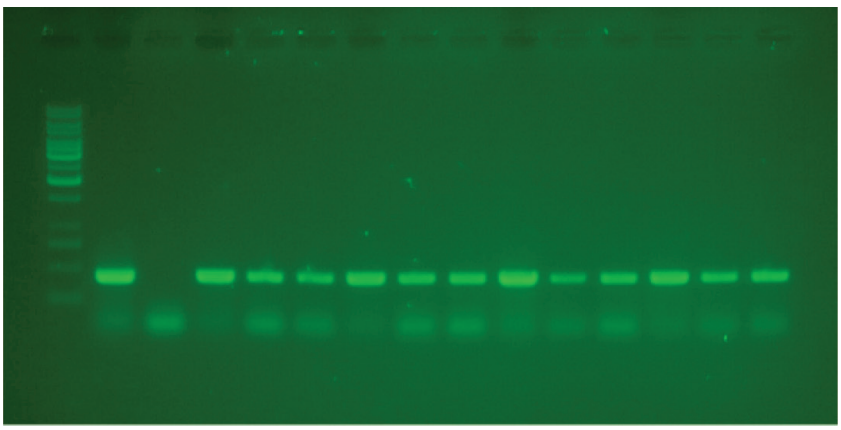
نتایج

از مجموع ۱۵۶ نمونه زنبور بالغ، تعداد ۳۴ نمونه (۲۱/۸ درصد) و ازمجموع ۱۵۶ نمونه شفیره تعداد ۳۲ نمونه (۲۰/۵۱) و از مجموع ۱۵۶ زنبورستان نمونه‌گیری شده، ۳۶ زنبورستان(۲۳/۰۸ درصد) در آزمایش RT-PCR از نظر DWV مثبت بودند. نمونه‌های مثبت از استان‌های اردبیل (۴ مورد زنبور بالغ و ۳ مورد شفیره)، آذربایجان شرقی (۱۱ مورد زنبور بالغ و ۱۰ مورد شفیره)، زنجان (۳ مورد زنبور بالغ و ۳ مورد شفیره)، گیلان (۳ مورد زنبور بالغ و ۳ مورد شفیره)، گلستان (۲ مورد زنبور بالغ و ۲ مورد شفیره)، البرز (۱ مورد زنبور بالغ و ۱مورد شفیره)، قزوین (۱ مورد زنبور بالغ و ۱ مورد شفیره)، خراسان شمالی (۴ مورد زنبور بالغ و ۳ مورد شفیره)، خراسان رضوی (۴ مورد زنبور بالغ و ۵ مورد شفیره)، چهار محال و بختیاری (۱ مورد زنبور بالغ و ۱ مورد شفیره) بودند (جدول۱). نکته جالب در نتایج حاصل از این تحقیق این بود که در نمونه‌های ۲ زنبورستان متعلق به استان‌های آذربایجان شرقی و خراسان رضوی DWV فقط از نمونه شفیره جدا شد. در ۴ زنبورستان متعلق به استان‌های اردبیل، خراسان شمالی و آذربایجان شرقی DWV فقط از نمونه زنبور بالغ جدا شد. در ۲ زنبورستان که متعلق به استان البرز و زنجان بود به علت از بین رفتن کلنی نمونه‌گیری زنبور بالغ از زنبورهای تلف شده در کف کندو صورت گرفت که هم در نمونه زنبور بالغ و هم در نمونه شفیره الودگی به DWV وجود داشت. نتایجRT-PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ویروس دفرمه کننده بال، یک ویروس بسیار متداول در لارو و زنبوران عسل بالغ می‌باشد و یکی از متداول‌ترین ویروس‌های زنبورعسل در جهان است. تقریباً DWV از تمامی‌کندوهای آلوده به مایت واروا در تمام دنیا گزارش شده است و ارتباط نزدیکی با آلودگی به واروآ و فروپاشی کلنی دارد. (۲, ۱۹)

تشخیص عفونت‌های ویروسی در زنبورعسل، بعلت فقدان علائم بالینی مشخص و واضح و مستندات روشن از تغییرات پاتولوژیك، با مشکل مواجه می‌باشد. کاربرد می‌کروسکوپ الکترونی و روش‌های سرولوژیك برای تشخیص عفونت‌های ویروسی خفیف و غیر آشکار در نمونه‌هایی که تعداد بسیار کمی از ویروس‌ها در آنها حضور دارند چندان دقیق نیست. بنابراین روش RT-PCR که در آن نواحی خاصی از اسید نوکلئیك ویروسی موجود در نمونه‌ها تکثیر می‌شود، به نظر می‌رسد روش قابل قبول و امی‌دوارکننده‌ای در تشخیص عفونت‌های ویروسی باشد.



شکل۱ - نتایج الکتروفورز بر روی ژلآگارز. ستون ۱ مربوط به Ladder، ستون ۲ مربوط به کنترل مثبت و ستون ۳ کنترل منفی و بقیه ستون‌ها، برخی از نمونه‌های DWV مثبت مورد آزمایش نشان داده‌شده است.

جدول ۱- نتایج به تفکیک استان‌ها

ردیف	نام استان	تعداد زنبورستان نمونه‌گیری شده	PCR مثبت (DWV) زنبور بالغ	PCR منفی (DWV) زنبور بالغ	PCR مثبت (DWV) شفیره	PCR منفی (DWV) شفیره
۱	اردبیل	۶	۴	۲	۳	۳
۲	آذربایجان غربی	۲	۰	۲	۰	۲
۳	آذربایجان شرقی	۲۴	۱۱	۱۳	۱۰	۱۴
۴	ایلام	۷	۰	۷	۰	۷
۵	اصفهان	۳	۰	۳	۰	۳
۶	یزد	۲	۰	۲	۰	۲
۷	زنجان	۸	۳	۵	۳	۵
۸	کهگیلویه‌وبویراحمد	۴	۰	۴	۰	۴
۹	مرکزی	۳	۰	۳	۰	۳
۱۰	سمنان	۴	۰	۴	۰	۴
۱۱	خراسان شمالی	۱۰	۴	۶	۳	۷
۱۲	خراسان رضوی	۳۴	۴	۳۰	۵	۲۹
۱۳	کرمانشاه	۵	۰	۵	۰	۵
۱۴	خراسان جنوبی	۴	۰	۴	۰	۴
۱۵	همدان	۶	۰	۶	۰	۶
۱۶	کرمان	۵	۰	۵	۰	۵
۱۷	گیلان	۵	۳	۲	۳	۲
۱۸	گلستان	۲	۲	۰	۲	۰
۱۹	فارس	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰
۲۰	مازندران	۱	۰	۱	۰	۱
۲۱	البرز	۲	۱	۱	۱	۱
۲۲	قزوین	۲	۱	۱	۱	۱
۲۳	چهارمحال‌وبختیاری	۴	۱	۳	۱	۳
	جمع	۱۵۶	۳۴	۱۲۲	۳۲	۱۲۴

در این مطالعه با استفاده از این روش حساس، سریع و اختصاصي، بررسی عفونتDWV در کلني‌های به ظاهر سالم با سابقه ریزش، تلفات و آلودگی به مایت واروآ بر روی نمونه‌های شفیره و زنبور بالغ انجام گردید.

این مطالعه اولین بررسی مولکولی بر روی پراکندگی DWV در زنبورستان‌های ایران بر روی نمونه‌های زنبور بالغ و شفیره می‌باشد. هدف از این مطالعه این بود که میزان شیوع و درگیری زنبورستان‌ها به ویروس تغییر شکل‌دهنده بال مورد ارزیابی قرار گیرد و اینکه آیا می‌توان این ویروس را در شفیره‌های زنبور عسل شناسایی نمود. در مورد حضور ویروس‌ها از جمله DWV در کلنی‌های زنبورعسل ایران اطلاعات بسیار کمی وجود دارد در حالیکه از فاکتورهای مهم بیماری‌زا در زنبورعسل بوده است و از این جهت هدف اصلی از این مطالعه، شناسایی این ویروس در کلنی‌های زنبورعسل به‌خصوص، در شفیره‌های زنبور و راه اندازی روش RT-PCR قرار گرفته است. در این تحقیق، برای اولین بار در ایران DWV از کلنی‌های زنبورعسل که دارای سابقه تلفات، کاهش و ریزش جمعیت و ابتلا به مایت واروآ بودند، شناسایی گردید. همچنین شیوع و پراکندگی ویروس تغییر شکل‌دهنده بال در زنبورستان‌های استان‌های مختلف ایران و جداسازی این ویروس از شفیره‌ها ارائه گردید که نکته جالب در نتایج حاصل از این تحقیق این بود که در نمونه‌های ۲ زنبورستان متعلق به استان‌های آذربایجان شرقی و خراسان رضوی DWV فقط از نمونه شفیره جدا شد.

در دو زنبورستان از استان‌های البرز و زنجان، نمونه زنبور بالغ از تلفات جلوی کندو و لارو و شفیره‌های تلف‌شده ارسال شده بود که در هر دو مورد DWV هم از زنبور بالغ و هم از شفیره جدا گردید.این نتایج نشان می‌دهد که برای تشخیص علت تلفات در سطح کلنی بهتر است نمونه‌گیری در سطوح مختلف اعم از لارو و شفیره و زنبوران بالغ در کندو صورت بگیرد.

با توجه به بروز پدیده اختلال فروپاشی کلنی CCD (Colony collapse disorder) از سال ۲۰۰۶ تاکنون، دانشمندان به دنبال کشف عوامل دخیل در بروز این پدیده هستند. با توجه به اینکه رونویسی از DWV به صورت فعال در مناطق مهمی از مغز، از قبیل نوروپیل‌ها که مسئول بینایی و بویایی هستند، صورت می‌گیرد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ویروس می‌تواند اثرات منفی بر روی بویایی و بینایی زنبور داشته به گونه‌ای که انجام رفتار معمولی را برای زنبور دشوار سازد. شاید ناپدید شدن ناگهانی زنبورها ناشی از فعالیت این ویروس و عدم توانایی زنبور در به یاد آوردن خاطرات باشد. مطالعات رفتاری بیشتری برای تایید این فرضیه که ویروس سبب تغییر رفتار طبیعی زنبورعسل می‌گردد، مورد نیاز است (۱۶).

توانایی در جدا سازی DWV از بقایای کلنی، از قبیل لارو و شفیره و یا زنبوران مرده در کف و اطراف کندو این امکان را فراهم می‌آورد که در مواقعی که زنبوردارها با پدیده CCD مواجه می‌شوند و به یک باره جمعیت زنبوران کلنی از دست می‌رود با بررسی این بقایا در کندو می‌توان دریافت که احتمالا DWV در بروز این مسئله می‌تواند ایفای نقش کند.درمطالعه حاضر ۲ زنبورستان متعلق به استان‌های البرز و زنجان به علت از بین رفتن کلنی (پدیده CCD) به اجبار نمونه‌گیری از زنبورهای تلف شده در کف کندو صورت گرفت که هم در نمونه زنبور بالغ تلف شده و هم در نمونه شفیره آلودگی به DWV وجود داشت که این مورد بخوبی نشان داد، می‌توان DWV را از زنبوران بالغ، زنبوران مرده در کف کندو و شفیره‌ها در کلنی‌های آلوده جدا کرد.

شن و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از تکنیک Dot Blot برای تعیین مقدار DWV در یک کلنی ۲ ساله که بشدت آلوده به واروا دستراکتور بود، در ۷۸ درصد شفیره‌هایی که آلوده به مایت بودند DWV را تشخیص داد در حالیکه ۱۰۰ درصد شفیره‌هایی که عاری از مایت واروا بودند از نظر DWV منفی بود(۱۵).

در نتایج این تحقیق نیز از مجموع ۱۵۶ زنبورستان آلوده به مایت واروآ در ۳۲ زنبورستان (۲۰/۵۱ درصد) آلودگی به DWV در شفیره‌ها زنبورعسل تشخیص داده شد.

با توجه به آلودگی کلنی‌های زنبورعسل ایران به واروا دستراکتور که در برخی مناطق نیز بسیار شدید است می‌توان ارتباط بسیار نزدیک آلودگی کلنی‌های زنبورعسل به واروا دستراکتور و آلودگی به DWV در کلنی‌های زنبورعسل را تایید کرده که این موضوع با نتایج مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا در خصوص اهمیت عفونت DWV به تنهایی و در ترکیب با وارواز‌یس همخوانی دارد. این تداخل‌ها احتمالاً تاثیر کاملاً معناداری بر روی سلامت و طول عمر زنبوران عسل همچنین بقاء کلنی‌ها و میزان تولیدات آن‌ها دارد. (۱۱),(۱۴)

ویروس DWV بصورت گسترده‌ای در کلنی‌های زنبورعسل آلوده به مایت واروا شایع است. از نمونه‌های اخذ شده از دو کلنی شدیداً آلوده در آمریکا ویروس DWV از ۹۲ درصد مایت‌های جمع‌آوری شده از این کلنی‌ها (۲۲ از ۲۴) و همچنین در تمام ۲۴ زنبور بالغ با علائم تغییر شکل بال‌ها، از ۹۲ درصد شفیره‌ها، از ۸۰ درصد لارو ها (۲۴ از ۳۰)، ۷۵ درصد زنبوران کارگر به ظاهر سالم ۱۸ از ۲۴) و ۴۷ درصد زنبوران نر بالغ (۱۴ از ۳۰) تشخیص داده شد. بنابراین ارتباط بسیار نزدیک بین آلودگی با مایت واروا دستراکتور و عفونت DWV در شفیره‌های جمع‌آوری شده از سلول‌های سربسته از کلنی‌های بشدت آلوده به واروا، تایید گردید. شفیره‌های جمع‌آوری شده از سلول‌های آلوده به مایت‌ها بطور معناداری حاوی مقادیر بسیار زیادتری از ویروسDWV نسبت به شفیره‌های جمع‌آوری شده از سلول‌های غیر آلوده به مایت واروا بودند. همچنین تعداد مایت‌های درون سلول‌ها همبستگی مثبت با تعداد شفیره‌هایی که از نظر شکلی تغییر یافته و تلف شده بودند، داشت. در ضمن بین تعداد پارتیکل‌های ویروسی در هر شفیره و میزان تغییر شکل و تلفات شفیره‌ها نیز همبستگی مثبت وجود داشت (۹).

در بررسی تنچوا و همکاران (۲۰۰۴) بر روی ۳۶۰ کلنی در سال ۲۰۰۴ مشخص شد که DWV و واروا دستراکتور در همه جای فرانسه بجز جزیره کوئست حضور دارد. این جزیره عاری از هر نوع آلودگی به واروا می‌باشد زیرا از ورود کلنی‌های زنبورعسل از اوایل سال ۱۹۸۰ به این جزیره جلوگیری به عمل آمده است. در این جزیره تنها اجازه ورود لاروهای جوان پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی به واروا، برای تولید ملکه داده شده است. با توجه به شیوع گسترده DWV در زنبورستان‌های فرانسه این لاروها نیز احتمالاً آلوده به DWV به صورت مخفی بوده اند، اما به دلیل عدم حضور مایت واروا در این جزیره، DWV

امکان تثبیت شدن در کلنی‌های زنبورعسل را نداشته است (۱۷).

انتشار DWV در مناطق مختلف ممکن است تحت تاثیر شرایط جغرافیایی، همچنین میزان تراکم زنبورستان‌ها و شدت حضور واروازیس در کلنی‌ها باشد. نمونه‌های تحت آزمایش از ۲۳ استان با شرایط آب و هوایی متفاوت و با سابقه آلودگی به مایت واروآ جمع‌آوری شد. در نتایج حاصله در مناطقی که دارای شرایط آب و هوای گرم بودند مانند یزد و ایلام DWV جدا نشد در صورتی که در نمونه‌های مربوط به مناطق معتدل، سرد و مرطوب مانند گیلان،خراسان شمالی و اردبیل DWV مثبت ارزیابی شد.

Baez و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر شرایط آب و هوایی را در بروزDWV مورد بررسی قرار دادند. آنها شیوع DWV را در مناطق گرمسیری و معتدل مقایسه نمودند. در مطالعه آنها تعامل این محیط‌ها و مایت واروآ در شیوع DWV و بروز عفونت آشکار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که شیوع DWV در لاروهای پارازیته شده با مایت واروآ در مناطق معتدل به طور معنی‌داری بیشتر از مناطق گرمسیری است. همچنین بروز عفونت آشکار در مناطق معتدل بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که فعل و انفعالات آب و هوایی و مایت واروآ نقش مهمی را درشیوع DWV بازی می‌کنند (۲).

نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج تحقیقات Baez مطابقت دارد هر چند بررسی این موضوع هدف اصلی طرح نبوده و قضاوت در این خصوص نیاز به بررسی‌های اپیدمیولوژیک دقیق‌تری دارد.

دلایل مربوط به نوع و میزان پراکندگی DWV احتمالاً به عواملی مانند مدیریت زنبورستان‌ها، کیفیت مهارت‌های عملی زنبورداران و از سوی دیگر حضور میزبانان و یا حاملین جایگزین مانند پارازیت‌ها و عوامل انگلی بستگی دارد (۱۸).

نتایج مطالعات انجام شده اهمیت عفونت DWV به تنهایی و همچنین در ترکیب با واروا دستراکتور را به خوبی تایید می‌کند. اهمیت و عواقب عفونت‌های ویروسی زنبورعسل، از جملهDWV که یکی از مهم‌ترین آن‌ها بوده و در بسیاری از کشورها حضور دارد هنوز به طور کامل مورد توجه قرار نگرفته است. برای جمع‌آوری اطلاعاتی در خصوص ارتباط بین آلودگی‌های ویروسی و آلودگی‌های انگلی، عوامل محیطی و علائم بالینی مشاهده شده در کلنی‌های زنبورعسل یا در زنبورستان، لازم است که انتشار و چرخه DWV در کلنی‌های بیمار ردیابی و پی‌گیری شود. روش RT-PCR به عنوان یك روش حساس و قابل اعتماد می‌تواند برای چنین هدفی مورد استفاده قرار گیرد. از مزایای دیگر RT-PCR مقایسه ژنتیکی و طبقه‌بندی سویه‌های گوناگون ویروس است که می‌تواند به سرعت با استفاده از سکانسینگ محصولات PCR انجام شود. این روش امکان طبقه‌بندی ویروس‌ها را نیز بوجود می‌آورد همانطور که Evans و Hung (۲۰۰۰) با موفقیت این کار را انجام دادند(۸).

این موضوع در آینده بیشتر مورد توجه قرار خواهد گرفت که به منظور حفظ کلنی‌های زنبورعسل (کلنی‌های کوچ رو و یا ثابت) ویروس‌های زنبورعسل به طور مرتب کنترل و مانیتور شوند تا به این وسیله کلیه بیماری‌هایی که بوسیله ویروس‌های بیماریزای زنبورعسل و از جمله DWV ایجاد می‌شوند و همچنین اختلالات نوپدید مانند CCD که مشکلات بسیاری را برای صنعت زنبورعسل و همچنین محیط زیست بوجود آورده‌اند، قابل پیش بینی گردیده و از گسترش آن‌ها در جمعیت‌های زنبورعسل پیشگیری شود.

منابع مورد استفاده

1.Allen M. and B. Ball. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77,141-162.

2.Anguiano-Baez R., E. Guzman-Novoa, L.G. Espinosa-Montaño and A. Correa-Benítez. 2016. Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) parasitismand climate differentially influence the prevalence, levels, and overt infections of deformed wing virus in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science* 16.

3.Bailey L., B.V. BALL and J. Perry. 1981. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology* 97,109-118.

4.Bailey L., J. Carpenter and R. Woods. 1979. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *Journal of General Virology* 43,641-647.

5.Berényi O., T. Bakonyi, I. Derakhshifar, H. Köglberger and N. Nowotny. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and environmental microbiology* 72,2414-2420.

6.Bowen-Walker P., S. Martin and A. Gunn. 1999. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (Apis melliferaL.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* 73,101-106.

7.Brutscher L.M. and M.L. Flenniken. 2015. RNAi and antiviral defense in the honey bee. *Journal of Immunology Research* 2015.

8.Chen Y., J.S. Pettis, A. Collins and M.F. Feldlaufer. 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 72,606-611.

9.Chen Y., I.B. Smith, A.M. Collins, J.S. Pettis and M.F. Feldlaufer. 2004. Detection of deformed wing virus infection in honey bees, Apis mellifera L., in the United States. *American Bee Journal* 144,557-559.

10.Francis R.M., S.L. Nielsen and P. Kryger. 2013. Patterns of viral infection in honey bee queens. *Journal of General Virology* 94,668-676.

11.Gisder S., P. Aumeier and E. Genersch. 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (Varroa destructor). *Journal of General Virology* 90,463-467.

12.Lanzi G., J.R. de Miranda, M.B. Boniotti, C.E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S.M. Camazine and C. Rossi. 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology* 80,4998-5009.

13.Möckel N., S. Gisder and E. Genersch. 2011. Horizontal trans-

mission of deformed wing virus: pathologicalconsequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology* 92,370-377.

14. Nordström S., I. Fries, A. Aarhus, H. Hansen and S. Korpela. 1999. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie* 30,475-484.

15. Paxton R.J., J. Klee, S. Korpela and I. Fries. 2007. *Nosema ceranae* has infected Apis mellifera in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38,558-565.

16. Shah K.S. 2009. Localization of Deformed Wing Virus (DWV) in the Brains of *Apis mellifera* (*European Honey Bees*).

17. Tentcheva D., L. Gauthier, S. Jouve, L. Canabady-Rochelle, B. Dainat, F. Cousserans, M.E. Colin, B.V. Ball and M. Bergoin. 2004. Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and Varroa destructor. *Apidologie* 35,431-439.

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

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