شناسایی مولکولی گونه های نوزما در زنبورستان های استان کردستان

محمدخضری[1]، مجتبی محرمی[2]، حسین مدیرروستا[2]، مریم ترکمن[2]، صالح صالحی[1]، بابک رخزاد[1]، هومن خانبابایی[1]

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران
۲- بخش تشخیص و تحقیق بیماری های زنبورعسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ماه ۹۶ / **تاریخ پذیرش**: دی ماه ۹۶

رایانامه: khezi1836@gmail.com

چکیده:

میکروسپوریدیاها انگلهای فرصت طلب داخل سلولی اسپورزا هستند که بطور طبیعی قادر به آلوده نمودن کلیه بی مهره گان بالاخص حشرات و همچنین مهره داران از جمله انسان می باشند. نوزموزیس یکی از مهمترین و شایعترین بیماری های زنبورعسل بالغ در سراسر جهان است. با توجه به این که گونه های مختلفی از نوزما در زنبورعسل موجب بیماری می گردند و شناسایی گونه مسبب بیماری باعث تدوین استراتژی مناسب مبارزه می گردد لذا به منظور شناسایی مولکولی عامل بیماری نوزموزیس در استان کردستان اقدام به نمونه برداری از ۱۰۰ زنبورستان استان گردید و سپس با استفاده از روش PCR اقدام به شناسایی عامل این بیماری در نمونه ها گردید. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تنها گونه نوزمای شناسایی شده در استان کردستان به روش مولکولی گونه نوزما سرانه می باشد و در نمونه های آزمایش شده اثری از دیگر گونه های نوزما مشاهده نشد، لذا با توجه به نتایج بدست آمده می توان اذعان نمود که محتملاً گونه نوزما سرانه عامل بیماری نوزموزیس در زنبورستان های استان کردستان می باشد.

واژه های کلیدی: نوزما سرانه، کردستان، شناسایی مولکولی ، نوزموزیس

مقدمه:

پرورش زنبورعسل یکی از کارهای پرفایده و کم خرج می باشد که از قدیم الایام در ایران مرسوم بوده و هم اکنون نیز در بسیار از نقاط کشور رواج دارد و قدمت آن را از زمان سومریان و بابلیان دانسته اند. نوزما گونه ای از میکروسپوریدیا ها است که از مهمترین عوامل بیماریزایی در حشرات محسوب می گردد. این گونه دارای دو زیر گونه نوزما سرانه و نوزما آپیس می باشد (Razmaraii *et al.,* 2013). میکروسپوریدیاها تک سلولی های اجباری داخل سلولی هستند که قادر به تولید اسپورمی باشند، میکروسپوریدیاها با دارا بودن ۱۶۰ جنس و بیش از ۱۳۰۰ گونه از لحاظ طبقه بندی متعلق به شاخه میکروسپورا می باشند و تقریباً نیمی از آنها دارای میزبانی از شاخه حشرات هستند (Keeling 2009). میکروسپوریدیاها در طبقه بندی جدید از گروه پروتوزئواها به گروه قارچها منتقل گردیده اند (Adl *et al.,* 2005). آلودگی کندوهای زنبورعسل به این میکروارگانیسم ها تاثیرات منفی زیادی دارد از جمله باعث کاهش طول عمر زنبورعسل، کم شدن راندمان تولید مثلی ملکه و همچنین تولیدات کندوها می گردد (Razmaraii *et al.,* 2013). در طول ۱۰ سال گذشته افزایش شدیدی در میزان عفونت های میکرسپوریدیایی در زنبورعسل از کشورهای مختلف جهان گزارش شده است (Higes *et al.,* 2010, Martín-Hernández *et al.,* 2007) بطوری که در همه این گزارشات افزایش مرگ و میر کلنی های زنبور عسل و کاهش شدید تولید در مناطق مشابه قابل تامل است (Nabian *et al.,* 2011).

گونه نوزما آپیس در سال ۱۹۰۹ شناسایی شد (Zander 1909). نوزما آپیس گسترش جهانی دارد (Nixon 1982). این میکروارگانیسم در مناطق با آب و هوای معتدل دارای اهمیت زیادی است (Furgala & Mussen 1978) و در خصوص نقش آن در کاهش شدید تولید کندوهای زنبور عسل در این مناطق گزارشات زیادی وجود دارد (Fries *et al.,* 1984, Moeller 1962) که نشان دهنده آلوده شدن کندو در فصل زمستان است (Fries 1988) و اهمیت بیماری زمانی بیشتر می شود که ملکه نیز به این بیماری مبتلا گردد (Farrar 1947). دلایل متعددی در خصوص کاهش تولید کندوهای مبتلا به نوزما آپیس وجود دارد از جمله: کاهش طول عمر زنبوران -عسل کارگر مزرعه ای (Wang & Moeller 1970)، کاهش ظرفیت زمستان گذرانی و درصورت شدت بیماری توسعه کندو در فصل بهار بسیار کند خواهد بود (Farrar 1942).

اسهال خونی یک فاکتور مهم در گسترش نوزما آپیس در کندو است (Bailey & Ball 1981) هر چندبطورمعمول نوزما عامل ایجاد اسهال خونی در کندو نیست (Bailey 1967). تاثیر نوزما آپیس بر روی غدد شیری زنبوران پرستار باعث کاهش تولید غذا و در نتیجه کاهش پرورش لارو زنبوران خواهد شد (Furgala & Mussen 1978). شناسایی اولیه نوزما سرانه در زنبور عسل آسیایی در سال ۱۹۹۶ اتفاق افتاد (Fries *et al.,* 1996) لیکن انتقال نوزما سرانه از زنبورعسل آسیایی به زنبورعسل اروپایی در چند سال اخیر اتفاق افتاده است (Klee *et al.,* 2007) بطوریکه در سال ۲۰۰۵ نوزما سرانه در تعدادی از کشورهای اروپایی از زنبورعسل اروپایی به روش ژنتیکی جداسازی و شناسایی شد (Higes *et al.,* 2006, Martín-Hernández *et al.,* 2005). بررسی های انجام شده نشان داده است که تلفات زنبوران عسل ناشی از نوزما سرانه در مقایسه با نوزما آپیس بسیار بیشتر است (Paxton *et al.,* 2007).

در حال حاضر بیماری نوزما ناشی از نوزما سرانه در هر پنج قاره وجود دارد (Giersch *et al.,* 2009, Higes *et al.,* 2009a, Klee *et al.,* 2007, Martín-Hernández *et al.,* 2007). وجود الگوهای متفاوت همه گیرشناسی ، علایم شناسی و بیماریزایی باعث شده است این بیماری بعنوان یک مشکل عمده بهداشتی در صنعت زنبورداری مطرح باشد (Martín-Hernández *et al.,* 2009, Paxton *et al.,* 2007). علایم ناشی از نوزما سرانه که باعث ایجاد بیماری نوزمای خشک می شود کاملاً با علایم بیماری نوزما ناشی از نوزما آپیس متفاوت است (Faucon 2005) ، همین تفاوت در علایم باعث شده است که بیماریهای ناشی از جنس نوزما بر اساس علایم کلینیکی به دو دسته تقسیم گردد : نوزمای ناشی از نوزما آپیس، نوزمای تیپ A و نوزمای ناشی از نوزما سرانه، نوزمای تیپ C گفته می شود (COLOSS 2009). با توجه به عدم وجود هر گونه اطلاعاتی در خصوص گونه مسبب بیماری نوزما در استان کردستان در این تحقیق که به سفارش اداره کل دامپزشکی استان کردستان انجام شده است مقرر گردید به روش مولکولی بیماری نوزما در استان مطالعه وگونه یاگونه های دخیل در بیماری نوزما شناسایی گردند.

روش کار

نمونه برداری: با همکاری معاونت بهبود تولیدات دامی سازمان جهادکشاورزی استان لیست زنبورداریهای فعال اخذ و برابر لیست تعداد زنبورستان لازم انتخاب و پس از مراجعه برابر دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور (Bokaie *et al.,* 2014) اقدام به اخذ نمونه از زنبوران کارگر ۱۰۰ زنبورستان

گردید. نمونه ها بعد از کدگذاری تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگه داری شدند.

آماده سازی نمونه ها: در آزمایشگاه بخش تحقیقات بیماریهای زنبورعسل، کرم ابریشم و حیوانات وحشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ابتدا مراحل آماده سازی نمونه ها به ترتیب ذیل انجام گردید:

۱-از هر نمونه تعداد ۲۰ عدد زنبورعسل شمارش و قسمت شکمی زنبوران جدا و به همراه ۱۰ سی سی آب مقطر استریل کاملاً له گردید و یک محلول هموژن تهیه شد.

۲- محلول هموژن از میان گاز استریل فیلتر شد و سپس در میکروتیوب های ۱/۵ سی سی جمع آوری گردید.

۳- میکروتیوب های حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه و ۴۸۴ g سانتریفیوژ گردید.

۴- بخش شفاف رویی به کمک سمپلر برداشته شده و به یک میکروتیوب جدید منتقل و مشخصات بر روی آن درج گردید.

۵- میکروتیوب ها مجدداً با ۶۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۶- مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل که حاوی اسپور است ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه و به کمک سمپلر به آرامی مخلوط تا رسوب در آب حل گردد.

۷- یک قطره از رسوب هر نمونه بر روی لام قرار داده شد و بعد از پوشش آن با لامل، با بزرگ نمایی ۴۰۰ اسلاید بررسی گردید تا با مشاهده میکروسکوپی وجود اسپور تعیین گردد.

۸- کلیه نمونه های آماده سازی شده بدین ترتیب بررسی و نتایج ثبت شد و سپس برای مراحل بعد به یخچال منتقل شد.

آماده سازی نمونه ها برای استخراج DNA : با استفاده ازکیت شرکت تکاپوزیست نسبت به جدا سازی DNA هر نمونه اقدام شد، جدا سازی DNA شامل چند مرحله بود در مرحله اول ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه آماده سازی شده با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۱۸۰ میکرولیتر بافر تخریب بوسیله همزن برقی بخوبی مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در مرحله دوم به محلول بدست آمده ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصال اضافه شده و پس از اختلاط کامل بوسیله همزن برقی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

در مرحله سوم به محلول ساخته شده ۲۰۰ میکرولیتر اتانول اضافه گردیده و پس از اختلاط به وسیله همزن برقی به ستون تخلیص منتقل گردید و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید، سپس بافر شستشو به میزان ۵۰۰ میکرولیتر اضافه شده و مجدداً به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ انجام شد، در ادامه بافر شستشوی شماره ۲ به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به محلول نمونه اضافه و به مدت ۱ دقیقه در ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ انجام شد و در آخرین مرحله، بافر رها سازی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و محلول بدست آمده حاوی DNA نمونه می باشد که برای انجام مراحل بعد آزمایش PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز : برای انجام این روش از پرایمرهای اختصاصی (=SSU Rrna) 16S rRNA برای شناسایی نوزما آپیس و نوزما سرانا استفاده گردید(OIE 2013).

جدول ۱) مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت آزمایش PCR

Name		Primer sequence(5`-3`)	Fragment size(bp)
N. ceranae	fwd	CGTTAAAGTGTAGATAAGATGTT	۲۱۸
	rev	GACTTAGTAGCCGTCTCTC	
N. apis	fwd	GCTTGTCTTTGACGTACTATG	۳۲۱
	rev	GACTTAGTAGCCGTCTCTC	

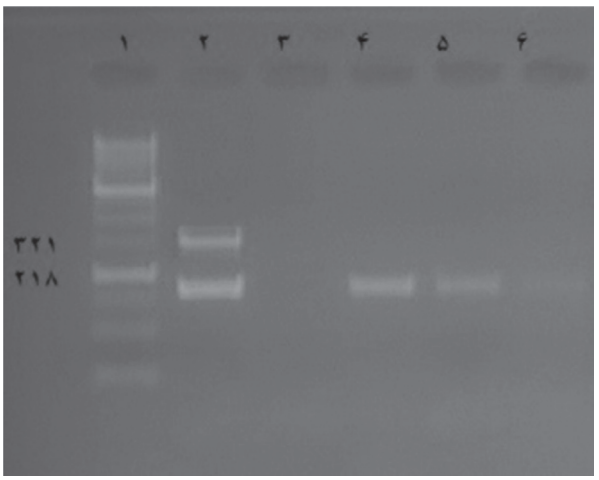
این مرحله با استفاده از کیت تولیدی شرکت تکاپوزیست و طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. برنامه استفاده شده بصورت یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۱۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۱/۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۲۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۱/۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و در انتها یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود

(OIE 2013). برای انجام آزمایش PCR از کنترل مثبت نوزما سرانه و نوزما آپیس و کنترل منفی مورد استفاده در آزمایشگاه رفرانس بخش تحقیقات بیماری های زنبور عسل، کرم ابریشم و حیوانات وحشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی استفاده گردید.

الکتروفورز: پروتئین های موجود در واکنش PCR بر اساس وزن مولکولی روی ژل آگارز ۲٪ که به آن اتیدیوم بروماید اضافه شده بود به صورت باند رسوب نمودند و روی دستگاه ماورای بنفش ترانس لومیناتور باندها مشاهده و سپس از ژل عکس گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری:

بررسی نمونه های تهیه شده از ۱۰۰ زنبورستان استان (جمعاً ۸۷۰ کندو) به دو روش انجام گردید در روش اول از رسوب شیرابه تهیه شده از قسمت شکمی زنبورها بعد از سانتریفیوژ، یک قطره در زیر میکروسکوپ در بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ۳۱ درصد از نمونه ها حاوی اسپور نوزما بودند. در روش دوم کلیه نمونه ها به روش تشخیصی PCR استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند و در ۳۴ درصد نمونه ها باند پروتئینی مربوط به نوزما سرانه مشاهده گردید و در هیچیک از نمونه ها اثری از باندهای پروتئینی نوزما آپیس مشاهده نشد. در نتیجه به استناد این تحقیق می توان اعلام نمود به احتمال زیاد تنها سویه مسبب بیماری نوزما در زنبورستان های استان کردستان گونه نوزما سرانه می باشد.



شکل ۱) نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز

: مارکر، ۲: کنترل مثبت نوزما سرانه و نوزما آپیس، ۳: کنترل منفی، ۴-۶: نمونه های مثبت و منفی نوزما سرانه

در سطح جهانی، زنبور عسل نقش زیست محیطی و اقتصادی مهمی را در گرده افشانی بسیاری از محصولات کشاورزی و گیاهان وحشی بازی می کند (Bradbear 2009). صنعت زنبورداری در حال حاضر در جهان با تهدیدات جدی مواجه شده است بطوری که گزارشات موجود موید ضرر و زیان ۱۰۰۰-۱۰۰ برابر بیش از گذشته است، با وجود این گزارشات، علل این پدیده هنوز مشخص نیست (Higes *et al.*, 2010)، اما تصور بر این است که علت این موضوع یک فرآیند چند وجهی می باشد که یکی از وجوه آن میکروارگانیسم نوزما باشد، میکروسپوریدیایی که نقش آن در از بین رفتن کلنی های زنبورعسل بشدت مورد بحث است (Higes *et al.*, 2013). در این تحقیق با آزمایش ۱۰۰ زنبورستان استان کردستان (۸۷۰ کندو) به روش مولکولی تنها گونه شناسایی شده نوزما سرانه بود و مقایسه سکانس نمونه های استان با سکانس نمونه های موجود در بانک جهانی ژن، شباهت را در حد ۹۳ یا ۹۹ درصد نشان داد.

در ایران اطلاعات در خصوص گونه غالب نوزما محدود می باشد به طوری که لطفی و همکاران تنها گونه مشاهده شده به روش میکروسکوپی در منطقه ارسباران استان آذربایجان شرقی را گونه نوزما آپیس اعلام کردند(Lotfi *et al.*, 2009) . رزم آرایی و همکاران به روش مشاهده میکروسکوپی میکروسپوریدیای نوزما آپیس را عامل بیماری نوزما در زنبورستانهای شهرستان میانه (آذربایجان شرقی) گزارش کردند(Razmaraii & Karimi 2010). مشاوری نیا و همکاران با روش مشاهده میکروسکوپی نوزما آپیس را عامل بیماری نوزما در استان خراسان شمالی اعلام نمودند(Moshaverinia *et al.*, 2012). رزم آرایی و همکاران به روش مولکولی گونه نوزما سرانه را بعنوان عامل بیماری نوزما در استان آذربایجان شرقی اعلام کردند(Razmaraii *et al.*, 2013).

نبیان و همکاران گونه نوزما سرانه را تنها گونه موجود در زنبورستان های استان مازندران گزارش کرده اند(Nabian *et al.*, 2011). مدیرروستا و همکاران اعلام کردند که بررسی مولکولی ۴۱ نمونه مثبت نوزما از استانهای تهران، گیلان، آذربایجان شرقی، قزوین والبرز که طی سالهای ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۳ جمع آوری شده، نشان داده است که تنها سویه مسبب بیماری در این استانها گونه نوزما سرانه است(Modirrousta *et al.*, 2014). محمدیان در بررسی نمونه های ۱۷ استان کشور به طور همزمان به روش مولکولی گزارش کرده است که در کلیه استان های مطالعه شده فقط گونه نوزما سرانه

مشاهده شده است (Mohammadian 2017).

میکروسپوریدیای نوزما سرانه تقریباً بطور همزمان در زنبورعسل آپیس ملیفرا در آسیا و اروپا تشخیص داده شد(Higes *et al.,* 2007, Huang *et al.,* 2007) و در حال حاضر یکی از شایعترین بیماری های زنبورعسل در سطح جهان می باشد(Fries 2010, Higes *et al.,* 2010, Huang *et al.,* 2007, Martín-Hernández *et al.,* 2012, Medici *et al.,* 2012)، علاوه بر این دلایلی نیز در خصوص نقش این میکروسپوریدیا در معظل جهانی از دست دادن کلنی ها مطرح است و این ارتباط در کشور اسپانیا ثابت شده است (Higes *et al.,* 2010, Higes *et al.,* 2009c). برخی از مطالعات انجام شده در خصوص ارتباط آلودگی کلنی های زنبورعسل به نوزما سرانه با سندروم از دست دادن کلنی های زنبور عسل، شرایط آب هوایی را موثر عنوان نموده اند(Borneck *et al.,* 2010, Higes *et al.,* 2008, Higes *et al.,* 2009c, Higes *et al.,* 2006, Menaker *et al.,* 2007) بطوری که در شرایط آب و هوایی سرد این ارتباط متقابل رد شده است در حالی که در شرایط آب و هوایی گرم و معتدل این ارتباط مورد تایید قرار گرفته است(Gisder *et al.,* 2010, Stevanovic *et al.,* 2010)، بنابر این شرایط آب وهوایی بر فعالیت این میکروسپوریدیا و گسترش آن تاثیر گذار است.

شاید بتوان عنوان نمود که بیماری نوزما شایع ترین بیماری زنبورعسل اروپایی است که گسترش جهانی دارد و تقریبا کشوری یافت نمی شود که در آن زنبورداری وجود داشته باشد و رد پایی از این بیماری نباشد. دوگونه نوزما که مسبب این بیماری هستند از لحاظ شدت بیماریزایی، علایم و همه گیری شناسی با هم متفاوت می باشند و در صورت توجه به این موارد امکان تشخیص آنها میسر می باشد. تفاوت در الگوی همه گیری شناسی بیماری نوزمای ناشی از نوزما سرانه در اروپا ثابت شده است (COLOSS 2009)، بطوری که این بیماری دارای دوره نهفتگی طولانی مدت بدون علایم کلینیکی واضحی می باشد که می تواند منجر به مرگ کلنی گردد(Higes *et al.,* 2008) به همین دلیل به آن لقب «قاتل خاموش» داده شده است .

علایم ابتلاء به نوزما سرانه عبارتند از : طولانی تر بودن دوره پرورش در ماههای سرد، عدم تناسب لازم بین زنبوران پرستار با جمعیت لاروهای موجود در کندو در ماههای گرم سال، کاهش تولید عسل در کندو ، ضعیف شدن کندو و کاهش جمعیت زنبوران بالغ صحرارو و در نهایت از بین رفتن کندو در طول ۲-۱/۵ سال است (Higes *et al.,* 2009b).

مکانیزم از بین رفتن چنین کندوهای آلوده ای به دو فرم است در فرم اول در فصل سرد بیش از ۵۰ درصد از جمعیت کندو بصورت تلف شده در یک سمت کندو مشاهده می شود و میانگین تعداد اسپور به ازای هر زنبور بیش از ۱۰ میلیون می باشد و در صورت یافتن ملکه آلودگی آن نیز محرز است، در فرم دوم مرگ کندو در اوایل بهار اتفاق می افتد و تعداد میانگین اسپور به ازای هر زنبور عسل کمتر است و معمولاً ملکه به بیماری مبتلا نشده است، در ضمن در این دو فرم نسبت بین زنبوران پیر و جوان در فصول سال متفاوت است. در اوایل بهار نسبت زنبوران عسل جوان آلوده به غیر آلوده کاهش می یابد در نتیجه باعث تاخیر در آلودگی ملکه می گردد (Higes *et al.,* 2010).

بروز یک بیماری ناشی از یک ارتباط پیچیده مابین اضلاع سه گانه اپیدمیولوژی عامل بیماری، میزبان و شرایط محیطی می باشد. در حیوانات اهلی، میزبان بشدت تحت تاثیر عوامل شرایط نگهداری و مدیریت می باشد (Higes *et al.,* 2013). میزبان یکی دیگر از اضلاع سه گانه بروز هر بیماری است که تفاوت های میزبانی منجر به تفاوت شدت بیماری می گردد مثلاً در تحقیقات آزمایشگاهی استفاده از زنبوران سنین مختلف منجر به اخذ نتایج متفاوت شده است که نشان دهنده تاثیر عوامل مرتبط با میزبان بر نتایج کسب شده از تحقیقات شده است (Higes *et al.,* 2007, Martín-Hernández *et al.,* 2009). شرایط محیطی از جمله اثرات ارتفاعی، نوع گیاهان منطقه و مدیریت زنبورستان بشدت روابط انگلی را تحت تاثیر قرار می دهند بطوری که در کشور اسپانیا تاثیر درجه حرارت بر روی گسترش گونه نوزما سرانه ثابت شده است و در حال حاضر وضعیت آلودگی کلنی های زنبور عسل در سراسر جهان به گونه های مختلف نوزما از الگوی آب و هوایی متفاوتی تبعیت می نمایند (Martín-Hernández *et al.,* 2012). مطالعات انجام شده در مناطقی که هر دوگونه نوزما شایع بوده اند نشان داده است که گونه نوزما سرانه در مناطق گرمتر (مناطقی با آب و هوای مدیترانه ای) شایع است و شیوع گونه نوزما آپیس در مناطقی با آب و هوای معتدل بیشتر است، و این موضوع در زمان ورود زنبوران مهاجر به چنین مناطقی باید مد نظر قرار گیرد(Fries 2010).

اثرات زیست محیطی در رقابت بین دوگونه نوزما آپیس و نوزما سرانه تاثیر داشته است بطوری که در بسیار از مناطق جهان گونه نوزما سرانه تنها گونه شناسایی شده در زنبور عسل بوده است(Chen *et al.,* 2008, Chen & Huang 2010, Klee *et al.,* 2007, Martínez *et al.,* 2012, Modir-

rousta *et al.,* 2014) لیکن در برخی از مناطق جهان به دلیل وضعیت خاص آب و هوایی غالبیت با نوزما آپیس است (Budge *et al.,* 2010, Gisder *et al.,* 2010). بررسی های اخیر در سطوح مختلف (فردی، کلنی، زنبورستان، کشور، نژادهای مختلف زنبورعسل) و همچنین تجزیه و تحلیل دلایل شیوع گونه های نوزما در جهان نشان داده است که هیچگونه جایگزینی بین دوگونه نوزما سرانه و نوزما آپیس در جهان رخ نداده است(Martín-Hernández *et al.,* 2012) فقط نوزما سرانه گونه غالب در طول سال و شیوع نوزما آپیس تابع یک الگوی اپیدمیولوژیک خاص (شیوع در بهار و پاییز) یا بطور کلی تر در فصول سرد می باشد و این تئوری در گذشته نیز بیان شده است (Bermejo & Fernández 1997, Pajue-lo *et al.,* 2008) و تحقیقات اخیر انجام شده در آمریکا نیز این موضوع را تایید نموده است(Runckel *et al.,* 2011). بسیاری از تحقیقات انجام شده در خصوص بیماری نوزما و تعیین میزان شیوع آن در فصل بهار که زمان شدت بیماری است انجام شده است(Bailey 1955, Martín-Hernández *et al.,* 2009) و این دقیقا مترادف با زمانی است که فقط نوزما آپیس بعنوان عامل بیماری نوزموزیس در کندو یافت می گردد، عاملی که معمولاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری فعالیت ندارد(Martín-Hernández *et al.,* 2009) در حالی که نوزما سرانه در تمام طول سال و در عرضهای جغرافیایی مختلف در کلنی قابل تشخیص است (Martín-Hernández *et al.,* 2007, Martín-Hernández *et al.,* 2012).

نتیجه گیری: مطالعه در خصوص گونه های مسبب بیماری نوزما در کشور محدود می باشد و برخی از این مطالعات به روش مشاهده میکروسکوپی انجام شده است با توجه به شباهت های بسیار اسپور این دو گونه تشخیص تفریقی آزمایشگاهی آنها با مشاهده میکروسکوپی بسیار مشکل و در مواردی غیر ممکن است(Fries *et al.,* 2006) لذا باید در این خصوص از روش های مولکولی کمک گرفت.

بررسی مطالعات منتشر شده در ایران موید این مطلب است که تحقیقاتی که با استفاده از روشهای مولکولی مبادرت به بررسی عامل بیماری نوزما نموده اند میکروسپوریدیای نوزما سرانه را بعنوان عامل این بیماری از ایران گزارش کرده اند و تحقیقات بر اساس مشاهده میکروسکوپی نوزما آپیس را به عنوان عامل بیماری معرفی کرده اند و تاکنون گزارشی در خصوص شناسایی مولکولی نوزما آپیس از زنبورستانهای ایران وجود ندارد. با توجه به گزارشات فراوان از بسیاری از کشورهای جهان در خصوص جایگزین شدن نوزما سرانه با نوزما آپیس و تغییر در علایم همه گیری شناسی بیماری(Higes *et al.,* 2006, Klee *et al.,* 2007, Martín-Hernández *et al.,* 2007, Paxton *et al.,* 2007)، و تحقیقات انجام شده در ایران محتمل است که عامل بیماری نوزما در ایران نیز نوزما سرانه باشد هر چند تایید قطعی این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

منبع ها:

Adl, S.M. Simpson, A.G.B. Farmer, M.A. Andersen, R.A. Anderson, O.R. Barta, J.R. Bowser, S.S. Brugerolle, G. Fensome, R.A. Fredericq, S. James, T.Y. Karpov, S. Kugrens, P. Krug, J. Lane, C.E. Lewis, L.A. Lodge, J. Lynn, D.H. Mann, D.G. McCourt, R.M. Mendoza, L. Moestrup, O. Mozley-Standridge, S.E. Nerad, T.A. Shearer, C.A. Smirnov, A.V. Spiegel, F.W. Taylor, M.F.J.R. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. J Eukar Microbiol 52 399–451.

Bailey, L. (1955). The epidemiology and control of Nosema disease of the honeybee. Ann Appl Biol 43: 379–389.

Bailey, L. (1967). *Nosema apis* and dysentery of the honeybee. Journal of Apicultural Research 6: 121-125.

Bailey, L. Ball, B.V. (1981). Honeybee Pathology. Harcourt Brace Jovanovich, sidcup, Kent, UK.

Bermejo, F.J.O. Fernández, P.G. (1997). Nosema disease in the honey bee (*Apis mellifera* L) infested with varroa mites in southern Spain. Apidologie 28: 105-112.

Bokaie, S. Sharifi, L. Mehrabadi, M. (2014). Prevalence and Epizootical Aspects of Varroasis in Golestan Province, Northern Iran. J. Arthropod Borne Dis. 8: 102-107.

Borneck, R. Viry, A. Martín-Hernández, R. Higes, M. (2010). Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. Journal of Apicultural Research 49: 334-336.

Bradbear, N. (2009). Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Non-wood Forest Products.

Budge, G. Powell, M. Roberts, K. Adams, I. Jones, B. Marris, G. Laurenson, L. Wilkins, S. Pietravalle, S. Brown, M. (2010). What has Nosema got to do with losses? Monitoring both Nosema species in the UK. In In Proceedings of the 4th European Conference of Apidology, Kence, M., ed. (Ankara Turkey).

Chen, Y.P. Evans, J.D. Smith, J.B. Pettis, J.S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97: 186-188.

Chen, Y.P. Huang, Z.Y. (2010). *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. Apidologie 41: 364-374.

COLOSS, w. (Year) of Conference. Conclusions, Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization". In, accessed on 20 Nov. 2009.

Farrar, C.L. (1942). Nosema disease contributes to winter losses and queen supersedure. Gleanings in Bee Culture 70: 660-661,701.

Farrar, C.L. (1947). Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields. J Econ Entomol 40: 333-338.

Faucon, J.P. (2005). La Nosémose. La Santé de l'Abeille 209: 344-368.

Fries, I. (1988). Comb replacement and Nosema disease (*Nosema apis Z.*) in honey bee colonies. Apidologie 19: 343-354.

Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). J. Invertebr. Pathol. 103: S73-S79.

Fries, I. Ekbohm, G. Villumstad, E. (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. Journal of Apicultural Research 23: 102-105.

Fries, I. Feng, F. da Silva, A. Slemenda, S.B. Pieniazek, N.J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp.(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32: 356-365.

Fries, I. Martín, R. Meana, A. GarcíaPalencia, P. Higes, M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. J. Apic. Res. 47: 230-233.

Furgala, B. Mussen, E.C. (1978). Protozoa, In: Morse, R. (Ed.) Honey bee pests, predators and diseases. Cornell University Press, Ithaca, USA, pp. 63-77.

Giersch, T. Berg, T. Galea, F. Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40: 117-123.

Gisder, S. Hedtke, K. Mo¨ckel, N. Frielitz, M.C. Linde, A. Genersch, E. (2010). Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? Appl Environ Microbiol 76: 3032–3038.

Higes, M. García-Palencia, P. Martín-Hernández, R. Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). Journal of invertebrate pathology 94: 211-217.

Higes, M. Martín-Hernández, R. Botías, C. GarridoBailón, E. González-Porto, A.V. Barrios, L. del Nozal, M. Bernal, J.L. Jiménez, J.J. Palencia, P.G. Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental Microbiology 10: 2659–2669.

Higes, M. Martín-Hernández, R. Garrido-Bailón, E. Botías, C. Meana, A. (2009a). First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African Honey bees (*Apis mellifera intermissa*). Journal of Apicultural Research 48: 217-219.

Higes, M. Martin-Hernandez, R. Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 41: 375-392.

Higes, M. Martín-Hernández, R. García-Palencia, P. Marín, P. Meana, A. (2009b). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). Environmental microbiology reports 1: 495-498.

Higes, M. Martín-Hernández, R. Garrido-Bailón, E. González-Porto, A.V. García-Palencia, P. Meana, A. Del Nozal, M.J. Mayo, R. Bernal, J.L. (2009c). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. Environmental Microbiology Reports 1: 110-113.

Higes, M. Martín, R. Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92: 93-95.

Higes, M. Meana, A. Bartolomé, C. Botías, C. Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. Environmental microbiology reports 5: 17-29.

Huang, W.-F. Jiang, J.-H. Chen, Y.-W. Wang, C.-H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie 38: 30-37.

Keeling, P. (2009). Five questions about Microsporidia. Plos Pathog 5: 1-3.

Klee, J. Besana, A.M. Genersch, E. Gisder, S. Nanetti, A. Tam, D.Q. Chinh, T.X. Puerta, F. Ruz, J.M. Kryger, P. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96: 1-10.

Lotfi, A.R. Jamshidi, R. Aghdam Shahryar, H. Yousefkhani, M. (2009). The Prevalence of Nosemosis in Honey Bee Colonies in Arasbaran Region (Northwestern Iran). American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 5: 255-257.

Martín-Hernández, R. Meana, A. García-Palencia, P. Marín, P. Botías, C. Garrido-Bailón, E. Barrios, L. Higes, M. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. Applied and Environmental Microbiology 75: 2554-2557.

Martín-Hernández, R. Meana, A. Higes, M. (2005). Increase of nosemosis in Spain. Acta Parasitol Portuguesa 12: 49-50.

Martín-Hernández, R. Meana, A. Prieto, L. Salvador, A.M. Garrido-Bailón, E. Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6331-6338.

Martín-Hernández, R. Botías, C. Bailón, E.G. Martínez-Salvador, A. Prieto, L. Meana, A. Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? Environmental microbiology 14: 2127-2138.

Martínez, J. Leal, G. Conget, P. (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. Parasitology research 111: 601-607.

Medici, S.K. Sarlo, E.G. Porrini, M.P. Braunstein, M. Eguaras, M.J. (2012). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. Parasitology research 110: 859-864.

Menaker, J. Stein, D.M. Scalea, T.M. (2007). Incidence of early pulmonary embolism after injury. J Trauma 63: 620-624.

Modirrousta, H. Moharrami, M. Mansouri, M.A. (2014). Retrospective study of the *Nosema ceranae* infection of honey bee colonies in Iran (2004-2013). Archives of Razi Institute 69: 197-200.

Moeller, F.E. (1962). Nosema disease control in package bees. American Bee Journal 102: 390-392.

Mohammadian, B. (2017). Investigation of Prevalence and some effective factors of Colony Collapse Disorder in Apiaries of Iran. Tehran University, Tehran, Iran.

Moshaverinia, A. Abedi, V. safaei, H. (2012). A survey of *Nosema apis* infection in apiaries of North Khorasan province, Iran. Iranian journal of Veterinary Science and Technology 4: 25-30.

Nabian, S. Ahmadi, K. Shirazi, M.N. Sadeghian, A.G. (2011). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. Iran. J. Parasitol. 6: 89.

Nixon, M. (1982). Preliminary world maps of honeybee diseases and parasites. Bee world 63: 23-42.

OIE (2013). Nosemosis of Honey Bees, In: OIE Terrestrial Manual.

Pajuelo, A.G. Torres, C. Bermejo, F.J.O. (2008). Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. J Apic Res 47: 84–86.

Paxton, R.J. Klee, J. Korpela, S. Fries, I. (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.

Razmaraii, N. Karimi, H. (2010). A survey of Nosema disease of honey bee (*Apis mellifera*) in East Azarbaijan province of Iran. J. Anim. Vet. Adv. 9: 879-882.

Razmaraii, N. Sadegh-Eteghad, S. Babaei, H. Paykari, H. Esmaeilnia, K. Froghy, L. (2013). Molecular Identification of Nosema species in EastAzerbaijan province, Iran. Archives of Razi Institute 68: 23-27.

Runckel, C. Flenniken, M.L. Engel, J.C. Ruby, J.G. Ganem, D. Andino, R. DeRisi, J.L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. PloS one 6: e20656.

Stevanovic, J. Stanimirovic, Z. Genersch, E. Kovacevic, S.R. Ljubenkovic, J. Radakovic, M. Aleksic, N. (2010). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. Apidologie.

Wang, D.-I. Moeller, F.E. (1970). The division of labor and queen attendance behavior of nosema-infected worker honey bees. Journal of Economic Entomology 63: 1539-1541.

Zander, E. (1909). Tierische parasiten als krankenheitserreger bei der biene. Münchener Bienenzeitung 31: 196-204.

Molecular identification of Nosema species in the apiary of Kurdistan province of Iran

M. Khezri[1], M. Moharami[2], H. Modirrousta[2], M. Torkaman[2], S. Salahi[1], B. Rokhzad[1], H. Khanbabaie[1]

1- Veterinary Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Sanandaj, Iran
2- Department of Honey Bee, Silk Worm and Wildlife Research Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Abstract

Nosema disease is the most important adult bee disease but is mostly by beekeepers as there are no characteristic obvious symptoms. Hence, Nosema disease is also referred to as "the silent killer". The aim of the present study was to determine the molecular identification of Nosema spices in Kurdistan province of Iran. 100 samples were collected from apiaries (870 hives) of Kurdistan. Samples were examined by a light microscope and polymerase chain reaction (PCR) assay. The light microscope was used for determination of the presence of Nosema spores in all of the collected samples. PCR assay based on 16S ribosomal RNA has been used to differentiate between *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Only *Nosema ceranae* was found in all samples, indicating that this species present in Kurdistan.

Key words: *Nosema ceranae*, Kurdistan, Molecular identification, Nosemosis

Corresponding Author: M. Khezri
Email: khezri1836@gmail.com