

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**HİJYENİK DAVRANIŞ BAKIMINDAN ISLAH EDİLMİŞ MUĞLA BAL
ARILARINDA BAZI PATOJEN VİRÜSLERİN RT-PCR İLE TESPİTİ VE
VARROA YÜKÜ İLE İLİŞKİLERİN BELİRLENMESİ**

Ayşe ALEMLİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**HİJYENİK DAVRANIŞ BAKIMINDAN ISLAH EDİLMİŞ MUĞLA BAL
ARILARINDA BAZI PATOJEN VİRÜSLERİN RT-PCR İLE TESPİTİ VE
VARROA YÜKÜ İLE İLİŞKİLERİN BELİRLENMESİ**

Ayşe ALEMLİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİJYENİK DAVRANIŞ BAKIMINDAN ISLAH EDİLMİŞ MUĞLA BAL
ARILARINDA BAZI PATOJEN VİRÜSLERİN RT-PCR İLE TESPİTİ VE
VARROA YÜKÜ İLE İLİŞKİLERİN BELİRLENMESİ**

Ayşe ALEMLİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından FYL-2017-2448 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİJYENİK DAVRANIŞ BAKIMINDAN ISLAH EDİLMİŞ MUĞLA BAL
ARISINDA BAZI PATOJEN VİRÜSLERİN RT-PCR İLE TESPİTİ VE
VARROA YÜKÜ İLE İLİŞKİLERİN BELİRLENMESİ

Ayşe ALEMLİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 22./01/2018..... tarihinde jüri tarafından Oybirliği /-Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Kemal KARABAĞ (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Yrd. Doç. Dr. Rahşan İVGİN TUNCA

2018


ÖZET

HİJYENİK DAVRANIŞ BAKIMINDAN ISLAH EDİLMİŞ MUĞLA BAL ARILARINDA BAZI PATOJEN VİRÜSLERİN RT-PCR İLE TESPİTİ VE VARROA YÜKÜ İLE İLİŞKİLERİN BELİRLENMESİ

Ayşe ALEMLİ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kemal KARABAĞ

Ocak 2018 / 99 Sayfa

Bal arısı kolonilerinde ani ve büyük çapta yaşanan kayıplar birçok çalışma tarafından bildirilmiştir. Tam olarak açıklanamayan bu durum ektoparazit akar *Varroa destructor* ve patojen virüslerin aynı kolonideki varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada materyal olarak, Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) tarafından 4 generasyon hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş 50 koloni ve hijyenik olmayan 50 koloniden toplanan yetişkin işçi arılar ve pupalar kullanılmıştır. Proje konusu olan patojen virüslerin (ABPV, CBPV, IAPV, DWV, SBV) varlığı ve yoğunluğu virüslere özgün TaqMan probalar ve primerler kullanılarak RT-qPCR ile tespit edilmiştir. Ayrıca, varroa akarı ve virüsler arasında bir ilişki olup olmadığını anlamak için örnek toplanan tüm kovanların *Varroa destructor* yükleri dip tahtası yöntemiyle belirlenmiştir. RT-qPCR analiz sonuçlarına göre sadece DWV'nin pozitif olduğu ve diğer virüsler bakımından kovanların negatif olduğu saptanmıştır. Bal arısı örneklerinde tespit edilen ortalama DWV yükünün hijyenik olmayan (241982,35 ve 862,68 adet) ve hijyenik (167097,47 ve 205,08 adet) kolonilerde istatistiksel olarak farklı seviyelerde olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca, kontrol (108,9) ve hijyenik (27,2) kolonilerin ortalama varroa yükleri de önemli derecede farklı bulunmuştur (0,01). Ancak, virüs yükü ile varroa yükü arasında önemli bir korelasyon olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak hijyenik davranış bakımından yapılan seleksiyonun virüsler ve varroa yükü üzerine etkili olduğu söylenebilir. Öte yandan, yaygın patojen virüsler bakımından Muğla yöresi arıların negatif olması ülke arıcılığı için olumlu bir durum olarak değerlendirilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Apis mellifera*, Bal arısı, MAYBİR, RT PCR, Varroa, Virüs.

JÜRİ: Doç. Dr. Kemal KARABAĞ

Yrd. Dr. Doç. Hasan MEYDAN

Yrd. Doç. Dr. Rahşan İVGİN TUNCA

ABSTRACT

DETECTION OF SOME PATHOGENIC VIRUSES ON MUĞLA HONEY BEES FOR SELECTED HYGIENIC BEHAVIOR BY RT-PCR AND DETERMINATION OF RELATIONS WITH VARROA LOAD

Ayşe ALEMLİ

MScThesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Ocak 2018 / 99 Pages

Many studies have reported that sudden and large-scale losses occur in honey bee colonies. However, this case is exactly unexplained but which is associated with presence of ectoparasites *Varroa destructor* and pathogenic viruses are the same colonies. Adult worker bees and pupae were used as material from 50 units colonies selected for 4 generations hygienic behaviour and 50 units colonies non-hygienic bees by Muğla Provincial Bee Farmers Association (MAYBİR). The presence and intensity of the project-specific pathogenic viruses were determined by RT-qPCR using virus-specific TaqMan probes and primers. In order to determine whether there is any relationship between viruses and varroa mites, the numbers of varroa was determined by the bottom board method. According to the results of RT-qPCR analysis, only DWV was positive but the other viruses were negative. The mean DWV load found in honey bee samples was determined to be statistically different in non-hygienic (241982.35 and 862.68) and hygienic colonies (167097.47 and 205.08) ($p < 0.05$). In addition, the mean varroa loads of non-hygienic bees (108.9) and hygienic colonies (27.2) determined significantly different (0.01). However, there was no significant correlation between virus loads and varroa loads.

As a result, it can be said that the selection for hygienic behavior is effective on viruses and varroa loads. On the other hand, the fact that Muğla region bees have negative in terms of common pathogenic viruses is considered as a positive situation for country beekeeping.

KEYWORDS: *Apis mellifera*, Honey bee, MAYBİR, Mite, RT PCR, Varroa, Virus.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Asst. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

Asst. Prof. Dr. Rahşan İVGİN TUNCA

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması hijyenik davranış yönünden ıslah edilmiş Anadolu Irkının Muğla ekotipi balarları üzerinde, balarısının en zorlu dış paraziti olan Varroa destructor ile beş adet virüs arasındaki etkileşimi belirlemek ve bu iki öge arasında doğru orantı olup olmadığını saptayabilmek için gerçekleştirilmiştir.

İki ayrı etapta tamamlanan bu projenin ilk etabı arazi çalışmasıydı. Bal arılarının yetiştirilme süreci ilgimi çeken bir konu olduğu için onları yakından tanıyabilmek benim için hem şans hem de eğlenceli bir süreçti.

Öncelikle; tez konusu belirleme sürecinden, son aşamaya kadar birlikte hareket edip bilgisinden faydalandığım, arazi çalışmalarında tecrübelerini aktaran tezim öncesinde laboratuvarında deneyim sahibi olmam için kendi projelerinde çalışmama izin veren ve en önemlisi bana güvenip sevdiğim bu bölümde yüksek lisans yapma şansı tanıyan değerli danışman hocam Doç. Dr. Kemal Karabağ'a,

Arazi çalışmalarımız sırasında tecrübelerini bizimle paylaşan ve bal arısı örneklerinin teminine yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Rahşan İvgin Tunca'ya,

Tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı değerli arkadaşlarım Emel Sevim Tüten, Berkant Yıldız ve Pelin Ünal'a,

Muğla Fethiye İncirliköy'de Balarısı kovanlarını ilaçlayıp, varroa ve arı örneklerini almamızı sağlayan Ramazan Bayırlı, Erdem Serdar, Hasan Güreşçi ve Bayram Ali Sönmez'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca eğitim konusunda farklı pencereleri görmemi sağlayan, hayatımın her zaman bir köşesinde bulunarak beni onurlandıran ailem, abim, öğretmenim Yrd. Doç. Dr. Aşkın Bahar'a hayatımda olduğu tüm zamanlar için yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Apis Mellifera Bal Arısının Sınıflandırılması.....	4
2.2. Koloni Bireyleri.....	7
2.3. Türkiye’de Bulunan Önemli Bal Arısı Irkları.....	8
2.4. Bal Arılarında Savunma Mekanizmaları (Hijyenik Davranış ve Tımarlama).....	11
2.5. Bal Arısı Virüsleri Genel Özellikleri.....	14
2.6. Bal Arısı Virüslerinin Diğer Hastalıklarla Etkileşimi.....	15
2.7. Bal Arısında Viral Hastalıklar ve Bulaş Yolları.....	16
2.7.1. Deforme kanat virüsü (DWV).....	18
2.7.2. Torba çürüklüğü/Tulumsu yavru çürüklüğü (SBV).....	20
2.7.3. Kronik arı felç virüsü (CBPV).....	21
2.7.4. Akut arı felç virüsü (ABPV).....	22
2.7.5. İsrail akut felç virüsü (IAPV).....	23
2.8. <i>Varroa destructor</i>	23
2.9. RT-PCR (Eş Zamanlı PCR/ Ters Transkriptaz PCR / Kantitatif PCR).....	26
2.9.1. Touchdown PCR (TD-PCR).....	27
2.9.2. Tek adım (one step) RT-PCR.....	28
2.10. Bal Arılarında Moleküler Çalışmalar.....	28
3. MATERYAL VE METOD.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.2. Metot.....	44
3.2.1. Varroa yükünün belirlenmesi.....	44

3.2.2. Proje konusu 5 virüsün tespiti.....	45
3.2.3. Pozitif örneklerin (standartların) seyreltilmesi / dilüsyonu.....	51
3.2.4. Primer ve propların seyreltilmesi.....	51
3.2.5. PpMix hazırlanması.....	53
3.2.6. RT-PCR mix hazırlığı.....	53
3.2.7. RT-PCR cihaz protokolü.....	54
3.2.8. İstatistiksel analizler.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. İstatistiki Analiz Bulguları.....	66
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ	75
7. KAYNAKLAR	76
8. EKLER.....	96
8.1. Gruplara Göre Total RNA'ların Bio Drop Ölçüm Sonuçları.....	96
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘Hijyenik Davranış Bakımından Islah Edilmiş Muğla Bal Arılarında Bazı Patojen Virüslerin Rt-Pcr İle Tespiti Ve Varroa Yüğü İle İlişkilerin Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

22/01/2018

Ayşe Alemlı



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat derece
ddH ₂ O	: De-iyonize su
G	: Relative Centrifugal Force
Km	: Kilo metre
M	: Molar
mm	: milimetre
mM	: Mili molar
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
ng	: nanogram
pm	: piko mol
V	: Volt
%	: Yüzde

Kısaltmalar

AMOVA	: Analysis of Molecular Variance
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
ABPV	: Acute Bee Paralysis Virus-Akut Arı Felç Virüsü
CBPV	: Chronic Bee Paralysis Virus-Kronik Arı Felç Virüsü
DWV	: Deformed Wing Virus- Deforme Kanat Virüsü
DNA	: Deoksiribo Nucleic Acid
dNTP	: Di Nucleotide Tri Phosphate
ddNTP	: Di deoksinükleoside Tri Phosphate
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EDTA	: Ethylene Daimin Tetra Acetic Acid
IAPV	: Israil Acute Paralysis Virus-Israil Akut Felç Virüsü
MtDNA	: Mitochondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
OD	: Optic Density
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophesis
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	: Reverse Transkriptaz Polymerase Chain Reaction
Rpm	: Rotate Per Minute
SBV	: Sacbrood Virus-Torba Çürüklüğü Virüsü ve
Taq	: Thermus Aquaticus
tRNA	: Transfer RNA
U	: Unite
UV	: UltraViole
vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Apis Cinsi Arıların Başlıca Türleri.....	5
Şekil 2.2. Bal Arısı Virüslerinin Bulaş Yolları	20
Şekil 3.1. Örneklerin Alındığı Muğla Ekotipi Balarılarını İçin İzole Edilen Islah Alanındaki İncirköy'ün Kuşbakışı Görünümü.....	42
Şekil 3.2. Muğla-Fethiye-İncirköy 'deki Muğla Ekotipi Balarılarında Yetişkin İşçi Balarısı ve Kapalı Gözlerden Pupa Örneklerinin Alınması.....	43
Şekil 3. 3. Dip Tahtası Yöntemiyle Toplanan Varroa'ların Sayımı.....	44
Şekil 3. 4. Total RNA İzolasyonu Öncesi Bal Arılarının Saf Sudan Geçirilmesi ve Kurutulması.....	46
Şekil 3.5. a, b. Yetişkin İşçi Arıların Matkapla Ezilmesi.....	48
Şekil 3.5. c. Dokuları Ezilen Bal Arılarının 72 °C'de Su Banyosunda Bekletilmesi.....	48
Şekil 3.5. d. Binding Buffer Eklenen Örneklerin Çalkalanması (Vortex).....	48
Şekil 3.5. e. Örneklerin Santrifüj İşlemleri/ Örnek RNA'larda İnhibitör Kaldırma, Yıkama,	48
Şekil 3.5. f, g. Total RNA'sı Çıkarılan Örneklerin Biodropla Ölçümü.....	49
Şekil 3.5. h. Formaldehitli Total Rnaların Santrifüj Yapılması.....	49
Şekil 3.5. ı. Örneklerin 65°C De Sıcak Su Banyosunda Bekletilmesi.....	49
Şekil 3.5. i. RNA Jele Yüklenen Örneklerin Elektroforez Cihazında Yürütülmesi.....	49
Şekil 3.5. j,k. Yürütülen RNA Jel İçin Etidyum Bromürlü TE Tampon Hazırlanması..	50
Şekil 3.5. l. Hazırlanan Etidyum Bromürlü Tampon İçine RNA Jel Yerleştirilmesi Ve Kapatılması.....	50
Şekil 3.5. m. Örneklerin Bulunduğu RNA Jeli Görüntüleyebilmek İçin Hazırlanan TE Tamponun Manyetik Karıştırıcıya Konulması.....	50
Şekil 3.5. n. RNA Jelin UV Görüntüleme Cihazında Görüntülenmesi.....	50
Şekil 4.1. Hijyenik Kolonilerde DWV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	56
Şekil 4.2. Kontrol Kolonilerde DWV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	57
Şekil 4.3. Hijyenik Kolonilerde DWV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	57

Şekil 4.4. Kontrol Kolonilerde DWV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları...	58
Şekil 4.5. Kontrol Kolonilerde ABPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	58
Şekil 4.6. Kontrol Kolonilerde CBPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları..	59
Şekil 4.7. Kontrol Kolonilerde IAPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları...	59
Şekil 4.8. Kontrol Kolonilerde SBV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	60
Şekil 4.9. Hijyenik Kolonilerde ABPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	60
Şekil4.10. Hijyenik Kolonilerde CBPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	61
Şekil 4.11. Hijyenik Kolonilerde IAPV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	61
Şekil 4.12. Hijyenik Kolonilerde SBV Bakımından İşçi Arıların RT-qPCR Sonuçları.....	62
Şekil 4.13. Kontrol Kolonilerde ABPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları....	62
Şekil 4.14. Kontrol Kolonilerde CBPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	63
Şekil 4.15. Kontrol Kolonilerde IAPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	63
Şekil 4.16. Kontrol Kolonilerde SBV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	64
Şekil 4.17. Hijyenik Kolonilerde ABPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	64
Şekil 4.18. Hijyenik Kolonilerde CBPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları.....	65
Şekil 4.19. Hijyenik Kolonilerde IAPV Bakımından Pupalardan RT-qPCR Sonuçları....	65
Şekil 4.20. Hijyenik Kolonilerde SBV Bakımından Pupalara Ait RT-qPCR Sonuçları.....	66
Şekil 4.21. DWV Bakımından Kontrol Ve Hijyenik Grubu İşçi Arıların Scatter-Dot Grafiği.....	67
Şekil 4.22. DWV Bakımından Kontrol ve Hijyenik Grubu Pupalardan Scatter-Dot	

Grafiği.....	68
Ŗekil 4.23. DWV Bakımından Kontrol ve Hijyenik Grubu İŖçi Arıların Histogram Grafiği.....	68
Ŗekil 4.24. DWV Bakımından Kontrol ve Hijyenik Grubu Pupaların Histogram Grafiği.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bal Arısı Apis Mellifera'nın Linnaeus'e Göre Taksonomideki Yeri.....	4
Çizelge 3.1. Tez Konusu Virüslere Özgü Primer Çiftlerinin Sekans Ve Fragment Büyüklükleri.....	52
Çizelge 3.2. Ppmix Hazırlığında Kullanılan Kimyasallar.....	53
Çizelge 3.3. RT-PCR Mix Hazırlığında Kullanılan Kimyasallar.....	54
Çizelge 3.4. Real Time PCR Cihaz Protokolü.....	55
Çizelge 4.1. DWV Bakımından Çalışılan Örneklerin Normal Dağılım Testleri.....	66
Çizelge 4.2. . DWV Bakımından Çalışılan Örneklere Ait Tanımlayıcı İstatistikler.....	67
Çizelge 4.3. Kontrol Ve Hijyenik Grubu Kolonilerin Varroa Yüğü Normal Dağılım Testi.....	69
Çizelge 4.4. Kontrol Ve Hijyenik Grupların Birleştirilmiş Varroa Yüğülerinin Normal Dağılım Testi.....	69
Çizelge 8.1. Hijyenik Davranış Bakımından İslah Edilmiş Pupa Bal Arılarının Bio Drop Ölçüm Sonuçları.....	96
Çizelge 8.2. Hijyenik Kolonilerin İşçi Arılarında Bio Drop Ölçüm Sonuçları.....	97
Çizelge 8.3. Kontrol Grubu Pupa Örneklerinde Bio Drop Ölçüm Sonuçları.....	98
Çizelge 8.4. Kontrol Grubu İşçi Bal Arılarının Bio Drop Ölçüm Sonuçları.....	99

1. GİRİŞ

Arı hastalık ve zararlıları tüm dünyada yıkıcı, zararlı etkisini sürdürmektedir. Yakın zamanda farklı ülkelerde gözlenen ve nedeni tam olarak açıklanamayan koloni sönmesi olayları gelecekte dünyanın biyolojik dengesini etkileyebilecek bir sorun olarak görülmektedir. Bal arılarının gelişme dönemleri pek çok hastalık etkeni ve zararlı için uygun bir ortam oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, kıtalar ve ülkelerarası arı, arı ürünleri ve arıcılık malzemeleri ticaretinin hızla yapılabilmesi arı hastalıklarının kısa sürede tüm ülkelere yayılmasına neden olmuştur. Arı hastalık ve zararlılarının neden olduğu artan koloni kayıplarına paralel olarak üretim maliyetlerinin yükselmesi ve verimin düşmesi başta Amerika ve Avrupa olmak üzere tüm dünyada önemli ekonomik sıkıntılara yol açmaktadır.

Benzer şekilde, ülkemizde kontrolsüz ana arı üretimi, arı ürünleri ve malzeme satışları, ayrıca kontrolsüz yapılan göçer arıcılık faaliyetleri hastalık ve zararlıların yayılmasını hızlandırmaktadır. Bölgesel ve ülkesel düzeyde güvenilir veri tabanlarının olmayışı ve uzman sayısındaki yetersizlikler ülkemizin de ciddi olarak tehdit altında olduğunu göstermektedir. Çok ciddi ekonomik kayıplara yol açan bu durumla baş edebilmek için dünya çapında çalışmalar sürdürülmektedir.

Koloni Çökme Bozukluğu (Colony Collapse Disorder) olarak adlandırılan kayıplara neden olarak varroa, virusler, pestisitler, fungal hastalıklar ve diğer çevresel etkenler gösterilmektedir (Çakmak 2012). Avrupa'da % 51 ve Ortadoğu'da % 85'lere (Neumann ve Carreck 2010) varan koloni kayıplarının ülkemizin özellikle Kuzeydoğu bölgesinde %70'ler seviyesine kadar çıktığı bildirilmiştir.

Koloniye zayıf veya güçsüz düşüren bazı sebepler (Nosema apis, zehirlenme, çevre kirliliği ve soğuk hava) ile birlikte özellikle ektoparazitik mayt olan *Varroa destructor* 'in varlığı virüs bulaşmasını ve etkisini daha da uygun hale getirmektedir. Varroanın arılarda açtığı yaralar virüsler için bulaşma yolu açmakta ayrıca varroa üzerindeki virüsler arı hemolenfine enjekte olabilmektedir. Bal arısı virüslerinin varlığı ve yaygınlığı hakkında ülkemizde çok sınırlı sayıda moleküler çalışma bulunmaktadır (Gülmez vd. 2009; Gümüşova vd. 2010; Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2016). Virüs, bakteri, fungus ve mayt gibi patojen veya parazitlerin polinatörler üzerinde buldukları, kolonilerin hastalanmasına, zayıflamasına ve ölümlere sebep oldukları bilinmektedir (Cox-Foster vd 2007).

Patojen olarak, bal arılarında en fazla rastlanan RNA virüsleri olmakla birlikte bugüne kadar 20'nin üzerinde RNA virüsünün varlığı gösterilmiştir. Hastalık belirtisi olmayan sağlıklı kolonilerde bile virüslerin varlığını sürdürebileceği bilinmektedir (Allen ve Ball 1996; Ellis ve Munn 2005; Tuncer ve Yeşilbağ 2009). Fiziksel özelliklerinden dolayı birçoğu pikarnovirüs olarak tanımlanan (Benjeddou vd. 2001) bu virüslerden bazıları öldürücü hastalıklara sebep olmaktadır (Tentcheva vd. 2004; Berenyi vd. 2006).

Literatür araştırması sonucunda dünya genelinde en çok bilinen ve arıcılık sektörü için en fazla tehlike arz eden 5 virüsün (CBPV: Chronic Bee Paralysis Virus-Kronik Arı Felç Virüsü, ABPV: Acute Bee Paralysis Virus-Akut Arı Felç Virüsü, DWV: Deformed Wing Virus- Deforme Kanat Virüsü, SBV: Sacbrood Virus-Torba

Çürüklüğü Virüsü ve IAPV: İsrail Acute Paralysis Virus-İsrail Akut Felç Virüsü) olduğu belirlenmiştir (Ball ve Bailey 1991). Son yıllarda yapılan çalışmalar varroanın virüsler için yüksek vektör potansiyeli olduğunu göstermesine rağmen, varroa ile virüsler arasındaki ilişkiler ve viral hastalıklar bakımından varroanın etkisi henüz tam olarak cevaplanmış değildir.

Bal arısı hastalık ve parazitlerine karşı mücadelede yoğun olarak kimyasal ve antibiyotik kullanılmaktadır. Ancak, tüm müdahalelere rağmen istenilen sonuca ulaşamaması ve arı ürünlerindeki kimyasal kalıntıların insan sağlığını tehlikeye sokmasından dolayı arıcılık sektöründe yeni ve sürdürülebilir çözümler bulunması zorunluluk olmuştur.

Dünya çapında meydana gelen felaketlere rağmen birkaç Avrupa bal arısı popülasyonunun herhangi bir mücadele yapılmadığı halde hayatta kalabildiği tespit edilmiştir. Bu popülasyonların hastalık ve parazitlere karşı doğal seleksiyona uğradıkları ve sahip oldukları bazı fizyolojik özellikler sayesinde bunlara karşı koymak için bir veya daha fazla davranış gösterdikleri bildirilmiştir (Seeley 2007).

Konukçu ve parazit arasındaki etkileşim oldukça karmaşık olmasından dolayı varroa parazite karşı toleransın farklı davranışlar şeklinde olabileceği öngörülmüştür. Bu noktada özellikle hijyenik davranış (davranışsal tolerans) ön plana çıkmıştır. Bu terim sadece birey için değil aynı zamanda koloni için de kullanılmaktadır (Boecking ve Spivak 1999). Enfeksiyonlara karşı işçi arıların davranışsal bir tepkisi olan hijyenik davranış, parazit bulaşmış, hastalıklı veya ölmüş yavruların bulunduğu petek gözlerini örten balmumunun açılması ve buradaki arının hızlıca kovandan uzaklaştırılması olayını tanımlar.

Hijyenik bal arısı işçileri kapalı kuluçkalıklardaki hastalıklı yavruları tespit edebilmekte ve hızla bu yavruları kovandan taşıma eğilimine girmektedir. Bu davranış varroa ile birlikte amerikan yavru çürüklüğü (*paenibacillus larvae larvae*) (Boecking ve Spivak 1999) ve kireç hastalığı (Gilliam vd. 1988) gibi enfeksiyonlara karşı da koloniyi korumaktadır (Harbo ve Harris 2009). Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar patojen virüslerin koloni sönmesi (colony collapse) olaylarında önemli bir faktör olabileceğine dikkat çekmektedir. Arıcılık sektörü bakımından yüksek tehlike arz eden ve bal arısı sağlığını tehdit eden virüslerin yerel bazda durumunu tespit etmek için çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bölgesel ve ulusal düzeyde güvenilir veri tabanlarının olmayışı ve uzman sayısındaki yetersizlikler ülkemizin de tehlike altında olduğunu göstermektedir.

Önceleri arı virüslerinin varlığı geleneksel olarak ELISA testi ile yapılırken, arı doku kültürü eksikliği, deneysel enfeksiyon için pupa temininin sezona bağlı olması, agar jel immünodifüzyon testler için tip-spesifik serum gereksinimi gibi zorluklar bilim adamlarını moleküler yöntemler kullanmaya yöneltmiştir.

Bal arısı virüslerine ait genom bilgilerinin bir kısmı veya tamamı GenBank'ta mevcut olmasından dolayı revers-transkriptaz PCR (RT-PCR)'a dayalı teşhis yöntemleri geliştirilmiştir (Benjeddou vd. 2001; Grabensteiner vd. 2001; Bakonyi vd. 2002; Ribiere vd. 2002; Tentcheva vd. 2004; Berenyi vd. 2006).

Bilinen bal arısı virüsünden 7 tanesinin nükleotid sekansı tanımlanmış ve bunlardan 4 tanesinin (*V. destructor* virus1, ABPV, KBV, SBV) sekans bilgisi EMBL (European Molecular Biology Laboratory)'ye yüklenmiştir. Sekans bilgilerinin elde edilmesi revers-transkriptaz PCR (RT-PCR)'a dayalı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır (Choe vd. 2012; Clermont vd. 2015; McMahon vd. 2015).

Problarla yapılan RT-PCR diğer geleneksel PCR'a göre avantajlara sahiptir. Birinci olarak, RT-PCR reaksiyonlardan elde edilen sonuçlar kullanıcı yorumlarını en aza indirmesinden dolayı tüm örnekler için kullanılan standart hesaplamalarla işlenir. İkinci olarak, örnekler arasında karşılıklı bulaşmayı en aza indirmesinden dolayı hedefin enzimatik amplifikasyonundan sonra reaksiyon tüpleri kapalı kalır. Üçüncü olarak RT-PCR tamamen kantitatif olabilir. Daha önceki çalışmalar TaqMan prob ile yapılan RT-PCR'ın geleneksel PCR'dan 1000 kat daha hassas olduğunu gösterdiğinden bu çalışmada da TaqMan problemler kullanılması tercih edilmiştir.

Ayrıca, PCR reaksiyonlarından sonra jel dokümantasyon gibi işlemlere gereksinim duymaması RT-PCR'ın daha hızlı sonuçlanmasını sağlar. Çok sayıda örnek ile çalışırken bu avantaj daha da önemli hale gelir. RT-PCR tanı tekniği temel protokoller kullanılarak bağımsız laboratuvarlarda hızlı bir şekilde uygulanabilir. Bu uygulamada kullanılan primer sekansları da tüm laboratuvarlarda aynı başarıyı gösterebilmektedir. RT-PCR pikarno benzeri virüsleri de içeren varyeteleri tanılamak için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır bu teknik güvenilir, hassas ve özgüdür (Benjeddou vd. 2001).

Muğla bal arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) yerli bal arısı ırklarımızdan Anadolu arısının önemli bir ekotipi olup Türkiye arıcılık sektöründe önemli bir yere sahiptir. Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) bünyesinde bulunan 100 koloni TAGEM/11/AR-GE/13 nolu tamamlanan tez kapsamında hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiştir. Bu kolonilerin, patojenlere karşı hijyenik davranış gösterip göstermedikleri bilinmemektedir.

Tamamlanan bu tez çalışmasında, MAYBİR bünyesinde bulunan hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş Muğla bal arısı kolonileri ve üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış Muğla bal arısı kolonilerinde CBPV, ABPV, DWV, SBV ve IAPV virüslerinin varlığı ve yoğunluğu özgün primerler ve TaqMan problemler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca, aynı kovanların varroa yükleri belirlenerek virüs varlığı ve yoğunluğu ile aralarındaki ilişki araştırılmıştır. Böylece, hijyenik davranış bakımından ıslah edilen kolonilerin patojen virüslere karşı da dirençli olup olmadıkları tartışılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Apis Mellifera* Bal arısının Sınıflandırılması

Bal arısı (*apis*), canlıların sınıflandırılması ve düzenlenmesi sistemine göre; hayvanlar alemi (*animalia*) eklembacaklılar (*Arthropoda*) şubesinin zarkanatlılar (*hymenoptera*) takımında yer almaktadır. *Hymenoptera* takımının çoğunluğu arılardan, az kısmı ise karıncalardan oluşmaktadır. Arılar ve karıncalar sınıflandırmanın *Apoidea* basamağında ayrılır. *Apidae* familyasında ise bombus ve bal arıları olarak sadeleşip nihayetinde *Apinae* alt familyasında tamamıyla bal arılarını kapsayacak biçimde sınıflandırmadaki yerlerini alırlar.

Genel olarak hymenoptera takım üyeleri; kültüre alınmış ya da yabani kalan bitkilerin tozlayıcılığını yaparak (polinatör) ve çoğu bitki için zararlı olan böcekleri yiyip yok ederek en önemlisi de bal yaparak ünlenmişlerdir (Lindauer 2017).

Arıları diğer böceklerden ayıran en önemli özellik ise sosyal böcek olarak tanımlanmalarıdır. Zira bu tanımlama toplu halde yaşadıklarından ve aralarında oluşturdukları iş bölümünden gelmektedir (Tolon 1999). Bal arısı, *A.mellifera* L.¹ kutuplar haricinde dünyanın hemen her bölgesindeki iklime ve yaşadığı yerin fiziksel koşullarındaki değişikliklere adapte olarak yeryüzüne dağılmıştır (Crane 1984). *Apis* cinsi altında en yaygın görülen 5 tür bulunmaktadır (Şekil 2.1.).

Çizelge 2. 1. Bal arısı *Apis mellifera*'nın Linnaeus (1758)'e göre taksonomideki yeri (Anonymous 1)

Alem	Animalia (Hayvanlar)
Şube	Arthropoda (Eklem Bacaklılar)
Alt Şube	Hexapoda (Altıbacaklılar)
Sınıf	Insecta (Böcekler)
Takım	Hymenoptera (Zar Kanatlılar)
Familya	Apidae
Alt Familya	Apinae
Oymak	Apinini
Cins	<i>Apis</i>
Tür	<i>Apis mellifera</i> (Bal arısı) <i>Apis dorsata</i> (Dev arı) <i>Apis indica</i> (Hint arısı) <i>Apis florea</i> (Cüce arı)

¹ Linnaeus, 1758 yılında bal arılarını “bal yapan” anlamına gelen *Apis mellifera* olarak isimlendirerek tür düzeyinde sınıflandırmıştır (Erickson vd. 1999).



a)



b)



c)



d)



e)



f)

Şekil 2. 1. *Apis* cinsi arıların başlıca türleri; **a)** *Apis florea* (cüce arı), **b)** *Apis dorsata* (dev bal arısı), **c)** *Apis mellifera* (bal arısı), **d)** *Apis cerena indica* (Hint Arısı), **e)** *Apis adreiformis* **f)** *Apis laboriosa*

Çeşitli hayvan ırklarında görüldüğü gibi bal arıları da yaşadığı yerin çevre koşullarına uyum sağlamış ve böylece değişik genotipler ortaya çıkmıştır. Her arı ırkının diğer bir ırktan üstünlük ve farklılık gösterdiği bir özelliği vardır. Bu nedenle iki ayrı arı ırkının üstün özelliğini bir popülasyonda toplayıp daha kazançlı arıcılık yapabilmek için ırklar arası melezleme yapılmakta ve yeni genotipler oluşturulmaktadır.

Bugün dünyada en yaygın olan bal arısı *Apis mellifera*'dır. *Apis dorsata* (dev bal arıları) ve *Apis florea* (minik bal arıları) daha ilkel bir yapıdadır ve ağaç dalı veya duvar yüzüne petek örüp yaşamaktadırlar. Bu arı türlerinin haberleşme sistemleri iyi gelişmemiştir ve *Apis mellifera* türünün kromozom sayısının yarısına sahiptirler. Hindistan arı türü olarak bilinen *Apis cerena* ise *Apis mellifera* türüne diğer ırklardan daha çok benzemektedirler (Güler 2006).

Linnaeus 1758 yılında yaptığı taksonomik² sınıflandırmada *Apis*'i dört tür olarak yorumlamaktaydı, fakat daha sonra yapılan çalışmalar tür sayısının dörtten fazla olduğunu ortaya koymaktadır. Otis (1996)'e göre eklenen bal arısı türleri; *Apis nigrocincta*, *Apis andreiformis*, *Apis nuluensis*, *Apis laboriosa*, *Apis koshevnikovi*'dir. Son olarak da belirlenen toplam tür sayısı 11 i bulmuştur. Bunlar sırasıyla;

Apis mellifera Linea

Apis cerena Fabriscus

Apis florea Fabriscus

Apis dorsata Fabriscus

Apis andreiformis Smith

Apis laboriosa Smith

Apis binghami Cockerrell

Apis breviligula Maa

Apis koshevnikovi Buttel-Reepen

Apis nigrocincta Smith

Apis nuluensis Tinget, Koeniger ve Koeniger türleridir (Güler 2006).

Dünyanın hemen hemen her bölgesinde yayılım göstermiş olan bal arısı evcil hayvanlardan sayılmakla birlikte esasen geçit bölgelerinde yabani formlarda ve bazı yerlerde farklı türler halinde bulunmaktadır. İyi bir şekilde değişik iklim koşullarına uyum gösteren bal arısının değişik formları bütünüyle doğal seçim sonucunda oluşmuştur ve insanlığın bu yayılmaya katkısı bir yerden başka bir yere bal arılarını taşıyarak olmuştur (Silici 2009).

² Genotip ve çevre ile belirlenen morfolojik özellikler genellikle niceldir. Örneğin; erken ilkbaharda eski peteklerden çıkan işçi arılar sezon süresince yeni peteklerde yetiştirilen işçi arılardan daha küçük olmaktadır (Ruttner 1988). Taksonomik sınıflandırma yapılırken bunun gibi morfolojik özellikler dikkate alınmaktadır.

2.2. Koloni Bireyleri

Bal arısı kolonisi; 1 ana (kraliçe), 200-2000 erkek ve binlerce işçi arıdan oluşur. Koloninin ana arısı çok sayıda erkek arı ile çiftleştiğinden koloni bireyleri bir ana ve çok sayıda babadan oluşan ebeveynin dölleridir. Çiftleşmeler sırasında ana arı sperm kesesine doldurduğu spermatozoalar vasıtasıyla ömrü boyunca döllü yumurta üretebilir. Bu sayede bal arısı ailesinin çok sayıdaki döllerinin tümü birbirleriyle öz kardeş olmamakta ve böylece bir arı ailesinde 8-10 üvey kardeş familyası bulunmaktadır (Güler 2006).

Koloni içerisindeki bireylerin tümü ana arının petek gözleri tabanına bıraktığı yumurtalardan meydana gelmektedir (Genç 2000). Kolonide topluluklar halinde yaşayan bal arıları; görünüm (fizyolojik) ve yapısı (morfolojik) bakımından birbirinden farklıdır ve bir ana arı, binlerce işçi arı ve sayıları oğul yapma döneminde zirveye ulaşan yüzlerce erkek arıdan meydana gelmektedir (Gempe vd. 2009; Gupta vd. 2012).

Normal koşullarda her bal arısı kolonisinde sadece bir ana arı bulunur. Fakat bu konumuna gelmeden önce bir mücadele geçirmekte ve diğer ana arı olabilecek rakiplerini öldürerek koloninin tek anası olmaktadır. Bu süreç şu şekilde ifade edilmektedir; kovadaki kraliçe (ana) arının herhangi sebeple yokluğu veya yaşlanmasından dolayı sperm kesesinde depoladığı spermatozoların da tükenmesiyle ana arı döllenmemiş yumurta bırakmaya başlar, döllenmemiş yumurtadan ise kovan içi işlerde yetkin olmayan erkek arılar meydana gelir. Doğduktan sonra gelişimini tamamlayan ve ilk uçuşuna çıkan ana arıları döllenmekten başka görevleri olmayan erkek arılar kovan içerisinde her hangi bir faaliyete katılmazlar (Lee 1985; Winston 1987; Schlüns vd. 2003; Czekonska vd. 2013). İşçi arılar ise; ana arının petek gözlerine yumurtlamasından sonra larva ve pupa olarak iki aşama daha geçirir ve yaklaşık 21 gün sonra oluşumları son bulduğunda petek gözünden çıkıp kovan içindeki hayatlarına başlarlar.

İşçi arılar, ana arının kendi yumurtasını spermatozoalarıyla döleyerek elde ettiği yumurtalardan oluştuğu için diploittir. Aynı şekilde ana arılar da diploittir ancak işçi arıların üreme yeteneği yokken ana arının vardır ve bunun sebebi; yumurta aşamasından sonra gelen larva döneminde yaşanan beslenme farklılıklarıdır (Gempe vd. 2009; Gupta vd. 2012). Bu farklılık yaşam süresine de yansımakta ve bir işçi arının ömrünü 35-40 gün civarında yaşamasına izin vermekteyken bir ana arının normal koşullarda üç dört yıl yaşamasına olanak sağlamaktadır (Winston 1987).

Fakat günümüz arıcılığında bir ana arı üç dört yıl değil sadece sperm kesesine depoladığı spermatozoidlerin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak en fazla iki yıl kullanılmaktadır (Seeley 1978; Cobey 2007; Rangel vd. 2013).

Bal arı kolonisinde en çalışkan olarak nitelendirebileceğimiz gruba işçi arılar oluşturur ve bu nedenle kovanda erkek arılara kıyasla çok daha fazladırlar. İşçi arılar kolonideki tüm işlerin yürütülmesinden sorumlu, aralarında yaş gruplarına göre iş bölümü olan bireylerdir. Genç işçi arılar yuva tabanlı görevlerde bulunurken, yaşlı işçi bal arıları koloni girişinin yakınında veya koloni dışında görev yapmaktadır (Winston 1987). Genel olarak görevler; hücre temizleme, sırlama, yumurta ve kraliçenin bakımı, beslemesi, petek yapımı, temizlik, gıda işleme ve tarlacılık gibi dış görevleri takip eder (Ellis 2015; Natsopoulou 2016).

İşçi bal arılarının yaşa bağlı görevleri sırasıyla; hücre hazırlama aşaması olarak başlar. Bu aşama işçi arıların, yetişkin arılar olarak hücrelerinden çıktıklarında yaptıkları ilk görevdir. İlk olarak, işçi arılar boşalan bir arı hücresini duvarlarından yukarıya doğru ve hücre girişine kadar temizlemeye başlarlar (Ellis 2015). Daha önceki hücre yolcularının bıraktığı kozaları ve dışkıyı kaldırırılar. Sonrasında ise; hücrede geride kalan herhangi bir pis kalıntıyı ince bir balmumu tabakasıyla örterler (Seeley 1982).

Kuluçkanın ve kraliçenin bakım dönemindeki işler hemşirelik özelliklerine benzemektedir. 4-12 gün arası (Ribbands 1953; Seeley 1982) yaklaşık 1 hafta sürer. Hemşireler, diğer sosyal arılardaki gibi genç arıları, polen yerine daha çok proteinli besinlerle besler (Michener 1974). Hemşireler, yavruyu beslemeye ilaveten proteinasit salgılarını yuvadaki küçük ayrıca yaşlı arılara da aktarırlar çünkü bu onların gelişimi ve bakımları için kritiktir (Crailsheim 1992). Ayrıca hemşire işçi arılar kraliçenin etrafında bir alan oluşturarak ona bakım yaparlar. Beraberindeki arılar, ana arının feromonlarını yuvaya yayarak (Velthuis 1972; Seeley 1979) haberci olarak görev yaparlar.

Orta yaşlı arıların görevleri ise; 12-21 günlük arası dönemlere denk gelmektedir. Bu görevlerinde ortalama bir haftanın biraz üzerinde kalmaktadırlar (Seeley 1982, Johnson 2008). Orta yaşta arılar, yuva boyunca yayılmış bir görev repertuarına sahiptir. Görev dağılımları hemşire arılarla örtüşmesine rağmen oldukça farklıdır, çünkü kuluçkaya bakım yapmazlar (Johnson 2008b). Bunun yerine, yuva yapımı ve bakımı ile nektar alımı ve işlenmesi, yuva girişini korumak gibi (Seeley 1982; Trumbo vd. 1997; Johnson 2003) çeşitli görevleri içermektedir.

Araştırmalar, bu grubun aralarında sürekli değişkenlik gösteren iki kategoriye ayrılabilirliğini öne sürmektedir. Genç orta yaşlılar, tarak yapımı ve genel koloni bakımına daha fazla zaman harcıyor görünürken, daha yaşlı olan orta yaşlılar, nektar işleme ve yuvanın girişine daha yakın konumlandırılan diğer görevlere geçiş yapmaktadırlar (Seeley 1995; Trumbo vd. 1997).

2.3. Türkiye’de Bulunan Önemli Bal arısı Irkları

Arı ırklarının belirlenmesinde ilk sınıflandırma çalışmasını, renk farklılığına bakarak İsa Peygamber ile aynı dönemde yaşayan Columella yapmıştır. Klasik sınıflandırma olarak kabul edilen bu yöntem zaman içinde yetersiz bulunmuş ve Buttel-Repen (1906) tarafından oluşturulan ve sürekli geliştirilen, günümüzde de yararlanılan tür altı, çeşit veya ırk esasına dayanan sistematik gruplandırma yöntemi kullanılmıştır (Güler 2006).

Bilimin olanaklarının günden güne artması ve yöntemlerinin kesinliği açısından bir adım daha iyi sonuç alınmasıyla bal arılarındaki (*Apis mellifera* L.) sınıflandırma da eskisinden farklılaşmıştır. Daha çok morfolojik ayırım yapılmakla belirlenen bal arısı ırkları genetik çalışmaların ve MtDNA analizlerinin ortaya çıkmasıyla morfolojik yapılan birçok ırk çalışmalarını yinelenmiştir. Sonuçlar önceki morfolojik çalışmalarla karşılaştırıldığında benzerliklerin yanı sıra farklılıkların da ortaya çıktığı görülmüştür. Bu yüzden mitokondri DNAsının ve enzim farklılıklarının bilinmesi, çalışılan bal arısının genetik ve coğrafik farklılıklarının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır (Smith 2002).

Bal arısı ırkları açısından bakıldığında Türkiye, coğrafik yönden Orta Doğu, Asya ve Avrupa'nın birleşme noktasında bulunmakta; sınırları içerisinde gerek yükselti farklılıklarından gerek enlemsel farklılıktan, gerekse denizellik ve karasallık etkisinin bir sonucu olarak kendi içinde çok zengin iklim tipleri göstermektedir.

Çeşitli iklim tiplerinin görülmesiyle oluşan coğrafyanın farklı bölgelerinde, farklı koşullar altında yaşayan türler, bu koşullara adapte olabilmek için vücut rengi, üretkenliği, belirli morfolojik ve fizyolojik karakterleri açısından büyük farklılıklara sahip olmuş ve birçok alttürün oluşumuna neden olmuştur (Ruttner 1984, Smith vd. 1997, Kaftanoğlu 2001) ve bunun olumlu bir sonucu olarak da birçok arı ırkı için Türkiye'ye bir gen havuzu olma niteliği kazandırmıştır (Adam 1983).

Öte yandan Smith (2002) Türkiye'nin durumuyla ilgili yaptığı yorumunda bal arısı ırklarındaki farklı genetik faktörlerin incelenmesiyle ulaşılabilecek yararlı bilgilere Türkiye'nin sahip olmasına rağmen, bu farklılıkların gezginci arıcılığın yaygınlaşmasıyla kaybolduğunu ve aynı köken kraliçelerin arıcılıkta kullanılmasıyla o bölgenin kendine has ırk ve ekotipinin kaybedilme riskini doğurmakta olduğunu bildirmiştir.

Türkiye'nin çoklu ekolojik yapısının neticesi olarak, bal arısı (*Apis mellifera* L.) Anadolu ve Trakya genelinde yayılmış ve oralarda çeşitli şekillerde farklılaşmıştır (Star ve Asal 1996). Günümüzde ise; aynı coğrafyada çeşitliliği artıran tek şey iklim ya da ekolojik koşullar olmayıp bal arılarının birçok yarar sağlayan özelliklerini bir arada görebilmek açısından insan eliyle yapılan ıslah çalışmalarıyla da yeni türler ortaya çıkmıştır (Adam 1987).

Türkiye'de en yaygın kullanılan bal arısı ırkları; Batı Anadolu ve İç Anadolu da Anadolu bal arı ırkı (*A. anatoliaca*), Kuzey Anadolu'da Kafkas arı ırkı (*A. caucasica*), doğuda İran arı ırkı (*A. meda*) ve güneydoğu Anadolu da ise Suriye arı ırkı (*A. m. syriaca*) olmak üzere dört ırk yer edinmiştir ve Anadolu'da Kafkas arısı dışında davranış biçimi ve morfolojisi bakımından farklılaşmış ekotipleri içeren en geniş bal arısı nüfusunu Anadolu arısı oluşturmaktadır (Doğaroğlu vd. 1992; Genç vd. 1999; Akyol ve Kaftanoğlu 2001).

Farklı ekotipleriyle dikkat çeken Anadolu bal arısı ırkı, sert iklime dayanıklılığıyla, yüksek kışlama ve yön bulma kabiliyetiyle, ana arı ve işçi arılarda uzun yaşam gibi nitelikleriyle bilinmektedir (Adam 1987). Kuluçka sezonu haricinde yavru yetiştirme diğer ırklarda görüldüğü gibi azdır. Fakat uygun koşullar sağlandığında hızlı ve yoğun şekilde yavru yetiştirme faaliyetlerine başlamaktadırlar (Silici 2009).

Özellikle Akdeniz bölgesinin farklı alanlarında kapsamlı bir şekilde performansı incelenen, batıda Ege denizi kıyısı boyunca yayılmış Muğla ekotipi, Anadolu ırkının en popüler ekotipidir (Doğaroğlu vd. 1992; Güler ve Kaftanoğlu 1999; Karacaoğlu ve Fıratlı 1999; Akyol ve Kaftanoğlu 2001; Arslan vd. 2004). Bu ekotip üzerinde yapılan çalışmalar, Muğla ekotipinin farklı üreme ve morfolojik yapısı ile diğer ekotiplerden ayrıldığını göstermektedir (Güler 1995; Karacaoğlu ve Uçak 2003; Genç ve Karacaoğlu 2003; Karacaoğlu 2005; Uçak ve Karacaoğlu 2005).

Karasal iklime adapte olmuş Anadolu ırkının İç Anadolu ekotipi kıtlık zamanlarında kuluçka üretimini durdururken, Ege ekotipi (Muğla arısı) üremesine devam etmektedir. Ege ekotipinin diğer Anadolu ırk ve ekotiplerinden daha yüksek

üreme gücü olduğu (Doğaroğlu 1982; Doğaroğlu vd. 1992; Fıratlı ve Budak 1994) ve daha çok miktarda bal ürettiği (Akyol 1998; Güler ve Kaftanoğlu 1999) yapılan çalışmalar sonucunda görülmektedir.

Birçok ülkede uysallığı, bal üretimindeki çalışkanlığı ve hastalık direnci için seçici olarak yetiştirilen ve dünyanın her yerindeki en popüler arılardan biri olan Karniyol arı ırkı (*Apis mellifera carnica*) Türkiye'nin Trakya bölgesinde bulunmaktadır. Slovenya, güney Avusturya ve Hırvatistan, Bosna-Hersek, Sırbistan, Macaristan, Romanya ve Bulgaristan'ın da yerli arı ırkıdır (Palmer vd. 2000). Ancak, bu verimi yüksek arı ırkı için henüz herhangi bir ıslah programı uygulanmamıştır. Bu nedenle bazı arıcılar Karniyol bal arısı (*Apis mellifera carnica*) kraliçelerini başta Almanya ve Avusturya olmak üzere Avrupa'daki yakınları aracılığıyla ithal etmektedirler (Smith vd. 1997).

Ülkemizin kuzeydoğusunda görülen ırk ise Kafkas (*Apis mellifera caucasica*) arı ırkıdır. Bal üretimindeki verimi ve uysallığıyla tanınan bu ırkın iki çeşidi vardır. Bunlardan biri; kökeni kafkas dağları olan gri renkli kafkas arısı (*Apis mellifera caucasica*), diğeri ise; yine kökeni aynı bölge olup fakat daha alçak arazilerde görülen sarı tip kafkas arısıdır. Bu ırk daha çok, bal arısı ırkları içinde en uzun dile sahip olmalarıyla, fazla oğul yapmamalarıyla tanınırlar.

İtalyan ırkında olduğu gibi yağmacı değildirler ve kış için fazla bal depolarlar. İstenmeyen özellikleri ise; ana arıyı kolay kabul etmezler ve fazla propolis taşırlar, bu sebeple kovanın temizlenmesi zordur (Balcı 1988). Özellikle alçak bölgelere Akdeniz ve Ege bölgelerine uygun olmamakla birlikte yapılan araştırmalar neticesinde bu ırkın sıcak iklimlere uygun olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Doğaroğlu vd. 1992; Arslan vd. 2004). Bununla birlikte, Kafkas (*Apis mellifera caucasica*) ırkının Muğla arılarıyla çaprazlanması sonucunda safkan melez göstermekte ve farklı bölgelerde kullanılabilir olmaktadır (Akyol ve Kaftanoğlu 2001).

Türkiye bal arısı ırkları hakkında yapılan çalışmalardan Ruttner (1988)'e göre, *Apis mellifera caucasica* (kafkas ırkı), Anadolu'nun kuzeydoğusunda ve doğu Karadeniz kıyısı boyunca, *Apis mellifera meda* güneydoğu Anadolu'da, *Apis mellifera anatoliaca* (Anadolu ırkı) Avrupa ülkeleri de dahil olmak üzere Türkiye'nin geri kalanında görülmektedir.

Fakat son yıllarda Kafkas (*Apis mellifera caucasica*) arı ırkı ile yapılan bazı genetik çalışmalarda önceki yapılanlardan farklılıklar bulunmaktadır. Anadolu bal arısının (*Apis mellifera anatoliaca*) ve Kafkas arısının (*Apis mellifera caucasica*) mtDNA'sına ayrıntılı olarak bakıldığında ikisinin DNA dizisinde farklılıklar görülmüştür.

Smith (2002), bu konu üzerinde bir çalışma yapmış ve bulduğu sonucun Ruttner (1988)'in yaptığı çalışma sonuçlarından farklı olduğunu, Van Gölü'nden Gürcistan sınırına kadar Kafkas arısı (*Apis mellifera caucasica*) ve Anadolu arısı arasında geniş bir çakışma alanını işaret ettiğini bildirmiştir. Bunun sebebinin ise, Kafkas arısındaki doğal gen akışı ve yayılımıyla ya da insanlar tarafından taşınmasına bağlı olabileceğini de belirtmiştir. Smith (2002) kendisiyle aynı konu üzerinde başka bir çalışma yapmış olan Garnery vd. (1992)'nin de Kafkas arısında buldukları mtDNA dizisinin, kendi bulduğu Kafkas ırkının (*Apis mellifera caucasica*) karakteristik özelliğiyle aynı olduğunu belirtmiştir.

DNA düzeyindeki çalışmalar bal arısı ırklarını anlamada daha kesin ve ayrıntılı bilgilere ulaşılmasının bir yolu olarak görülmesine rağmen Türkiye bal arıları genetik farklılıkları yönünden ancak yeni yeni çalışılmaya başlanan bir konudur. Bal arısı ırklarının genetik farklılıklarını anlayarak ve bilerek yetiştiricilik yapılması arıcılar tarafından da ekonomik öneme sahiptir. Nitekim o bölgede yetişip o bölgenin iklim ve doğa şartlarına kendini adapte etmiş bir bal arısı kendi bölgesinde hayatta kalabilme yollarını daha iyi bilmekte ve o arı ırkı o bölgedeki bir arıcı için daha ekonomik, daha güçlü ve hastalıklara daha dirençli olmaktadır.

Türkiye'nin iklim ve bitki örtüsündeki çeşitliliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkan göçer (gezginci) arıcılık, bölgeler arasındaki farklı çiçeklenme dönemlerinden faydalanarak bal üretiminin çoğaltılmasını olanak sağlarken, amansız görülen *Varroa destructor* gibi parazitlerin ya da diğer hastalıkların hızlı bir şekilde bulaşmasına aracılık etmektedir. Başka bölgelerden gelen bu bal arıları yeni bölgenin iklimine uyum sağlamakta zorlanmasının yanında yeni bölgenin hastalık ve zararlılarına karşı daha hassas olmaktadır. Böylece Türkiye'deki bal arısı ırklarının genetik farklılıkları henüz belirlenmeden ülkemiz bu çeşitliliği kaybetme riski ile karşı karşıya kalmıştır (Smith 2002). Bu nedenle ana arı yetiştirilmesi ülkemiz açısından büyük öneme sahip olmakta, doğru ana arıların doğru bölgeler için kullanılması da hem ekonomik hem hayati yönden önem arz etmektedir.

Ülkemizde ana arı yetiştiriciliği bazı işletmelerce ve kişilerce yapılmasına rağmen yıllık 300.000 olan üretim Türkiye ana arı ihtiyacının % 20 civarını ancak karşılayabilmektedir (Anonim 2016).

Günümüzde halen başka ülkelerden yüksek ücretler ödeyerek ana arı getirilmeye devam edilmesinin önlenmesi, ancak ana arı yetiştiriciliğinin geliştirilmesiyle ve ıslah programlarına ağırlık verilmesiyle mümkün görünmektedir.

2.4. Bal arılarında Savunma Mekanizmaları (Hijyenik Davranış ve Tımarlama)

Tarımda olduğu gibi hayvancılık alanında da yaygın olan ıslah ve geliştirme, bal üretiminde bal arılarına uygulanarak yapılmaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde ıslah çalışmaları ürün iyileştirmek için çok fazla kullanılmaktadır. Bu nedenle ülkemizin arıcılıkta ilerlemesi hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı hatlar geliştirilmesiyle paralel görünmektedir (Oskay 2008).

Bal arısı genetiğinde uzmanlaşmış araştırmacılar, arı ırkları ve ekotiplerinin hatta kolonilerin varroa akarına farklı seviyelerde duyarlılık gösterdiklerini gözlemlemişler ve varroaya diğerlerinden daha dayanıklı olan kolonilerden yetiştirilen ana arılarla oluşturulan kolonilerin bu akara karşı daha dayanıklı olduğunu kanıtlayan bulgular elde etmişlerdir. Bu konu üzerinde çalışma yapılarak uygulamaya aktarılması neticesinde bu parazit ile mücadelede büyük bir adım olacağını ve başarı sağlanabileceğini ifade etmişlerdir (Nasr 1998; Palacio vd. 2000).

Dünya çapında son yıllarda yaygın olarak görülen koloni çökmeleri birçok ülkede rapor edilmektedir ve bu konuda çalışmalarda bulunan araştırmacılar (Brettell ve Martin 2017) koloni çökmelerini birçok etkenin varlığına bağlamışlardır, fakat çoğunluk bu çöküşün varroa ve varroanın açtığı yaralardan giren virüslerin varlığıyla oluştuğu görüşünde birleşmektedirler.

Varroa dış parazitine karşı birçok kimyasal ilaç kullanılmasına karşın kesin bir sonuç alınamaması varroanın bal arısı ile senkronize hareket içinde olmasına ve kullanılan kimyasallara karşı kısa sürede direnç kazanmasıyla ilişkilendirilmektedir, dolayısıyla varroaya karşı dirençli hatlar yetiştirmenin gerekliliği burada da görülmektedir.

Bal arılarında varroaya karşı ıslah çalışması, *Apis cerena*'nın (Doğu Bal Arısı) Varroa akarına karşı oluşturduğu direnç mekanizmalarından esinlenmektedir. *Apis cerena* bu parazitle evrimleşerek geliştiğinden parazite karşı doğal olarak bir savunma mekanizması oluşturmuştur. Bu savunma mekanizmaları; kapalı göz içinde (parazite edilmiş damızlık hücrelerin çıkarılması) varroa zararına uğrayan yavruyu dışarı çıkarmak (hijyenik davranış), kendi kendinin üzerindeki veya kovandaki diğer bal arılarına yardımcı olarak varroayı üzerinden atmak (tumar) şeklinde (Bigio vd. 2014; Pritchard 2016) ortaya çıkmaktadır. Bu davranışsal beceriler *V. destructor*'un sağkalım ve üreme başarısını etkileyebilmektedir (Boecking ve Spivak 1999; Evans and Spivak 2010).

Hijyenik davranış, bal arılarında (*Apis mellifera* L.) sosyal bir bağışıklık özelliğidir; bu sayede, işçiler, sağlıklı yavruyu tespit eder, söküp atar ve koloni içindeki hastalık direncini geliştirirler (Guarna vd. 2017). Bu arıcılık için ekonomik açıdan değerlidir; Bununla birlikte, bu olgunun arkasındaki moleküler mekanizma halen iyi bir şekilde anlaşılmamıştır (Nganso vd. 2017).

Bal arılarındaki hijyenik davranışı ölçmek için belli metotlar vardır. Bunlardan birisi kolonide belirlenen hücrelere sıvı azot dökerek kuluçkadaki yavruları öldürme suretiyle gerçekleştirilir (Lin vd. 2016).

Ölmüş yavruları işçi arıların ne kadar sürede kaldırdıklarına göre o kolonideki hijyenik davranışın varlığı- yokluğu ve yoğunluğu anlaşılmaktadır. Diğer metotta ise kuluçkadaki yavru gözlerine iğne batırarak yavrular öldürülür ve yine ne kadar zamanda hücrelerin temizlendiğine bakılarak hijyenik davranış o koloni için ölçülmektedir (Lin vd. 2016; Scannapieco vd. 2017).

Kolonideki hijyenik davranışı ölçme metotlarının hangisinin daha etkili olduğunu karşılaştırmak için Akyol (2016) 40 koloni kullanarak iki metodu test etmiştir. 20 şer li olarak ayırdığı koloninin birini iğneleme yöntemi ve diğerini sıvı azot yöntemi uygulamıştır. En yüksek hijyenik davranış gösteren koloni ikinci yıl damızlık olarak kullanılmış ve o kolonideki larvalardan ana arı üreterek toplamda 40 koloniye tamamlayarak yine iğne ve sıvı azot yöntemiyle kolonileri test etmişlerdir. Sonuçta iğneleme yönteminin sıvı azot yöntemine göre daha yüksek oranda hijyenik davranış gösterdiklerini bildirmişlerdir.

McAfee vd. (2017), sıvı azot yöntemiyle canlılıklarına son verdikleri kuluçkadaki yavru arılar üzerinde yaptıkları hijyenik davranış çalışmalarında hijyenik davranışa neden olan koku alıcılarını bulmak için sıvı azotla dondurarak öldürülmüş olan yavru kokularıyla canlı kuluçka profilinin kokularını karşılaştırdıklarını ve şaşırtıcı bir şekilde, donarak öldürülmüş yavrulardan önemli ölçüde fazla sera feromonu (β -ocimene) salındığını bulmuşlardır. β -ocimene bolluğunun da hijyenik davranış ile pozitif yönde ilişkili olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, β -ocimene'in işçi antenlerini doza bağımlı bir şekilde uyarıldığını ve sol antenlerin hijyenik arılarda sağ antenlerden anlamlı derecede daha güçlü tepki verdiğini, ancak hijyenik olmayan arılarda

olmadığını keşfetmişlerdir. Bu karmaşık davranışın moleküler mekanizmayı anlamak açısından bir adım olduğunu belirtmişlerdir.

Pritchard (2016) bu konudaki araştırmasında; *Apis cerena* ile *Apis mellifera*yı tımar davranışları yönünden karşılaştırmış ve Doğu Bal Arısı *Apis cerana*'da bire bir ve toplu tımarlanma gözlemlenmiştir, tımarlama işleminden sonra varroa akarları ölü veya aldığı darbeler etkisiyle yaralanmış halde kovan tabanına düşmüştür.

Pritchard benzer davranış için Batı Bal arısı *Apis mellifera*yı gözlemlendiğinde hem kendini tımar etme hem de diğer arıları tımar etme yönünden verdiği yanıt hızlarının *A. cerana*'ya kıyasla çok daha yavaş olduğunu ve akarların hasarlanma sıklığıyla derecesinin de çok daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Jiang vd. (2016), bu konudaki çalışmalarını varroa direnci ve duyarlılığı için ekstrem fenotip gösteren iki bal arısı kolonisi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu kolonileri 6 yıllık bir süre boyunca geniş bir gen havuzundan doğal seleksiyon yoluyla tanımlayarak elde ettiklerini belirtmişlerdir. Varroa istilasında bal arısının direnç gösterdiği potansiyel savunma mekanizmalarını araştırmak, pupa ve erişkin evrelerde toleranslı ve duyarlı kolonilerde farklı şekilde eksprese edilen genleri tanımlamak için DNA mikroarray ve eş zamanlı nicel (PCR) analizleri kullanmışlardır. Sonuçlarında ise; varroaya dirençli arılarda hassas kolonideki arılara göre daha farklı şekilde eksprese edilen genlerin tanımlandığını bildirmişlerdir; bu sonucu, dirençli kolonide, varroa akarı istilasına karşı genetik kapasitenin artmasının göstergesi olarak belirtmişlerdir. Her iki kolonide de, pupa aşamasındaki arıların varroa istilasına yetişkin arılardan daha duyarlı olduğunu ve yetişkin aşamasında daha farklı olarak ifade edilmiş genlerin tespit edildiğini gözlemlenmiştir. Bu durum pupa arılarının yetişkin arılardan varroa istilasına daha duyarlı olduğunu belirtir. Sonuç olarak; iki koloni fenotipi arasındaki farklı olarak eksprese edilen genlerin saptanması, varroa dirençli/toleranslı bal arılarının seçimi ve yetiştirilmesi için potansiyel moleküler belirteçlerin olabileceğini belirtmişlerdir.

Ayrıca yakın zamanda Hamiduzzaman vd. (2017)'nin tımarlama davranışı geni üzerinde yaptıkları çalışmada yoğun tımarlama (IG/intense groom) ve düşük tımarlama (LG) olarak ayırt ettikleri bireyleri, tımar etme davranışları ölçüsünce bağışıklık sistemi, sinir, detoksifikasyon, gelişimsel ve sağlıkla ilgili genlerin ifadesi arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. *V. destructor*'a yanıt olarak tımarlama davranışının çeşitli seviyeleri için bir laboratuvar tahlilinde test edilen bireysel arılar, gen ekspresyonu için analiz etmişlerdir. Yoğun tımarlama davranışı gösterenler (IG/intense groom), tımara başlamak için düşük tımar yapanlara göre daha az zamana ihtiyaç duymaları ve akarları bedenlerinden başarıyla çıkarmak için diğerlerinden daha az bakıma ihtiyaç duymaları bakımından en verimli davranışı göstermişlerdir. Laboratuvar koşullarında test edilmiş olan bu ve diğer çalışmalarda, ıslahla yapılabilecek olan ve Türkiye için büyük bir sorun olan yerli irkların veya ekotiplerin ıslah edilmesinde, yoğun tımarlama (IG) davranış geni ekspresyonu önem arz etmektedir.

Son yıllarda yapılan bu çalışmalar ışığında ortak nokta hijyenik davranış mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılacağı ve bal arılarındaki koku alma duyusuyla ya da antenlerdeki değişik gen ifadesiyle de ilişkilendirilen hijyenik davranışın moleküler belirteç olarak kullanılacağı saptamaların olabileceğidir (Mondet vd. 2015; Scannapieco vd. 2016; Bixby vd. 2017; Guarna vd. 2017; McAfee vd. 2017).

2.5. Bal arısı Virüsleri Genel Özellikleri

Virüsler, bir protein katında bulunan genetik materyalden (RNA veya DNA) oluşan mikroskopik organizmalardır, yalnızca bir ev sahibinin canlı hücreleri içinde çoğalabilmektedir. Tek bir virüs ünitesine bir virüs parçacığı veya virion adı verilir ve bu parçacıkların bir konakçıdaki bolluğu virüs titresi olarak adlandırılır. Bir virüs parçacığı kendisini bir konakçı hücreye enjekte eder ve kopyalarını çıkarmak için hücrelerin organellerini kullanır. Bu süreç hücrede belirgin bir değişiklik yapılmadan devam etmekte ve büyük miktarlarda enfektif virüs partikülleri konakçı hücre hasar görene veya ölene kadar salmaktadırlar (Moore vd. 2015).

Bal arısı RNA virüsleri, daha iyi incelenen memeli virüslerinin, genom kompozisyonuna, biyofiziksel özelliklerine ve birden fazla kapsid proteini bulunması benzerliğine göre üstünkörü tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu virüsler, "pikornavirüs benzeri" olarak adlandırılan; böceklerin, omurgalı hayvanların ve bitkilerin tam olarak karakterize edilmemiş büyük ve heterojen grubuna dahil edilmiştir (Bailey 1976). Çoğunluğu bu takımdan olan bal arısı virüslerinin genetik materyali tek zincirli RNA'dır ve RNA'nın çevresinde dış etkenlerden koruyan bir protein kılıfıyla (kapsid) çevrilidirler (De Miranda vd. 2012).

Taksonomisi ve filogenezi bakımından bal arısı (*Apis mellifera*) virüslerinin içinde tanımlanan iki istisna dışında (filamentous virüs ve *Apis iridescent* virüs) tüm virüsler pozitif iplikçik RNA virüsleri olarak belirtilmiştir (Carter ve Genersch 2008).

Memelileri enfekte eden pozitif iplikçik RNA virüsleri arasında büyük bir aile Picornaviridae (küçük RNA virüsleri) olarak adlandırılmış ve başlangıçta küçük (28 nm), çıplak ve özelliksiz parçacık olarak tanımlanmıştır.

Kapsitleri, pozitif duyuya sahip bir RNA genomu içeren 3-4 çeşit proteinden oluşmakta ve genom, 5' terminusda yapısal proteinlerin belirtimi ve 3' de yapısal olmayan proteinler ile tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) halindedir.

Genomun 5' ucundaki özel bir RNA yapısı, bir iç ribozom girişi alanı (IRES) olarak adlandırılır ve RNA'nın metillenmiş kapak için normal şartı atlayarak doğrudan ribozomlarla çevrilmesine izin verir (Carter ve Genersch 2008).

Genom sekansı belirlenmiş virüslerden; SBV ve DWV ise iflaviridae familyasının üyeleri (Chen vd. 2006) olmakla birlikte BQCV, KBV, IAPV ve ABPV Dicistroviridos familyasının (Nielsen vd. 2008) üyeleridir.

Iflaviride virüsler, yaklaşık 9-11 kilobazlık monopartit, pozitif iplikçikli RNA genomlarına sahip küçük, zarflanmamış virüslerden oluşan bir ailedir. Tüm sınıflandırılmış türlerin virüsleri, arthropod konakçularına enfeksiyon bulaştıran böcekleri enfekte eder. Hem faydalı hem de haşere böcekler konakçı olarak görev yapar ve enfeksiyonlar belirti içermez.

Nilaparvataljenler baldew virüsü 1 gibi veya gelişimsel anomalilere Deforme Kanat Virüsü gibi, davranış değişikliklerle Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü gibi ve prematüre mortaliteye enfeksiyöz flacherie virüsünde olduğu gibi belirtilere neden olabilir. Ayrıca Iflavirüsler için en yaygın bulaşma yolunun, virüs ile kirlenmiş gıda kaynaklarının yutulması olduğu belirtilmiştir (Valles vd. 2017).

2.6. Bal arısı Virüslerinin Diğer Hastalıklarla Etkileşimi

Bal arısı hastalıklarının gelişmesindeki unsurların başında; uluslararası arıcılık sektöründeki hızlı ve kontrolsüz yapılan bal arısı ürünlerinin ticareti, ülkemiz içinde yapılan gezginci arıcılığın hastalığı taşınması ve bal arısı parazitlerinin açtığı yaralar neticesindeki hastalıklar olduğu düşünülmektedir (Öztürk 2001; Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Bu hastalık etmenleri; bakteriyel, fungal, viral, paraziter ve protozoon ya da hastalığın etkilediği konağa göre; yetişkin ve yavru arı hastalıkları olabilmektedir. Bu tez konusu araştırılan beş hastalığın etmeni ise virüslerdir.

Virüs hastalıklarıyla yakın bağlantılı olduğu düşünülen ve hala bir fenomen olan Koloni Çöküşü Bozukluğu'da virüsler ve diğer hastalıklarla bağlantısını açıklığa kavuşturmak için son yıllarda ağırlıklı olarak çalışılan bir konudur.

Bal arısı hastalıklarının bir sonucu gibi görünen koloni çöküşü bozukluğu (CCD), kolonilerinin çöküşünün dünya çapında arıcıların önemli derecede zarar görmesine neden olmuştur (Genersch vd. 2010).

CCD etkilenen kolonilerde, yetişkin arı popülasyonunun çoğu kaybedilerek geride sadece canlı bir kraliçeyle, bol miktarda yavru, bol miktarda yiyecek ve ölü bal arıları kalmakta olduğu gözlemlenmiş (van Engelsdorp vd. 2009) ve bal arısı virüsleri de dahil olmak üzere çeşitli patojenlerin koloni çöküşüne neden olduğu bildirilmiştir (Cornman vd. 2012).

RNA virüsleri ve özellikle de İsrail Akut Felç Virüsü (IAPV) başlangıçta CCD ile ilişkili görünmekte olduğu bildirilmiştir (Maori vd. 2007).

Apis mellifera L.'ye patojen olan diğer virüsler olan Kaşmir Virüsü ve Deforme Kanat Virüsü de çökmüş kolonilerde bulunmuştur (Highfield vd. 2009; Cornman vd. 2012). Buna ilaveten son yıllarda, Koloni Çöküş Bozukluğu akademik çevrenin ve kamuoyunun dikkatini çekmiş ancak nedenleri ve önemi belirsizliğini korumuştur.

Yakın tarihli araştırmalar, CCD'de parazitler, patojenler (Runckel vd. 2011), zirai ilaçlar ve diğer çevresel stres faktörleri aralarındaki etkileşimlerinin çeşitli faktörlerin bulunduğunu ortaya koymaktadır (Johnson 2010; Nazzi vd. 2012; Chejanovsky vd. 2014; Hou vd. 2014; Traynor vd. 2017).

Bunun yanında, *V. destructor* tarafından istila edilen bal arısı kolonileri, arı paraziti akar sendromunu geliştirmekte ve bu durumun değişkenlik gösteren semptomlara sahip olduğu bilinmektedir (Shen vd. 2005; Gisder vd. 2009). Bu semptom değişkenliğine rağmen, tüm istila edilmiş koloniler genellikle bir veya daha fazla bal arısı virüsü bulaştırılmış hastalıklı yavruların varlığına sahip olmaktadır.

Çeşitli virüs hastalıkları salgınları varroa akarları tarafından ortak istila edilmesiyle belgelenmiştir (Tentcheva vd. 2004).

Varroa akarı, bal arısı virüsü enfeksiyonlarını aktarmada ve aktive etmede bir vektör olarak doğrulanmıştır ve varroa kaynaklı koloni çöküşünde *V. destructor* tarafından vektörlenmiş virüslerin önemli bir rolü olduğu görüşü kabul görmüştür (Ball vd. 1988; Sumpter ve Martin 2004; Gisder vd. 2009).

2.7. Bal arısında Viral Hastalıklar ve Bulaş Yolları

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte viral hastalıkların tesbiti de mümkün olmuş ve arılarda hastalık sonucu görülen ani koloni çökmesinin incelenmesine de olanak sağlanmıştır. Bunların başında Kronik Arı Felci Virüsü ve Akut Arı Felci Virüsü ilk defa 1963 te tanımlanmasının sonrasında birçok virüs daha keşfedilmiş ve bu virüslerin çoğunun klinik belirti göstermeden hastalıklarının seyir ettiği gözlenmiştir (Genersch ve Aubert 2010).

Bal arısı virüsleri genellikle larva veya pupa evresini etkilemekte ancak semptomlar çoğunlukla yetişkin arılarda belirgin olarak görülmektedir. Bu virüslerin çoğu, arıları besleyen hemşire arılar tarafından üretilen polen veya arı sütü içinde tüketildiği gibi birçok virüs varroa tarafından da iletilmektedir. Varroalar bal arısının hemolimfi ile beslenirken, virüsleri doğrudan bal arısı gövdesindeki her hücrelere ulaşan açık dolaşım sistemine aktarmaktadırlar (Moore vd. 2015). Ayrıca bal arısı virüsleri bal arıları ile sınırlı olmayıp diğer *Apis* arı türlerinin koloni sakinlerinde (küçük kovan böceği gibi) polen ve nektarında da bulunmakta olduğu bildirilmiştir (Bailey ve Gibbs 1964; Genersch vd. 2006; Singh vd. 2010).

Bal arısı virüsleri enfekte kolonilerden enfekte olmayanlara aktararak, kolonilerin başka yerlere transfer edilmesiyle, bal arılarının ortak çiçekler üzerinde avlanmasıyla veya zayıf, çökmüş kolonilerin başka arılar tarafından soyulması yoluyla da ortaya çıkabilmekte olduğu gözlemlenmiştir (Singh vd. 2010).

Mevcut bal arısı kolonileri son 15 yılda özellikle kış boyunca yoğun şekilde kayıp vererek dünyanın farklı bölgelerinden sıkça rapor edilmiş (Meixner 2010) fakat bu kayıpların birçoğuna açıklama getirilememiştir. Bu durumu önemseyen Virolog Michel Aubert bu olayın daha iyi anlaşılabilmesi için disiplinli bir araştırma başlatmasına sebep olmuştur (Gisder ve Genersch 2015).

Aubert (2017) bu konu hakkında en son teknoloji ile araştırma için bir temel oluşturabilmeyi amaçlamış ve mevcut olan bal arısı virüsleri hakkında bilgi toplanmasına öncülük ederek bir kampanya başlatmıştır. Başlatılan kampanya neticesinde o günden içinde bulunduğumuz güne kadar arı virüsleri ve arı virolojisi hakkındaki bilgiler önemli ölçüde artmıştır (Gisder ve Genersch 2015).

Ayrıca son on yılda bal arısı kolonilerinin sayısında küresel bir azalma olduğu ve küresel gıda tedarikinin güvenliğini tehdit etmekte olduğu Vanbergen vd. (2013) tarafından da bildirilerek patojenlerin, özellikle de virüslerin (Tantillo vd. 2015) bu gerilemelere önemli ölçüde katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu viral patojenler çoğunlukla tek sarmallı, Dicistroviridae ve Iflaviridae familyalarının pozitif duyu RNA virüsleridir ve farklı virülans düzeyleri gösterebilmektedir ayrıca asemptomatik akut ve larva ölümüne kadar uzanan enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (McMenamin ve Genersch 2015).

Örneğin, en yaygın bal arısı virüsü Deformed kanat virüsü (Lanzi vd. 2006) ve çok yakından ilişkili varyant *Varroa destructor* virüs-1 (Ongus vd. 2004) ve Kakugo virüsü (Fujiyuki vd. 2004) genellikle vertikal veya oral yolla bulaştırıldığında düşük seviyeli virüs ile asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Buna karşın, ektoparazitik akar *Varroa destructor* tarafından bal arısı hemollenfine doğrudan enjeksiyon yoluyla DWV iletimi, genetik çeşitliliğin önemli

ölçüde azaltılmış olarak yüksek derecede patojen olan DWV suşlarının seçilmesine neden olmakta (Martin vd. 2012; Ryabov vd. 2014) ve enfekte pupa bölgelerinde çok yüksek seviyelere birikip hastalık belirtilerini göstermektedirler.

Şimdiye kadar genom sekansı belirlenen birçok bal arısı virüsü bulunmaktadır. Bunlardan bazıları;

Kaşmir Arı Virüsü (KBV: Kashmir Bee Virus),

Akut Arı Felci Virüsü (ABPV: Acute Bee Paralysis Virus),

Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV: Chronic Bee Paralysis Virus),

İsrail Akut Arı Felci Virüsü (IAPV: İsrail Acute Bee Paralysis Virus),

Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV: Black Queen Cell Virüs),

Deforme Kanat Virüsü (DWV: Deformed Wing Virus),

Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV: Sacbrood Virüs)

Yavaş Arı Felci Virüsü (SBPV: Slow Bee Paralysis Virus) dir (Ghosh vd. 1999; Olivier vd. 2008; De Miranda, ve Genersch 2010).

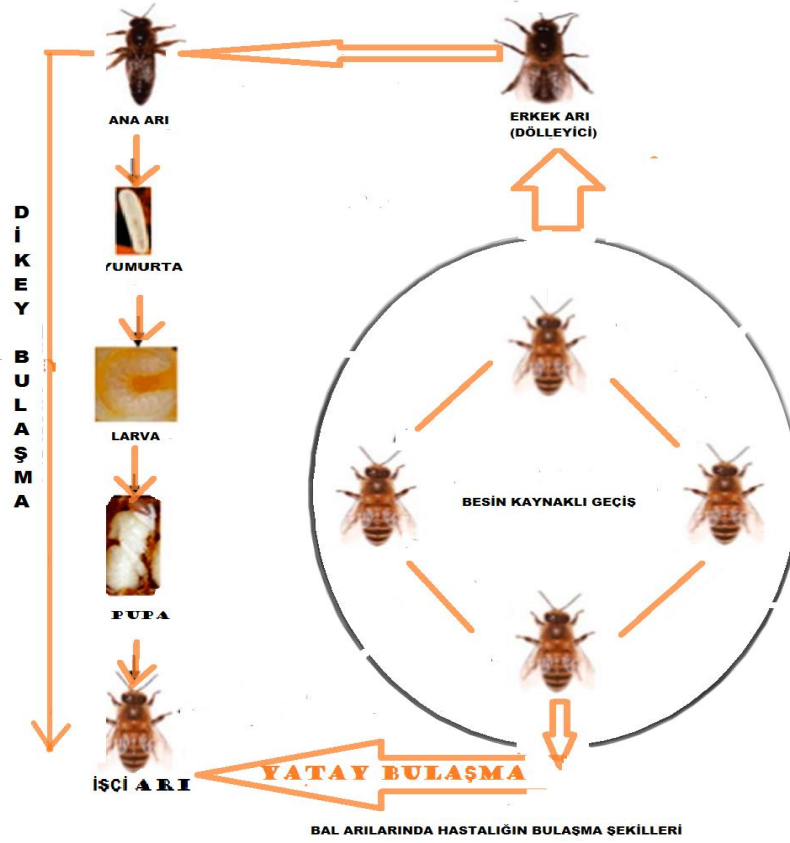
Bu virüsler, koloni içindeki arı sütü, bal, polen gibi besinlerde bulunabilmektedir. Besin yoluyla bulaşımın görülmesi, virüslerin bağırsak ve dışkılarında virüs bulunması ile kanıtlanmaktadır.

Bugüne kadar 22 virüsün (arılardaki Dicistroviridae ve Iflaviridae ailelerinde başta pozitif iplikli RNA virüsleri olmak üzere), bal, yumurta, larvalar, pupa ve yetişkinler gibi gelişmekte olan farklı evrelerde bulaşabilmekte olduğu bilinmektedir (Tantillo vd. 2015).

Virüs enfektesini belirleyen asıl unsur olan konağa bulaşım şekli iki farklı şekilde oluşur (Şekil 2. 2.). Bunlardan biri yatay (horizontal) diğeri ise dikey (vertical) iletim şeklidir. Yatay iletimde, aynı neslin bireyleri arasında virüsler bulaşırken, dikey bulaşmalar da annelerden yavrularına doğru gerçekleşmektedir (Chen ve Feldlaufer 2006).

Yatay iletim doğrudan veya dolaylı olarak sınıflandırılabilir. Doğrudan yatay geçişte virüs, doğrudan enfekte bir organizmadan sağlıklı bir organizmaya geçer. Doğrudan bir rota ile yatay geçiş, havada bulaşan enfeksiyon, gıda kaynaklı enfeksiyon ve zührevi enfeksiyonu içerir. Dolaylı bir yolla iletimde ise, virüsler bir konakçıdan diğerine bulaştıran ve aktaran biyolojik veya fiziksel bir vektörü içerir (Tantillo vd. 2015).

Hem kraliçe hem de dronların üreme organlarında viral genomik sekansların saptanması (Chen vd. 2004) bal arılarında cinsel yolla virüs bulaşmasının varlığını da önermektedir. Ayrıca farklı dokulardaki virüslerin tayini, bağırsakta tespit edilen virüs titrasyonunun, hemolimf, yumurtalıklar, kafa, spermateka ve iç organın çıkarılması gibi diğer incelenen dokulara göre önemli derecede yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Chen vd. 2006a). Bu sonuçlar gıda kaynaklı bulaş yollarının diğer bulaşma yollarına kıyasla daha fazla istatistiksel önemi olduğunu göstermektedir (Tantillo vd. 2015).



Şekil 2. 2. Bal arısı virüslerinin bulaş yolları (Shan vd. 2017)'den uyarlanmıştır

2.7.1. Deforme Kanat Virüsü (DWV)

Koloni kayıplarında büyük rol oynayan virüslerden biri Deforme kanat virüsü (DWV) Iflaviridae cinsine ait pozitif iplikçikli RNA virüsüdür (Lanzi vd. 2006) ve genellikle, bal arılarında gizli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Yue vd. 2007). Fakat yine de akar virüsünün patogenezdaki rolü hala tam olarak anlaşılammıştır ve virüs ile 'kanat deformitesi semptomu arasında doğrudan bir nedensel bağlantı kurulmamıştır. Son zamanlarda, DWV enfeksiyonlarının dronlar ve kraliçeler vasıtasıyla dikey olarak iletilebileceği ve bu iletim yolunun gizli enfeksiyonlara (görünür semptomların yokluğunda virüs varlığı) neden olduğu gösterilmiştir (de Miranda ve Genersch 2010).

DWV kolonilerdeki bireyler arasında dışkı, tükrük bezleri salgıları ile yatay olarak, dronlardan kraliçelere çiftleşme sırasında ve enfekte kraliçelerden yavrularına dikey olarak da iletilebilmektedir (Chen ve Siede 2007). Ayrıca DWV'nin, açık bir hastalık semptomuna neden olmadan DWV içeren larva gıdalarının alımı yoluyla larvalara yatay olarak iletilebileceğine dair kanıtlar da bulunmuştur (Gisder vd. 2009; Yue ve Genersch 2005).

2008 yılında Miranda ve Fries, DWV içermeyen bakire kraliçelerde enfekte spermle yapılan suni dölleme vasıtasıyla DWV'nin cinsel yolla bulaşan iletimini göstermiştir (Miranda ve Fries 2008). Ayrıca DWV genomik sekansları sadece spermatekada değil, aynı zamanda yumurtalıklarda da tespit edilmiş ve bu sonuçlar, suni dölleme ile DWV cinsel yolla bulaşma varlığını da ortaya koymuştur (Tantillo vd. 2015).

DWV'nin klinik bulguları; kanat deformasyonu, kısalmış karın, gövde büyüklüğü, canlılığın azalması gibi yetişkin arı deformitelerini içermektedir (Bowen-Walker vd. 1999; Martin 2001). Akar aynı zamanda, arıdaki bağışıklık sistemindeki genlerin ekspresyonunu baskı altına alarak arıdaki viral titrelerin artmasını sağlamakta ve arıların bağışıklık sistemini zayıflatmaktadır, bu durum işçi arıların hayatta kalma oranını ve onların koloniyeye uyumunu azaltmaktadır (Yang ve Cox-Foster 2007).

Yakın geçmişte gözlemlenen bal arısı koloni kayıpları, özellikle kış aylarında, hem ektoparazitik akar varroa hem de Pikornavirüs benzeri virüs olan DWV ile ilişkilendirilmiştir (Wu vd. 2017). Bununla birlikte, DWV'nin konukçuya bağlanması veya giriş mekanizmaları hakkında çok az şey bilindiği kabul edilmektedir (Organtini vd. 2017).

Kolonide *V. destructor* olmadığında DWV enfeksiyonun görünür semptomlara neden olmadığı veya konukçusuyla bir belirgin etki yaratmadığı (De Miranda ve Genersch 2010) ancak ektoparazitik akar *Varroa destructor* tarafından iletilindiğinde, morfolojik deformite hatta ölüme yol açarak arılar üzerinde yıkıcı etkilere neden olduğu bildirilmektedir (Gisder vd. 2009).

DWV'nin bal arısına iletilmesi, kontamine polen tüketimi yoluyla ve yetişkin arılar arasında doğrudan irtibat yoluyla yatay olarak gerçekleşebildiği gibi virüs tarafından enfekte olmuş erkek arı (drone) bir kraliçeyi döylediği zamanda görülebilmektedir. Ayrıca DWV enfekteli yumurta yumurtlayan bir kraliçe tarafından da dikey olarak iletilebilir (Organtini vd. 2017).

Bu konu hakkında sıkça yapılan çalışmalardan biri olan ve bal arısında virüslerin dikey olarak geçebildiğini gösteren ilk çalışma olduğunu belirten Chen vd. (2006), toplamda altı virüs üzerinde gözlemledikleri virüs iletimini kraliçelerin dışkı ve dokularındaki virüslerin varlığını inceleyerek değerlendirmişler ve kafa dokusu haricinde, beş dokunun yanı sıra kraliçenin dışkılarını da virüs enfeksiyonları için pozitif bulduklarını belirtmişlerdir.

Ayrıca bal arılarının kafalara DWV enfeksiyonu enjekte edilerek yapılan bir çalışmada bu virüsün bal arılarında öğrenme eksikliklerine neden olduğu (Iqbal ve Mueller 2007) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada, foretik akarların, arıların hemollemfi ile beslenirken DWV'yi yetişkin arılara yatay olarak iletilebildiğini ve bu iletimin muhtemelen beyni ve sinir sistemini (Shah vd. 2009) etkilediğini belirtmişlerdir.

DWV'nin, her ne kadar bal arısı virüsü olarak ismi geçse de, ülkemizde Sarıca olarak bilinen, Avrupa Eşek Arısı (*Vespa crabro* L.) ile yapılan bir çalışmada (Forzan vd. 2017) Avrupa Eşek Arısı'nın (Sarıca arısı) kraliçelerinin de DWV ile enfekte olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada semptom gösteren ve göstermeyen eşekarısının karın ve göğüs bölgesinin RT-PCR tetkikiyle pozitif olduğu ve aktif replikasyona işaret ettiği bildirilmiştir. Bu bulgunun sadece Avrupa Bal Arısını (*Apoidea*) değil, aynı zamanda virüslü bal arılarının eşekarısı tarafından yutulması ile olası bir bulaş yolunu doğruladıklarını ve bu çalışmanın eşekarısında DWV'nin saptanmasına ilişkin ilk raporunun olduğunu belirtmişlerdir.

Buna ek olarak (Zanni vd. 2017) Kuzey yarımkürede bildirilen bal arısı kolonilerinin (*Apis mellifera* L.) yıllık kayıplarının tarım ve biyoçeşitlilik için küresel

bir problemi temsil ettiğini belirterek parazit akar *Varroa destructor*'in, Deforme Kanat Virüsü (DWV) ile birlikte bu fenomende anahtar rol oynamakta olduğunu, ancak altta yatan mekanizmaların halen belirsizliğini koruduğunu belirtmişlerdir. Bu mekanizmaları aydınlatmak için, laboratuvar ve tarla koşullarında, enfekte edilmemiş ve akar bulaştırılmış arıların gen ekspresyon profilini analiz ederek, çeşitli koşullarda parazitleşmenin bal arısının transkriptomuna (organizmadaki genler bütünü) etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda parazitleşmenin yüksek viral yüklerle anlamlı derecede korelasyon içinde olduğunu ve akar istilasına maruz bırakılan arıların, stres tepkisi, bağışıklık, sinir sistemi fonksiyonu, metabolizma ve davranışsal olgunlaşma ile ilişkili genlerin değişen bir ifadesini sergilediklerini bildirmektedirler.

2.7.2. Torba Çürüklüğü/Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV)

Tulumsu yavru çürüklüğü /Sacbrood virüsü (SBV) ve Deforme Kanat Virüsü (DWV), evrimsel olarak pozitif iplikçikli RNA virüsleri, Iflavirus grubunun üyeleridir. Her ikisi de *Apis mellifera L.* ile arıcılık yapanların büyük bir sorunudur. Arazide SBV ile enfekte olan larva dönemindeki arılar genellikle larval gelişimini durduran, larva ölümüne neden olan virüsü yüksek seviyede biriktirme semptomları göstermektedir (Ryabov vd. 2016).

Tulumsu Yavru Çürüklüğü (Sacbrood) virüsü (SBV) Avrupa bal arıları *Apis mellifera L.* 'de yaygın olarak bulunur. SBV, en yaygın arı virüsü olup dünya çapındaki hemen hemen tüm kolonilerde tespit edilmiştir. Asıl enfeksiyon larva üzerinde meydana gelse de yetişkin arıları da etkilemektedir (Choe vd. 2012). Asya bal arılarında (*A. cerana*) farklı bir SBV türü olan AcSBV pupa oluşumundan önce larvanın ölümüne neden olmakta ve çoğunlukla kolonileri boşaltarak çöküşe yol açmaktadır (Huang vd. 2017).

Tulumsu Yavru Çürüklüğü hastalığı ilk defa 1913 yılında tanımlanmış ve 1917 yılında virüs enfeksiyonu olarak bilinmiş olsa da (White 1917) bu enfeksiyona sebep olan SBV etmeni 1964'e kadar tanımlanamamıştır (Bailey vd. 1964).

Tulumsu Yavru Çürüklüğü (SBV) Çin bal arısına bulaştığında ise Çin sacbrood virüsü (CSBV) olarak adlandırılmıştır. CSBV ilk kez 1972'de Guangdong Çin'de tanımlanmış ve 2008 yılında Liaoning China'da bireysel arılarda ölümcül hastalıklara neden olmasıyla ve tüm kolonilerin çökmesine sebebiyet vermesiyle yeniden ilan edilmiştir (Mingxiao vd. 2011). Çin Sacbrood virüsü (CSBV) hem Avrupa bal arısı (*Apis mellifera*) hem de Asya bal arısı (*A. cerana*) 'yi enfekte eden pozitif iplikçikli bir RNAvirüsdür. Bununla birlikte, CSBV, Asya bal arılarında Avrupa bal arılarından çok daha yıkıcı etkilere sahiptir ve *A. cerana*'ya dayanan tarım ve doğal ekosistemler için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Shan vd. 2017).

Tulumsu Yavru Çürüklüğü hastalığı genellikle, koloninin en hızlı şekilde büyüdüğü ve kolonide larva ve genç erişkinlerin çok fazla olduğu ilkbahar döneminde ortaya çıkmaktadır (Bailey 1969).

Enfekte olmuş kolonide hastalık, ölen larvanın hücrede kalmış atığını temizlemek için larvaları yiyen işçi arılara bulaşmasıyla başlar (Bailey 1969) ve enfekte olan işçi arılar diğer yavruları beslerken ağız salgıları ile virüsü yavrulara bulaştırırlar. Enfekte olmuş larvanın rengi beyazdan soluk sarıya dönüşür ve ölümünden sonra çabucak kuruyarak koyu kahverengi gondol şeklini almaktadır (Bailey 1975). Hastalık,

yavrunun deri değişimi sırasında gerçekleştiğinden deri değişemez ve iki deri arasında sıvı birikmesi olup tuluksu bir şekil alır. SBV ayrıca yetişkin arıyı enfekte edebilir ve enfekte işçilerin ömrünü kısaltır (Bailey 1976). Bununla birlikte, yetişkin bal arısı enfekte olduğunda, açık bir fiziksel bulgu göstermez (Bailey 1975; Berényi vd. 2006).

Çin sacbrood virüsünün (CSBV) çapı 26-30 nm olup, zarflanmamış, yuvarlak ve görünüm bakımından özelliksizdir ve küçük RNA virüsü ailesine, Picornaviridae'ye aittir. Virüs genomu + ssRNA'dır ve kapsidinde (Qinfen vd. 2002) dört tane yapısal protein (30.5, 31.5, 37.8 kDa ve 44.2 kDa) bulunur, ancak SBV hakkında üç yapısal protein (25, 28 ve 31.5 kDa) bildirilmiştir. (Ghosh vd. 1999). SBV, tamamen sekanslanmış ve genomik RNA'sı tipik memeli pikornavirüslerinden (yaklaşık 7,500 nt) daha uzun 8,832 nükleotid olan ve 2.858 amino poli proteini kodlayan tek, büyük bir açık okuma çerçevesi içeren ilk arı virüsüdür (Mingxiao vd. 2011).

2.7.3. Kronik Arı Felç Virüsü (CBPV)

Kronik Arı Felci Virüsü yetişkin arı felcinin bir etmenidir ve işçi arılarının kayıplarına neden olur (Bailey vd. 1963; Allen ve Ball 1996). CBPV pozitif tek iplikli RNA virüsü olarak kabul edilmesine rağmen, herhangi bir ailede sınıflandırılmamıştır. Virüs parçacıklarının morfolojisi ve RNA genomunun yapısal düzenlenmesi diğer bal arısı RNA virüslerine kıyasla belirgin profillerdir (Olivier vd. 2008). CBPV ilk kez 1963 yılında tanımlanmış ve iki farklı önemli hastalık belirtisi indüklemiştir (Bailey vd. 1963).

Kronik Arı Felci Virüsü, izole edilmek istenen ilk bal arısı virüslerinden biridir. Bal arısı virüsleri arasında farklı bir parçacık boyutuna ve genom kompozisyonuna sahip olması bakımından benzersiz olmakla birlikte enfeksiyondan kaynaklanan hem gözlemlenebilen davranış hem de fizyolojik değişikliğe sahip olan tek bal arısı virüsü olarak nitelendirilmiştir.

Hastalığın belirtileri yetişkin arılarda iki semptom grubundan birinde görülür (Genersch ve Aubert 2010). Tip 1 semptomlarında, yetişkin arıların uçamayarak, kanatları ve vücutları titrek hareketler gösterir, çoğunlukla birlikte kümelenirler. Arılarda ayrıca dizanteri oluşturan şişmiş bir karın olabilir ve belirtiler gösterdikten birkaç gün içinde ölürlür (Moore vd. 2015).

Tip 2 belirtileri, uçabilen yağlı, tüysüz siyah yetişkin arılardır, ancak birkaç gün içinde uçuşa elverişsiz olurlar ve titreyerek ölürlür. Bu sendromların her ikisi de aynı koloni içerisinde oluşabilir. Çoğunlukla koloni (Ribiere vd. 2010) hızlı bir şekilde yetişkin işçilerini kaybederek çöküşe doğru ilerler (Bailey ve Ball 1991). Ancak bu belirtiler benzerdir ve sıklıkla *Nosema apis*, koloni çöküş bozukluğu (CCD), trakeal akarlar, kimyasal toksisite ve diğer virüsleri içeren diğer bal arısı hastalıklarıyla karıştırılmaktadır (Moore vd. 2015) .

Yetişkin bir arının kütükülü üzerindeki kırık tüylerden küçük kesikler ve enfekte erişkin arılarla doğrudan temas, virüsü açık gözenekler yoluyla yayar; Bu hızla meydana gelir ve yetişkin arılara enfekte olursa, koloni ölümü ile sonuçlanan bir salgın ortaya çıkar. Bir koloni içinde enfekte arılardan alınan dışkı da hastalığı yayabilir, ve olası diğer varroa iletimi de dahil olmak üzere, diğer iletim yolları da yaymakta rol oynar.

Virüs yılın herhangi bir zamanında bir salgın olarak ortaya çıkabilmektedir. İlkbahar ve yaz virüsün ölüm nedeni olarak en sık görülen mevsimdir ancak belirgin

semptomlar göstermeksizin koloni yıl boyunca devam edebilmektedir (Miranda vd. 2012).

Kronik Arı Felci Virüsü bir RNA genomuna sahiptir ancak pikornaya benzemez. Bunun yerine, bu virüs olağandışı elipsoid bir yapıya ve 5 molekül RNA bulundurmaktadır (Bailey 1976).

CBPV, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Genomu RNA1 ve RNA2 olmak üzere iki büyük RNA'dan oluşur (Overton vd. 1982). CBPV'nin yapısal proteinlerinin RNA2'de bulunan ORF2 ve ORF3 tarafından kodlandığı önerilmiştir (Olivier vd. 2008). CBPV virionlarının RNA2'nin ORF2 ve ORF3'ü tarafından kodlanan iki protein içerdiğini (Gisder ve Genersch 2015) bildirmişlerdir.

2.7.4. Akut Arı Felç Virüsü (ABPV)

Akut Arı Felci Virüsü, CBPV ilk izole edildiğinde yanlışlıkla keşfedilen bir virüs olmuştur (Bailey 1963). CBPV'den farklı olarak, ABPV virüsü doğrudan varroa istila ile ilgilidir fakat CBPV'ye benzer semptomları da vardır. APBV, semptom göstermeyen enfekte erişkin arılardan, larval jölede (arı sütü) gelişmekte olan larvalara veya varroa akarları tarafından larvalara ve pupalara gönderilmektedir (Moore vd. 2015) ve oral yolla erişkinlerden arılara bulaştırıldığında tipik olarak gizli enfeksiyonlara neden olmaktadır.

ABPV, beslenme yoluyla ölüme neden olan yaklaşık bir milyar viral parçacık almaktadır ancak varroa tarafından vektörlendiğinde ve gelişmekte olan arının hemollemasına doğrudan enjekte edildiğinde, yalnızca 100 virüs parçacığı ölmeye yeterli olmaktadır (Genersch ve Aubert 2010). Varroa akarının beslenme periyodu ne kadar uzun olursa, iletim hızı da o kadar yüksek olmakta (Genersch ve Aubert 2010) ve ABPV ile enfekte olan pupa, o dönemi atlatmadan ölmektedir. Gelişmekte olan arılardaki virüs ise bir koloninin çöküşüne doğru gitmesine neden olmakta, ABPV salgınıyla enfekte olmuş koloni aynı sezonda ölmektedir (Sumpter ve Martin 2004).

Akut Arı Felç Virüsü'nün İnkübasyon süresi çok zaman almamakta, felcin gelişimi ve belirtilerinin ortaya çıkması 3-4 gün sürmekte ve ortaya çıktıktan 1-2 gün içerisinde de bireyler ölmektedirler. Yetişkin arılar ve larvalar üzerinde etkili olan bu virüs daha çok yaz aylarında görülür. Kurak havalarda hastalığın şiddeti artar. Arıların kanatları açık, sarkık ve titrer vaziyettedir ve uçuşa yetenekleri kaybolmuştur. Kümeler halinde, arılık önünde, toprakta sürünürler. Kovadaki arılar ise, yavrulu çerçevelerin üst kısmında toplanmaktadır.

Kanatlarda ve vücutta felç olarak tanımlanan titremeler görülmekte, midedeki bal dolu sıvı dışarı atılmadığı için abdomen şişkinleşmektedir. Ayrıca vücutlarının tüysüz, parlak ve yağlı bir görünümde olması da Kronik Arı Felcine benzer nitelikteki semptomlarıdır. Bütün arı hastalıklarında olduğu gibi bulaşmanın besin alışverişi ile meydana geldiği sanılmaktadır.

ABPV'nin tek-ipliklik RNAsı poly (A) kuyruğu hariç 9470 nükleotid içerir. İki kodlama bölgesi bulunur (ORF1 ve ORF2) ve 5' ORF1 sekansı 605-6325 ve 3'ORF2 sekansı ise 6059-9253 arasındadır. ORF1 sekansı polimeraz, helikaz ve proteaz kodlaması yaparken ORF2 35, 33 ve 24 kDa büyüklüğünde kapsid proteinleri kodlar. ABPV sekansı ile Drosophila C virüs, Plautia stali, Rhopalosiphum virüs ve Himetobi P virüs arasında yüksek benzerlik olup bunlar pikorna benzeri insekt enfeksiyonu yapan RNA virüsleri olarak tanımlanmaktadır (Govan vd. 2000).

2.7.5. İsrail Akut Felç Virüsü (IAPV)

Bal arısı mortalitesi, yakın zamanda, koloni çökme bozukluğu (CCD) olarak bilinen yeni bir sendrom için önerilen etiyolojik bir etmen olan İsrail Akut Felç Virüsü (IAPV) ile ilişkilendirilmiştir. Bu virüsle bulaşık arıların belirtileri kanat titremesi sonrasında felç ve kovanın dışında ölümle son bulmaktadır (Reynaldi vd. 2011).

ABD'de sağlıklı ve CCD'den etkilenen koloniler arasında yapılan bir araştırmada (Foster vd. 2007), CCD'den etkilenmiş koloniler ile 2004 yılında ilk kez tanımlanan RNA virüsü olan İsrail Akut Felci Virüsü arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (Maori vd. 2007).

İsrail Akut Felç Virüsü, KBV ve ABPV ile yakın ilişkili görülse de IAPV'nin genetik ve serolojik olarak farklılıklarının bulunduğu bildirilmiştir (Maori vd. 2007). Son yıllarda ABD'de meydana gelen büyük koloni kayıpları ile yakından ilişkili olduğu düşünülen ve bu yönde araştırılan çalışmalarda ani sönme gelişen kolonilerin büyük çoğunluğunda IAPV tespit edilmiştir (Cox-Foster vd. 2007).

Genetik yapısından dolayı Dicistroviridae ailesinin yeni bir üyesi olarak karakterize edilen IAPV'nin genomik RNA büyüklüğü 9487 nükleotid 2 ORF bölgesine sahiptir (Maori vd. 2007). Bir ORF kodlama bölgesi sahip ve bir protein sentezi olan Picornaviridae ailesine benzemeyen özelliği 2 ORF bölgesine sahip olmasıdır (Palacios vd. 2008).

Chen vd. (2014)'te yaptıkları çalışmalarında arı kolonileri hiçbir klinik enfeksiyon bulgusu göstermese de, IAPV'nin yaygın olarak bulunduğunu ve IAPV-pozitif PCR sinyali, yumurta, larva, pupa, yetişkin işçiler, dronlar ve kraliçelerde ve arılar üzerinde beslenen *V. destructor*'da da tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Fransa'da tespit edilen ilk IAPV'yi bildirdiklerini belirten Blanchard vd. (2008) şiddetli kayıp ve ölüm oranı gösteren Fransa'da ki arılıktan arıları toplayarak İsrail Akut Felç Virüsü (IAPV) varlığı açısından RT-PCR ile taradıklarını ve iki farklı coğrafi bölgede bulunan 35 çalışma yapılan arılıktan 5i pozitif belirlenmiştir.

Bal arısı ölümleri son yıllarda Arjantinli arıcılar arasında da ciddi bir problem haline gelmiştir. Bu nedenle Reynaldi vd. (2011)'de Arjantin'deki birkaç ilden alınan örneklerde IAPV'yi tespit etmek için bir çalışma gerçekleştirerek ters transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma neticesinde Arjantin'in asemptomatik kovanlarında IAPV görülme sıklığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

2.8. *Varroa destructor*

Örümcek (*Araneae*), arı biti (*Braula coeca Nitzsch*), eşek arısı (*Vespa crabro L.*), büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella L.*), kulağakaçan (*Forficula auricularia L.*), arı kuşu (*Merops apiaster L.*), gümüş böceği (*Lepismatidae*) gibi birçok bal arısı zararlısının yanında *Varroa destructor*'da bulunmaktadır (Lermi 2010). Fakat *Varroa destructor* diğer bal arısı zararlılarından daha baskın bir şekilde 'arıcılık endüstrisini tehdit eden en ciddi zararlı' olarak anılmaktadır (Jiang vd. 2016). Bu küçük

akarın ününe yakışır bir şekilde aldığı 'yıkıcı' (destructor) ünvanı da bunu belirtir niteliktedir.

Varroa destructor, bal arısı (*Apis mellifera* L.) 'nin ektoparasitik bir akarıdır (Pritchard 2016). Asya anakarasına ait olan ve sadece *Apis* cinsi bal arılarında üreyen küçük akar grubundan biri olan varroa, dünyada hemen hemen her ülkeye hızlı bir biçimde yayılmıştır. Bal arısı kolonileri üzerinde büyük zararlara neden olan bu akar, bal arılarında (*Apis mellifera* L.) ilk kez görülmesinden günümüze kadar (Morse ve Laigo 1969) halen araştırılmaktadır.

Varroa destructor orijinalde Doğu Bal Arısı *Apis cerana* ile sınırlı bir parazitken, geçen yüzyılın ilk yarısında yeni ev sahibi *Apis mellifera*'ya geçtikten sonra, dünyadaki diğer ülkelere dağılmış ve günümüzde arıcılık için baş tehdit olarak görülmeye başlanmıştır. Varroozun neden olduğu hasar Avrupa'da ve ABD'de periyodik koloni kayıpları için önemli bir itici güç olarak düşünülmekte ve bu ülkelerde düzenli varroa tedavilerini zorunlu kılmaktadır. Dolayısıyla varroa araştırması, sadece konukçu-parazit ilişkisi ile değil, aynı zamanda arıcılık için sürdürülebilir çözümler bulmakla da yükümlü hale gelmiştir (Peter Rosenkranz vd. 2010).

Apis mellifera'ya *V. destructor*'un bulaşmasının arıcılar aracılığıyla olduğu yaygın olarak kabul gören bir gerçektir. *V. destructor* ve *A. mellifera* birlikte gelişmediğinden parazit /konukçu ilişkisinin olgunlaşmadığı dolayısıyla *A. mellifera*'nın varroaya karşı savunmasının yetersiz kaldığı tahmin edilmektedir. *V. destructor*, *Apis mellifera*'da hem işçi hem de erkek arıda (drone) kuluçka üretirken, doğal konakçısında sadece erkek arı sürüsünde çoğalmaktadır (Anderson ve Trueman 2000). Bu önemlidir çünkü işçi arıların kuluçka hücreleri erkek arı (drone) kuluçka gözünden çok daha fazla olmaktadır.

Varroa akarının neden olduğu ciddi sorunlardan biri de, bal arılarında ölümcül hastalıklara neden olan virüslerin bulaşmasına aracılık etmesidir. Bal arılarında bulunan virüslerin 50 yıldır bilim adamları tarafından bilinmesine rağmen varroanın yaygın bir sorun haline gelmesiyle (1980'li yıllara kadar) genellikle zararsız sayılan virüsler de başlıca sorun olarak ele alınmıştır (Moore vd. 2015).

O zamandan bu yana, yaklaşık yirmi bal arısı virüsü keşfedilmiş ve bunların çoğunluğu, fiziksel ve / veya biyolojik vektör olarak davranan Varroa akarları ile ilişkilendirilmiştir (Kevan vd. 2006).

V. destructor, hemen hemen tüm dünyaya kısa sürede yayılmıştır ve Avustralya dışında herhangi bir yerde varroa içermeyen bir bal arısı kolonisi bulmak artık zor görünmektedir. Periyodik tedavi olmadan, ılıman iklim koşullarındaki bal arısı kolonilerinin çoğu 2-3 yıllık bir süre içinde çökmekte ve sürekli uygulanan tedaviler, arıcılık maliyetlerini ve arı ürünlerinin kimyasal kalıntı riskini arttırmaktadır (Anderson ve Trueman 2000).

Varroa destructor, Avrupa'daki arıcılık ve bal arısı kolonilerinin sayısındaki azalışta önemli bir faktör olarak görülmektedir. Doğal polinatörlerin dünya çapında azalması ile birlikte, varroa akarı, gelecekteki tozlaşma olaylarındaki olumsuzluğu daha da arttırabileceği görülmektedir (De la Rúa vd. 2009). Bu nedenle varroa araştırmaları, arıcılık, böcek patolojisi ve akaroloji alanlarında çalışan tüm bilim adamları için bir mücadeledir.

Ongus vd. (2004)'de yaptığı çalışmada, *Varroa destructor*'da virüsün üreyebilme durumu araştırılmış ve varroa akarından virüslerin bulaşabildiğini kanıtlanmıştır, önceden de varlığı bilinen fakat önemsenmeyen virüsler varroa zararlısı yüzünden hemen hemen tüm ülkelerde sorun olarak bildirildiği belirtilmiştir.

Koyu-kızıl kahverengi renkte olan dişi yetişkin varroalar 1,1-1,2 mm uzunluğa sahip ve 1.6-1.7 mm genişliğindedir. Dişi varroalardan daha küçük gri-beyaz sarımsak renkte olan erkek varroalar 0,8-0,9 mm uzunluğunda ve 1-11 mm kadar genişliğindedirler. (Kaftanoğlu vd. 1992). Dişi varroalar; yetişkin bal arısı üzerinde, pupa veya larva üzerinde görülebilmekteyken erkek varroaları sadece petek gözler içinde görülmektedir. Bunun nedeni erkek varroaların hücre içerisinde dişilerle çiftleştikten sonra ölmeleridir (Akyol ve Korkmaz 2005).

Dişi varroalar delici-emici ağız yapısında olup, ağız tarafında eğri uçlu ve keskin bir çift kısıp bulunur. Her kısıp ileri geri hareket edebilmekte ve ön kısımda bulunan iğneler aracılığıyla arının segmentleri arasında kolaylıkla tutunabilmektedirler (Akyol vd. 1997). Kısıpçalarının iki yanlarında bulunan çift hareketli ağız kenarları vardır ve bunlar kütikula tabakasının delinmesini sağlamakta ve açılan delikten yetişkin arının hemolenfini emmekte kullanılmaktadırlar.

Dişi varroa, genellikle yetişkin arı üzerinde bir hafta kadar kalarak onun kanı ile beslendikten sonra ergin arıyı terk eder ve hücre kapanmadan hemen önce (5. İstar) (Boot vd. 1992) kapanma durumunda olan larvalı bir petek gözüne girer, orada larva kanını emerek beslenir, yumurtlar ve çiftleşirler. (Anderson ve Trueman 2000). Dişi petek gözlerine oranla, erkek petek gözlerinde yaklaşık 8-10 kat fazla sayıda varroa bulunur (Fuchs 1990). Bunun sebebi ise erkek arı hemolenflerinde varroanın üreyebilmesi için gereken juvenil hormonunun dişi arılardaki juvenil hormonuna göre fazla miktarda bulunmasındandır.

Ağız yapısı yetişkin arının hemolenfini emmeye uygun olmayan erkek varroalar, sadece spermlerini dişi varroaya aktaracak şekilde gelişmişlerdir, bu yüzden beslenemeyen erkek varroalar petek göz içerisinde çiftleştikten kısa bir süre sonra ölürlar (Tutkun ve İnci 1992).

Eğer bir kolonide varroa yoğunluğu fazla değilse o kolonide varroa uzun süre kendini belli etmeden yaşayabilmektedir. Çünkü varroa, bal arısının vücudundaki toraks ve abdomen segmentleri arasına girerek arı hemolenfiyle beslenirken, arıdan başka bir arıya ya da arıdan petek gözüne veyahut petek gözünden arı üzerine yerleşerek kovan içinde istediği gibi hareket edebilmekte ve belirti göstermeden uzun süre gizlenebilmektedirler ve bu şekilde parazit yoğunluğu artmadan yaşamlarını idame ettirebilmektedirler. Fakat çok az sayıda varroa bir yetişkin arı üzerinde görülse dahi koloni içerisindeki nüfus yoğunluğu çok hızlı bir şekilde artabilmektedir (Kaftanoğlu vd. 1992).

Bal arısının paraziti olan varroalar tıpkı bal arılarında olduğu gibi döllenmesiz yumurtadan erkek, döllenmiş yumurtadan ise dişi varroa üremektedir. Kapanacak larva gözüne giren dişi varroa hücre gözünün kapanmasından yetmiş saat sonra (Ifantidis 1983) ana akar (dişi varroa) yumurta bırakmaya başlar ve beş ila altı yumurta 30 saat aralıklarla atılabilir (Ifantidis 1983; Martin 1994). İlk yumurta haploiddir ve bir erkek akar halinde gelişirken, sonraki yumurta diploiddir ve dişi akara dönüşür (Rehm ve Ritter 1989; Martin 1994). Böylece 6,5-7 günde ergin duruma gelen erkek varroalar 5-6

günde erginleşen dişi varroalarla aynı dönemde yetişkin olmaktadır. Aynı anda ergin zamana denk gelen kardeş varroalar birbiriyle çiftleşerek dişi varroalar sperm kesesini doldurur ve anne varroayla birlikte hücreden çıkararak kendine yeni bir konukcu bulurken erkek varroalar ise çiftleştikten sonra ölerken hücre tabanında kalmaktadırlar (Donzé vd. 1996; Akyol ve Korkmaz 2005).

Eğer varroanın petek gözündeki sayısı, ikinin altındaysa bal arısının sadece yaşam gücünü azaltırken 3 ya da daha fazla sayıda olan varroa, bal arılarında kanat ve ayak deformasyonu, yaşam kısalığı, kanat yokluğu, erginlerin canlı ağırlıklarında azalma, erkek arılarda sperm kalitesi düşüklüğü, yavru yetiştirme azalması gibi birçok sorun olarak kendini göstermektedir (Kumova 2003).

Arı hemolimfi ile beslenen akar, arı sağlığı üzerinde önemli bir stres yaratır ve hem bireysel arılar hem de koloni için çeşitli olumsuz fiziksel etkilere neden olmaktadır. Varroa beslenirken pupaların yumuşak vücut dokusunu tekrar tekrar delerek fiziksel olarak yaralamakta olduğundan hemolenf kaybı organ gelişimini de olumsuz etkilemektedirler (Schneider ve Drescher 1987).

2.9. RT-PCR (Eş Zamanlı PCR/ Ters Transkriptaz PCR / Kantitatif PCR)

PCR (Polimeraz zincirleme tepkimesi), ismini aldığı polimeraz enziminin başrol oynadığı bir işlemin tanımıdır. Bilindiği üzere canlı vücudunda DNA eşlenmesi yapılırken kullanılan bu enzim (polimeraz) canlı hücrenin dışında da DNA eşlenmesinin yapılmayı istenmesiyle keşfedilmiş ve sentetik olarak üretilmiştir. Kısacası, canlı hücre içerisinde sürekli yapılan DNA çoğaltma işlemi bu cihaz ile taklit edilmiştir (Heid vd. 1996; Dorak 2007; Fraga vd. 2008).

Çoğaltılmak istenen örnek DNA, bir takım kimyasallar, primerler ve enzimlerin PCR cihazında muamelesiyle çoğaltılmıştır. Fakat canlı hücre içinde DNA eşlenmesini sağlayan enzimlerin görevlerini, PCR cihazı içerisinde ‘sıcaklıkların değiştirilmesi’ faktörü almıştır. Bu sıcaklık değişimleriyle ve polimeraz enziminin istenilen sürede aktif edilmesiyle DNA çoğaltımı sağlanmıştır.

30 yıldır varolan ve bilim insanlarının sürekli faydalandığı klasik PCR’ın ışığında daha yeni bir teknik olan RT-PCR cihazı geliştirilmiş ve RT-PCR son 20 yıldır sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

RT-PCR’ın kullanımının yapıldığı bazı konular; mRNA’nın seviyesini sayısal olarak saptama, tek nokta mutasyonlarını, DNA hasarını ve patojenleri saptayabilme, metillenme saptaması, SNP (Tek nükleotit polimorfizmi) analizi, kromozom bozukluklarının belirlenmesi gibi konulardır (Logan ve Edwards 2009).

Aynı zamanda RT-PCR; DNA çoğaltımı,

RNA’nın tek veya iki adımda DNA’ya çevrilmesi (RNA, cDNA, DNA),

DNA’nın sayısal olarak miktar tayini,

İşlem gerçekleşirken eş zamanlı olarak cihaz ekranından işlemin sonuçlarını göstermesi,

İşlem zamanını ve işgücünü kısaltması,

Olabilecek kontaminasyon riskini de en aza indirmesi gibi özellikleri bakımından da klasik PCR’ye göre üstün kabul edilmiştir (Dorak 2007).

RT-PCR, klasik PCR'dan farklı olarak floresan ışımaya yapan probaların (Sybr green, Taq Man) kullanılmasıyla fark yaratmış ve her ışımaya cihaz monitoründen izlenme ayrıcalığı sağlamıştır (Kubista vd. 2006).

Problar, floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik olarak dizayn edilmiş oligonükleotidlerdir. Floresan boyalar (problar); çoğaltılması amaçlanan DNA'nın belirli bir dizisine tamamlayıcı olacak şekilde dizayn edilebildiği gibi (Taq Man prob gibi zincire özgü ve sadece hedeflenen DNA çoğaldığında ışımaya yapabilen), primerin katlanmasıyla oluşan çift zincire (primer dimer) ve hedef genle ilgili olmayan yerlere bağlanabilen ve PCR ürününün doğru şekilde saptanabilmesi için erime eğrisi analizi (melt curve analysis) gerektiren problar da (Sybr Green) bulunmaktadır.

Her iki yöntemin de kendi içinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Çoğaltılacak hedef DNA spesifik değilse etidyum bromid ve SYBR Green I; eğer DNA'nın çoğaltılmak istenilen bölgesi, spesifik bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında ise floresan isaretili problar kullanılmaktadır (Logan ve Edwards 2009; Bişkin vd. 2011).

2.9.1. Touchdown PCR (TD-PCR)

Touchdown (TD) PCR, uzun optimizasyonlar veya primerlerin yeniden tasarımı gereksizdir, PCR'leri optimize etmek, özgünlüğü, hassasiyeti ve verimliliği artırmak için basit ve hızlı bir yöntemdir.

Touchdown PCR, kullanılan primerlerin öngörülen ergime sıcaklığının (T (m) üzerinde bir başlangıç bağlanma sıcaklığı kullanır ve daha sonra, ardışık döngüler boyunca daha düşük, bağlanmaya izin verici bir bağlanma sıcaklığına kademeli olarak geçiş yapar (Shen vd. 2007; Korbie ve Mattick 2008).

Doğru ve yanlış bağlanma arasındaki T (m) herhangi bir fark, döngü başına iki katlı bir avantaj sağlamaktadır. TD-PCR, RT-PCR'da (ters transkriptaz) dahil olmak üzere standart PCR protokollerinde yaygın olarak uygulanabilirliği ve aynı zamanda cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında ve tek nükleotid polimorfizm taramasında kullanılmaktadır.

TD-PCR, amplifikasyonu zor olan kalıplar için özellikle yararlıdır, ancak özgüllüğü ve ürün oluşumunu arttırmak için standart olarak da kullanılabilir. İşlem, DNA kalıp uzunluğuna bağlı olarak 90 ila 120 dakika arasında sürmektedir (Korbie ve Mattick 2008).

TD-PCR, dejenere primerlerin nonspesifik bağlanma durumunu engelleyen ve primerlerin bağlanma sıcaklığını tayin eden bir PCR yöntemidir.

Touchdown PCR yönteminde, bağlanma sıcaklığı döngüler arasında 1-2 C düşürülmekte optimal sıcaklık derecesi belirlenmekte ve bu en uygun olan sıcaklıkta kalan amplifikasyon döngüleri tamamlanmaktadır (Don vd. 1991; Bişkin vd. 2011).

PCR ile oluşan spesifik olmayan bantların oluşumunu önlemek için TD-PCR kullanılarak yapılan bir çalışmada (Suzuki vd. 2006) TD-PCR yönteminin amplifikasyon boyunca spesifik olmayan bantların oluşmasını önlediği bildirilmiştir.

2.9.2. Tek Adım (One Step) RT-PCR

Eş Zamanlı (Real Time) PCR tek adım ve iki adım olmak üzere iki ana yöntem altında birleşmektedir.

Eğer ters transkripsiyon işlemi (RNA'dan cDNA'ya dönüşüm) PCR ile aynı tüp içinde gerçekleştirilirse diğer bir deyişle; RNA cDNA'ya, cDNA DNA'ya dönüşüyorsa tek adımlı RT-PCR olarak tanımlanırken; ters transkripsiyon ayrı bir reaksiyonda cDNA'ya dönüştürülüp sonrasında cDNA'nın PCR reaksiyonuna eklenmesiyle gerçekleşirse bu işlem iki adımlı RT-PCR olarak tanımlanmaktadır (Zhao ve Wurst 2001).

Tek adımlı reaksiyonların birkaç avantajı vardır; bunlar, basit ve hızlı olması, örnekleme ve numune alma işlemlerini azaltması, daha az pipetleme aşaması (muhtemel hataları ve kontaminasyonu azaltması), yüksek verimli tarama için en iyi seçenek olması, yalnızca birkaç deneme tekrarlandığında en iyi yöntemin oluşturabilmesi gibi seçenekleri içermektedir. Ayrıca bu yöntem, hızlı bir şekilde kurulmakta ve ilgilenilen birkaç gen yükseltildiğinde, birden fazla RNA örneğinin işlenmesini kolaylaştırmaktadır (Wacker ve Godard 2005).

Yaklaşık 15 yıldır kullanılan bu cihaz birçok bilim insanı tarafından; hassas, güvenilir ve özgün (Pfaffl ve Hageleit 2001; Bustin vd. 2005; Kukielka vd. 2008; Mingxiao vd. 2013; Dong vd. 2018) olarak nitelendirilmekte ve geliştirildiği günden bu yana yüzlerce bilim insanı tarafından değerli bir araç olarak bilimsel çalışmalarında sıkça yer bulmaktadır (Lanciotti vd. 2000; Pfaffl 2001; Spackman vd. 2002; Jothikumar vd. 2006; Regge vd. 2012; Besnard vd. 2014; Babu vd. 2016; Darzi vd. 2018).

Bu nedenlerden yola çıkılarak bu tez konusu virüslerin araştırılması ve tayininde Taq Man prob tek basamak, Touch Down RT-PCR kullanılmıştır.

2.10. Bal arılarında Moleküler Çalışmalar

Apis mellifera L. ile ilgili yurt içi ve dışında yapılan çalışmalarda bal arılarında virüs yaygınlığı, virüslerin filogenetik karşılaştırılması, bal arılarında virüs/varroa sonuçlu mortalite, bal arılarındaki ölüm oranlarının *Varroa destructor* paraziti ile olan ilişkisi, virüs miktarlarının farklı evrelerdeki değişimi ve yoğunluğu, konuları ele alınmış ve bu amaçla tek adımlı ya da iki adımlı eş zamanlı kantitatif RT-PCR kullanılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları;

Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016), Hakkari'de 90 farklı arılıkta Akut Arı Felç Virüsü varlığı ve yaygınlığını RT-PCR kullanılarak araştırmış ve 90 arılığın iki tanesinde söz konusu virüse rastladıklarını bildirmişler ve çalışma yapılan bölgede bu virüsün yaygın olmadığı sonucuna varmışlardır. Bulunan iki örnekte ABPV'nin dünyadaki ırklarla akrabalık derecesini inceleyip filogenetik analizlerini yapmışlar ve çıkan sonuç neticesinde dünyadaki diğer ABPV'lerle % 85 - % 97 benzediğini rapor etmişlerdir.

Adjlane ve Haddad (2014) Deforme Kanat Virüsünün kovanlardaki yaygınlığı ile ilgili Cezayir'de ve Kuzey Afrika'nın büyük bölümünde gerçekleştirilmiş ilk çalışma olarak belirttikleri araştırmalarında DWV'nin bal arıları mortalitesi üzerindeki etkisini ve *Varroa destructor* parazitik akarı ile olan ilişkisini ele almışlardır. Çalışma neticesi

PCR sonuçları, *Apis mellifera intermissa* bal arısı kolonilerinin % 42'sinin bu virus ile enfekte olduğunu göstermiştir. Çalışmalarının *V. destructor* ve Deforme Kanat Virüsü arasında ayrıca arılıkta görülen ölüm vakaları arasında bağlantı olup olmadığının aydınlatılması bakımından önem arz ettiğini bildirmişlerdir.

Mingxiao vd. (2013), bal arılarını (*Apis mellifera*) etkileyen ve larvaların ölümüyle sonuçlanan pikornaya benzer bir virüs olan Çin Sacbrood Virüsü ile ilgili yaptıkları çalışmada klinik örneklerde Çin SBV'sini (CSBV) saptamak için çeşitli prosedürler mevcut olmasına rağmen CSBV enfeksiyonunun seviyesi tahmin edilmediğinden bu virüsün hızlı tespiti ve kantifikasyonu için bir test geliştirmeyi amaçlamışlardır. CSBV yapısal protein genleri için spesifik primerler ve probler tasarlayarak TaqMan temelli eş zamanlı kantitatif PCR oluşturmuşlardır. Deneyin özgüllüğü, duyarlılığı ve stabilitesi değerlendirmişlerdir ve özgüllüğünün yüksek olduğunu veya diğer arı virüsleri ile çapraz reaktiviteye girmediklerini vurgulamışlardır. Test, 37 klinik örnekte CSBV'yi saptamak için uygulanmış ve etkinliği, klinik tanı, elektron mikroskopisi gözlemi ve konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırılmıştır. TaqMan CSBV için MGB tabanlı prob flüoresans gerçek zamanlı kantitatif PCR test edilen diğer yöntemlerden daha duyarlı, hassas, güvenilir olduğunu ve bu çalışmanın, CSBV testi, epidemiyolojik araştırmalar ve hayvan modellerinin geliştirilmesi için yararlı bir protokol oluşturmuş olduğunu bildirmişlerdir.

Gauthiera vd. (2007), bal arısı kolonilerinde hastalık semptomu göstermeyen birçok viral hastalıkların arazide teşhisinin zor olduğunu ve bu nedenle bal arısı ve varroadaki altı farklı RNA virüsünün yükünü tespit etmek için bir moleküler metot geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bu amaçla görünüşte sağlıklı 360 koloniden varroa ve bal arısı toplanmışlardır. Yapılan analizler sonucunda, bazı örneklerde çok geniş ölçüde viral titre saptamışlar ve kolonideki viral enfeksiyonları teşvik edebilen varroanın bazı RNA virüslerinin kaydedilen yüksek titresinin doğrulandığını bildirmişlerdir.

Kukielka vd. (2008), İspanya bal arılarında (*Apis mellifera L.*) en yaygın virüslerden Deforme Kanat Virüsü ve Siyah Kraliçe Hücre Virüsünün tespitini SYBR Green (SG) kimyasına dayanan tek adımlı bir eş zamanlı RT-PCR ile araştırmışlardır. Tanımlanan tek adımlı S-G Real Time PCR ile gizli enfeksiyonlara neden olan bu bal arısı virüslerini saptamak ve ölçmek için hızlı, doğru ve kullanışlı bir teknik olduğunu kanıtladıklarını belirtmişlerdir.

Chen vd. (2005) yetişkin bal arılarında kanat deformitesine ve erken ölüme neden olan birçok arı virüsü gibi belirgin bir semptom göstermeyen gizli bir enfeksiyon olarak devam eden DWV ile ilgili çalışmalarında ters transkripsiyon RT-PCR ve Southern hibridizasyonunu kullanarak, deforme kanatlı ve deforme olmayan yetişkinler de dahil olmak üzere bal arılarının tüm yaşam evrelerinde DWV'yi araştırmışlar ve farklı yaşam evrelerindeki DWV seviyelerini, TaqMan RT-qPCR kullanılarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca parazit akar *Varroa destructor*'da DWV bulduklarını ve bu yüzden varroanın DWV yi bulaştırdığını düşündüklerini vurgulamışlardır. Bununla birlikte, normalde akar parazitliği (yumurta ve larva) ile bağlantılı olmayan yaşam evrelerinde virüsün saptanması, diğer bulaşma şekillerinin de olabileceğini belirtmişlerdir.

Blanchard vd. (2014) SBV'nin nicelendirilmesi için iki aşamalı taqman temelli RT-qPCR analizinin geliştirilmesi ve semptomatik bal arısı kolonilerinin saha araştırmasına uygulanması için yaptıkları çalışmada SBV miktarını belirlemek için

semptomatik arılardan (larvalar, pupalar, erişkin arılar) FAM-TAMRA kullanarak TaqMan teknolojisi temelli iki adımlı RT-PCR testi geliştirmişlerdir. Test sonuçlarının güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğini, deneyin performansının teyit edildiğini ayrıca SBV nicelleme semptomatik larvalarda virüs yükünün klinik bulgusu olmayan örneklerle göre anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Shah vd. (2009) Japonya'daki agresif arıların beyinlerinden izole edilen pozitif iplikçikli bir RNA virüsü olan, arılar arasında dikey ve yatay olarak bir koloni halinde bulaştığı bilinen, arılarda hem semptomatik hem de asemptomatik enfeksiyonlara neden olabilen DWV'nin bal arısı *Apis mellifera L.* nin beyindeki lokalizasyonunu saptamak için RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. DWV ile enfekte arılardaki virüsün, görme ve koku alma olaylarından sorumlu nöropiller de dahil olmak üzere beynin kritik bölgelerinde çoğaldığını gösteren bulgular elde etmişlerdir. Bu nedenle, beyindeki DWV enfeksiyonu, kritik duyu işlevlerini olumsuz bir şekilde etkileyebilir ve normal arı davranışını değiştirebildiğini belirtmişlerdir.

Chantawannakul vd. (2005) Tayland'da bulunan (*Varroa destructor*) akarlarda arı virüslerinin ilk raporu olduğunu belirttikleri çalışmada Tayland bal arısı kovanlarından varroa akarları toplayarak RT-PCR (taqman) ile bal arısı virüslerinin varlığına bakmışlardır. Akar örnekleri üzerinde (*Varroa destructor*) söz konusu yedi arı virüsünün beş tanesini tesbit ettiklerini ve yaptıkları bu çalışmada arı virüslerinin tek bir akar üzerinde bir arada bulunup bulunmadığına dair kanıt sağladığını bildirmişlerdir.

Grabensteiner vd. (2007) bal arısı (*Apis mellifera L.*) Akut Arı Felci Virüsü (ABPV), Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV) ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsünün (SBV) eş zamanlı tespiti için multipleks tek aşamalı RT-PCR kullandıklarını belirterek viral genomların korunan bölgelerinde her virüs için spesifik üç primer seti tasarlayarak RT-PCR testlerini kombine multipleks analizi ile en yüksek duyarlılık ve özgüllük için optimize ettikleri RT-PCR testini Avusturya bal arısı kolonilerinden alınan saha örnekleri üzerinde test etmişlerdir. Çalışma neticesinde her üç virüsü de tespit ettiklerini ve bunu PCR ürünlerinin dizilimi ile teyit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kukielka vd. (2009) sybr green (SG) kimyasına dayanan iki adet tek adımlı eş zamanlı RT-PCR testlerini, Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) ve Akut Arı Felci Virüsü'nün (ABPV) tespiti, farklılaştırılması ve nicelendirilmesi için sırasıyla uyarlamışlardır. Viral tespit ve teşhisi, erime eğrisi analizi ve PCR ürünlerinin dizilimi ile teyit etmişlerdir. Her iki tekniği de İspanya bal arısının virüs örneklerini değerlendirmek ve bu virüslerin dağılımını sağlamak için kullanmışlardır. Sonuçlarda Akut Arı Felci Virüsüne rastlamadıklarını ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsünün ise düşük frekanslarda görüldüğünü bildirmişlerdir.

Genersch vd. (2006), Deforme Kanat Virüsü (DWV) ile verimli bir şekilde virüs bulaştırılmış arıların (*Apis mellifera*), pupal evrelerde *V. destructor* vasıtasıyla kanat ve diğer morfolojik deformiteleri gösteren yetişkinlere dönüştüğünü belirtmiş ve DWV ile enfekte olan bal arılarında görülen kanat deformitelerine benzeyen belirtilerin bombus arılarında da (*Bombus terrestris*, *Bombus pascuorum*) ilk kez ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Klinik olarak DWV'nin saptanması için spesifik RT-PCR protokollerini kullanarak, bombus arılarına DWV bulaştırdıklarını göstermişlerdir.

Simeunović vd. (2014) bu çalışmayı farklı Sırp bölgelerinden getirdikleri 55 bal arısı kolonisi ile gerçekleştirmişlerdir. Deforme Kanat Virüsü (DWV) ve Akut Arı Felci

Virüsü (ABPV) varlığı açısından TaqMan tabanlı RT-PCR kullanarak test ettikleri sonuçlarda, her kovanlıkta DWV varlığını, 11 kovanlığın 10'unda ise ABPV olduğunu ortaya koymuşlardır. Asemptomatik kolonilerde yüksek DWV (% 76,4) ve ABPV (% 61,8) pozitif numuneler olduğunu rapor ederek RT-PCR tekniğinin bu tür bir araştırma için en güvenilir yöntem olduğu bildirmişlerdir.

Siede vd. (2008) bal arısı kolonilerinin aşırı kışlama kapasitesinde Akut Arı Felci virüsünün önemini belirtmek için arazi koşulları altında yaptıkları çalışmada 2004 yılından 2006 yılına kadar Almanya'da topladıkları örneklerden kontrollü bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Açıklayıcı değişken olarak kış öncesi ABPV yükü üzerinde yoğunlaşan ikili lojistik regresyon modeli kullanarak başarılı bir şekilde kışlama kolonilerini (kontrol) kış ölümleri ile karşılaştırma yapmışlardır. ABPV yükünü ölçmek için bir SYBR Green tabanlı eş zamanlı PCR protokolü geliştirip RNA'ya bağlı RNA polimeraz bölgesine melezleşen bir ABPV'ye spesifik primer çifti kullanarak yöntemin spesifik ve tekrarlanabilir olduğunu kanıtlamışlardır.

Yue ve Genersch (2005) bal arısının viral patojeni olan ve çoğunlukla gizli bir enfeksiyon olarak devam eden veya bal arılarında kanat deformitesine neden olan Deforme Kanat Virüsü (DWV) tespiti için yakın geçmişte geliştirilmiş olan RT-PCR protokolü kullanmışlardır. *Varroa* enfeksiyon seviyelerinde farklılıklar olan kovanlardan kaynaklanan varroaların ve sakat arıların varlığını analiz etmişlerdir. Enfekteli arıların hemen hemen tüm vücut bölgelerinde DWV replikasyon göstermiş ve akarları DWV varlığı açısından incelediklerinde, populasyonlarda farklılık gösterdiğini görmüşlerdir. Buna ek olarak, DWV'nin sadece bazılarında çoğaltılabildiği gösterilmiş ve akarlardaki virüs replikasyonunun kanat deformitesiyle korelasyona girdiğini belirtmişlerdir.

Bakonyi vd. (2002) yetişkin arıların ve parazit akar *Varroa destructor*'ın araziden alınan örneklerinde Akut Arı Felci Virüsü'nün oluşumunu belirlemek için iki yıllık bir çalışma yapmışlar ve viral nükleik asidi ters transkripsiyon RT-PCR kullanarak saptadıklarını belirtmişlerdir. Görünüşte sağlıklı 114 Macar bal arısı kolonilerinden topladıkları örneklerin 14'ünde ABPV RNA'nın varlığını saptadıklarını belirtmişlerdir. Araştırmada, arıların üçte ikisinin ABPV ile % 12.2 enfekte olduğunu, incelenen sekiz diğer kovanlıkta ise (% 87.5) ani çöküşten sonra kolonilerden virüs varlığı tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu kolonilerin aynı anda *Nosema apis* veya *Varroa destructor* ile enfekte olduğunu da rapor etmişlerdir. RT-PCR'ın amplikonunu dizileyerek nükleik asit dizisi, % 93 homolojiyi ortaya çıkaran GeneBank veritabanında biriktirilen tam ABPV dizisine hizaladıklarını bildirmişlerdir.

Tozkar vd. (2015), 2010 yılında sekiz bölgede koloni kaybı araştırmaları için, 158 arıcının kolonisi ile gerçekleştirdikleri araştırmada (98'i göçer, 60'ı sabit arıcı) ve 2011 yılında, yedi farklı bölgedeki 221 arıcılık araştırmasını değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada örneklerden herhangi birinde KBV, IAPV ve SBV saptamadıklarını belirtmişlerdir. Bu örneklerde sadece ABPV, DWV bulunduğunu, iller arasındaki arı patojenlerinin dağılımı ve 2010 yılında arıcılık uygulamaları ile önemli oranda farklılık gösterdiğini görmüşlerdir. Genel olarak, Bitlis, Hatay, Muğla ve Ardahan'da DWV yükleri diğer bölgelerden daha yüksek görülürken ABPV, Bitlis'teki en yaygın ve özellikle göçmen arıcılarının örneklerinde yüksek oranda tesbit etmişlerdir. 2011 yılında DWV yükleri bölgeler arasında önemli farklılıklar gösterdiğini belirterek DWV yüklerinin Muğla, Hatay ve Yığılca'da daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yığılca ve Ardahan'daki sabit arılardan alınan örneklerde ve Hatay, Muğla göçmen örneklerinde ABPV görülme oranının en yüksek olduğunu,

Hatay'ın sabit kolonilerinde ise en düşük seviye olduğunu gözlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, ABPV yükleri Yığılca-Kırklareli ile Yığılca-Muğla arasında fark gösterdiğini ($p=0,0398$ ve $p=0,0478$) belirterek Muğla ve Ankara'daki ABPV yüklerini, 2010 yılında göçmen arıcılık örneklerinde, sabit arıcılık örneklerine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. 2011 yılı örneklerinin arasında göç kolonilerinin patojen yüklerinin Muğla ve Hatay'da da daha yüksek olduğunu ancak sonuçların anlamlı bulunmadıklarını da rapor etmişlerdir.

Muz ve Muz (2009)'da Hatay ilinde koloni çökmesine uğramış arılıklardaki kraliçe arılarda yaptıkları araştırmada çöken kolonilerdeki DWV'nin varlığını ve birden fazla parazitin olup olmadığına bakarak bu iki öge arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırma sonucunda bal arısı örneklerinde DWV, *Nosema sp.*, *Malpighamoeba mellificae* ve *Varroa destructor* tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca Türkiye'de çöken kolonileri olan arılarda çok sayıda parazit enfeksiyonu bulunan bal arı kraliçelerinde DWV'nin ilk kaydı olduğunu da rapor etmişlerdir.

Gümüşova vd. (2010)'da bu çalışmayı Karadeniz bölgesinde 28 farklı kovanlıktan 10 ar işçi arı (toplamda 280 bal arısıyla) toplayarak gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada 3 bal arısı virüsünü (ABPV, CBPV, BQCV) Rt-qPCR ile tesbit etmek için yaptıkları analiz sonuçlarında ABPV'ye rastlamadıklarını, CBPV ve BQVV nin ise pozitif olduğunu belirterek ayrıca Türkiye de bu virüslerin ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir.

Özkırım ve Schiesser (2013) Türkiyenin 20 farklı şehrinde farklı iklimlerde hem RT-PCR hem Nested PCR kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda IAPV virüsünü tespit ettiklerini ve tüm sonuçları jel elektroforezinde gözlemlediklerini belirterek, farklı illerdeki 71 numunenin 15'inde IAPV'yi kaydettiklerini belirtmişlerdir. Bu virüsün kış koloni kayıplarıyla ilişkisini de inceleyerek istatistik verilerin kış ölümleri ve IAPV ile ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bunun Türkiye de ilk tespit edilen IAPV virüsü olduğunu rapor etmişlerdir.

Muz ve Muz (2017), 2015 ve 2016 yılları içinde yaptıkları çalışmada Tekirdağ'daki farklı arılıklardan bal arısı numuneleri (koloni popülasyonundaki beklenmeyen azalma veya ani koloni kaybı gösteren kovanlardan) toplayarak incelemişlerdir. Sonuçta 17 arılıktan 510 bal arısı örneğini, DWV, *Nosema cerenae* ve *Varroa destructor* yönünden kontrol etmişlerdir. Arılıkların tümünde varroa, 15'inde DWV ve 5'inde ise *Nosema cerenae* bulduklarını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ani koloni kaybında bu üç tür materyalin koloni çökmesindeki oranlarını bulmayı hedeflediklerini belirtmişlerdir.

Amiri vd. (2014) bal arılarının bir hastalığı olarak bilinen Kronik Arı Felci Virüsü ile ilgili yaptıkları çalışmada koloni içindeki tek üreme bireyi olan kraliçede bulunan CBPV patojenini araştırmışlar ve kraliçelerin CBPV 'ye duyarlılığına ilişkin deneyler yapmışlardır. Duyarlılık deneyinden elde edilen sonuçlar, enfeksiyon sonrası işçi arılara kıyasla, kraliçelerde benzer bir hastalık ilerlemesi göstermemiştir. Enfekte kraliçelerin enfeksiyondan sonra 6. güne kadar belirti gösterdiğini ve virüs düzeylerinin 1011 kopyaya ulaştığını belirtmişler. Semptomatik işçi arılarına zorla temas eden kraliçeler altı günde kafa başına en fazla 1011 virüs kopyasıyla belirgin bir enfeksiyon kazanmasına karşın semptomatik işçi arılarla temas halindeki kraliçelerde, ancak kovanın dışındaki sağlıklı arılardan yiyecek alma şansı ile sağlıklı çıktıklarını görmüşlerdir. Dokuz gün sonra bu kraliçelerin çoğunda virüs yükleri 107'yi geçmediğini

ve semptomatik işçi arıların, belirgin bir enfeksiyona neden olması için, yeterli düzeyde aktif CBPV parçacıklarını trofallazis yoluyla kraliçeye iletebileceğini bildirmişlerdir.

Boncrisiani vd. (2009), yıllardır bal arısı viral hastalıklarının altında yatan patojenetik mekanizmaların anlaşılmasının, virüs yayılımı için bir hücre kültürü sisteminin bulunmamasıyla ciddi şekilde engellendiğini belirtmiş ve virüs replikasyonunun belirlenmesinin virüslerin patogenezi sürecinin anlaşılmasına yönelik önemli bir adım olacağını vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmada, bal arılarında ve bal arısı parazitik akarı olan *Varroa destructor*'da DWV çoğaltmasının analizi için iplikçik-spesifik RT-PCR tabanlı bir yöntem geliştirdiklerini ve biyotinlenmiş primerler ve manyetik boncuklarla TaqMan RT-PCR kullanarak, bal arılarında DWV enfeksiyonunun çoğaltılması ve doku tropizmini karakterize etmiş olduklarını bildirmişlerdir.

Chen vd. (2006) bal arısı kolonilerinde Akut Arı Felci Virüsü, Siyah Kraliçe Hücre Virüsü, Kronik Arı Felci Virüsü, Deforme Kanat Virüsü, Kaşmir Arı Virüsü ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü dahil altı arı virüsünün transmisyon mekanizmalarını ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR) yöntemlerini kullanarak incelemişlerdir. Kraliçelerin virüs durumunu, hemolimf, bağırsak, yumurtalık, spermateka, kafa ve iç organları dahil olmak üzere kraliçelerin dışkı ve dokularındaki virüs varlığını da incelediklerini belirtmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda kafa dokusu haricinde beş dokunun yanı sıra kraliçe dışkılarını da virüs enfeksiyonları bakımından pozitif bulmuşlardır. Arı kolonilerindeki kraliçeler BQCV, DWV, CBPV, KBV ve SBV için pozitif olarak tanımlandıklarında, yavrular, yumurtalar, larvalar ve yetişkin işçilerin de aynı virüslerde pozitif olarak tanımlandıklarını belirtmişlerdir. Öte yandan, kraliçeler yalnızca iki virüs, (BQCV ve DWV) için pozitif olduklarında, bu iki virüs kraliçenin yavrularında da pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Yumurtalıkların dokusunda virüs varlığı ve kraliçenin yumurtaları ve genç larvalarında aynı virüslerin bulunması, kraliçelerden yavrulara virüslerin dikey olarak bulaştığını göstermekte olduğunu, ayrıca bu çalışmanın bal arısı kolonilerinde virüslerin dikey geçişinin ilk kanıtı olduğunu rapor etmişlerdir.

Abd-El-Samie vd. (2017) tarafından yapılan bir araştırmada, Mısır Giza Valiliğinden alınan arılarla gerçekleştirilmiş olup, baş, göğüs ve karından toplam RNA ve varroa akarları için değerlendirilmiştir. Sırasıyla 250 ve 540 bç Deforme Kanat Virüsü ve Kakugo (işçi arılarının beyinlerinde en sık görülen pikornaya benzeyen bir virüs) virüslerinden oluşan iki fragmenti, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak amplifiye etmiş, sekanslamış ve analiz etmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda ise; DWV negatif olan asemptomatik bal arısı örnekleri dışındaki arı vücudu parçalarının, güçlü bir şekilde DWV sonuçlandığını rapor etmişlerdir.

Youssef vd. (2015) erişkin bal arılarında bulaşıcı bir hastalığa neden olan CBPV hakkında yaptıkları çalışmada, iki saflaştırılmış CBPV majör RNA'sının in vivo inokülasyonunun sonuçlarını sunmuşlar ve RNA 1 ve RNA 2'nin bulaşıcı olduğunu göstermişlerdir. Bal arısı başına 109 RNA kopyasıyla aşıladıklarını ve aşılandıktan sonraki 6 gün içinde felç belirtileri geliştiğini belirtmişlerdir. Enfeksiyon boyunca CBPV RNA kopyaları sayısının önemli ölçüde artmış olduğunu belirterek, CBPV RNA'nın negatif iplikçiklerini RT-PCR ile tespit etmişlerdir. Aşılanmış bal arılarındaki CBPV parçacıklarını elektronik mikroskopi ile görselleştirmişlerdir. Bu sonuçlar, CBPV RNA 1 ve CBPV RNA 2 bölümlerinin virüs replikasyonunu indükleyebildiğini ve CBPV virüsü partikülleri üretebildiğini belirtmişlerdir.

Ribiere vd. (2007)'de yaptıkları bir çalışmada, arı dışkısında bulaşıcı Kronik Arı Felci Virüsünün varlığını ve dolaylı bir enfeksiyon yolu olarak rolünü değerlendirmişlerdir. Felçli arıların örneklerini, saflaştırılmış virüs ile deneysel inokülasyon yoluyla üretilen kronik felç sergileyen kovanlardan toplamışlar ve arı kafaları veya dışkılarıdaki CBPV'yi RT-PCR ile tespit etmişlerdir. CBPV RNA, doğal olarak ve deneysel olarak enfekte olan arıların dışkılarında ve yapay olarak CBPV ile enfekte olan arılarda ayrıca enfekte olmuş bir koloninin zeminini kaplamak için kullanılan kağıt sayfalarında sistematik olarak tespit etmişlerdir. Arıların dışkılarından alınmış virüs ile arıların intratorasik (göğüs içi) olarak aşılması ve kontamine kovanlarda arıların yerleştirilmesiyle hassas arılarda belirgin bir hastalık yarattığını belirterek böylelikle virüsün bulaşıcı olduğunu dair kanıt geliştirmişlerdir. Araştırmalarındaki bu dolaylı enfeksiyon yolunun açık kronik felce yol açabileceğini de vurgulamışlardır.

Benjeddou vd. (2001)'de yaptıkları çalışmada ABPV ve BQCV bulguları için kullandıkları RT-PCR ile ABPV'den 900 bp ve BQCV'den 700 bp'lik bir fragmenti çoğalttıklarını belirterek, her iki genomun 3 'ucundan 1 kb'lik alanda spesifik PCR primerleri tasarlamışlardır. Guanidinyum tiosiyanat, silika zar yöntemini sağlıklı ve enfekte olmuş pupa numunelerinden RNA çıkarmak için kullanmışlardır. Kör bir teste (marka bildirmeden yaptırılan ürün değerlendirilmesi) RT-PCR, ABPV ve BQCV içeren örnekleri başarıyla tespit ettiklerini, saflaştırılmış ABPV'nin yaklaşık 1,600 genom eşdeğerlerinde, BQCV'nin ise 130 genom eşdeğerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Locke vd. (2014) yaptıkları bir çalışmada bilinen tüm arıcılık hastalıklarına göre daha fazla hasar veren ve dünya çapında bir dağılıma sahip bal arısı ektoparazitik akarı *Varroa destructor* kaynaklı koloni ölüm oranlarının akar tarafından vektörize edilen sekonder virüs enfeksiyonlarının bir sonucu olduğunu ve bunun varroaya karşı dirençli bal arısının virüs enfeksiyonlarına direnç veya tolerans içerebileceği anlamına geldiğini belirtmişlerdir. İsveç Gotland adasındaki akarlara dayanıklı (MR) Avrupa bal arısı popülasyonu için durumun böyle olup olmadığını görmek istemişler ve bu nüfusun, kontrol edilemeyen akar istilasından yıllar geçtikçe kurtulduğunu ve varroaya özgü direnç özellikleri geliştirdiklerini gözlemlemişlerdir. Gotland MR popülasyonunda geç dönem virüs enfeksiyonlarını, varroa akar istila ve bal arısı koloni popülasyon dinamiklerini izlemiş ve bunu, kovanlık yakınlarda bulunan mite duyarlı (MS) kolonilere RT-qPCR tekniklerini kullanarak kıyaslamışlardır. Yazdan sonbahara kadar Deforme Kanat Virüsü (DWV) titreleri MR ve MS popülasyonları arasında benzer şekilde artarken, Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV) ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) titreleri MR popülasyonunda MS popülasyonuna kıyasla önemli ölçüde birkaç derece azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca MR kolonileri bir sonraki kışı yüksek akar istilası, yüksek DWV enfeksiyonu ve düşük oranlarda sonbahar kuluçkalıklarından sağ kurtarılan; MS kolonilerinin hepsinin yok olduğunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Tentcheva vd. (2005) *Apis mellifera* L. ve *Varroa destructor*'daki Deforme Kanat Virüsü'nün (DWV) RNA yüklerini izlemek için iki aşamalı niceliksel bir RT-PCR tahlili uyguladıklarını ve rastgele DWV RNA polimeraz gen bölgesinin korunmuş bir alanında melezleşen bir çift primer dizayn ettiklerini belirtmişlerdir. Bu primerlerin SYBR-green kullanılarak nicelendirilmiş 69 nükleotid fragmentinden çoğaltılmış olduğunu belirterek yöntemin deneysel olarak doğrulanması için farklı PCR tabakları üzerinde tekrarlamışlardır. Pupa öncesi erkek arılar üzerinde yapılan RT-PCR analizi, DWV RNA yükleri, parazitlenen birkaç ana akar hücrelerinde daha yüksek görünmüş fakat işçi arılarda DWV prevalansı doğrudan akar istila edilmesiyle ilişkilendirilmiş ve

DWV'nin yumurta dışındaki tüm arı gelişim evrelerinde tespit edildiği belirtilmiştir. DWV RNA yükleri klinik belirtinin olmaması durumunda bile kaydedilmiş; deforme kanatlarla ortaya çıkan arılar ağırlıklı olarak DWV ile enfekte olmuşlardır. Gelişmekte olan arılar üzerinde toplanan akarlarda ise DWV RNA verimi, 104 ila 106 kopya arasında değiştiğini, ancak bazı durumlarda 108 kopyayı aşabildiğini bildirmişlerdir.

Baker ve Schroeder (2008)'de Devon'da yaptıkları çalışmada, kolonilerde düşük seviyelerde bulunan ve tipik olarak enfeksiyon belirtileri göstermeyen bal arısı *Apis mellifera* L. virüslerini RT-PCR kullanılarak 23 kovanlıkta 6 arı virüsünün varlığı açısından taramışlar, buldukları pozitif kolonileri viral genetik çeşitlilik açısından analiz etmişlerdir. Kolonilerin % 97'si Deforme Kanat Virüsü (DWV) için pozitif sonuçlanırken, % 29'u Akut Arı Felci Virüsü (ABPV) için pozitif olarak gözlenmiş ve % 1,4'ü hem Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) hem de Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü (BQCV) için pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak; çoklu enfeksiyonların yaygınlığını ve kolonilerin % 32'sinden fazlasının virüsle enfekte olduğunu bildirmişlerdir.

Antúnez vd. (2006), arıların Uruguay ve dünya genelinde periyodik olarak yüzleşmesi gereken ciddi bir sorun olarak niteledikleri bal arısı mortalitesini ele alıp diğer patojenlere ek olarak, kolonide RNA virüslerinin varlığının da mortaliteler üzerinde rolü olabileceğini belirtmişlerdir. *Varroa destructor* ve *Nosema apis* bakımından pozitif ve negatif olan Uruguay bal arısı kolonilerinden sağladıkları örneklerini Kronik Arı Felci Virüsü, Akut Arı Felci Virüsü, Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü, Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü ve Deforme Kanat Virüsü bakımından test etmişlerdir. Farklı illerdeki virüslerin tespiti, kolonilerin birkaç virüs tarafından eşzamanlı olarak bulaşması ve örneklerin % 96'sının bir veya daha fazla virüs ile enfekte olması gerçeğinin yaygınlığını rapor etmişlerdir.

Martin (2001), bal arısı *Apis mellifera*'nın dünya çapındaki bir zararlısı olan ekto-parazit akar *Varroa destructor*'ın koloni ölümlerindeki rolünün pek anlaşılmasına rağmen milyonlarca koloninin ölümüyle bağlantılı olduğunu belirtmiştir. Yaptığı çalışmada, koloni ölümünün her zaman gerçekleşmediğini göz önüne alarak varroa akarı ile ana arı kolonisinin çöküşü arasındaki bağlantıyı açıklamak için bir simülasyon modeli geliştirip akar tarafından vektörlenmiş iki virüsün (DWV, APV) konakçı koloni üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Daha önce yayınlanmış iki simülasyon model olan bir arı ve bir akarı birleştirmiş ve çeşitli arı hastalıklarıyla ılıman iklim koşullarında kullanılmak üzere uyarlamıştır. Model, DWV'nin başlangıçta koloni üzerinde çok az etkili olduğunu, ancak yazın geç döneminde DWV'yi ileten akarların popülasyonunun artmasıyla virüsün, aşırı miktarda kışlayan nüfusa giren sağlıklı genç arıların sayısının azalmasına neden olduğunu görmüştür. Kışlayan arıların yaş yapısındaki bu dengesizlikten dolayı, kışın veya ilkbaharda koloninin ölümüne neden olduğu gözlemlenmiş sonbaharda ise 2000-3600 kadar akarın koloniyi öldürebileceğini bildirmiştir.

Martin vd. (2012), Hawai bal arısına varroa akarlarının bulaşmasının bal arısı virüslerinin yaygınlığı, yükü ve suş çeşitliliğindeki değişiklikleri araştırmalarına olanak sağladığını belirtmişlerdir. Varroa akarının bal arısı popülasyonlarında % 10'dan % 100'e kadar varan bir viral titre olan Deforme Kanat Virüsü (DWV) yaygınlığını artırırken viral titrede bir milyon kat artışı beraberinde getirmiş ve DWV çeşitliliğinde büyük bir azalma gözlenip tek bir DWV suşunun baskınlığına yol açtığını

bildirmişlerdir. Bu nedenle varroanın yaygınlaşmasıyla, DWV'nin en yaygın ve bulaşıcı böcek virüslerinden biri olmasına izin verdiğini bildirmişlerdir.

Locke vd. (2012) bal arısı (*Apis mellifera*) kolonilerinin azalmasında etkili olan ve bal arılarının sağlığını tek başına veya birlikte etkileyen bir takım stres faktörleri tespit etmişlerdir. Genellikle akar ile sıkı sıkıya ilişkili olan bal arısı virüsü ve ektoparazitik akar *Varroa destructor* 'ın kolonideki popülasyonunu kontrol etmek için kullanılan böcek ilaçlarının bal arısı sağlığını farklı şekillerde etkileyebilecek karmaşık bir stres faktörü oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bir akarisit tedavisinde akara maruz bırakılan yetişkin arılarda Deforme Kanat Virüsü (DWV), Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) ve Siyah Kraliçe Hücre Virüsünün (BQCV) enfeksiyon dinamiklerini analiz edip, bunların ilişkili olduğu varroa akarları ile enfekte olmayan pupaların tümünü kontrol kolonilerindeki benzer numunelerle karşılaştırmışlardır. Ortaya çıkan sonuçta DWV titrelerinin akarisit uygulamasının başlamasıyla birlikte arttığını ve daha sonra kademeli olarak varroa akarının ortadan kaldırılması ile azaldığını belirtmişlerdir. DWV titrelerindeki başlangıçtaki bu artışı, tau-fluvalinatın viral enfeksiyona duyarlılığı üzerinde fizyolojik bir etki olarak yorumlamışlardır. Yetişkin arılarda ve enfekte olmayan pupalarda DWV titrelerinin, tedavi edilen kolonilerde tedavi edilmemiş kolonilerden daha yüksek kaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca; SBV ve BQCV titrelerinin, akar ile herhangi bir doğrudan ilişki göstermediğini ve akarisit tedavisinin çeşitli olası etkilerini gösterdiğini düşündüklerini belirtmişlerdir. Sonuçlar, varroa akarı istilasının yanı sıra diğer faktörlerin kolonilerde zararlı DWV titrelerinin geliştirilmesi ve korunması için önemli olabileceğini göstermekte olduğunu bildirmişlerdir.

Prisco vd. (2011) İsrail Akut Felç Virüsü ile yaptıkları bu çalışmada *Varroa destructor*'ın bal arılarında IAPV'yi vektörleme kabiliyetine sahip olduğunun ilk kanıtını sunduklarını bildirmişlerdir. Bal arısı, IAPV virüsü taşıyan varroa akarlarına maruz kaldıktan sonra IAPV ile bulaştığını ve arılardaki IAPV'nin kopya sayısı, varroa akarlarının yoğunluğu ve varroa akarlarına maruz kalma süresi ile pozitif korelasyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Dahası, akar virüs birlikteliğinin konakçı bağışıklığını azaltabileceğini ve dolayısıyla virüs replikasyonunun seviyelerini yükselttiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın, IAPV'nin bulaşmasında varroa akarlarının aktif rolü olduğunu ve bal arılarındaki IAPV enfeksiyonunun epidemiyolojisi üzerine ışık tuttuğunu bildirmişlerdir.

Santillan-Galicia vd. (2008), DWV ile ilgili yaptıkları çalışmada arıların pupal gelişimi sırasında enfeksiyona maruz kaldıklarında kanat deformasyonuna neden olduklarını belirterek saha gözlemleri ve laboratuvar deneylerinin akar *Varroa destructor*'ın virüsün bir vektörü olduğunu önermekte olduğunu ve DWV'nin bu akar içinde çoğaldığı belirtilmiştir. Yaptıkları çalışmanın amacının, *V. destructor*'un DWV iletimindeki rolünü anlamak, akar içindeki DWV'nin birikmesini veya replikasyon alanlarının immünohistokimyasal olarak bulunmasını sağlamak olduğunu açıklamışlardır. Yapılan analizlerde hiçbir dokuda DWV'ye spesifik antikor bağlanmadığı için akar DWV'nin çoğaldığına dair bir kanıt bulunmadığını fakat sadece *V. destructor*'un orta bağırsak lümeninde, büyük, yoğun küreleri andıran yapılarda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Gisder vd. (2009) yaptıkları bir çalışmada normalde gizli enfeksiyonlara neden olan ancak arılara *Varroa destructor* tarafından ulaştığında morfolojik deformite veya ölüme yol açarak arılar üzerinde yıkıcı etkilere neden olabilen Deforme Kanat Virüsü (DWV) araştırmışlardır. *V. destructor*'un sakat kanatların gelişimindeki rolünü

belirlemek için bireysel akarları DWV'nin varlığı ve replikasyonu için analiz ettiklerini bildirdikleri çalışmada akarlardaki viral kopyalama ile morfolojik olarak deforme olan arılarla arasındaki korelasyonunun desteklediğini görmüşlerdir. Viral genom eşdeğerlerinin nicelleştirilmesi, belirgin bir DWV enfeksiyonu indükleyebilen akarların, akar başına 1010-1012 genom eşdeğeri içerdiğini ortaya koymuştur. Aksine, sakat kanatlara neden olamayan akarlar, akar başına yalnızca 108 viral genom eşdeğeri içerdiğini tesbit etmişlerdir. Deforme kanatların gelişmesinin yalnızca *V. destructor* tarafından DWV iletimine değil, aynı zamanda *V. destructor*'da viral replikasyona ve parazitleşen akarların DWV titresine de bağlı olduğu sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir.

Ongus vd. (2004) yaptıkları bu çalışmada kesitlenmiş *Varroa destructor* akar dokusunun elektron mikroskobu görüntülerinde 27 nm virüs benzeri partiküllerin biraraya toplandığını gözlemlediklerini ve bireysel parçacıkların dağılık oluşumu ve virionların sitoplazmada birikmesi neticesinin bu virüsün, akar içinde çoğaldığını açık bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Safılaştırılmış virüsün RNA'sının dizilim analizi, İflavirus cinsinin üyeleriyle yüksek benzerlik gösteren bir genom organizasyonunu ortaya çıkarmıştır. Polimerazın filogenetik analizi, virüsün arılardaki Deforme Kanat Virüsü (DWV) ve Kakugo Virüsü (KV) ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu virüs için önerilen ad *Varroa destructor* virüsü 1 (VDV-1) 'dir. VDV-1'in akarlarda çoğalıp çoğalmadığını belirlemek ve negatif-sense RNA iplikçiklerinin varlığını saptamak için seçici bir RT-PCR yapılmıştır. Virüs izolatu ve yakından ilişkili DWV, her biri bir virüse özgü, iki primer seti tarafından ayırım yapılabileceğini belirterek her iki virüsün de incelenen akar türlerinin popülasyonunda çoğaldıklarını bildirmişlerdir.

Yue vd. (2007) bir kolonide *V. destructor* yoksa DWV enfeksiyonun, görünür semptomlara neden olmadığını ve akardan bağımsız geçişin gizli bulaşmalara neden olabileceği belirtilmiş, varlığında ise hastalık semptomlarının olmaması ve virüsün dikey bulaşması ile karakterize etmişlerdir. DWV için dikey bulaş enfeksiyonları göstermek için DWV'nin dikey iletim yolları üzerinde ayrıntılı bir çalışma yapmışlardır. Toplamda, sekiz bakire kraliçeden çıkan ve aynı kraliçelerden DWV negatif (üç kraliçe) veya DWV-pozitif (beş kraliçe) sperm ile suni dölleme yapıldıktan sonra aynı sayıda döllenen yumurta ayrı ayrı analiz edip F0 kraliçeleri ve dronlar ile F1 dronları ve işçileri de viral RNA için analiz ettiklerini belirtmişlerdir. İn situ hibridizasyon ile, DWV pozitif olmayan yumurta bırakan bir F0 kraliçesinin yumurtalığında viral diziler tespit edilmiş ve DWV pozitif meni ile dölllenmiştir. Sonuç olarak, sırasıyla kraliçelerden drone ve işçi yavrularına, döllenenmemiş ve döllenen yumurtalar yoluyla dikey olarak aktarıldığı gösterilerek, döllenen yumurtalarda viral sekanslar, kraliçeden ve aynı zamanda DWV pozitif meni vasıtasıyla dronlardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Möckel vd. (2011) koloni kayıplarında başrol oynayan patojenlerden birisinin Deforme Kanat Virüsü (DWV) olduğunu belirterek, deforme kanat sendromu olarak ortaya çıkan DWV enfeksiyonlarının, DWV'yi yatay olarak ileten ektoparazitik akar *Varroa destructor*'dan sonra bal arısı için tehdit oluşturmaya başladığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, virüs ile kanat deformatsi arasındaki belirtinin direkt nedensel bağlantısının henüz kurulamadığını fakat, farklı yatay iletim yollarının etkisini ve özellikle akarların belirgin DWV enfeksiyonlarının gelişimindeki rolünü değerlendirmek için pupa ve erişkin arılara enfeksiyon testleri uygulamışlardır. DWV ile enjekte edilen pupaların, yetişkin arılarda deforme kanatlarla karakterize belirgin

infeksiyonları geliştirdiklerini göstermek suretiyle, DWV'nin pupa tarafından bulaşması halinde, deforme kanat sendromunun etkeni olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir.

Moore vd. (2011) Deforme Kanat Virüsü ile *Varroa destructor* virüs-1 (VDV-1) arasında, bal arılarında ve *Varroa destructor* akarlarında DWV'den daha yüksek seviyelerde biriken yeni rekombinantları tanımlamak için yüksek verimli Illumina dizilişini kullandıklarını bildirmişlerdir. Rekombinantların, VDV-1VVD ve VDV-1DVD, 5'-UTR ile yapısal (kapsid) ve yapısal olmayan viral proteinleri kodlayan bölgeler arasında çapraz geçişler sergilemekte olduğunu bu genomların modüler olduğunu ve insan enterovirüslerinde gösterildiği gibi her bölgenin bağımsız olarak evrimleşebileceğini belirterek, bal arısı pupalarını, gözlemlenen rekombinantların ve DWV'nin bir karışımı ile enfekte etmişler ve sonucunda bal arısı pupalarında ve ilişkili akarlarda VDV-1DVD seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Nielsen ve Kryger (2008) yaptıkları bir çalışmada yüksek derecede kışlık ölüm oranına sahip olan arılardan yetişkin bal arıları örneklerini ve hastalık semptomları olan kovanların yavrularını Akut Arı Felci Virüsü (ABPV), Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü (BQCV), Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV), Deforme Kanat Virüsü (DWV), Kaşmir Arı Virüsü (KBV) Ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) bakımından RT-PCR ile analiz etmişlerdir. Altı virüs tespit edilmiş ancak frekanslar önemli derecede değişiklik göstermiştir. 78 kovanlıkta SBV, 55'te DWV, 11'de ABPV, 4'te CBPV, 1'de BQCV ve 1'de KBV bulunduğu belirtilmiş ve bunun, Danimarka'daki KBV'nin ilk kaydı olduğunu rapor etmişlerdir. Arı örneklerinin büyük çoğunluğuna bir veya daha fazla virüs bulaştığı, tek, ikili ve üçlü enfeksiyonlar gözlemlendiği belirtilmiştir. Her virüsün PCR ürünlerinin nükleotid dizilerini belirleyip CBPV haricinde GenBank katımlarına % 98-99 özdeş olduğu bildirmişlerdir.

Chen vd. (2005) bireysel bal arısı *Apis mellifera* L. Akut Arı Felci Virüsü, Kronik Arı Felci Virüsü, Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü, Deforme Kanat Virüsü, Kaşmir Arı Virüsü Ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü gibi altı bal arısı virüsünün varlığı açısından incelemişlerdir. Örneklerde ABPV dışındaki tüm virüslerin tespit edildiğini ve virüs enfeksiyonlarında muayene edilen kraliçeler arasında % 93'ünden fazlasının virüs enfeksiyonuna maruz kaldığını rapor etmişlerdir. Kraliçelerdeki virüslerin tespiti, enfekte kraliçelerin yumurtaları yoluyla yavrularına virüs geçirebileceği dikey bir aktarım yolu olasılığını artırdığını bildirmişlerdir.

Francis vd. (2013), arı kolonilerinin çökmesinde yüksek oranda şüpheli olarak görünen varroa akarları ve virüsler hakkında yaptıkları bir yıl süren çalışmada varroa yükü ve Akut-Kaşmir-İsrail kompleksi (AKI) ve Deforme Kanat Virüsü'nün (DWV) mevsimsel değişimlerini gözlemlemişlerdir. Toplamda 23 koloniden (15 kovanlık) üç ayrı deneme uygulayarak organik asitler (11 koloni), piretroid (9 koloni) ve tedavi edilmemiş (3 koloni) bal arılarındaki varroa akarlarının viral titrelerini gözlemlemişlerdir. Nisan 2011'den Ekim 2011'e ve Nisan 2012'ye kadar her ay yaklaşık 200 arı örneklendirdiklerini belirten araştırmacılar, 200 arı 20 arıdan 10 altı örneğe bölerek ayrı ayrı analiz etmişler ve bunun virüs bulaşmış arıların yaygınlığını belirlemelerini sağladıklarını belirtmişlerdir. Çalışmalarının sonucu olarak; varroa muamelesinin akar yükünü azalttığı koloniler başarıyla kışı geçirmiş, akarların ve virüslerin arılarla bir sonraki sezona taşınmasına izin vermişlerdir. Genel olarak, AKI ve DWV titreleri tedaviye belirgin bir yanıt vermezken, sezon boyunca Nisan'dan Ekim'e kademeli olarak artmıştır. Tedavi edilmeyen kontrol grubunda titreler belirgin biçimde

artmış ve viral kopyalar varroa akarlarının sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Kış aylarında çökmüş olan çoğu koloni, ekim ayında hayatta kalanlara kıyasla AKI ve DWV titrelerini önemli ölçüde yükseltmiş ve kışın sadece tedavi edilen kolonilerin hayatta kaldığını bildirmişlerdir.

Garbian vd. (2012) bal arılarının (*Apis mellifera*) zorunlu bir ektoparaziti olan *Varroa destructor* hakkında yaptıkları araştırmada İsrail Akut Felç Virüsüne homolog bir dizi ile çift sarmallı RNA (dsRNA) ile besledikleri bal arılarının, viral hastalığa karşı korunduğunu bildirdiklerini belirtip, arılar tarafından alınan dsRNA, varroa akarına, akardan da parazitlenmiş arıya aktarıldığını göstermişler. Arı ve varroa arasındaki karşılıklı dsRNA değişimi bu genlerde susturma hedeflemiş ve akar popülasyonunda % 60'ın üzerinde bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle, bu omurgasız konakçı ile onun ektoparaziti arasında gen susturma tetikleyici moleküllerin aktarılmasıyla, varroa kontrolüne kavramsal olarak yeni bir yaklaşımın getirilebileceğini de bildirmişlerdir.

Zioni vd. (2011) İsrail'deki arılarda viral patojenleri saptamak için ülke çapında geniş ölçekli yapılan araştırmada Deforme Kanat Virüsü (DWV) ve *Varroa destructor*-1 virüsünün (VDV-1) önemli oranda görülme oranını ortaya koyduğunu belirterek bu virüslerin bal arılarının deforme kanat sendromuna olası katılımını anlamak için semptomatik ve asemptomatik olarak enfekte olan arılardaki replikasyonlarını, kantitatif eş zamanlı RT-PCR ve büyük viral kapsid proteininin immunodeteksiyonu ile niteliksel ve kantitatif olarak incelemişlerdir. VP1-. İlk kez ortaya çıkan semptomatik arılarda VDV-1 ve / veya bir VDV-1-DWV rekombinant virüsünün replikasyonunu bulduklarını bildirmişlerdir. Bu virüsler, yüksek kopya sayısına kopyalanarak viral partiküllerin daha sonra birleştirilmesi için işlenmiş büyük viral kapsid VP1'i vermişler. Bulgularının, VDV-1 ve VDV-1-DWV ile enfekte semptomatik ve asemptomatik arılar arasında açık bir şekilde ayırım yapmış olduğunu ve DWV'ye ek olarak VDV-1'in deforme kanat patolojisine neden olabileceği hipotezini önermektedirler. Böylece VDV-1-DWV rekombinasyonu, varroa ile enfekte olan arı kolonilerinde belirgin enfeksiyonlara neden olan virülan suşları üretebileceğini bildirmektedirler.

Grabensteiner vd. (2000) Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsünün (SBV), bal arısı larvalarını (*Apis mellifera*) enfekte ederek pupaların ölümle sonuçlanmasına neden olduğunu belirtmişler ve 2000 yılında yaptıkları bu araştırmada kısa süre önce SBV'nin tüm nükleotid dizisinin belirlendiğini ve bu verilerle, bu virüslerin doğrudan, hızlı ve hassas algılanması için ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR) testi ile çalıştıklarını bildirmişlerdir. Enfekte olmuş bal arısı ve coğrafi olarak farklı bölgelerden köken alan larvalar kullanılarak SBV genomunun beş farklı bölgesini hedeflemek için RT-PCR kullanmışlardır. RT-PCR testi, coğrafik kökene bakılmaksızın enfekte olan bal arısı örneklerinde SBV nükleik asidinin doğrudan tespiti için hızlı, spesifik ve hassas bir teşhis aracı olduğunu belirterek, filogenetik analizde en az üç farklı SBV genotipinin varlığını ortaya koymuşlardır.

Sanpa ve Chantawannakul (2009) altı bal arısı virüsü üzerinde Kuzey Tayland'da yaptıkları çalışmada RT-PCR kullanılarak araştırmalarını gerçekleştirdiklerini ve Tayland'daki arıların yaklaşık % 80'inde virüs bulunduğunu belirtmişlerdir. Test edilen örneklerin Deforme Kanat Virüsü (DWV), Akut Arı Felci Virüsü (ABPV), Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) Ve Kaşmir Arısı Virüsü (KBV) için pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak; toplanan numunelerde ne Kronik Arı Felci Virüsü ne de Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü nükleik asitlerinin tespit edilemediğini rapor etmişlerdir.

Williams vd. (2009) işçi ve erkek arılarda genellikle asemptomatik etki gösteren bal arılarındaki DWV ile yaptıkları çalışmada *Varroa destructor*'un parazitizasyonu ile bağlantılı yoğun enfeksiyonların ortaya çıktıktan 67 saat sonra işçi arıların kanat deformitesine ve ölümüne neden olabileceğini belirtmişlerdir. Kanada'nın Nova Scotia kentinde *V. destructor* ile enfekte olmuş iki koloniden gelen on işçi ve üç dron ayrıca Kanada'nın Prince Edward Adası'ndan *V. destrucor* ile enfekte olmuş iki koloniden yeni ortaya çıkan iki kraliçeyi, DWV için analiz etmişlerdir. Kanat morfolojisine bakılmaksızın, tüm işçilerde ve dronlarda DWV'yi tespit ettiklerini ve bu çalışmanın Atlantik Kanada'dan gelen DWV'nin ilk raporu olduğunu bildirmişlerdir.

Desai vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada Deforme Kanat Virüsününün (DWV), semptomatik arılarda kanat deformitesi, asemptomatik arılarda ise prematüre ölümle ve koloni performansı ile ilişkili olduğunu belirtmişler ve ilk instar larvayı ve yetişkin *A. mellifera*'yı, DWV ile aşılansmış arılardaki DWV'ye spesifik çift sarmallı (ds) bir RNA yapısı olan DWV-dsRNA ile besleyerek DWV enfeksiyonunu azalttıklarını belirtmişlerdir. DWV'nin larvalarla beslenmesinin, varroa akarlarının yokluğunda yetişkin arılarda kanat deformitesine neden olduğunu ve yetişkin arılarda DWV verilmeyen arılara kıyasla hayatta kalma oranlarının düşmesine neden olduğunu da eklemişlerdir. Virüs ile aşılama öncesi DWV-dsRNA ile larvaların beslenmesi, DWV'nin viral seviyesini düşürmüş olduğunu ve DWV ile beslenen yeşil floresan protein-dsRNA'ya (muhtemelen RNA sessizleşmesinin bir sonucu) ait kanat deformitesini azalttığını da bildirmişlerdir. DWV-dsRNA'nın beslenmesi, larvaların hayatta kalma oranlarını etkilemediğini bu da dsRNA'nın larvalara toksik olmadığı anlamına geldiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak; virüs ile aşılama öncesi yetişkin işçilere DWV-dsRNA verilmesinin ömürlerini uzattığını ve kontrollere göre DWV konsantrasyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Berényi vd. (2006)'da yaptıkları çalışmada; Akut Arı Felci Virüsü (ABPV), Siyah Kraliçe Hücresi Virüsü (BQCV), Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV), Deforme Kanat Virüsü (DWV), Kaşmir Arısı Virüsü (KBV) ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsünün oluşma, prevalans ve dağıtım şekilleri (SBV), ters transkripsiyon-PCR kullanılarak nüfus azalması, ani çökme, felç veya koyu renklenme semptomlarından mustarip 90 Avusturya bal arısı kolonisinde araştırmışlardır. Avusturya'nın her yerinden aldıkları örneklerde en yaygın virüsün DWV (% 91'inde), sırasıyla ABPV, SBV ve BQCV olduğunu belirtmişlerdir (sırasıyla % 68, % 49 ve % 30). Çoğu örnekte birden fazla virüs tespit ettiklerini ve ABPV, BQCV, CBPV ve SBV'nin dağılımını araştırdıkları farklı coğrafi bölgeler arasında önemli derecede farklılık gösterdiklerini ve DWV'nin Avusturya'nın tüm federal eyaletlerinde yaygın olarak gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Özellikle koyu renk ve yönelim bozukluğu gösteren arılarda CBPV'yi tespit ettiklerini belirterek, DWV ve ABPV'nin eşzamanlı enfeksiyonları, zayıflık, nüfus azalması ve ani çökme görülen kolonilerde daha sık gördüklerini de eklemişlerdir. Aynı kovanlık içindeki görünüşte sağlıklı kolonilerden aldıkları arıların benzer bir virüs dağılımı göstermiş olduğunu; bununla birlikte, göreceli virüs yükü hastalıklı kolonilerdeki arılarından 10 ila 126 kat daha düşük olduğu da rapor etmişlerdir.

Chen vd. (2004) uniplex RT-PCR kullanarak bal arısı kolonilerini Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV), Deforme Kanat Virüsü (DWV), Kaşmir Arısı Virüsü (KBV) ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) dahil olmak üzere birkaç arı virüsü varlığı açısından taramış ve bu kolonilerden arılardaki karışık virüs enfeksiyonlarını saptamışlardır. Tek arının aynı anda dört virüs taşıyabileceğini ilk kez bildirdiklerini belirterek, aynı zamanda birden fazla arı virüsünün eş zamanlı tespiti için multipleks

RT-PCR testi de geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Multipleks RT-PCR testinin fizibilite ve özgünlüğünü, bu testin arı kolonilerinde karışık virüs enfeksiyonlarının eşzamanlı muayenesi için etkili bir araç olduğunu, arazideki ve laboratuardaki bal arısı viral hastalıklarının teşhisi ve gözlemi için faydalı olacağını da önermektedirler. Virüslerle kodlanan varsayımsal helikaz ve RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) 'nin filogenetik analizi, DWV ve SBV'nin ortak bir nesilden gelen organizmalar grubunda olduğunu ortaya koyarken, KBV ve BQCV'ın, bitkiler, böcekler ve omurgalılara enfekte olan diğer pikorna benzeri virüslerle farklı bir çizgiye ait olduğunu belirtmişlerdir. Bu virüslerin saha araştırmalarından elde edilen sonuçlar, bal arısındaki BQCV, DWV, KBV ve SBV'nin karışık enfeksiyonlarının muhtemelen virüslerin geniş coğrafi dağılımına bağlı olarak ortaya çıktığı fikrini belirtmişlerdir.

Lanzi vd. (2006) bal arılarının deforme olmuş kanat virüsünü tanımlarken (DWV), karakteristik kanat deformiteleri, abdominal şişkinlik, felç ve ortaya çıkan yetişkin arıların hızlı ölüm oranı ile yakından ilişkili olduğunu vurgulayarak DWV'yi hastalıklı arılardan saflaştırıp genomunu klonlamış ve DWV'nin sekansını yapmışlardır. DWV genomik RNA'sının uzunluğu 10, 140 nükleotid olduğunu ve bir 328 kDa polipeptidini kodlayan tek bir geniş ORF içerdiğini belirtmişlerdir.

Shen vd. (2005) bal arılarındaki viral hastalıkların arıcılıkta büyük bir sorun olduğunu, dünya çapında ciddi ekonomik kayıplara neden olduğunu belirterek, bal arıları, akarlar ve koloni azalması arasındaki ilişkinin anlaşılmasını arttırmak için Kaşmir Arı Virüsü ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü'nü incelemişlerdir. KBV için antikor bazlı bir test geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada ELISA ve RT-PCR kullanarak, poliklonal antikor üretimi için iki yapısal rekombinant protein saflaştırmışlar ve KBV SBV varlığını, farklı gelişim aşamaları ve arı kovanları arasındaki ilişkiyi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Sonuçlar, KBV'nin son derece düşük viral-kapsid protein seviyeleri ile viral bir genom halinde kalabileceğini ve KBV'nin ve SBV'nin bal arılarına ortak enfekte edebileceğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışma, hem kraliçelerde hem de yumurtalarda KBV ve SBV RNA'larının RT-PCR ile var olduğunu göstermiş ve transovarial (yumurta yoluyla) bir geçiş yolunu düşündürdüğünü belirtmişlerdir. Yatay geçiş, yetişkin arılar arasında ve erişkin işçilerden larvalarına gıda kaynakları yoluyla da geçmesinin muhtemel olabileceğini belirtmişlerdir, çünkü her iki virüs, tüm gelişim evrelerinde ve besin kaynaklarında (besin, bal, polen ve arı sütü) tespit edilmiştir. Dahası, akarların ve bunların tükürüklerinin her ikisinde de virüsler olduğu için, akarların yatay iletim için bir başka olası yol olduğu gösterilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada, ilk kez, varroadaki virüslerin bir araya geldiğini tespit ettiklerini ve akarların farklı arı virüslerini vektörlemede önemini altını çizdiklerini bildirmişlerdir. Bu nedenle, bu sonuçların bal arısı viral hastalıkları için çoklu enfeksiyon yollarının varlığına ışık tuttuğunu belirtmişlerdir.

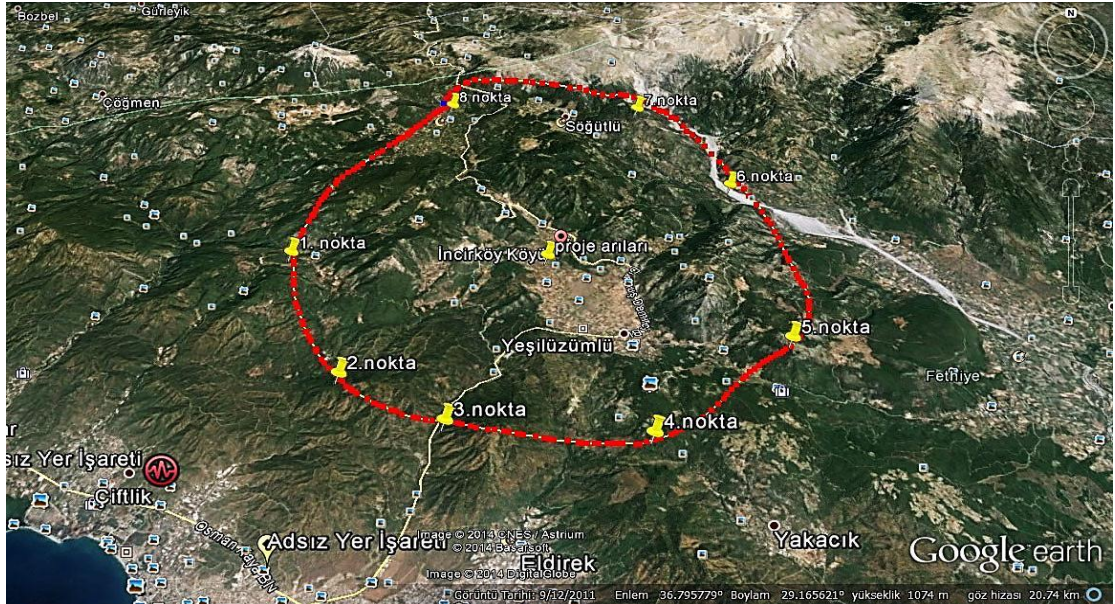
Gülmez vd. (2009), birçok ülkede DWV'nin rapor edilmiş olmasına rağmen, Türkiye'de bugüne kadar herhangi bir DWV enfeksiyonunun varlığına dair bir rapor bulunmadığını belirterek, Ordu ilinden *Apis mellifera* L. ve *V. destructor*'da DWV'nin varlığını tek adım ters transkripsiyon PCR ile test etmişlerdir. Sonuç olarak, yaptıkları çalışmada sağlıklı arıların DWV ile enfekte olduğunu göstermişlerdir. PCR ürün dizilerinin BLAST analizi, bilinen DWV virüs izolatlarının polipeptid genine% 96-98 benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan bal arısı örnekleri Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) tarafından sağlanmıştır. MAYBİR bünyesinde Muğla Bal arısında (*Apis mellifera anatoliaca*) Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına Karşı Direnç Geliştirilmesi" (TAGEM-11/AR-GE/13) isimli proje kapsamında 100 koloni hijyenik davranış bakımından 4 kuşak ıslah edilmiştir.

Islah çalışmaları deniz seviyesinden 601 metre yükseklikte olan Türkiye'nin güney batısında yer alan Muğla ilinin Fethiye ilçesinin İncirköy mevkiinde ($36^{\circ} 46' 20.0208''$ // $29^{\circ} 12' 57.9492''$) yapılmıştır (Şekil 3. 1). Ayrıca bu arazinin başka bir kısmında üzerinden herhangi bir ıslah çalışması yürütülmeyen 100 adet Muğla bal arısı kolonisi de bulunmaktadır.



Şekil 3. 1. Örneklerin alındığı Muğla ekotipi bal arıları için izole edilen (kırmızı çizgi içerisinde kalan) ıslah alanındaki İncirköy'ün kuşbakışı görünümü

Tamamlanan bu tez projesinin materyalini sağlamak için İncirköy'e 2-9 Nisan 2017 tarihlerinde gidilerek hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş ve edilmemiş kovanlardan 50'şer adet bal arısı rastgele seçilmiştir. Hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş kovanların ve kontrol gurubu kovanların her birinden 10'ar adet işçi ve 10'ar adet kapalı hücrelerden pupa örneği alınarak önceden hazırlanmış falkon tüplere konulmuştur. Aynı tüplere örnek alınan kovan numaraları da yazılarak hangi kovandan hangi örneklerin alındığı tespit edilmiştir. Böylece, hijyenik ve hijyenik olmayan kolonilerde 500' adet işçi, 500'er adet pupa toplanmıştır (Şekil 3.2). Toplam deneme materyalini 2000 adet arı örneği oluşturmuştur.

Proje önerisinde belirtilmesine rağmen, olumsuz mevsim koşullarından dolayı örnek toplanan tarihte kovan içerisinde yeterli sayıda erkek arı bulunamamıştır. Bunun da, koloni gelişimini kötü etkileyebileceği göz önüne alınarak erkek arı alınmamıştır.



Şekil 3. 2. Muğla-Fethiye-İncirköy³'teki Muğla ekotipi bal arılarından yetişkin işçi bal arısı ve kapalı gözlerden pupa örneklerinin alınması

Ayrıca, proje konusu virüsler ile varroa yükü arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla arı örneği alınan her bir kovandan dip tahtası yöntemiyle varroa sayıları belirlenmiştir.

³ "Muğla Bal arısında (*Apis mellifera anatoliaca*) Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığına Karşı Direnç Geliştirilmesi" (TAGEM-11/AR-GE/13) projesinin yürütüldüğü izole edilmiş bölge içindeki ıslah alanı

3.2. Metot

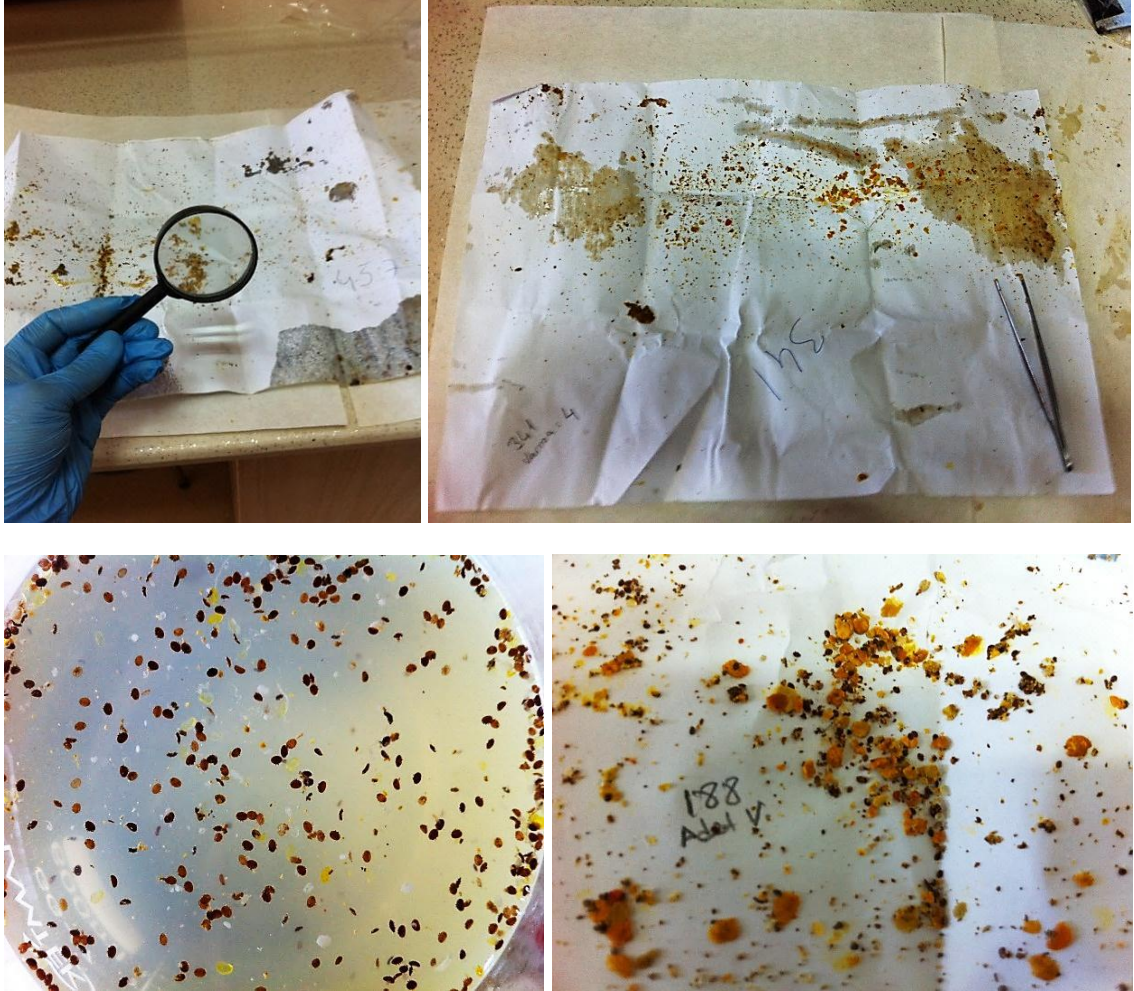
Proje kapsamında uygulanan metotlar alt başlıklar halinde aşağıda sıralanmıştır.

3.2.1. Varroa Yükünün Belirlenmesi

Arı numunelerinin toplandığı kovanların varroa yüklerini tespit edebilmek için bal arısı örneklerinin alındığı kovanlarda dip tahtası yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntemde, hijyenik ve hijyenik olmayan bal arısı örneklerinin alındığı tüm kovanların tabanına aynı boyutta beyaz kağıt serilmiş, ardından kovan içerisine rulamit içeren duman verilmiştir.

Duman verilen kovanlar bir saat bekletildikten sonra Rulamit içeren dumanın etkisiyle işçi arıların üzerinde bulunan varroalar tabana dökülmüştür. Son olarak dip tahtası üzerine serili beyaz kağıtlar katlanıp kilitli poşetlere konularak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvarda açılan her bir kağıt üzerinde bulunan varroalar bir büyüteç yardımıyla sayılıp kayıt edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Dip tahtası yöntemiyle toplanan varroaların sayımı

3.2.2. Proje Konusu 5 Virüsün Tespiti

Projenin araştırma konusu olan ABPV, CBPV, IAPV, SBV ve DWV patojenlerin tespit edilebilmesi için uygulanan yöntemler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır. Virüslere özgün primer ve TaqMan problemler ile gerçekleştirilen çalışmalar birbirini takip eden basamaklardan oluşmaktadır.

Total RNA İzolasyonu Aşaması:

- 1) İşlem öncesinde laboratuvar ve tezgah temizliği yapılarak çalışılacak ortam sterilize edilmiştir. Kullanılacak mikrosantrifüj tüpleri ve diğer malzemeler otoklavlanmıştır, otoklavlanmayan malzemeler DNA ve RNA'dan steril materyallerden seçilmiştir (RNase / DNase Free).
- 2) Saf su ile yıkanacak olan bal arıları örneklerini kurutmak için 40 x 40 ölçülerindeki kurutma kağıdı tezgah üzerine serilmiş ve kaymaması için yapıştırılarak sabitlenmiştir.
- 3) Ardından konik (falcon) tüplerin kapağındaki numaralar sabitlenen kurutma kağıdının üzerine yazılarak, örneklerin konulacağı yer belirlenmiş ve işaretlenmiştir.
- 4) Aynı şekilde, araziden toplandıktan sonra alkol içinde muhafaza edilen örneklerin bulunduğu konik (falcon) tüplerin kapağındaki numaralar 1,5 µl mikrosantrifüj tüplerinin üzerine yazılarak bal arılarının hangi tüpten alındığı da işaretlenmiştir.
- 5) Konik tüplerde etanol içinde bekleyen bal arısı örneklerinden etanolün uzaklaşması için ön çalışmada uygulandığı gibi yıkama işlemi için 5-6 beher içine saf su konularak hazırlanmıştır.
- 6) Her bir konik tüpten sırasıyla bal arıları alınarak beherlere konulan saf su içerisinde 3dk yıkanmıştır. Saf su içinde yıkanan arılar, üzerindeki etanolü bu su içerisine bıraktığından saf su bulanıklaştığında yenisiyle değiştirilmiştir.
- 7) Her yıkanan örnek, kurutma kağıdına yazılan sıraya göre dizilerek kuruması için 1 gün boyunca bekletilmiştir (Şekil 3.4.).
- 8) Bu işlem sırasıyla; kontrol grubu olarak toplanan (hijyenik davranış bakımından ıslah edilmemiş) yetişkin dişi bal arılarına (50 adet mikrosantrifüj tüp içinde bulunan örnekler) ve pupalarına (50 adet m.tüp) ayrıca hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş yetişkin dişi bal arılarına (50 adet m.tüp) ve pupalarına aynı şekilde uygulanmış ve -80 °C de muhafazası sağlanmıştır.



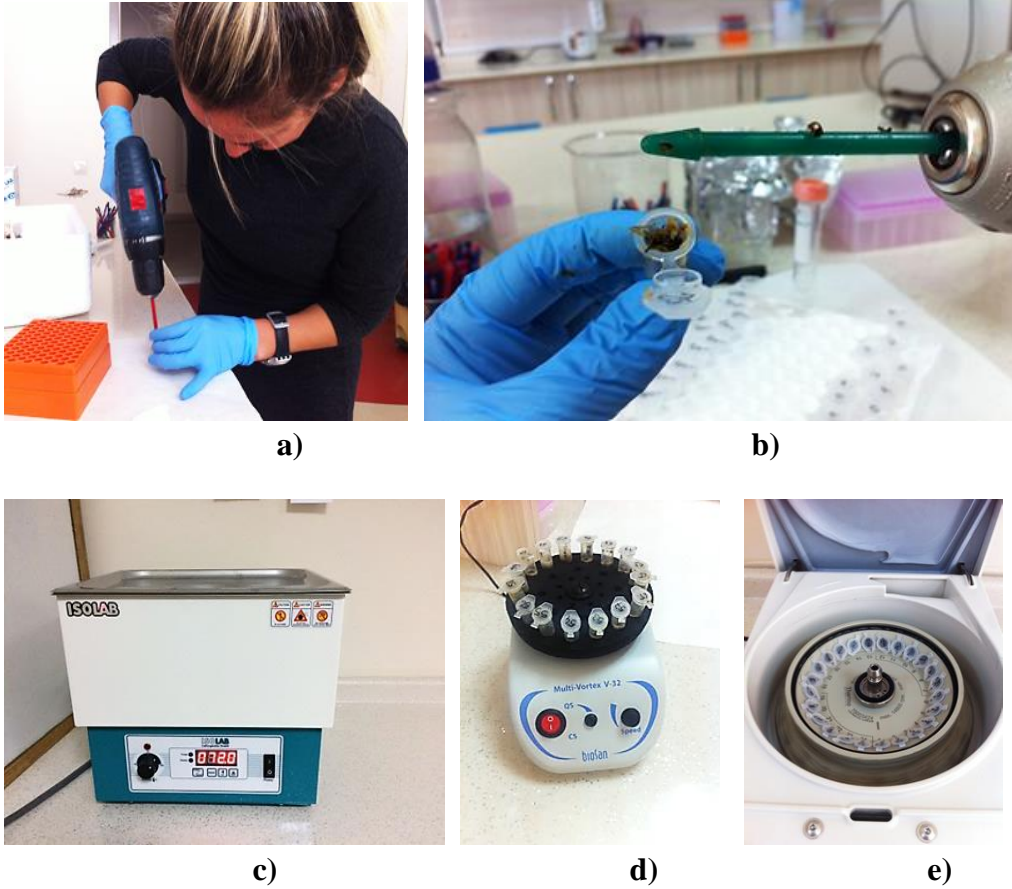
Şekil 3. 4. Total RNA izolasyonu öncesi bal arılarının saf sudan geçirilmesi ve kurutulması

- 1) Laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce, örneklerden 10 adet bal arısı rastgele seçilip bir ön çalışma (test etmek için) yapılmıştır. Ön çalışmalar sonucunda istenilen miktar ve kalitede RNA elde edildikten sonra asıl çalışmalara başlanmıştır. Test çalışması aşağıda verilen işlem sırasına göre yapılmıştır.

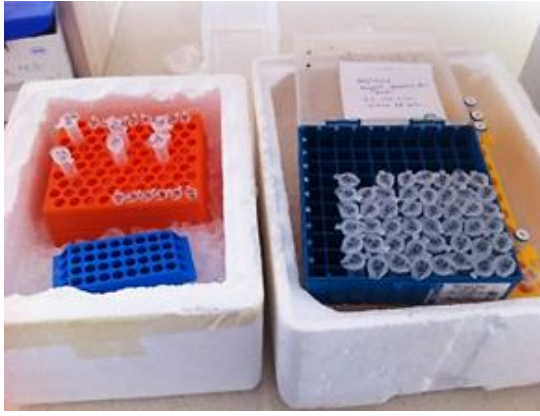
- 2) RNA izolasyon öncesi kullanılacak materyallerin RNase-free olmasına özen gösterilerek, plastik havanlar ve kullanılacak alanlar sterilize edilmiş, tez projesi kapsamında alınan RNase-free pipet uçları kullanılmıştır. High pure viral nucleic acid kit version 19 (Roche) protokolüne göre kit içerisinde kullanılacak solüsyonlar hazırlanmıştır.
- 3) Bal arıları örneklerinin daha kontrollü izolasyonun sağlanabilmesi için 4 grubun ((1) kontrol grubu (hijyenik davranış bakımından ıslah edilmemiş yetişkin dişiler), (2) kontrol grubu pupalar, (3) hijyenik davranış yönünden ıslah edilmiş yetişkin dişiler ve (4) hijyenik davranış yönünden ıslah edilmiş pupalar) her biri ortalama (50 adet tüp) kendi içinde 3 parçaya bölünerek (16, 17, 17 adet) izolasyon işlemi yapılmıştır. Bir grubun Total RNA izolasyonu bittikten sonra diğer gruba geçilmiştir.
- 4) Pupa dönemindeki bal arılarının yumuşak dokuya sahip olmasından dolayı pupa ezilme işlemi kolaylıkla yapılırken; yetişkin bal arılarının kitin tabakasından dolayı ezme işlemi küçük el matkabı yardımıyla aynı prosedürde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5.a,b).
- 5) Total RNA izolasyonu hazırlık aşamasında yıkanıp kurutulan ve mikrosantrifüj tüpünde -80 °C de muhafaza edilen bal arıları dondurucudan çıkartılıp Total RNA izolasyonu için buz üzerine alınmıştır. Bal arıları solüsyon katmadan kuru bir şekilde plastik havanlarla bir süre ezildikten sonra üzerine 200 µl PBS ilave edilerek ezilmeye devam edilmiştir.
- 6) Kit protokolüne göre önceden hazırlanan (50 µl poly A carrier RNA ve 2,5 ml binding buffer içeren) working solution, ezilme işlemi biten her örneğe 200 µl eklenmiştir (Working solution taze hazırlanması gereken bir solüsyon olduğundan solüsyon her seferinde yeni hazırlanmıştır).
- 7) Ardından (kuru toz şeklinde olan Proteinase K, 5 ml Elution Buffer içerisinde eritilerek hazırlanmıştır) proteinase K solüsyonundan da her örneğe 50 µl eklenmiştir. Eklenen Proteinase K karıştırılarak 72°C de sıcak su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir (Şekil 3.5.c).
- 8) Sıcak su banyosundan alınan bal arısı örneklerinin herbirine 100 µl binding buffer eklenerek vorteks cihazıyla karıştırılmıştır (Şekil 3.5.d). Kit içerisinde bulunan 2 ml lik toplama tüpüyle filtre tüpü kombine edilerek 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpü içerisindeki örnekler yeni filtrelili tüpe aktarılmıştır.
- 9) Yeni tüpe geçen örnekler 1dk 8000 x g modunda santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında alt kısımdaki toplama tüpünün içine inen sıvı kısım atılarak yeni toplama tüpüyle değiştirilmiştir.
- 10) Alt kısmı değiştirilen kombine tüpün filtrelili kısmına 500 µl İnhibitor Removal Buffer eklenerek 1dk. 8000 x g modunda santrifüj yapılmıştır. İnhibitörleri kaldırmak için 1. yıkama işlemine geçilmiştir (Şekil 3.5.e).
- 11) Santrifüj sonrasında toplama tüpü ve toplama tüpünde toplanan sıvı kısım atılarak yeni tüple değiştirilmiş ve 450 µl wash buffer eklenerek 1dk. 8000 x g modunda santrifüj yapılmıştır.
- 12) Santrifüj sonrasında alttaki toplama tüpü tekrar değiştirilerek 2. yıkama işlemi için 450 µl wash buffer eklenmiştir. 1dk. 8000 x g modunda santrifüj yapılmıştır. Kalıntı yıkama tamponu (wash buffer) kalmaması için 13.000 x g

modunda 10 saniye tekrar santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında alt toplama tüpleri sıvılarıyla birlikte atılarak önceden grup ismi ve birey numaraları yazılmış olan 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüplere filtreli tüpler yerleştirilmiştir.

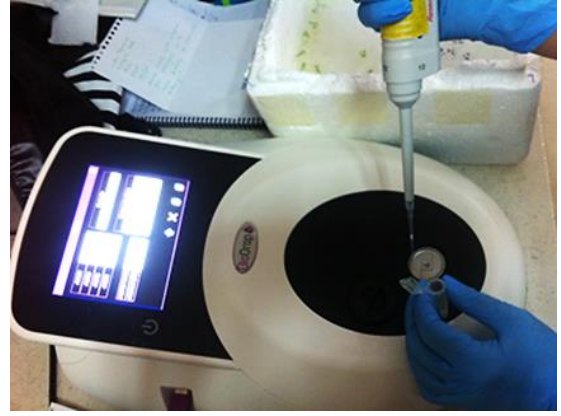
- 13) Mikrosantrifüj tüplerine 50 µl Elution Buffer eklenerek 1dk 8000 x g modunda santrifüj yapılmış ve filtreli tüpler atılarak örneklerin bulunduğu tüpler - 80°C de sonraki kullanımına kadar muhafaza edilmiştir.
- 14) Total RNA izolasyonu yapılan tüm bal arıları örneklerinin total RNA'nın konsantrasyonunun belirlenebilmesi için biodrop cihazıyla ölçümleri yapılmış (Şekil 3.5.g) ve miktarları kaydedilmiştir (Ek 1).
- 15) Ölçümü yapılan total RNAları formaldehit elektroforezde yürütebilmek için her RNA örneğinden 3 µl ayrı bir tüpe eklenmiştir ve her örneğe 3 µl formaldehit eklenip 10 saniye santrifüj yapılmıştır (Şekil 3.5.h).
- 16) Santrifüj sonrası örnekler 65°C de 15 dk. sıcak su banyosunda bekletildikten sonra (Şekil 3.5.i,j.) RNA Jele (Reliant Gel System) yüklenerek 2 saat elektroforez cihazında yürütülmüştür (Şekil 3.5.k,l).
- 17) Yürütülen RNA Jel 5 µl etidyum bromür konulan 50 ml TE Buffer içine konularak yaklaşık 10 saat manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş hızda sallandırılmıştır (Şekil 3.5.m) ve RNA Jel sonuçları UV görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.5.n).



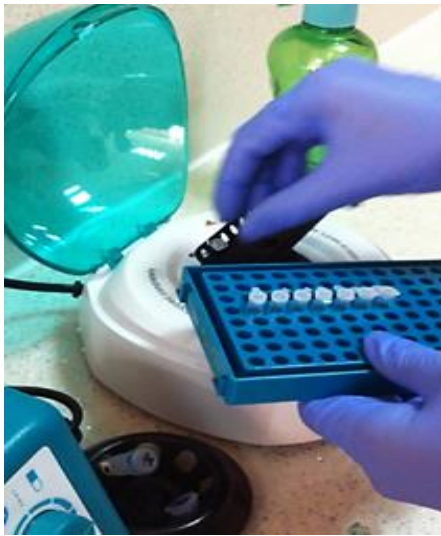
Şekil 3. 5. a, b) Yetişkin işçi arıların matkapla ezilmesi c) Dokuları ezilen bal arılarının 72 °C'de su banyosunda bekletilmesi d) Binding buffer eklenen örneklerin çalkalanması (vortex). e) Örneklerin santrifüj işlemleri (RNA'larda inhibitör kaldırma, yıkama, elüsyon)



f)



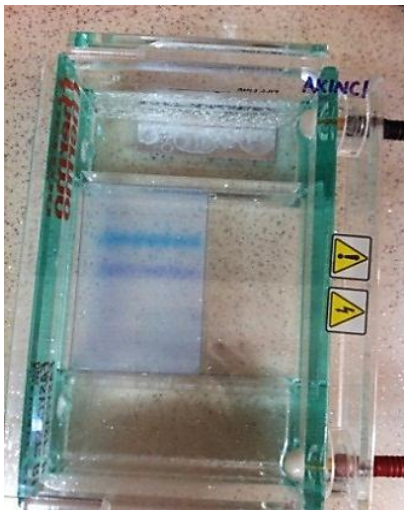
g)



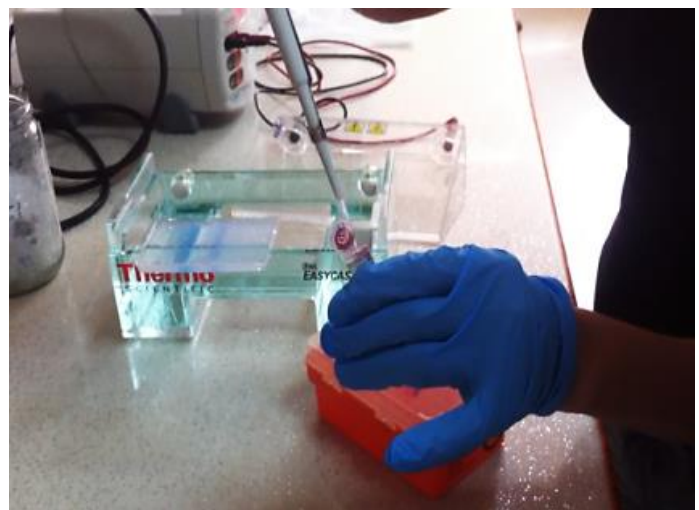
h)



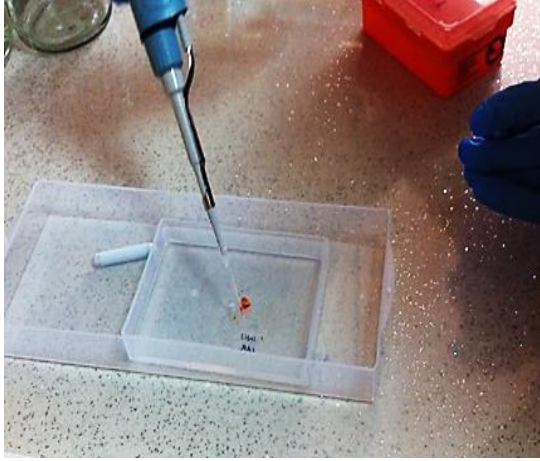
i)



i)



J)



k)



l)



m)



n)

Şekil 3. 5.) f, g) Total RNA'sı çıkarılan örneklerin biodropla ölçümü h) Formaldehitli total RNAların santrifüj yapılması ı) Örneklerin 65°C de sıcak su banyosunda bekletilmesi i) RNA Jele yüklenen örneklerin elektroforez cihazında yürütülmesi j,k) Yürütülen RNA Jel için etidyum bromürlü TE tampon hazırlanması l) Hazırlanan etidyum bromürlü tampon içine RNA Jel yerleştirilmesi m) Örneklerin bulunduğu RNA Jeli görüntüleyebilmek için hazırlanan TE tamponun manyetik karıştırıcıya konulması n) RNA Jelin UV görüntüleme cihazında görüntülenmesi

3.2.3. Pozitif Örneklerin (Standartların) Seyreltilmesi / Dilüsyonu

RT-qPCR amplifikasyonları sırasında virüs barındıran örneklerin taşıdığı virüs miktarını hesaplamak için sentetik virüs RNA'ları dizayn edilmiştir. Bu sentetik virüs örneklerinin yoğunluğu (virüs miktarı) bilindiği için üssel olarak seyreltme yapılarak pozitifler standart haline getirilmiştir. Pozitif standartlar hem PCR miksin çalışıp çalışmadığını hem de tespit edilen virüs miktarının isabetli bir şekilde hesaplanmasını sağlamıştır. Standartların hazırlanışı aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

Ana stok içerisinde 10^9 virüs yoğunluğu bulunmaktaydı. Bu tüpten 10 µl örnek çekilip bi destile saf su ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra aynı işlem üssel olarak azaltılarak 10 fold sulandırma olacak şekilde tekrarlanmıştır. Böylece 10^9 'dan 10^1 'e kadar 10 seri elde edilmiştir. PCR reaksiyonları sırasında çok yoğun pozitiflerden diğer örneklere bulaş olabileceğinden dolayı en yoğun ilk 3 tüp stok olarak saklanmış ve 10^6 'dan itibaren 6 seyreltik pozitif standart olarak kullanılmıştır.

Yoğunluk derecelerine göre numaralandırılan standartlarla, ön çalışmada total RNAsı çıkarılan ve biodropla miktarı ölçülen 10 örnek için RT-PCR kuruldu ve bu standartlarla (sentetik pozitiflerle) örnekler test edildi.

3.2.3. Primer ve Propların Seyreltilmesi

Tez konusu virüslerin primerleri daha önce kullanılan kaynaklar göz önüne alınarak tasarlanmıştır (Çizelge 3. 1.).

- 1) RT-PCR aşamasında kullanılacak olan ppmix (primer-prop mix) için primerlerin ve propların seyreltilmiş olması gerekmektedir. Bu nedenle kullanılacak primerler ve proplar (Fam/CV5) $+4^{\circ}\text{C}$ den çıkarıldı ve seyreltme işlemine başlamak için 10 sn santrifüj yapıldı.
- 2) 5 virüs için forward ve reverse olarak toplamda 10 adet primeri seyreltmek amacıyla her biri 10 nmol olan primerlere 100 µl saf su eklenerek 100 pmol/ µl e dönüştürüldü.
- 3) Toplamda 5 adet olan propların (boya) 4'ü FAM işaretli prop, 1'i ise CV5 işaretli probtan oluşmaktadır. Herbiri 3 nmol olan proplara 150 µl saf su eklenilerek 20 pmol/µl 'e dönüştürüldü.
- 4) Prop ve primerler saf su eklendikten sonra 3-5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 2 dk vortex cihazında karıştırıldıktan sonra primerlerin üzerine 100 pmol, propların üzerine 20 pmol olduğu not edilerek -20°C ye konuldu.

Çizelge 3.1. Tez konusu virüslere özgü primer çiftlerinin sekans ve fragment büyüklükleri

Virüs	Forward primer	Revers primer	size- bp	Kaynak
DWV	ctgtaggtgtgctcctgatg	taattgccaccatatttacgc	453	Choi vd. 2015
	ttgcaagatgctgtatgtgg	gtcgtgcagctcgataggat	395	Tentcheva vd. 2004
	attgtgccagattggactac	agatgcaatggaggatacac	434	Berenyi vd. 2006
IAPV	ctccgctcaattgcttcattaatagtatggg	ccgctcctgagcacaaccacgataagtg	553	Choi vd. 2015
	cctgcatggggatattctc	ctgtgagttgatcctgatcg	492	Choi vd. 2015
	agacaccaatcacggacctcac	agatttctgtctcccagtcacat	457	Maori vd. 2007
CBPV	agttgtcatggtaacaggatacagag	tctaatttagcacgaagccgag	455	Ribierevd 2002
	ggatgaaaggaaattaccag	ccactaggtgatccacact	426	Tentcheva vd. 2005
	tcagacaccgaatctgattattgtg	actactagaaactcgtcgttcgtggactg	569	Choi vd. 2015
SBV	accaaccgattcctcagtag	ccttggaactctgctgtgta	487	Berenyi vd. 2006
	gtgctatcttgaatactac	aaggyttaggttctactact	618	Berenyi vd. 2014
	gagagggaattactaatataacc	cctttgcaatgttctagtgtc	554	Choi vd. 2015
ABPV	catattggcgagccactatg	ccactccacacaactatcg	398	Bakonyi vd. 2002
	tctcaagcttggaaaagag	ggtggacaagaagcaagaa	256	Choi vd. 2015
	tctgatgatgctgaagagagaaa	aatcatcattgccggctcta	500	Teixeira vd. 2008

3.2.5. PpMix (Primer Prob Mix) Hazırlanması

- 1) 5 adet 500 µl mikrosantrifüj tüpünün kapaklarına 5 ayrı virüs isimleri yazılmıştır. 5 parametre (arı virüsü) için ayrı ayrı ppmix aynı şekilde hazırlanmıştır. 200 örnekli olan ve 4 gruba ayrılan bal arısı örnekleri tek bir grup (örneğin Maybir Pupa) alınarak tek bir virüse göre bakılacağı için (örneğin IAPV), hazırlanacak plate ortalama 50 örnek, 6 sentetik pozitif standart (pozitif kontrol), ortalama 2 negatif kontrol ve 2x mixte fazladan hesaba katılarak 60 x olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.).
- 2) Prob ve primerler işlemde 20 dk önce oda sıcaklığında bekletilip vortex cihazıyla karıştırılmış ve santrifüjlenmiştir.
- 3) Ppmix hazırlama aşamasında hacmi en fazla olan H₂O/saf su ile başlanarak hacmi en az olan primerler konularak işleme devam edilmiştir. 60 kuyucuk için 500 µllik mikrosantrifüj tüpüne sırasıyla H₂O eklenmiştir.
- 4) Her bir virüs için kendi kanalında çalışacak önceden 20 pmole seyreltilen problemlerden eklenmiştir.
IAPV, DWV, SBV ve ABPV için; FAM kanalından yansıyacak proplar, CBPV için ise; CV5 kanalından yansıyacak prob eklenmiştir.
- 5) Son olarak; önceden 100 pmol olarak seyreltilen her virüse özgü primerden forward ve reverse olarak eklenerek karışım vorteks cihazında karıştırılıp, RT-PCR için mix hazırlığına geçilmiştir.
- 6) Ppmix her virüs için ayrı olarak 180 x hazırlanmış ve 3 plate için yeterli olan Ppmix bittiğinde tekrardan 180 veya 120 x hazırlanmıştır.

Çizelge 3. 2. Ppmix hazırlığında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	1x	100x
F. Primer	0,08 µl (100 µM)	8 µl
R. Primer	0,08 µl (100 µM)	8 µl
TaqMan Prob	0,10 µl (20 µM)	10 µl
Saf Su	0,74 µl	74 µl
Toplam hacim	1 µl	100 µl

3.2.6. RT-PCR Mix Hazırlığı

- 1) RT-PCR mix son aşama olan solüsyon hazırlığıdır. Önceden hazırlanan ve bal arısı örneklerinde varlığı ya da yokluğuna bakılacak olan 5 virüs için ayrı ayrı hazırlanan ppmix, analiz edilecek virüse göre değişmekle birlikte diğer tüm kimyasallar 500 µl lik mikrosantrifüj tüplerine aynı şekilde ve oranda eklenmiştir.

- 2) İlk olarak H₂O / Saf su eklenip sırasıyla; reaction buffer, ppmix, enzyme blend konularak her kimyasal eklendiğinde dikkatli bir şekilde pipetlenip, vortex cihazında karıştırılmıştır.
- 3) RT-PCR için son solüsyon hazır olduğunda pcr plate buz üzerine alınmış ve A1 gözünden başlanarak yukarıdan aşağıya doğru ilk 50 kuyucuğa hazırlanan mixten 15 µl konulmuştur.
- 4) Örnek RNAlar için 50 göze konulan mixten sonra pcr plate kuyucuklarının en sağında yer alan A12 gözüne gelinerek sentetik pozitif standartların konulacağı gözlere de standart sayısınca yukarıdan aşağıya doğru RT-PCR mix eklenmiştir.
- 5) Ardından, hazırlanan karışımda herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını anlayabilmek için negatif kontrol olarakta kullanılacak bu mixten yine 15 µl G12, H12 gözlerine eklenmiştir (Negatif kontrol, RNA olmadan sadece hazırlanan bu karışımın konulmasıyla sağlanmıştır).
- 6) Buzun üzerinde olan pcr plate mix dağıtım işlemi bittikten sonra sırasıyla örnek RNAların dağıtımına yine A1 gözünden başlanıp aşağı doğru gidilerek örnek sayısınca 5 µl konularak işleme devam edilmiştir.
- 7) Örnekler bittiğinde pcr plate'in A12 gözüne gelinerek, mix konulan kuyucuklara yoğunluk sırasına göre standart olarak kullanılan sentetik pozitifler 5 µl konulmuştur. Negatif kontroller için ise, negatif kontrol kuyucuklarına konan mix üzerine herhangi bir materyal eklenmeden kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıdaki tabloda (Çizelge 3.3) verilmiştir.

Çizelge 3. 3. RT-PCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	1x	10x
H ₂ O (PCR-grade)	9,6 µl	96 µl
Ppmix	1 µl	10 µl
Reaction Buffer (5x)	4 µl	40 µl
Enzyme Blend (50x)	0,4 µl	4 µl
Toplam	15 µl	150 µl
Örnek RNA	5 µl	
Toplam Hacim	20 µl	

3.2.7. RT- PCR Cihaz Protokolü

Total Rna izolasyonları yapılan bal arısı örneklerinin 5 ayrı parametrede viral RNAlarının araştırılması için Roche Lightcyler 96 cihazı kullanılmıştır. RT-PCR cihaz protokolü başlıca 3 kısımdan oluşmaktadır.

Bunlar sırasıyla; tek iplikli RNAnın cDNA ya çevrilmesi için uygulanan preincubation aşaması, 3 Step Amplification aşaması ve son olarak soğutma işlemi gerçekleştiren cooling aşamasıdır. Cihaz uygulamaları ayrıntısıyla çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3. 4. RT-q PCR cihaz protokolü

(cDNA)	step 1	Target: 50°C	Duration: 300 sn	Ramp: 4. 4
	step 2	Target: 58°C	Duration: 300 sn	Ramp: 2. 2
Denatitürasyon	step 1	Target: 95°C	Duration: 60 sn	Ramp: 4. 4
3 Step Amplification 40 Döngü	step 1	Target: 95°C	Duration: 10 sn	Ramp: 4. 4
	step 2	Target: 60°C	Duration: 30 sn	Ramp: 2. 2
	touch down	Second Target Change 58°C	Delay: 1sn	Ramp: 2.2
			Temp.Change: 1 °C	
step 3	Target: 72°C	Duration: 1 sn (single)	Ramp: 4.4	
Cooling	one step	Target: 37°C	Duration: 30 sn	Ramp: 2.2

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Kontrol ve hijyenik kolonilerde yetişkin ve pupalar için gerçekleştirilen RT-qPCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilirken pozitif standart olarak kullanılan sentetik örnekler göre çizilen standart eğri dikkate alınmıştır (Şekil 4.1-4). Burada, 6 kademeli dilisyon değerlerine göre her bir örnekte amplifiye olan virüs sayısı hesaplanmıştır. Hesaplanan virüs yüklerini istatistiksel olarak karşılaştırmadan önce tüm veriler normal dağılım testine (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk) tabi tutulmuştur. Amplifikasyon ürünleri ve C_q sonuçları karşılaştırılırken normal dağılım gösteren veri seti için bağımsız grup t-testi ve normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney U testi yapılmıştır. Kolonilerin virüs yükleri ile varroa yükleri arasında ilişki olup olmadığı pearson korelasyon ile test edilmiştir. Analizler SPSS v.24 yazılımı ile yapılmıştır.

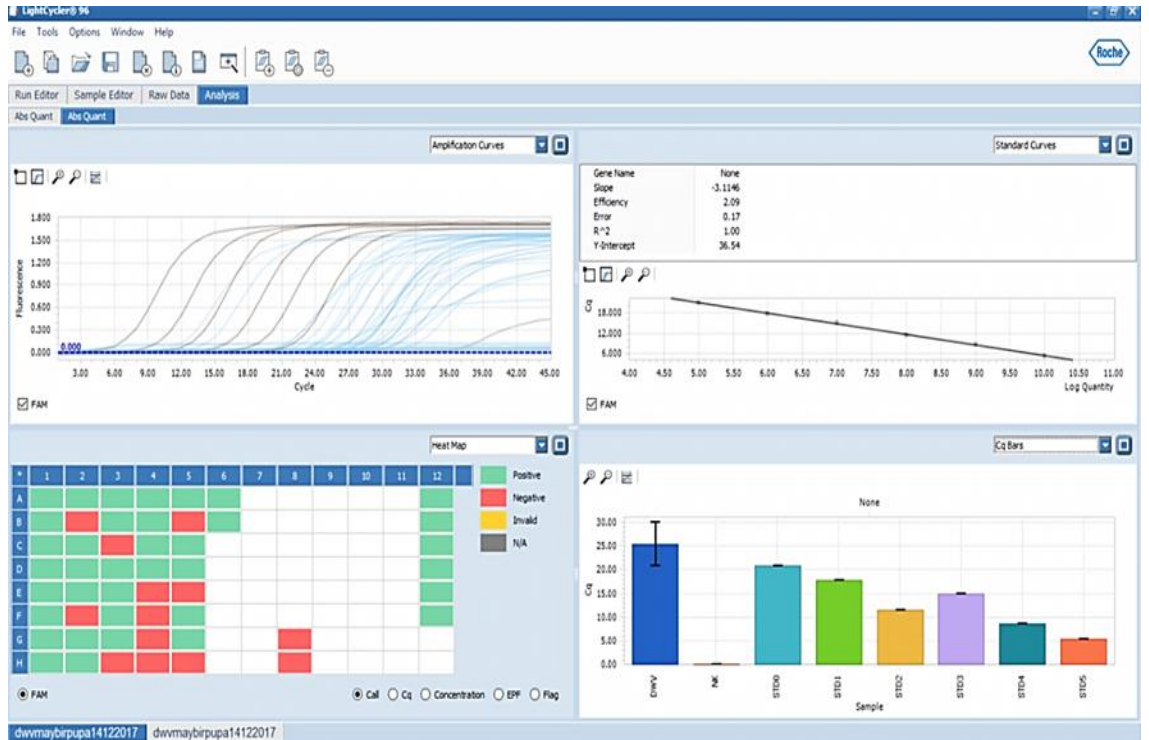
Ancak, virüs bulunmayan örnekler sıfır değeri aldığından, virüs miktarları arasında çok yüksek farklılıklar bulunması sebebiyle qPCR ortalamalarına ait standart sapmalar çok yüksek hesaplanmıştır. Bu durumu gidermek için MINITAB 18 yazılımı kullanılarak qPCR sonuçlarına Box-Cox transformasyon yapılmış ve standart sapmadaki çarpıklık giderilmiştir.

4. BULGULAR

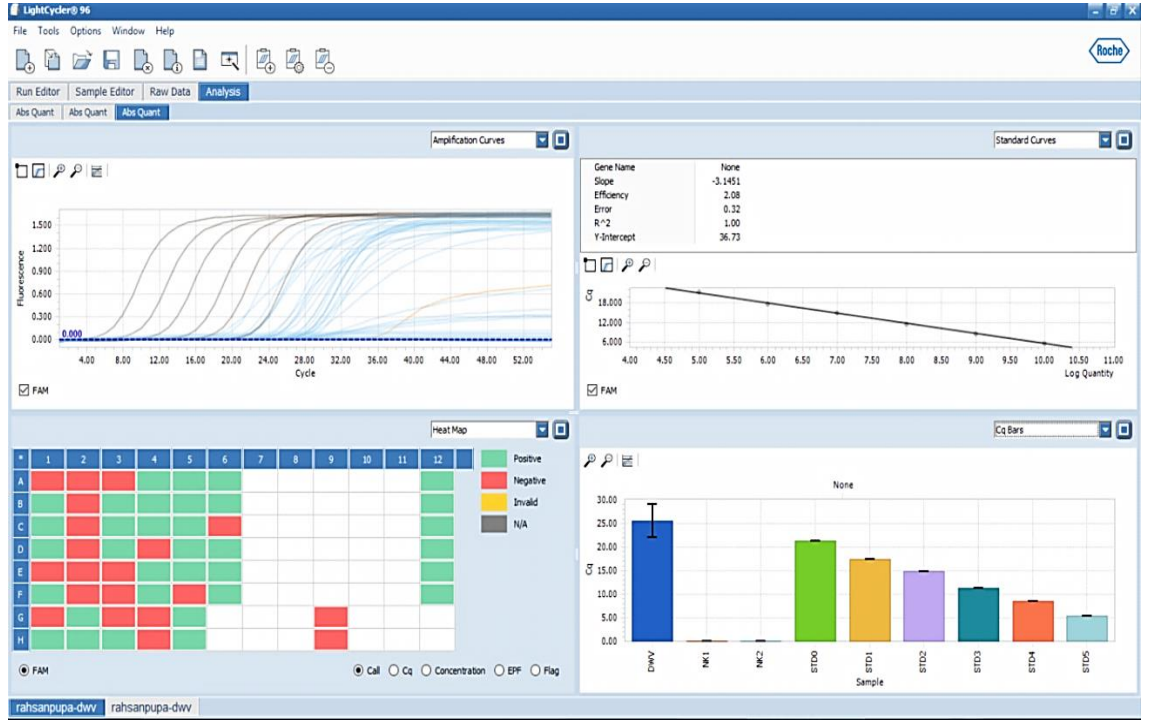
Proje kapsamında MAYBİR tarafından hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş 50 adet koloniden ve kontrol grubu olarak kullanılan 50 adet Muğla bal arısı kolonisinden alınan yetişkin (işçi) arı ve pupalarda proje konusu ABPV, CBPV, IAPV, DWV, SBV ve DWV virüslerin varlığı ve yoğunluğu özgün primerler ve TaqMan prob kullanılarak RT-qPCR’da tespit edilmiştir. Ayrıca, arı örneği alınan kovanların varroa yükleri de dip tahtası yöntemiyle belirlenmiştir.

Toplam 200 örnekte yapılan analizler sonucunda proje konusu 5 virüsten sadece DWV virüsünün kolonilerde var olduğu (Şekil 4.1-4.) çalışılan diğer virüsler bakımından kolonilerin negatif olduğu görülmüştür (Şekil 4.5-20.). Pozitif standartların ve çalışılan örneklerin PCR amplifikasyonlarına ait Cq değerleri ve döngüler boyunca artan ürün miktarı adı geçen şekillerde gösterilmiştir. Bu şekillerde her bir virüs için Light Cycler 96 (ROCHE) cihazında analiz sırasında kullanılan 96’lık platelerdeki sonuçlar doğrudan verilmiştir.

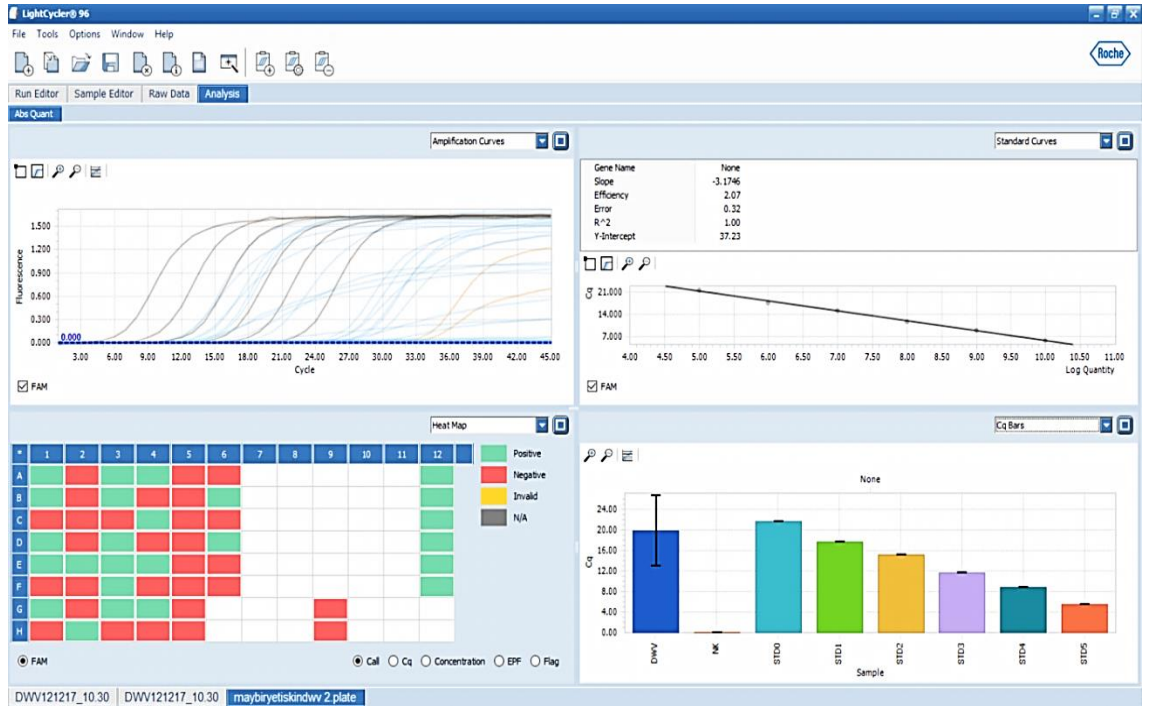
Sonuçların güvenilirliği sağlamak için her bir çalışma iki kez tekrarlanmıştır. Ayrıca, her bir plate koşutururken pozitif standartlar kullanılmıştır. Kullanılan standartların reaksiyonda beklenen slope, efficiency, R2 ve Y-intercept değerlerini ve standart eğrileri göstermesi sonuçların güvenilirliğinin bir göstergesidir. PCR analiz sonuçlarının güvenilirliğinin birer göstergesi olan bu istatistikler elde edilen sonuçların değerlendirilebilir nitelikte olduğunu göstermektedir.



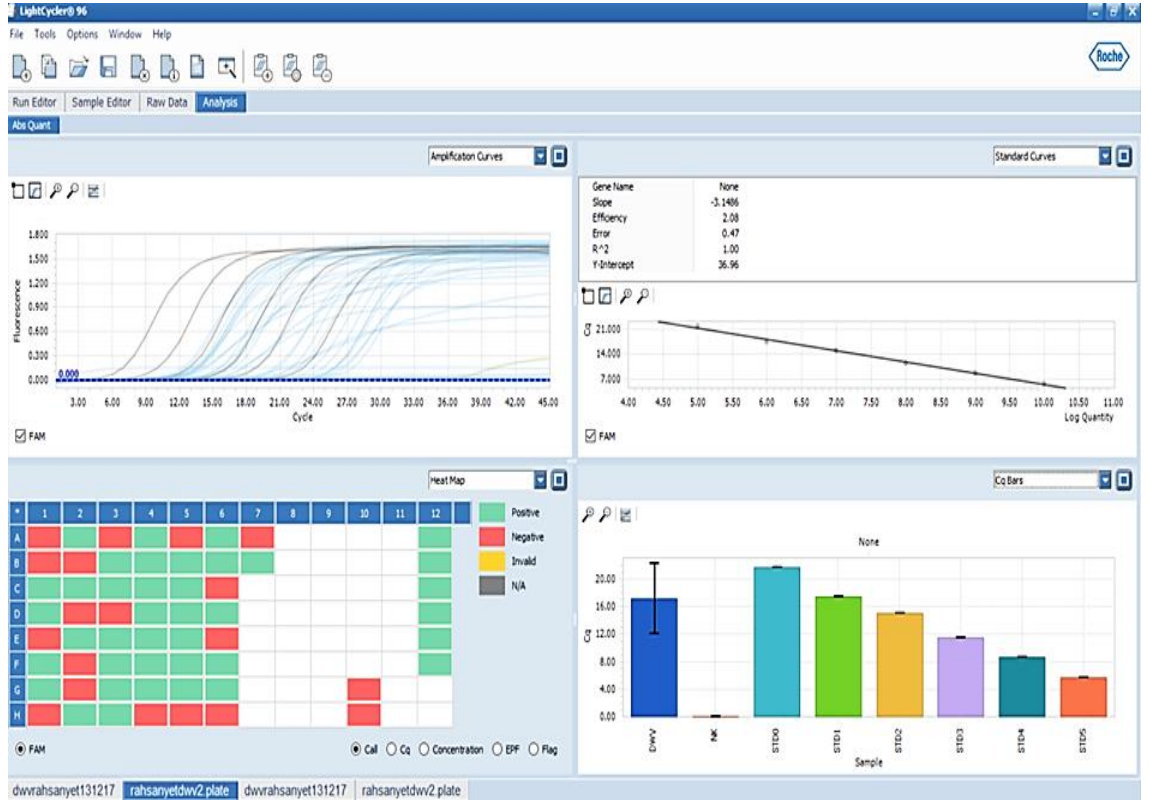
Şekil 4. 1. Hijyenik kolonilerde DWV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



Şekil 4. 2. Kontrol kolonilerde DWV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları

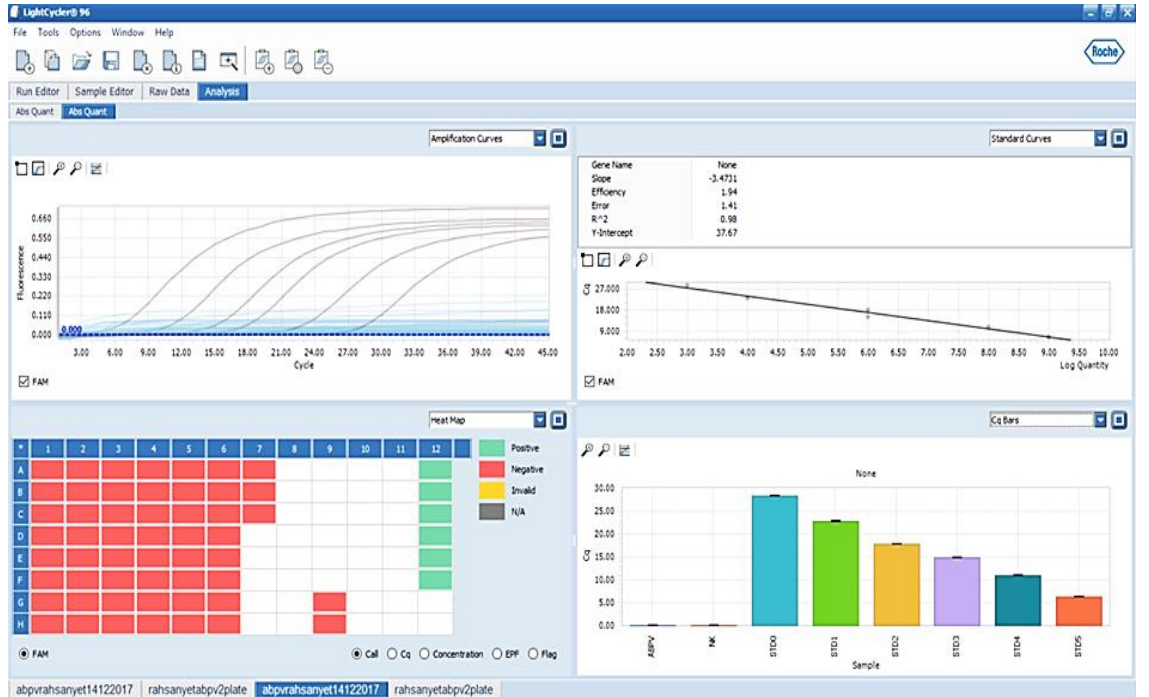


Şekil 4. 3. Hijyenik kolonilerde DWV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları

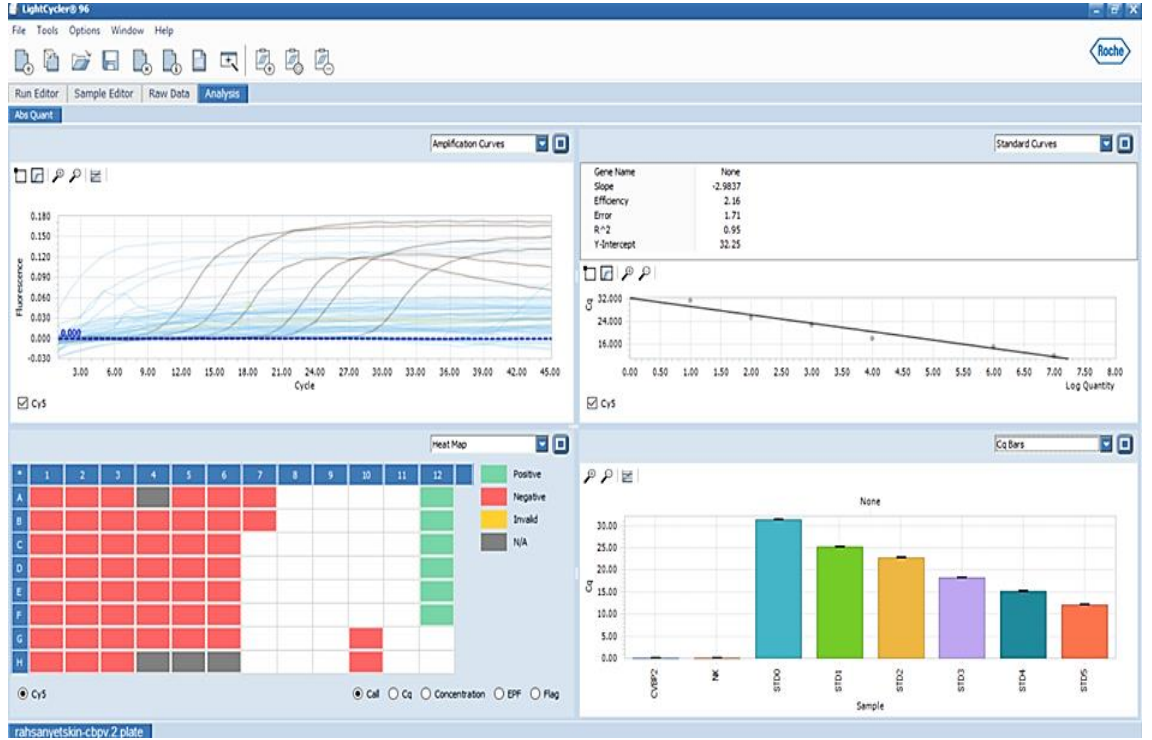


Şekil 4. 4. Kontrol kolonilerde DWV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları

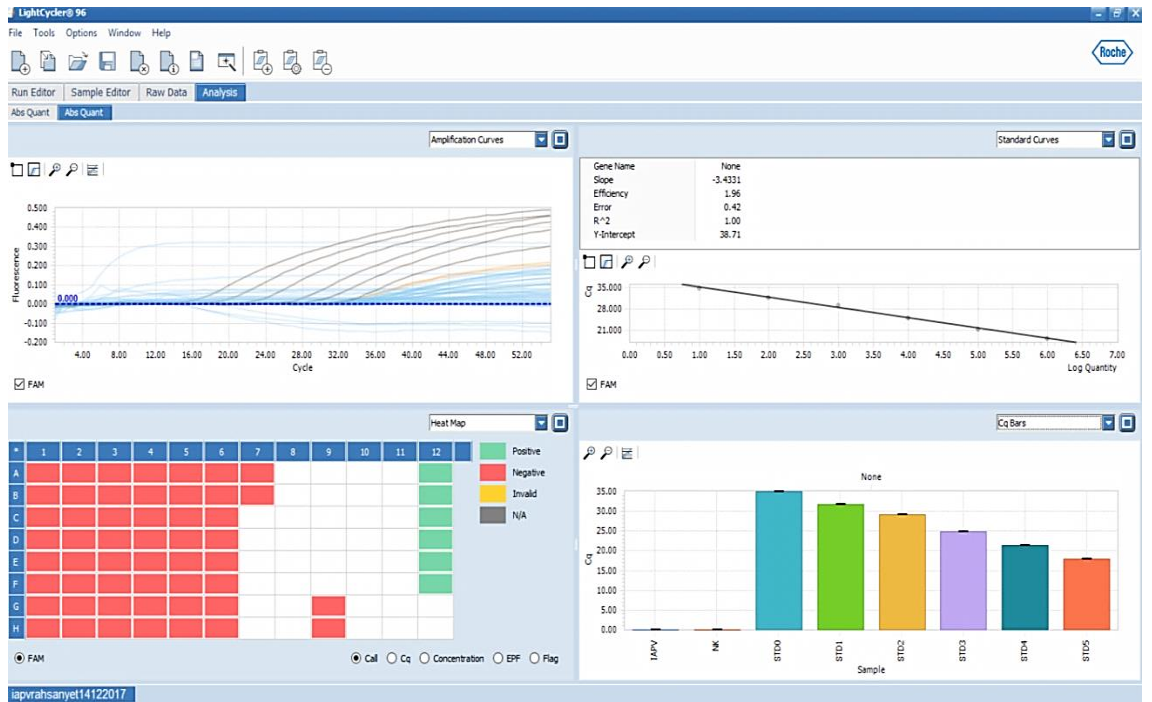
Negatif sonuçlar veren her bir virüs için tamamlanan RT-qPCR bulguları aşağıda sırasıyla hem kontrol hem de hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş koloniler için sıralanmıştır (Şekil 4.5.- 4.20).



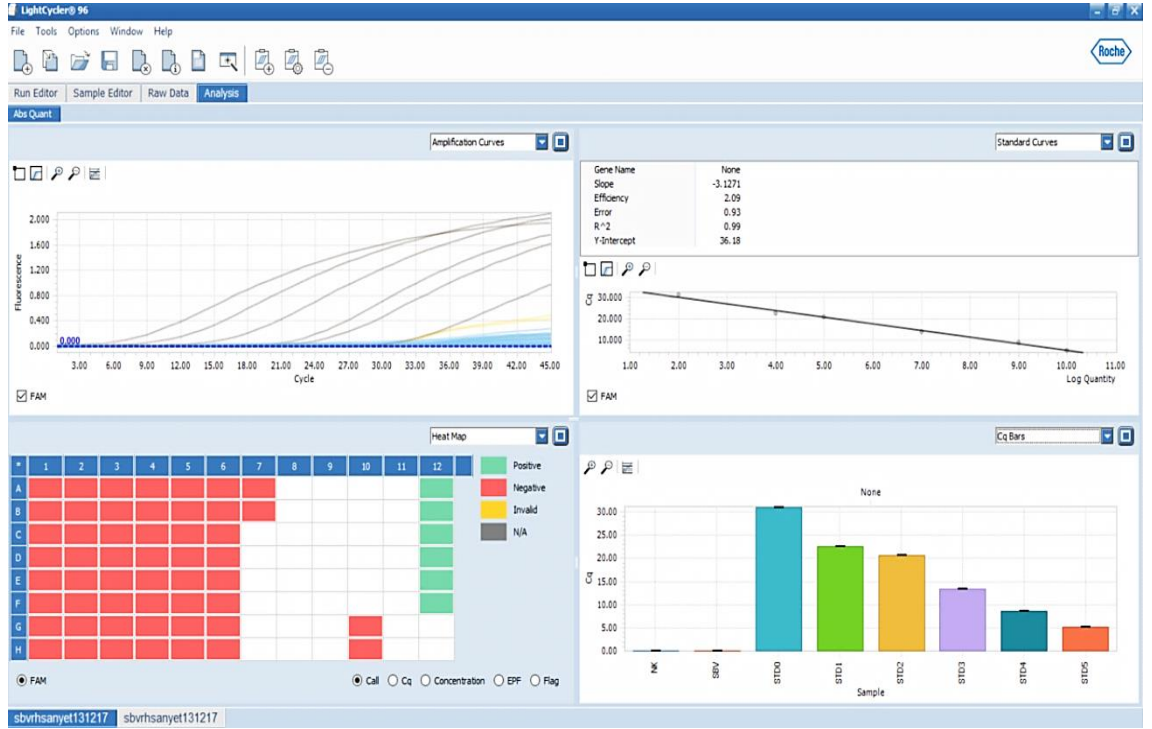
Şekil 4. 5. Kontrol kolonilerde ABPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



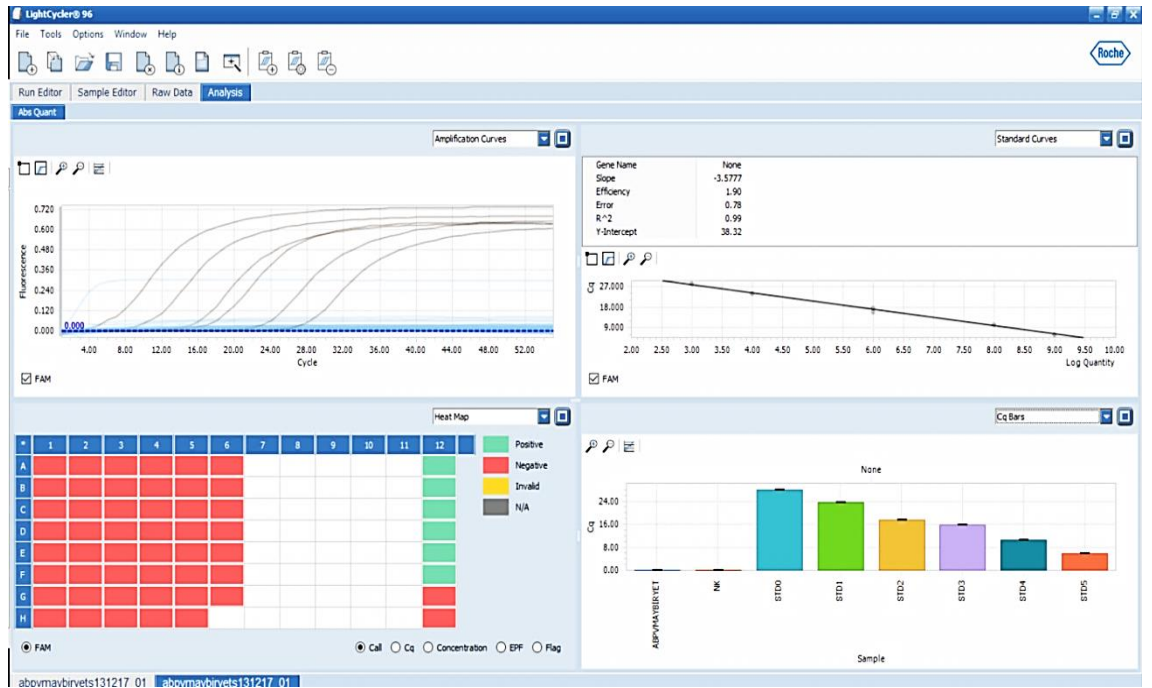
Şekil 4. 6. Kontrol kolonilerde CBPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



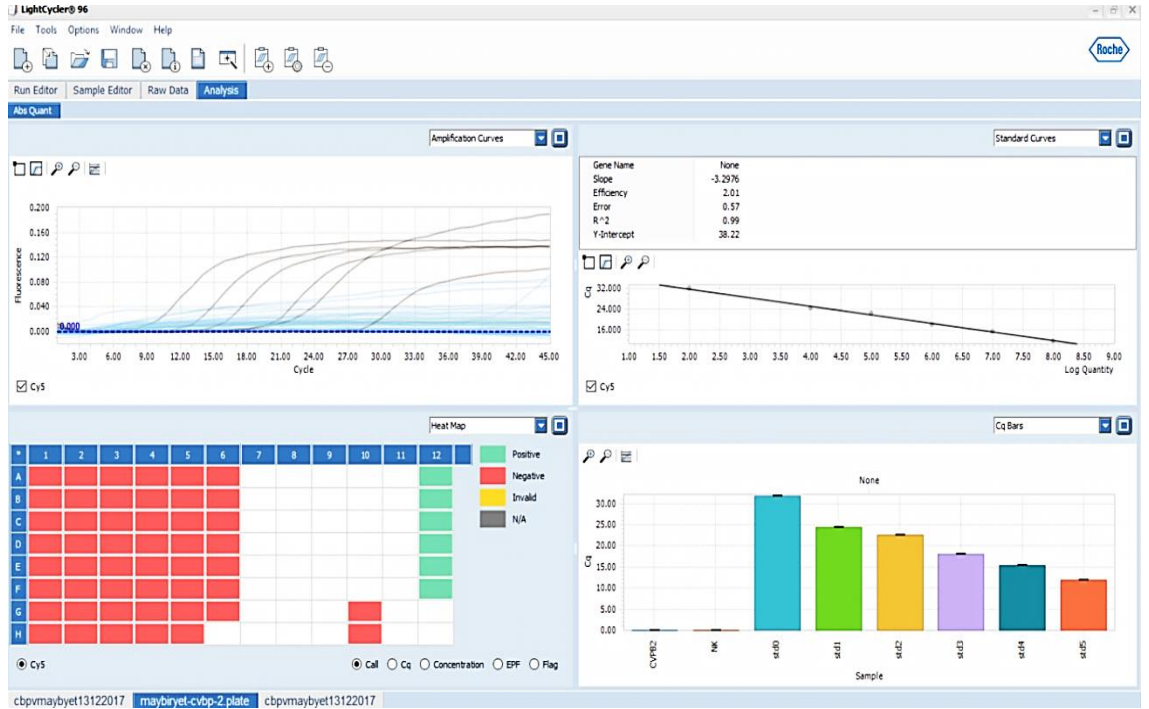
Şekil 4. 7. Kontrol kolonilerde IAPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



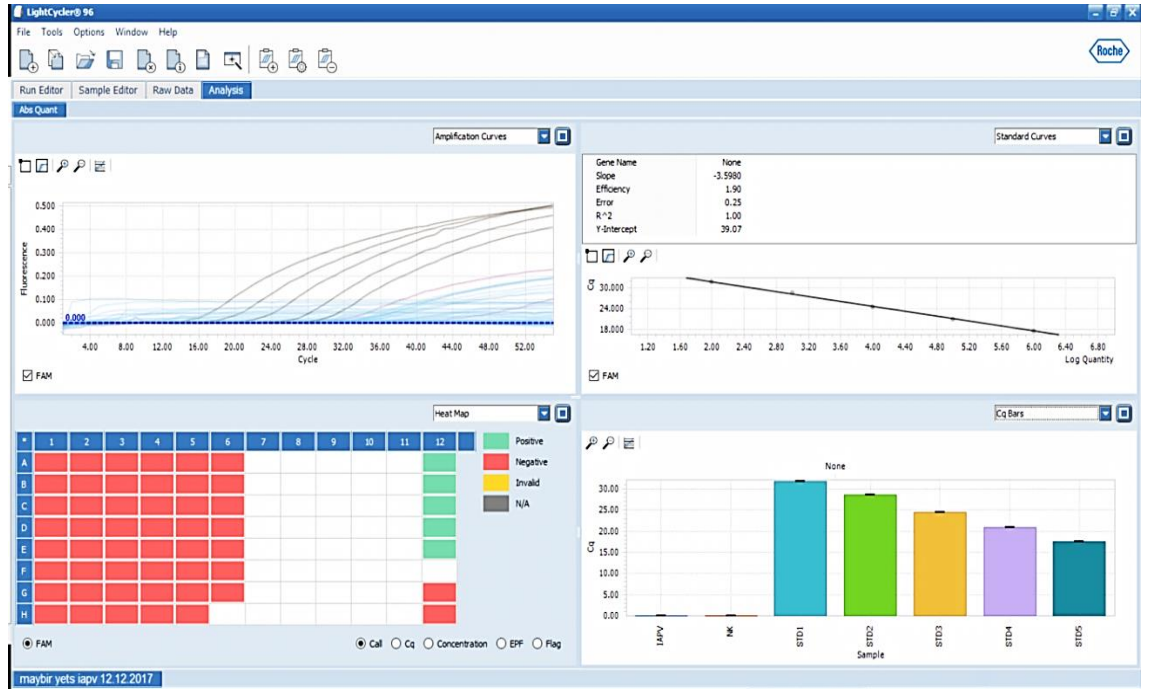
Şekil 4. 8. Kontrol kolonilerde SBV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



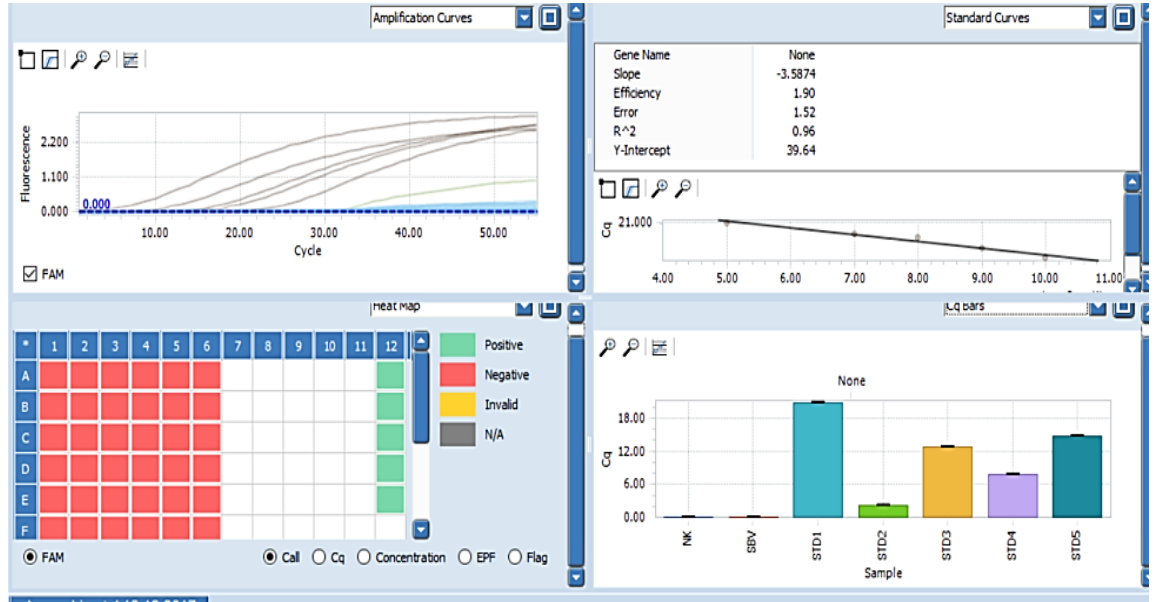
Şekil 4. 9. Hijyenik kolonilerde ABPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



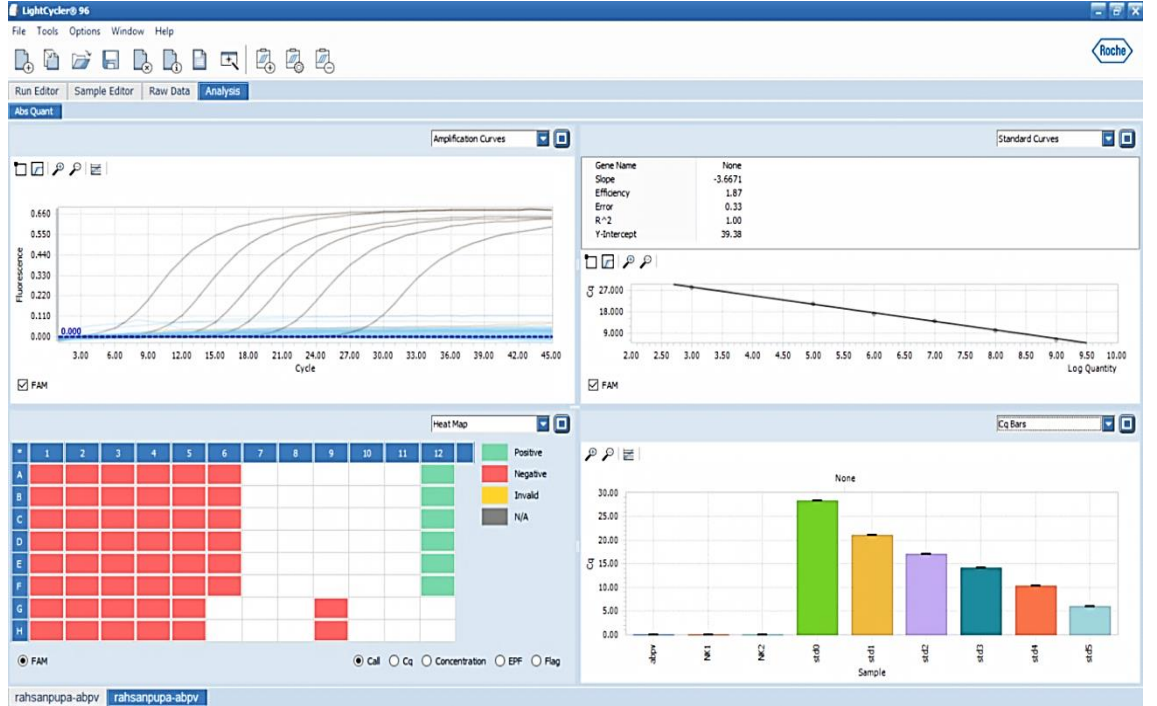
Şekil 4.10. Hijyenik kolonilerde CBPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



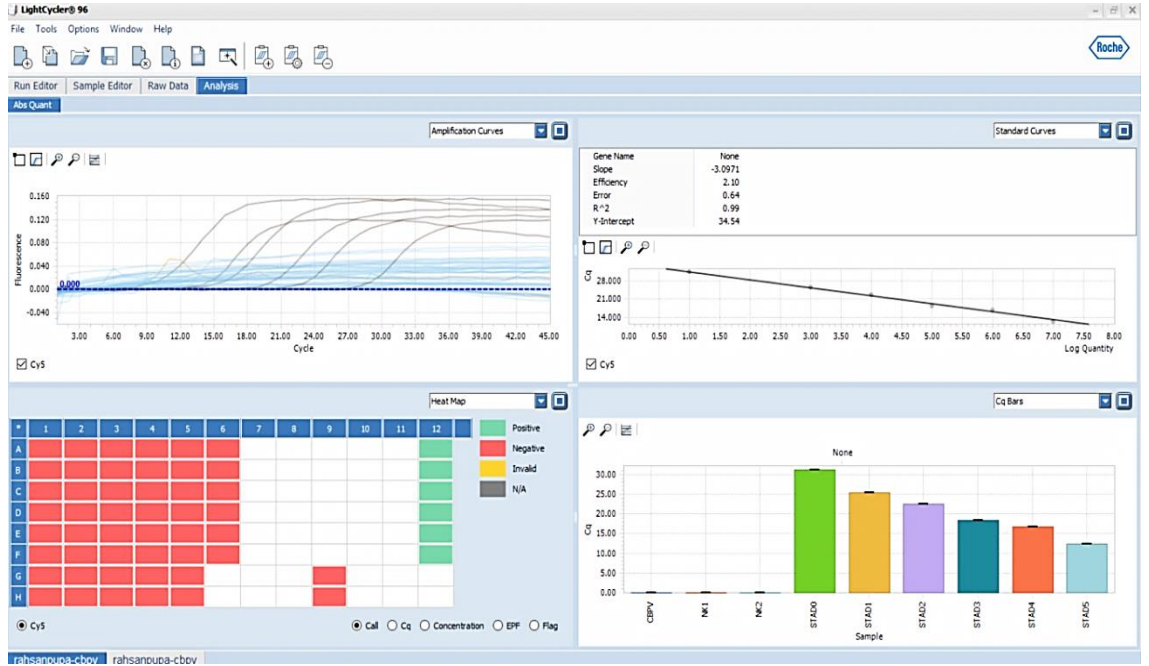
Şekil 4. 11. Hijyenik kolonilerde IAPV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



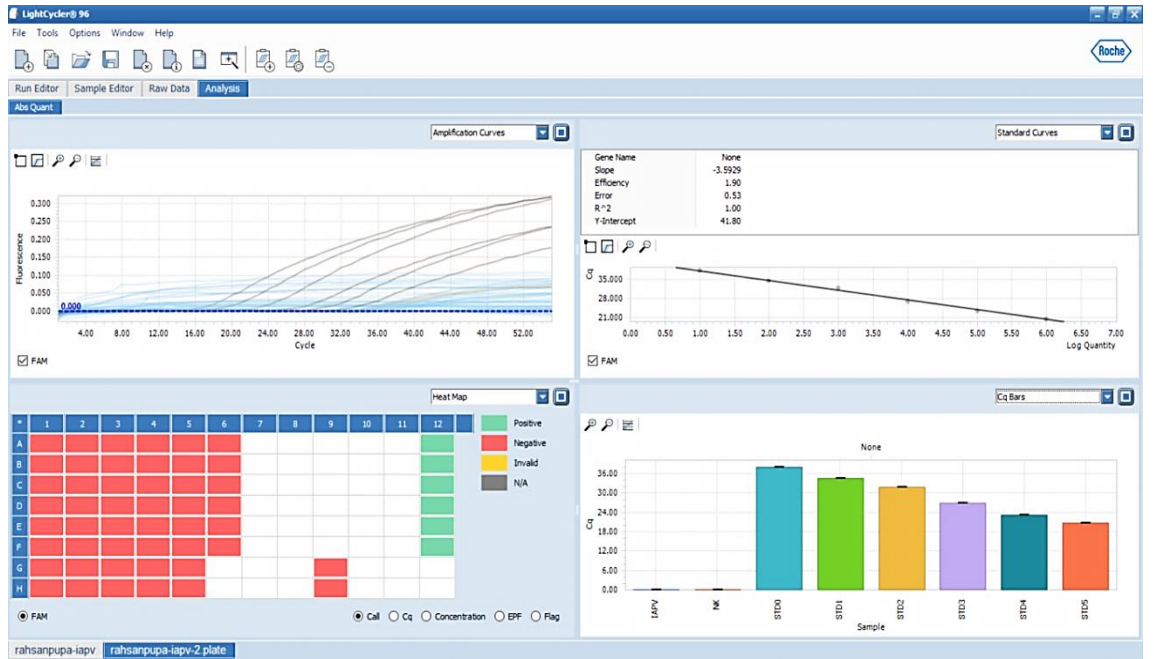
Şekil 4. 12. Hijyenik kolonilerde SBV bakımından işçi arılara ait RT-qPCR sonuçları



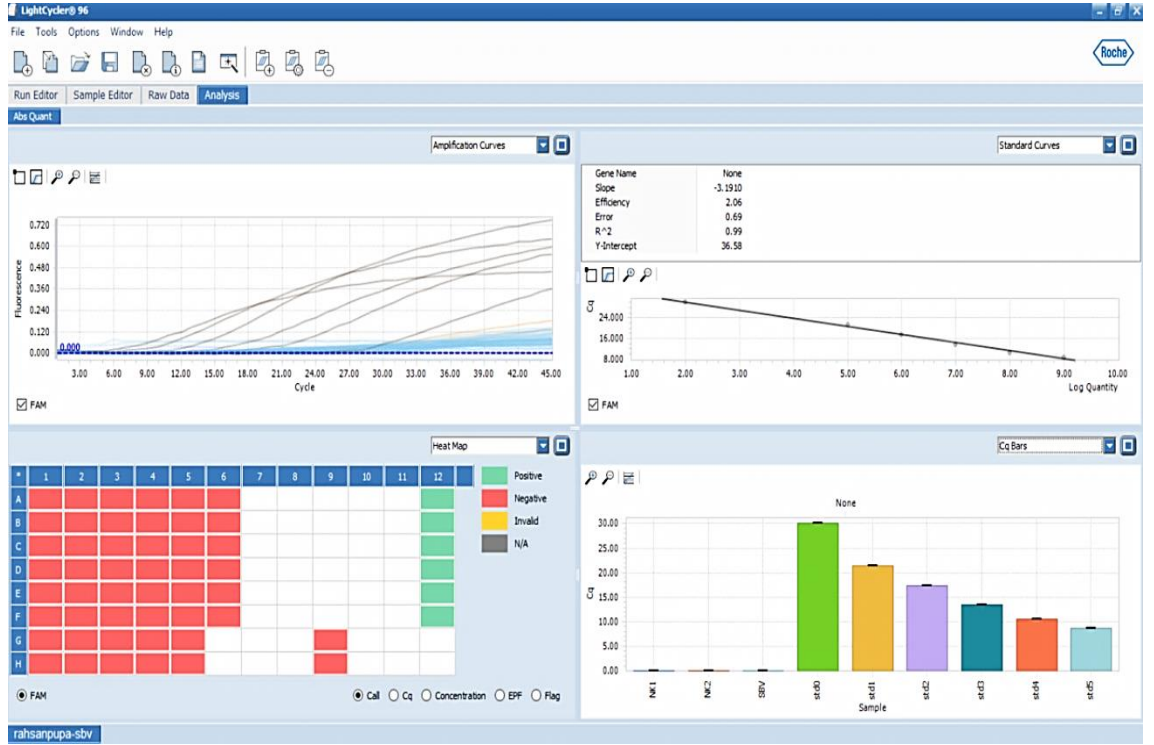
Şekil 4. 13. Kontrol kolonilerde ABPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



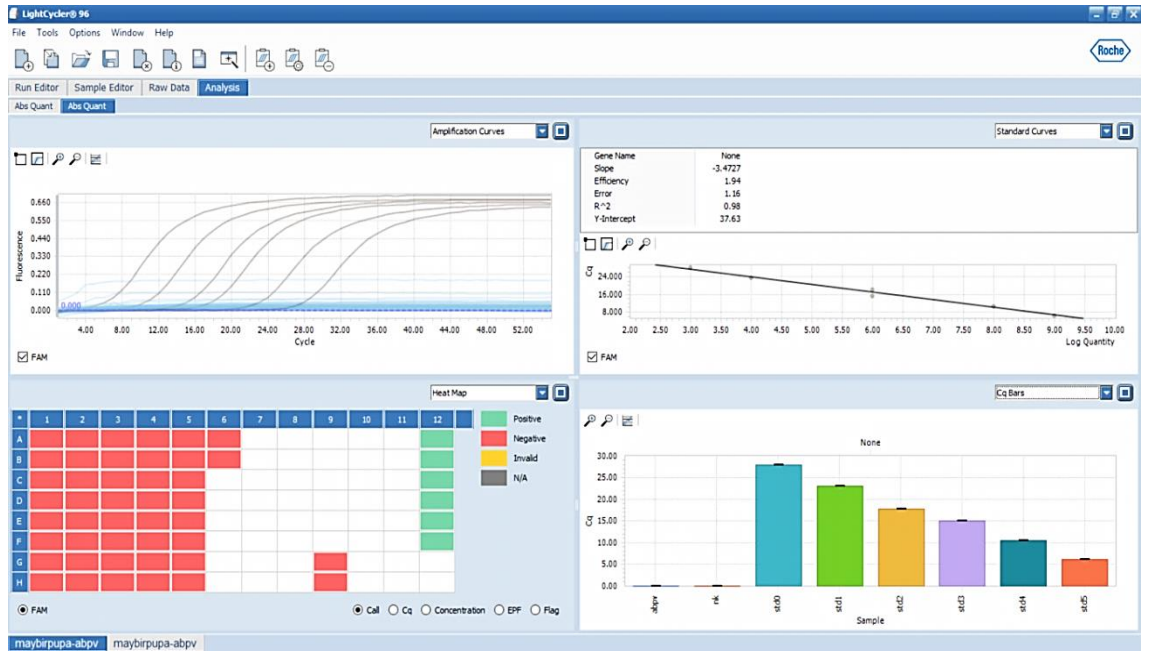
Şekil 4. 14. Kontrol kolonilerde CBPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



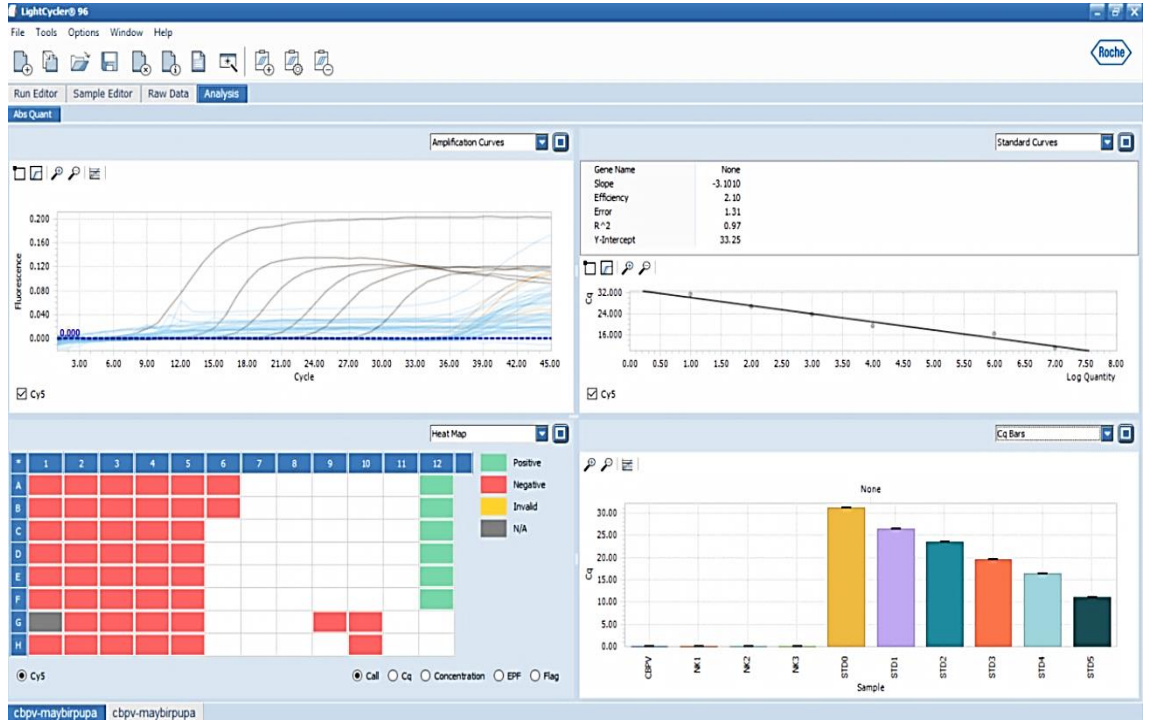
Şekil 4. 15. Kontrol kolonilerde IAPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



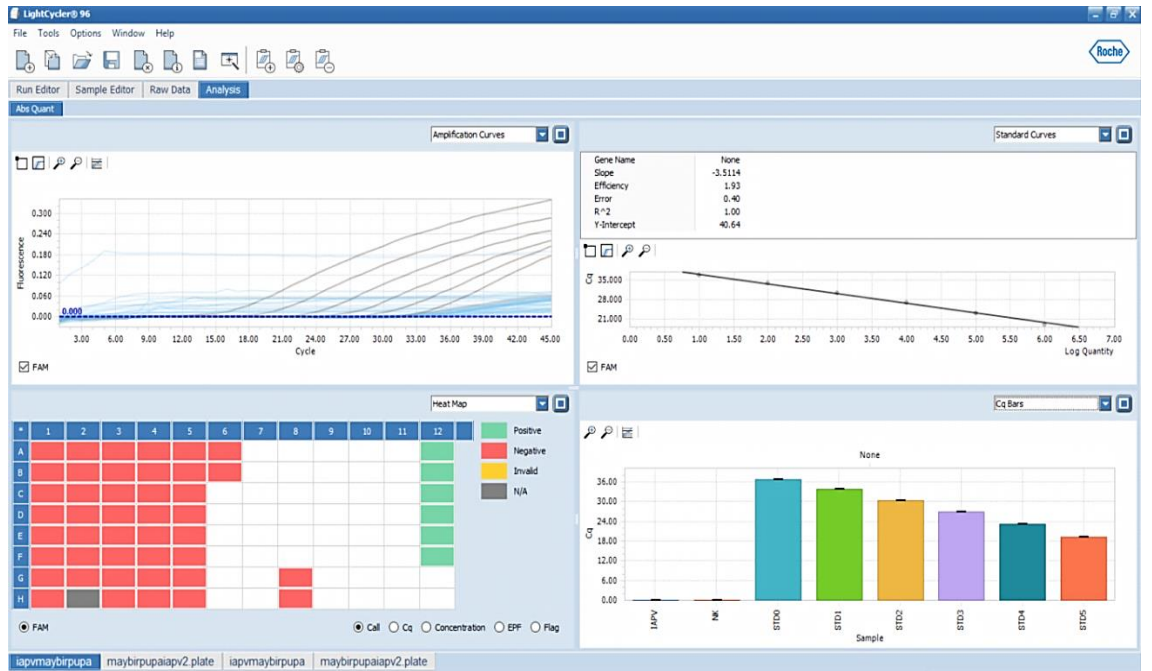
Şekil 4. 16. Kontrol kolonilerde SBV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



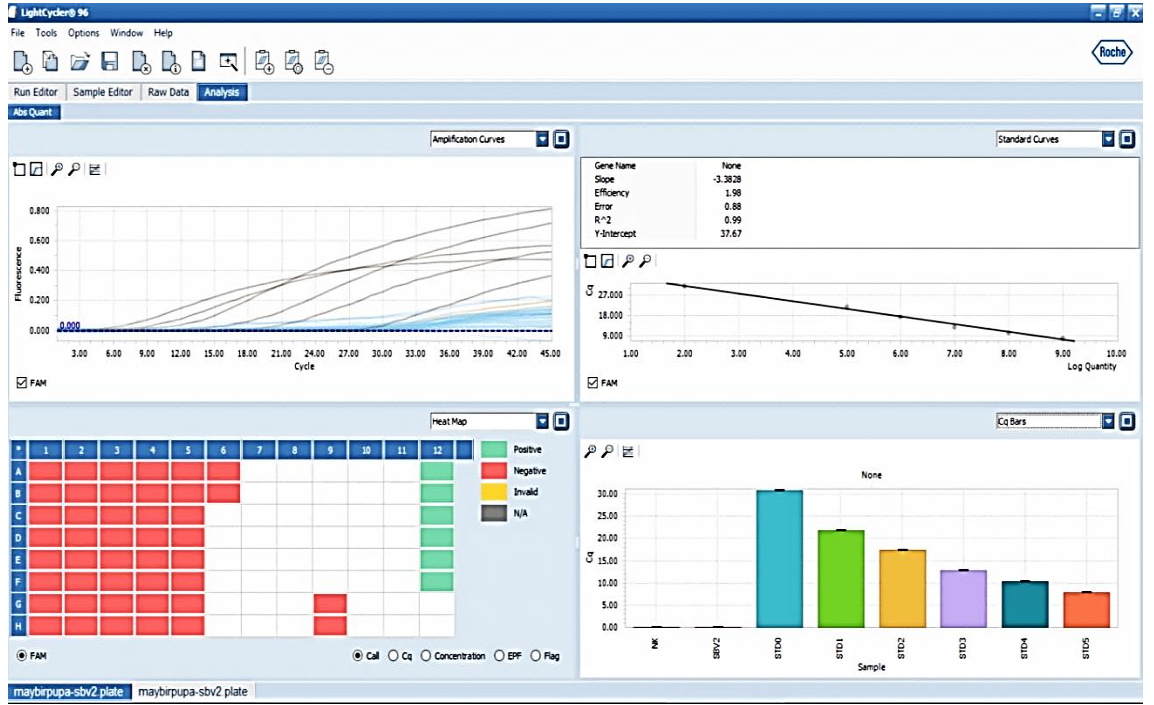
Şekil 4. 17. Hijyenik kolonilerde ABPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



Şekil 4. 18. Hijyenik kolonilerde CBPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



Şekil 4. 19. Hijyenik kolonilerde IAPV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları



Şekil 4. 20. Hijyenik kolonilerde SBV bakımından pupalara ait RT-qPCR sonuçları

4.1. İstatistiki Analiz Bulguları

Kontrol ve hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş kolonilere ait yetişkin (işçi) arılar ve pupaların qPCR amplifikasyon sonuçları normal dağılım göstermemiş ancak Cq değerleri normal dağılım göstermiştir (Çizelge 4.1). RT-qPCR ve Cq sonuçları karşılaştırılırken normal dağılım gösteren veri seti için bağımsız grup t-testi ve normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney U testi yapılmıştır.

Ancak, virüs miktarları arasında çok yüksek farklılıklar bulunması sebebiyle qPCR ortalamalarına ait standart sapmalar çok yüksek hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Bu durumu gidermek için qPCR sonuçlarına Box-Cox transformasyon yapılarak standart sapmadaki çarpıklık giderilmiştir (MINITAB 18 kullanılmıştır).

Çizelge 4.1. DWV bakımından çalışılan örneklerin normal dağılım testleri

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol işçi	,299	18	,000	,669	18	,000
Hijyenik işçi	,272	18	,001	,767	18	,001
Kontrol pupa	,446	18	,000	,315	18	,000
Hijyenik pupa	,388	18	,000	,523	18	,000
Kontrol işçi Cq	,133	18	,200*	,959	18	,587*
Hijyenik işçi Cq	,175	18	,149	,928	18	,182*
Kontrol pupa Cq	,124	18	,200*	,953	18	,471*
Hijyenik pupa Cq	,078	18	,200*	,977	18	,914*

*Normal dağılım gösteren parametreler

RT-qPCR ve Cq sonuçları karşılaştırılırken normal dağılım gösteren veri seti için bağımsız grup t-testi ve normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney U testi yapılmıştır. Pozitif sonuç veren DWV bakımından çalışılan örneklerle ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 4.2.'de özetlenmiştir.

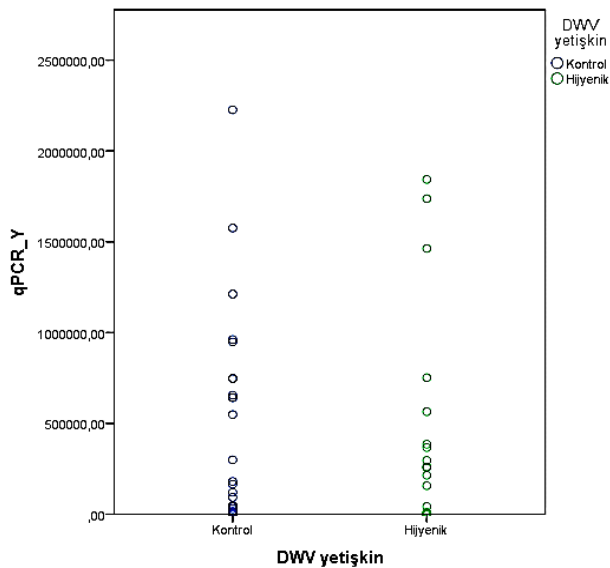
Ancak, virüs miktarları arasında çok yüksek farklılıklar bulunması sebebiyle qPCR ortalamalarına ait standart sapmalar çok yüksek hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Bu durumu gidermek için qPCR sonuçlarına Box-Cox transformasyon yapılarak standart sapmadaki çarpıklık giderilmiştir (MINITAB 18 kullanılmıştır).

Çizelge 4. 2. DWV bakımından çalışılan örneklerle ait tanımlayıcı istatistikler

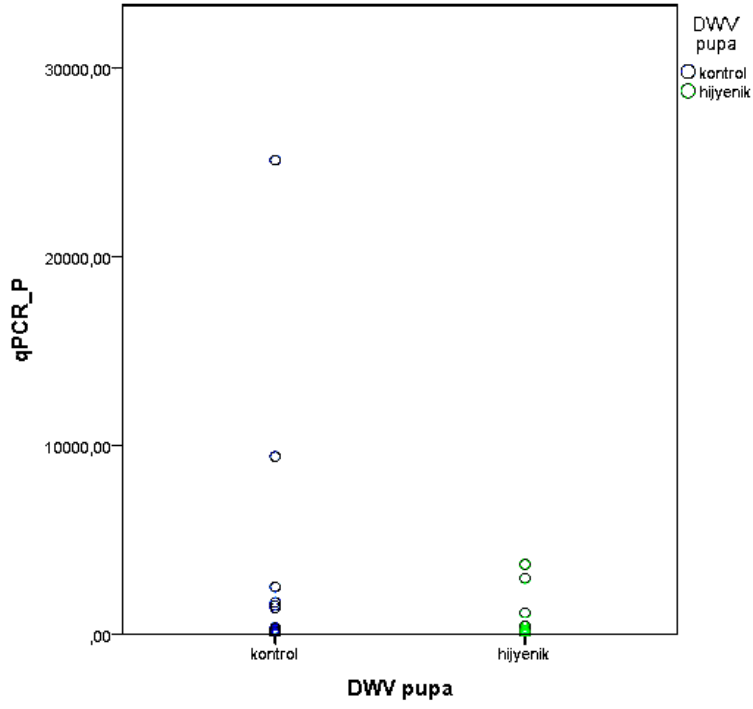
	N	Min	Max	Mean	Std. Dev	Std.Error
Kontrol işçi	50	,00	2227040,00	241982,35	466496,94	65972,63
Hijyenik işçi	50	,00	1843190,00	167097,47	419424,60	59315,59
Kontrol pupa	50	,00	25120,00	862,68	3769,14	533,04
Hijyenik pupa	48	,00	3698,00	205,08	688,27	99,34
Kontrol işçi Cq	33	10,69	22,80	17,13	3,38	0,59
Hijyenik işçi Cq	19	12,44	29,95	20,10	4,10	1,15
Kontrol pupa Cq	28	17,55	30,99	25,56	3,49	0,91
Hijyenik pupa Cq	29	20,14	31,86	26,36	2,94	0,91

Kontrol ve hijyenik kolonilerde tespit edilen DWV yükü hem işçi arılarda ($0,003 < 0,05$) hem de pupalarda ($0,002 < 0,05$) istatistiki olarak farklı bulunmuştur. Ayrıca, Cq değerleri bakımından yapılan istatistiki karşılaştırma sonucunda kontrol ve hijyenik kolonilere ait yetişkin bireylerin farklı olduğu ($0,024 < 0,05$) ancak pupalar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

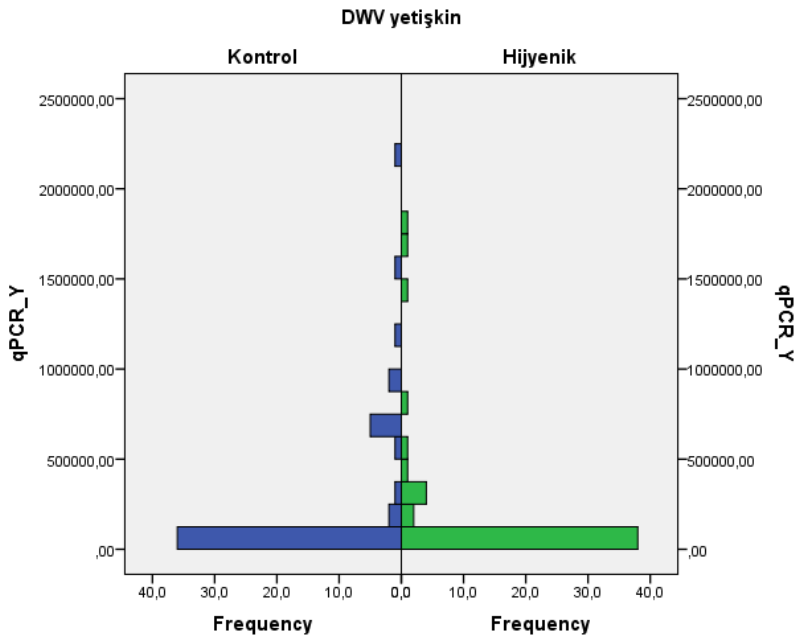
DWV yükü bakımından kontrol ve hijyenik grubuna ait işçi (yetişkin) arıların ve pupaların farklılıkları Şekil 4.21-24.'de görselleştirilmiştir.



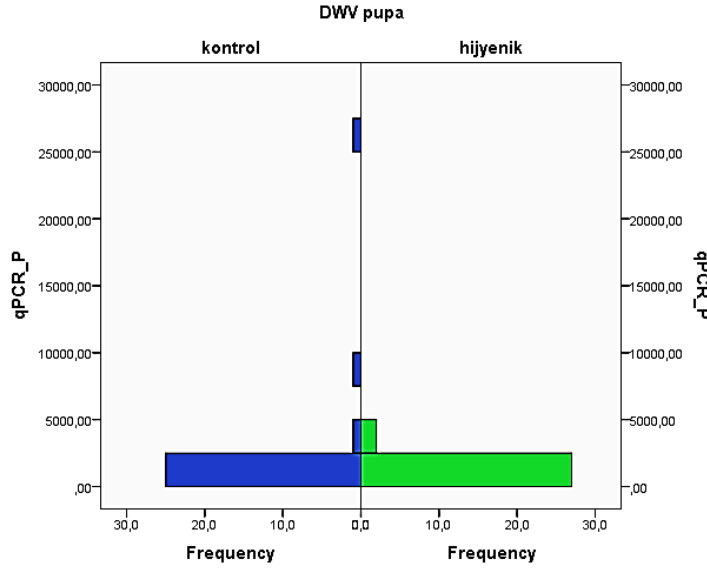
Şekil 4. 21. DWV bakımından kontrol ve hijyenik grubu işçi arıların scatter-dot grafiği



Şekil 4. 22. DWV bakımından kontrol ve hijyenik grubu pupaların scatter-dot grafiği



Şekil 4. 23. DWV bakımından kontrol ve hijyenik grubu işçi arılarının histogram grafiği



Şekil 4. 24. DWV bakımından kontrol ve hijyenik grubu pupaların histogram grafiği

Kontrol ve hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş kolonilerinin varroa yükleri normal dağılım testine tabi tutulmuştur ve kontrol gurubu normal dağılım gösterirken hijyenik gurubun normal dağılım göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu durumda tüm veriler tek bir setmiş gibi tekrar normal dağılım testi yapılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Kontrol ve hijyenik grubu kolonilerin varroa yükü normal dağılım testi

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol	,100	50	,200*	,964	50	,132
Hijyenik	,233	47	,000	,651	47	,000

*Normal dağılım gösteren parametreler.

Tüm veriler bir arada normal dağılım testi yapıldığında verilerin dağılımının normal olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.4.). Bu durumda kontrol ve hijyenik grupların varroa ortalamalarını karşılaştırmak için bağımsız iki gurup t-test yerine Mann Withney U testi yapılmıştır.

Çizelge 4.4. Kontrol ve hijyenik grupların birleştirilmiş varroa yüklerinin normal dağılım testi

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Varroa Sayısı	,175	97	,000	,859	97	,000

Ortalama varroa sayısı kontrol ve hijyenik gruplar için sırasıyla $108,9 \pm 9,8$ ve $27,2 \pm 5,2$ olarak bulunmuştur. Varroa yükü bakımından her iki grup kolonileri karşılaştırıldığında hesaplanan fark istatistik olarak önemli ($0,00 < 0,01$) bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Proje kapsamında, Muğla İli Arıcılar Birliği (MAYBİR) bünyesinde bulunan hijyenik davranış bakımından 4 kuşak selekte edilmiş koloniler ve üzerinde hiçbir çalışma yapılmamış olan Muğla bal arısı kolonileri beş patojen virüs (ABPV, CBPV, IAPV, SBV ve DWV) bakımından başarıyla test edilmiştir. Virüslerin tespitinde özgün primerler ve TaqMan probolar kullanılarak one step RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır.

Tez projesi kapsamında çalışılan kolonilerde ABPV, CBPV, IAPV ve SBV varlığına rastlanmamıştır. Ancak, DWV nerdeyse tüm kolonilerdeki işçi ve pupalarda görülmüştür. Ayrıca, DWV yükü bakımından kontrol ve hijyenik kolonilere ait işçi ve pupaların istatistiki olarak karşılaştırması yapılmış ve analizler sonucunda DWV yükü bakımından kontrol grubu ve hijyenik grup birbirinden farklı bulunmuştur. Ayrıca materyal olarak kullanılan kolonilerin varroa yükleri de tespit edilmiş olup aynı kolonilerin virüs yükü ile varroa yükü arasında bir ilişki olup olmadığı istatistiki olarak test edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda DWV pozitif örneklerde, virüs yükü ile varroa yükü arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. DWV bakımından yapılan analiz sonuçlarının ise daha önce dünya genelinde bal arıları üzerinde yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlar gösterdiği görülmüştür.

DWV ilk kez Japonya’da izole edildiğinden beri (Bailey ve Ball 1991) 30 yıla yakın zamanda dünyanın birçok ülkesine yayılmış ve birçok bilim insanının çalışma konusu olmuştur.

DWV’nin varlığı ve yaygınlığı Amerika (Chen vd. 2004), Tayland (Sanpa ve Chantawannakul 2009), İtalya (Williams vd. 2010), Şili (Barriga vd. 2012), İsveç (Nordström vd. 1999) ve Avusturya’nın tüm federal eyaletlerinde (Berényi vd.2006); ve dünyanın farklı ülkelerinde birçok araştırmacı tarafından (Martin 2001; Ongus vd. 2004; Chen vd. 2005; Yue ve Genersch 2005; Antúnez vd. 2006; Chen vd. 2006; Yue vd. 2007; Nielsen vd 2008; Santillan-Galicia vd. 2008; Boncristiani vd. 2009; Gisder vd. 2009; Moore vd. 2011; Möckel vd. 2011; Locke vd. 2012; Martin vd. 2012; Francis vd. 2013; Locke vd. 2014; Abd-El-Samie vd. 2017) farklı zamanlarda rapor edilmiştir. Amerika’da ve Avrupa’nın birçok bölgesinde varlığı bildirilen DWV ayrıca Orta Doğu ülkelerinden İsrail (Zioni vd. 2011), Mısır, Tunus, Suudi Arabistan (Ellis ve Munn 2005) ve Ürdün’de (Haddad vd. 2010) de pozitif olarak bildirilmiştir.

Afrika kıtasında DWV ile yapılan çalışmalara bakıldığında Afrika kıtasının doğusunda yer alan Uganda’da DWV tesbiti için çalışma yapılmış (Kajobe vd. 2010) bal arılarında varroa ve DWV araştırılmıştır. Fakat bu arılarda DWV’nin tespit edilemediği rapor edilmiştir. Bunun aksine DWV Kenya’da sıklıkla tespit edilirken (Muli vd. 2014) varroa Sudan’da (El –Niweiri ve El-Sarrag 2006), Etiyopya’da DWV enfeksiyonuna özgü semptomlarla birlikte görüldüğü de bildirilmiştir (Begna 2015).

Bunların yanısıra DWV’nin sadece bal arılarında hastalık etmeni olmakla kalmayıp aynı zamanda eşek arılarına (Forzan vd. 2017) ve bombus arılarına da bulaşması (Genersch vd. 2006) bu virüsün türler arasında geçiş yapmasıyla geniş çapta bulaşım yoluna işaret etmektedir.

DWV geçmiş yıllarda ve şimdilerde birçok ülkede çalışılmış bir virüs olmasıyla dikkat çekicidir. Türkiye’de ise yakın geçmişe kadar pek çalışılmamış bir konu olmasına karşın son dokuz yıl içinde çalışılmaya başlanmıştır. Ülkemizde bu konuyla ilgili az sayıdaki çalışma bulunmaktadır (Gülmez vd. 2009; Muz ve Muz 2009; Tozkar

vd. 2015; Muz ve Muz 2017) ve bu çalışmaların sonuçları bu tezdeki çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermekte olup DWV yapılan tüm çalışmalarda pozitif olarak bildirilmiştir.

Türkiye’de DWV ile yapılan çalışmalardan biri Gülmez vd. (2009)’nin Ordu ilinde yaptıkları ve DWV’yi Türkiye’de ilk kez rapor ettiklerini belirttikleri çalışmalarıdır. Çalışmalarında *Apis mellifera* L. ve *V. destructor*’da DWV’nin varlığını RT-PCR ile test ettiklerini ve sağlıklı arıların DWV ile enfekte olduklarını göstermişlerdir. Türkiye’deki bal üretiminde ilk üçe giren Ordu ili Karadeniz bölgesi için önemli bir bal merkezi olarak dikkat çekmekte ve bu virüsün Ordu için pozitif olması Ordu ili arıcuları için ilgilenilmesi gereken bir durum olarak görülmektedir.

Muz ve Muz (2009) Hatay ilinde koloni çökmesine uğramış arılıklardaki kraliçe arılar ile yaptıkları araştırmada çöken kolonilerde DWV’nin varlığını ve birden fazla parazitin olup olmadığını ayrıca bu iki öge arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda bal arısı örneklerinde DWV ve *Varroa destructor* tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca Türkiye’de çöken kolonilerdeki arılarda çok sayıda parazit enfeksiyonu bulunan bal arısı kraliçelerinde DWV’nin ilk kaydı olduğunu da rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada DWV’nin ve varroa akarının aynı kolonide pozitif olması, koloninin çökmesi ve kraliçe arılarda DWV’ye raslanması muhtemel bir varroa yoluyla bulaşımı işaret etmektedir. Çünkü DWV ancak hemolinf yoluyla bulaştığında ölümcül tehlikesi artmaktadır. DWV’nin normalde gizli enfeksiyonlara neden olduğu, ancak ektoparazitik akar *Varroa destructor* tarafından iletildiğinde morfolojik deformite ya da ölüme yol açarak arılar üzerinde yıkıcı etkilere neden olabileceği (Gisder vd. 2009) bilinmektedir. Kraliçe arıya bulaşan virüs kraliçenin tüm yumurtladığı yavrulara dikey yolla DWV bulaşmasını takip etmekte bu da koloni için kaçınılmaz bir çöküşle sonuçlanmış olabileceğini göstermektedir. Ayrıca Muz ve Muz (2017) yılında yine DWV ve *Varroa destructor* yönünden bu kez Tekirdağ ilindeki 17 arılıktan aldıkları numunelerle yaptıkları çalışmada da 17 arılığın tümünde varroosis tesbit etmişler ve 15’inde ise DWV’ye rastlamışlardır.

Gümüşova vd. (2010) Karadeniz bölgesinde yaptıkları çalışmada 28 farklı kovanlıktan aldıkları 10’ar işçi bal arısı (toplamda 280) ile çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. 3 bal arısı virüsünü (ABPV, CBPV, BQCV) RT-qPCR ile tesbit ettikleri analizlerin sonucunda ABPV’ye rastlamadıklarını, CBPV ve BQCV’nin ise pozitif olduğunu ve Türkiye’de ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir. Yaklaşık 50 yıl önce dünyada ilk kez izole edilen bu tez konusu patojenlerinden biri de olan CBPV’nin (Bailey vd. 1968) Türkiye’de ilk kez 2010 yılında rapor edilmesi ve o zamandan bu yana Muğla yöresindeki bal arılarında negatif olması CBPV’nin ve DWV’nin hayatta kalma mekanizmalarının bilinmesi yönünden önem taşımakta ve bu konu üzerinde daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada, Tozkar vd. (2015), Türkiye’nin sekiz bölgesinden 158 arı işletmesinde (98’i göçer, 60’ı sabit arıcı) RT-PCR ile yaptıkları çalışma sonucunda IAPV ve SBV saptamadıklarını ancak ABPV ve DWV var olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, DWV yükleri Bitlis, Hatay, Muğla ve Ardahan’da diğer bölgelerden daha yüksek, ABPV ise Bitlis’teki en yaygın ve özellikle göçmen arıcularının örneklerinde yüksek oranda tesbit etmişlerdir. ABPV bakımından en düşük seviye Hatay’ın sabit kolonilerinde bulunmuştur. Yığılca-Kırklareli ile Yığılca-Muğla arasında ABPV bakımından istatistiksel farklar olduğu ($p= 0,0398$ ve $p= 0,0478$) belirlenmiştir. Muğla ve Ankara’da ABPV yükleri, göçmen arıcılık örneklerinde 2010

yılında sabit arıcılık örneklerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yaptıkları çalışmadan farklı olarak yapılan bu tez çalışmasında sadece DWV'nin var olduğunu diğer virüsler bakımından Muğla arılarının negatif olduğu belirlenmiş ve Tozkar vd. (2015) çalışmalarının sonuçları gezginci arıcılığın da virüs bulaşması yönünden bir etken olduğunu göstermiştir.

Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016), RT-PCR yöntemi kullanılarak Hakkari'de 90 farklı arılıkta ABPV varlığı ve yaygınlığını araştırmışlardır. Yapılan analizler sonucunda sadece iki arılıkta söz konusu virüsün varlığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlar çalışma yapılan bölgede bu virüsün yaygın olmadığını göstermiştir. ABPV için Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile bu tez çalışmasının sonuçları yüksek benzerlikte olup her ikisi de ABPV için negatif sonuç göstermektedir.

Grabensteiner vd. (2007) bal arısı (*Apis mellifera* L.) örneklerinde ABPV ve SBV tespiti için multipleks tek aşamalı RT-PCR kullanmışlar ve sonuçta her iki virüsün varlığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan farklı olarak bu tez çalışmasında Muğla bal arılarında ABPV ve SBV bulunmamıştır. Benzer bir çalışmayı Kukielka vd. (2009) İspanya bal arılarında gerçekleştirmişlerdir. Tek adımlı eş zamanlı RT-PCR analizleri sonucunda ABPV'ye rastlamadıklarını, SBV'nin ise düşük frekanslarda görüldüğünü bildirmişlerdir.

Simeunović vd. (2014) farklı Sırp bölgelerinden topladıkları 55 bal arısı kolonisinde DWV ve ABPV varlığı TaqMan prob kullanarak RT-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Ayrıca, aynı kovanlarda varroa yükünü de belirleyip virüs yükü ile aralarındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan analizler sonucunda hastalık belirtisi göstermeyen kolonilerde yüksek DWV (% 76,4) ve ABPV (% 61,8) bulunmuş ve aynı kolonilerde varroa miktarının da fazla olduğunu belirlemişlerdir. Varroa akarının bal arısı virüslerinin aktarımında ve aktivasyonunda rol oynadığını ve varroaya karşı mücadelenin yetersiz olduğu durumlarda virüs sayısının da artabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da varroa ile virüs yükü arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve hem hijyenik hem de kontrol kolonilerinde böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır. Ancak, hijyenik koloniler ile kontrol kolonileri arasında varroa yükü bakımından fark olduğu görülmüştür. Bu farklılığın kaynağı Simeunovic vd (2014)'nin dikkat çektiği varroaya karşı mücadele farklılığından olabilir. Çünkü hijyenik kolonilerin varroaya karşı ilaçlama işlemleri kontrol kolonilerine göre daha stabil kabul edilebilir.

Bakonyi vd. (2002) Macar yetişkin arıların ve parazit akar *Varroa destructor*'un araziden alınan örneklerinde ABPV'nin oluşumunu belirlemek için iki yıllık bir çalışmayı ters transkripsiyon RT-PCR yöntemini kullanarak yapmışlardır. Toplam 114 hastalık belirtisi olmayan koloninin 14'ünde ABPV varlığını saptamışlardır. Araştırmada, arıların üçte ikisinin ABPV ile bulaşık ve enfeksiyonun oranının % 12,2 olduğunu bildirmişlerdir. Koloni çökmesi yaşanan sekiz arılıktan yedisinde (% 87,5) ABPV tespit edilmiştir. Ani koloni çökmesi yaşanmış kolonilerde virüs varlığını bu kadar çok olması aynı kolonilerde *Nosema apis* ve *Varroa destructor* varlığının da yüksek olmasına bağlı olarak söylenebilir. Bu tez çalışmasında materyal olarak toplanan kolonilerin sağlık durumunda herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiş ve ani koloni çökme vakasına da rastlanmamıştır. Bu durum muhtemelen DWV enfekteli arıların viral titre yüksekliği az olduğunda belirti göstermeksizin uzun süre hayatta kalması ve ABPV'nin ise enfekte olmasının ardından yaklaşık 1 hafta içinde ölmesinden

kaynaklanmaktadır. Bakonyi vd (2002)'nin bildirdiği yüksek oranda ABPV sonuçlarının bu tez çalışmasının sonuçlarından farklı olmasının sebebinin bu durum olması muhtemeldir.

Chen vd. (2006), bal arısı kolonilerinden topladıkları kraliçe arıların farklı dokularında Akut Arı Felci Virüsü, Siyah Kraliçe Hücre Virüsü, Kronik Arı Felci Virüsü, Deforme Kanat Virüsü, Kaşmir Arı Virüsü ve Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü'nün transmisyon mekanizmalarını ters transkripsiyon RT-PCR yöntemlerini kullanarak incelemişlerdir. Kafa dokusu haricinde diğer dokuların yanı sıra kraliçe dışkıları da virüs enfeksiyonları için pozitif bulunmuştur. Arı kolonilerindeki kraliçeler DWV, CBPV, KBV ve SBV için pozitif olarak tanımlandıklarında, yavrular, yumurtalar, larvalar ve yetişkin işçiler de dahil olmak üzere aynı virüslerde pozitif olarak tanımlanmışlardır. Yumurtalık dokusunda virüs varlığı, yumurtalarda ve genç larvalarda aynı virüslerin bulunması, kraliçelerden yavrulara virüslerin dikey olarak bulaştığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmanın bal arısı kolonilerinde virüslerin dikey geçişinin ilk kanıtı olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, bizim bulduğumuz sonuçlarda hem işçi arılar hem de pupalarda DWV'nin yaygın bulunması bu virüsün dikey geçiş yapmış olabileceğini göstermektedir.

Prisco vd. (2011) İsrail Akut Felç Virüsü ile yaptıkları bir çalışmada *Varroa destructor*'un bal arılarında IAPV'yi vektörlene kabiliyetine sahip olduğunu ilk kanıtını sunduklarını bildirmişlerdir. Bal arısı, IAPV virüsü taşıyan varroa akarlarına maruz kaldıktan sonra IAPV ile bulaştığını ve arılardaki IAPV'nin kopya sayısı, varroa akarlarının yoğunluğu ve varroa akarlarına maruz kalma süresi ile pozitif korelasyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Dahası, akar virüs birlikteliğinin konakçı bağışıklığını azaltabileceğini ve dolayısıyla virüs replikasyonunun seviyelerini yükselttiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın, IAPV'nin bulaşmasında varroa akarlarının aktif rolü olduğunu ve bal arılarındaki IAPV enfeksiyonunun epidemiyolojisi üzerine ışık tuttuğunu bildirmişlerdir.

Türkiye'de ise IAPV tesbitinde çalışmalar yeni yapılmaya başlanmış olup, Özkırım ve Schiesser (2013) tarafından Türkiye'nin 20 farklı yöresinden toplanan örneklerde RT-PCR ve Nested PCR kullanarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda IAPV virüsünü tespit ettiklerini ve tüm sonuçları jel elektroforezinde gözlemlediklerini, farklı illerdeki 71 numunenin 15'inde kaydettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, bunun Türkiye'de ilk tespit edilen IAPV raporu olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışması analiz sonuçlarının hiçbirinde IAPV'ye rastlanmamıştır. Bu sonuç IAPV'nin yeni suş olduğunu ve ülkemizde henüz yaygınlaşmadığını düşündürmektedir.

Nielsen vd. (2008) yaptıkları bir çalışmada yüksek derecede kışlık ölüm oranı görülen kolonilerin işçi arılarını ve hastalık semptomları olan kovanların yavrularını ABPV, CBPV, DWV ve SBV bakımından RT-PCR ile analiz etmişlerdir. 78 kovanlıkta SBV, 55'te DWV, 11'de ABPV, 4'te CBPV bulunduğu belirtmişlerdir. Arı örneklerinin büyük çoğunluğuna bir veya daha fazla virüs bulaştığı, tekli, ikili ve üçlü enfeksiyonlar gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Yapırları çalışmada birçok virüsün birlikte bulunması sağlıklı ve zayıf koloniler de çoklu virüs enfeksiyonunun olabileceğini göstermiştir. Tamamlanan bu tez çalışmasında çoklu virüs enfeksiyonuna rastlanmamış olması materyal olarak seçilen kolonilerde ani çökme veya herhangi bir hastalık belirtisi olmamasından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuç, kış aylarında zayıflamış, yetersiz beslenmiş veya enfeksiyona yakalanmış kolonilerin çoklu virüs enfeksiyonlarına karşı daha dirençsiz olduğunu düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında sadece Deforme Kanat

Virüsü'ne rastlanmış olması, örnek toplanan sezonun bahar ayına denk gelmesi ve bu aylarda yavru üretiminin maksimum olmasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü, DWV artan koloni sayısına paralel olarak enfeksiyonu arttırabilmektedir.

Sanpa ve Chantawannakul (2009), Kuzey Tayland bal arılarında altı bal arısı virüsünü RT-PCR kullanılarak araştırarak Tayland'daki arıların yaklaşık % 80'inde virüs bulunduğunu belirtmişlerdir. Örneklerinde DWV, ABPV ve SBV tespit ettiklerini ancak CBPV ve BQCV yönünden negatif olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmayı (Berényi vd. 2006) nüfus azalması, ani çökme, felç veya koyu renklenme semptomları görülen 90 Avusturya bal arısı kolonisinde yapmışlar ve sonuç olarak, en yaygın virüsün % 91 oranında DWV olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bu tez çalışmasındaki analiz sonuçları ile uyum göstermektedir.

Birçok çalışmada DWV virüsünün diğerlerine göre daha yaygın olmasının sebepleri arasında; diğer virüslerin aksine bu virüsün koloniye bulaşmasının hemen ardından bireylerin ölümüyle sonuçlanmaması, virüs titresinin düşük miktardaki kopya sayısı ile bal arılarının uzun süre belirti bile göstermeden hayatta kalabilmeleri ve hayatta kalan bireylerin tarlada, kraliçe bakımında, yavru beslemede, diğer kovan içi, dışı işlerde görev alarak geniş bir bulaştırma alanı oluşturma imkanlarının olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca yatay ve dikey bulaş yollarını kullanarak yayılan DWV'nin koloni de varroa akarıyla birlikte bulunmasıyla enfekte etme oranının hemolinf yoluyla daha güçlü olduğu söylenebilir.

Literatür taramaları sonucunda bu tez çalışmasının konu ve kullanılan materyal bakımından özgün olduğu görülmüştür. Bu çalışma, hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş arılar ile kontrol grubu arıların yaygın patojen virüsler bakımından karşılaştırılması ve ıslah başarısının ortaya çıkarılması bakımından literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca, bu çalışmanın varroa ile virüs arasındaki ilişkilerin anlaşılması bakımından önemli olduğuda düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Amaç ve hedeflerine uygun şekilde tamamlanan bu tez çalışmasında materyal olarak Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) tarafından dört kuşak ıslah edilmiş 50 koloni ve üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış 50 koloniden toplanan işçi arı ve pupalar kullanılmıştır. Rastgele seçilen her bir kovandan 10'ar adet işçi ve 10'ar adet pupa örneği toplanmıştır. Böylece, toplam deneme materyali 2000 adet arı örneği ile teşkil edilmiştir. Bu örnekler kovanları bakımından birleştirilerek toplamda 200 adet örnek meydana getirilmiştir. Herbir örnekte proje konusu olan ABPV, CBPV, IAPV, DWV, SBV ve DWV varlığı ve yoğunluğu özgün primerler ile TaqMan prob kullanılarak RT-qPCR'da tespit edilmiştir. Ayrıca, proje konusu virüsler ile varroa akarı arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla arı örneği alınan her bir kovanın dip tahtası yöntemiyle varroa sayıları belirlenmiştir.

Çalışılan 5 virüsten sadece DWV virüsünün kolonilerde var olduğu diğer virüsler bakımından kolonilerin negatif olduğu görülmüştür. DWV yükü bakımından hijyenik ve kontrol grubu koloniler işçi ve pupalarda ayrı ayrı tespit edilen virüs miktarlarına göre karşılaştırılmıştır. Kontrol ve hijyenik kolonilerde tespit edilen DWV yükü hem işçi arılarda ($0,003 < 0,05$) hem de pupalarda ($0,002 < 0,05$) istatistiki olarak farklı bulunmuştur. Ayrıca, Cq değerleri bakımından yapılan istatistiki karşılaştırma sonucunda kontrol ve hijyenik kolonilere ait yetişkin bireylerin farklı olduğu ($0,024 < 0,05$) ancak pupalar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. Kontrol ve hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş koloniler varroa yükü bakımından karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiki olarak önemli ($0,00 < 0,01$) farklılıklar bulunmuştur. Ancak varroa yükü ve virüs yükü arasında önemli bir korelasyon hesaplanmamıştır.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular virüs tespiti için bu çalışmada kullanılan yöntemlerin etkin olduğunu göstermiştir. Yüksek hassasiyetli TaqMan problemler ile yapılan RT-qPCR sonuçlarına dayanarak Muğla yöresindeki kolonilerin DWV hariç diğer yaygın virüsler bakımından enfekte olmadığı söylenebilir. Bu sonuç ülke arıcılığı için sevindirici bir durum arz etmektedir.

Ayrıca, DWV virüs yükü ile aynı kolonilerin varroa yükü arasında önemli bir ilişki bulunamaması DWV'nin yaygınlığında varroa'nın tek başına önemli bir vektör olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Hijyenik koloniler ile kontrol kolonileri arasında virüs yükü ve varroa yükü bakımından istatistiki olarak önemli farklılıkların bulunması MAYBİR bünyesinde 4 kuşak yapılan ve sürdürülen ıslah çalışmasının başarılı ve arıcılık sektörü için faydalı olduğu kanaatini doğurmaktadır. Islah çalışmalarının kesintisiz olarak sürdürülmesi durumunda arı hastalık ve zararlılarına dirençli stokların geliştirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizde izole alanların çoğaltılıp, bal arısı ıslah çalışmalarının teşvikinin sağlanması, ıslah edilen damızlık kraliçelerin arıcılara ulaştırılması ve arıcıların bilinçlendirilmesi bal üretiminde dünyada ilk sıralarda yer alan Türkiye için mühim ve zorunlu olarak görünmektedir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda bal arılarında hijyenik davranış bakımından seleksiyonun virüs varlığı ile ilişkilendiren başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

7. KAYNAKLAR

- Abd-El-Samie, E. M., Adham, F. K., El-Mohandes, S., and Seyam, H. (2017). First detection of deformed wing and kakugo viruses in honeybees (*Apis mellifera* L.) in Egypt by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). *African Journal of Biotechnology*, 16(14), 738-748.
- Adam B., (1983). In search of the best strains of honey bee. Northern Bee Books, West Yorkshire, UK.
- Adam B., (1987). In Search of the Best Strains of Bees Northern Bee Boks, West Yorkshire, UK.
- Adjlane, N., and Haddad, N. (2014). Detection of Deformed Wing Virus in the local bee colonies *Apis mellifera intermissa* in Algeria and its relationship with *Varroa destructor*. *Mellifera*, 28, 3-10.
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., and Klein, A. M. (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*, 18(20), 1572-1575.
- Akyol, E. (2016). A Study on Method Development in Hygienic Behaviour in Honeybee Colonies (*Apis Mellifera* L., 1758). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(12), 1207-1211.
- Akyol, E. (1998). Kafkas ve Muğla Arılarının (*Apis mellifera* L.) Saf ve Karşılıklı Melezlerinin Morfolojik, Fizyolojik ve Davranışsal Özelliklerinin Belirlenmesi.Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi (Basılmamış).153s., Adana.
- Akyol, E., ve Korkmaz, A. (2005). Bal arısı (*Apis mellifera*) zararlısı *Varroa destructor*'un biyolojisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, (3).
- Akyol, E., Kaftanoğlu, O., (2001). Colony characteristics and the performance of Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) and Mugla (*Apis mellifera anatoliaca*) bees and their reciprocal crosses. *J. Apicult. Res.* 40:11-15.
- Akyol, E., Kaftanoğlu, O., Özkök, D. (1997). KKTC'li Arıcılara Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları Kurs Notları.
- Allen, M.F., Ball, B.V., (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141-162.
- Amiri, E., Meixner, M., Büchler, R., and Kryger, P. (2014). Chronic bee paralysis virus in honeybee queens: Evaluating susceptibility and infection routes. *Viruses*, 6(3), 1188-1201.
- Anderson, D. L., and Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3), 165-189.ISO 690

- Anonim, Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkezi Birliği. Arı Dosyası. Açık Erişim. <http://www.tab.org.tr/ari> Son Erişim Tarihi: 03.01.2018)
- Anonymous 1: *Apis mellifera* Linnaeus 1758 file online. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=154396#null (Son erişim tarihi: 03.01.2018)
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., and Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67-70.
- Aubert, M., et al. *Virology and the Honey Bee*, 458 pp. Office for Official Publications for the European Communities. Luxembourg. ISBN 92-79-00586, 2007.
- Babu, B., Jeyaprakash, A., Jones, D., Schubert, T. S., Baker, C., Washburn, B. K., ... and Paret, M. L. (2016). Development of a rapid, sensitive TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of Rose rosette virus using multiple gene targets. *Journal of virological methods*, 235, 41-50.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. *J Gen Virol* 2:251–260. 10.1099/0022-1317-2-2-251.
- Bailey, L. (1969). The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Annals of Applied Biology*, 63(3), 483-491.
- Bailey, L. (1975). Recent research on honeybee viruses. *Bee World*, 56(2), 55-64.
- Bailey, L. (1976). Viruses attacking the honey bee. *Advances in virus research*, 20, 271-304.
- Bailey, L., and Ball, B. V. (1991). *Honey Bee Pathology*. 2nd. Ed. Pub. Academic Press.
- Bailey, L., Gibbs, A. J., and Woods, R. D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21(3), 390-395.
- Bailey, L., Gibbs, A. J., and Woods, R. D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23(3), 425-429.
- Baker, A., and Schroeder, D. (2008). Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of invertebrate pathology*, 98(2), 239-242.
- Bakonyi, T., Farkas, R., Szendrői, A., Dobos-Kovács, M., and Rusvai, M. (2002). Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, 33(1), 63-74.
- Balcı F.1988. Arıcılık. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Mesleki yayınlar(Tarım Meslek Liseleri Ders Kitabı) Yayın:10, Ankara, 56s.

- Ball, B. V. and Allen, M. E. (1988). The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Appl Biol* 113, 237–244.
- Ball, B. V. (1983). The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. In *Proceedings of a Meeting of the EC Experts' Group, Wageningen, 7–9 February 1983*. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Ball, B. V. (1985). Acute paralysis virus isolates from honeybee, *Apis mellifera*, colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res* 24, 115–119.
- Ball, B. V. (1997). *Varroa and viruses*. *Varroa*, 11-15.
- Ball, B. V. (1999). Paralysis. *Options Méditerranéennes. Série B: Etudes et Recherches (CIHEAM)*.
- Ball, B.V., Bailey, L., (1991). Virus of honey bees. In: Adams, J.R., Bonami, J.R. (Eds.), *Atlas of Invertebrate Viruses*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 525–551.
- Barriga, G. P., Cifuentes-Muñoz, N., Rivera, P. A., Gutierrez, M., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D., and Engel, E. A. (2012). First detection and complete genome sequence of Deformed wing virus in Chilean honeybees. *Virus genes*, 45(3), 606-609.
- Begna, Desalegn. "Occurrences and distributions of honeybee (*Apis mellifera Jemenetica*) varroa mite (*Varroa destructor*) in Tigray region, Ethiopia." *J. Fish. Livest. Prod.* 3 (2015): 126.
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., (2001). Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2384–2387.
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., and Nowotny, N. (2006). Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and environmental microbiology*, 72 (4), 2414-2420.
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., and Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveill*, 19(13), 20751.
- Bigio, G., Al Toufalia, H., and Ratnieks, F. L. W. (2014). Honey bee hygienic behaviour does not incur a cost via removal of healthy brood. *Journal of evolutionary biology*, 27(1), 226-230.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A., ve Düzlü, Ö. (2011). Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8, 43-51.
- Bixby, M., Baylis, K., Hoover, S. E., Currie, R. W., Melathopoulos, A. P., Pernal, S. F., and Guarna, M. M. (2017). A Bio-Economic Case Study of Canadian Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies: Marker-Assisted Selection (MAS) in

- Queen Breeding Affects Beekeeper Profits. *Journal of Economic Entomology*, 110(3), 816-825.
- Blanchard, P., Guillot, S., Antúnez, K., Köglberger, H., Kryger, P., de Miranda, J. R., and Ribière, M. (2014). Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of virological methods*, 197, 7-13.
- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnudel, P., Thiéry, R., and Ribière, M. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 99(3), 348-350.
- Boecking, O., and Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2-3), 141-158.
- Boncristiani, H. F., Di Prisco, G., Pettis, J. S., Hamilton, M., and Chen, Y. P. (2009). Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology journal*, 6(1), 221.
- Boot, W. J., Calis, J. N. M. and Beetsma, J. (1992). Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* 16(4), 295–301.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. and Gunn, A. (1999). The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of invertebrate pathology* 73(1), 101–106.
- Brettell, L. E., and Martin, S. J. (2017). Oldest *Varroa* tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. *Scientific Reports*, 7.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Buttel-Reepen, H. (1906). *Apistica*. Beiträge zur Systematik, Biologie, sowie zur geschichtlichen und geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifera* L.), ihrer Varietäten und der übrigen *Apis*-Arten. Veröff Zool. Mus. Berlin. 118-120.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., Elibol, Z., and Tekinay, T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 1947-1957.
- Carter, M. J., and Genersch, E. (2008). Molecular characterisation of honey bee viruses. *Virology and the Honey Bee*. VIth Framework. EC Publications, Brussels, 85-120.

- Chantawannakul, P., Puchanichanthranon, T., and Wongsiri, S. (2005). Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the growth of *Ascosphaera apis*. *Acta Horticulturae*, 678, 183-189.
- Chejanovsky, N., Ophir, R., Schwager, M. S., Slabezki, Y., Grossman, S., and Cox-Foster, D. (2014). Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology*, 454, 176-183.
- Chen, Y. (2011). Viruses and viral diseases of the honey bee, *Apis mellifera*. In *Recent Advances in Entomological Research* (pp. 105-120). Springer Berlin Heidelberg.
- Chen, Y. P. and Siede, R. (2007). Honey bee viruses. In: Maramorosch, K., Shatkin, A. J., and Murphy, F. A. (Eds.) *Advances in Virus Research*, Vol 70. Elsevier Academic Press Inc, USA. pp 33–80.
- Chen, Y. P., et al. "Prevalence and transmission of honeybee viruses." *Applied and environmental microbiology* 72.1 (2006): 606-611.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. and Feldlaufer, M. F. (2005). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 436–441.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Corona, M., Chen, W. P., Li, C. J., Spivak, M., ... and Delaplane, K. (2014). Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. *PLoS pathogens*, 10(7), e1004261.
- Chen, Y., Evans, J., Feldlaufer, M., (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee (*Apis mellifera*), *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 152–159.
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H. T., Evans, J., and Feldlaufer, M. (2004). Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of invertebrate pathology*, 87(2), 84-93.
- Choe, S.E., Nguyen, L.T.K., Noh, J.H., Koh, H.B., Jean, Y.H., Kweon, C.H., Kang, S.W., (2012). Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 330–333.
- Clermont A., Pasquali M., Eickermann M., Kraus F., Hoffmann L., Beyer M. 2015. Virus Status, Varroa Levels, and Survival of 20 Managed Honey Bee Colonies Monitored in Luxembourg Between the Summer Of 2011 and the Spring Of 2013. *J. Apic. Sci.* Vol. 59, 59-73.
- Cobey, S. W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4), 390-410.
- Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., and Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS one*, 7(8), e43562.

- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Crailsheim, K. (1992). The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of comparative physiology B*, 162(8), 681-689.
- Darzi, E., Smith, E., Shargil, D., Lachman, O., Ganot, L., and Dombrovsky, A. (2018). The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread via pollination. *Plant Pathology*, 67(1), 244-251.
- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., and Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3), 263-284.
- De Miranda, J. R., and Fries, I. (2008). Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, 98(2), 184-189.
- De Miranda, J. R., and Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S48-S61.
- De Miranda, J. R., Dainat, B., Locke, B., Cordoni, G., Berthoud, H., Gauthier, L., ... and Stoltz, D. B. (2010). Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of general virology*, 91(10), 2524-2530.
- De Miranda, J. R., Gauthier, L., Ribiere, M., and Chen, Y. P. (2012). Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. *Honey bee colony health: Challenges and sustainable solutions*, 71-102.
- Deborah R. Smith (2002) Uludağ Bee Journalist Genetic Diversity In Turkish Honey Bees University Of Kansas, Department Of Ecology And Evolutionary Biology, Lawrence, Ks, USA)
- Desai, S. D., Eu, Y. J., Whyard, S., and Currie, R. W. (2012). Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect molecular biology*, 21(4), 446-455.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani Jr, H. F., Evans, J. D., and Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, 92(1), 151-155.
- Dodoloğlu, A., Genç, F., (2002). Determining the some physiological characteristics of Caucasic and Anatoliaca honeybees (*A. mellifera* L.) and their reciprocal crosses. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 26:715-722
- Doğaroğlu, M. (1982). Türkiye’de yetiştirilen önemli arı ırk ve tiplerinin “Çukurova Bölgesi koşullarında performanslarının karşılaştırılması. *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 13 (3-4):46-60.

- Doğaroğlu, M., Özder, M.ve Polat, C. (1992). Türkiye’de önemli bal arısı (*Apis mellifera* L .) ırk ve ekotiplerinin Trakya koşullarında performanslarının karşılaştırılması. *Doğa Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 16 :403-414.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nuc Acids Res*, 19: 4008.
- Dong, H., Xiao, K., Xian, Y., and Wu, Y. (2018). Authenticity determination of honeys with non-extractable proteins by means of elemental analyzer (EA) and liquid chromatography (LC) coupled to isotope ratio mass spectroscopy (IRMS). *Food chemistry*, 240, 717-724.
- Donzé, G., Herrmann, M., Bachofen, B. and Guerin, P. M. (1996). Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological entomology* 21(1), 17–26.
- Dorak, M. T. (Ed.). (2007). Real-time PCR. Taylor and Francis.ISO 690
- El-Niweiri, M. A. A., and El-Sarrag, M. S. A. (2006). Detection of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) of honeybees. *Apis mellifera*, 60-75.
- Ellis J. (2015). American Bee Journal. The Tasks Of A Worker Honey Bee file online. <http://americanbeejournal.com/the-tasks-of-a-worker-honey-bee/> (Son erişim tarihi: 03.01.2018)
- Ellis, J.D., Munn, P.A., (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86, 88–101.
- Erickson, E. H., Atmowidjojo, A. H., and Hines, L. H. (1999). *Varroa*-tolerant honey bees are a reality. *American bee journal*.
- Evans, J. D., and Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S62-S72.
- Fıratlı, Ç.ve Budak, E. 1994. Türkiye’de çeşitli kurumlarda yetiştirilen ana arılar ile oluşturulan bal arısı *Apis mellifera* L. kolonilerinin fizyolojik, morfolojik ve davranış özellikleri. A.Ü. Ziraat Fakültesi, Yayın No:1390
- Forzan M, Felicioli A, Sagona S, Bandecchi P, Mazzei M. (2017). Complete genome sequence of deformed wing virus isolated from *Vespa crabro* in Italy. *Genome Announc* 5:e00961-17.
- Fraga, D., Meulia, T., and Fenster, S. (2008). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, 10-3.
- Francis, R. M., Nielsen, S. L., and Kryger, P. (2013). *Varroa*-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PloS one*, 8(3), e57540.
- Fuchs, S. (1990). Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* 21(3), 193–199.

- Fujiyuki, T., Takeuchi, H., Ono, M., Ohka, S., Sasaki, T., Nomoto, A., and Kubo, T. (2004). Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *Journal of virology*, 78(3), 1093-1100.
- Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S., and Sela, I. (2012). Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and Varroa destructor: Varroa gene silencing reduces Varroa population. *PLoS pathogens*, 8(12), e1003035.
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., and Bergoin, M. (2007). Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, 38(5), 426-435.
- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiött, M., Hause, G., Otte, M., and Beye, M. (2009). Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS biology*, 7(10), e1000222.
- Genç, F., Dülger, C., Dodoloğlu, A., Kutluca, S., (1999). Comparison of some physiological characteristics of Caucasian, middle Anatolian and Erzurum honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 23:645-650
- Gençer, H. V. ve Karacaoğlu, M. (2003). Kafkas ırkı (*Apis mellifera caucasica*) ve Kafkas ırkı ile Anadolu arısı-Ege ekotipi (*Apis mellifera anatoliaca*)'nin karşılıklı melezlerinin Ege bölgesi koşullarında yavru yetiştirme etkinlikleri vebal verimleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 13 (1):61-65
- Ghosh, R. C., Ball, B. V., Willcocks, M. M., and Carter, M. J. (1999). The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6), 1541-1549.
- Genersch, E. and Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research* 41(6), 54.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I., and de Miranda, J. R. (2006). Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of invertebrate pathology*, 91(1), 61-63.
- Gilliam, M., Taber, S., Lorenz, B. J., and Prest, D. B. (1988). Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascospaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 314-325.
- Gisder, S., and Genersch, E. (2015). Special Issue: Honey Bee Viruses.
- Gisder, S., Aumeier, P., and Genersch, E. (2009). Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90(2), 463-467.
- Goodvin, M., Eaton V. C. (2001). Control of Varroa. A Guide for New Zealand Beekeepers

- Gosh, M., Barman, A., Meikap, A. K., De, S. K., and Chatterjee, S. (1999). Hopping transport in HCl doped conducting polyaniline. *Physics Letters A*, 260(1), 138-148.
- Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., and Nowotny, N. (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of invertebrate pathology*, 94(3), 222-225.
- Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M. J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., and Nowotny, N. (2001). Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(1), 93-104.
- Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., ... and Nowotny, N. (2000). Molecular characterisation of the sacbrood virus of the honey bee by RT-PCR and phylogenetic studies. *Apidologie (France)*.
- Grabenstiner, E., Ritter, W., Carter, M.J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., Boeching, O.I., Derakhshifar, R., Moosbeckhofer, E., Licek, N., Nowotny, (2001). Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 93–104.
- Guarna, M. M., Hoover, S. E., Huxter, E., Higo, H., Moon, K. M., Domanski, D., ... and Desai, S. (2017). Peptide biomarkers used for the selective breeding of a complex polygenic trait in honey bees. *Scientific Reports*, 7(1), 8381.
- Gupta, P., Conrad, T., Spötter, A., Reinsch, N., and Bienefeld, K. (2012). Simulating a base population in honey bee for molecular genetic studies. *Genetics Selection Evolution*, 44(1), 14.
- Güler, A. 2006. Bal Arısı(*Apis mellifera*) On Dokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fakültesi. Der Kitabı No:55,Samsun, 46,61,62,410 s.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O., (1999). Determination of performances of some important races and ecotypes of Turkish honeybees (*Apis mellifera* L.) under migratory beekeeping condition. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 23:577- 582.
- Güler, A.(1995). Türkiye'deki önemli bal arısı (*Apis mellifera* L.) Irk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri ve performanslarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi (Basılmamış),157s, Adana.
- Güler, A.ve Kaftanoğlu, O. (1999). Türkiye'de önemli bal arısı (*Apis mellifera* L.) ırk ve ekotiplerinin göçer arıcılık koşullarında performanslarının karşılaştırılması. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 23 Ek Sayı3. 577-581
- Gülmez Y., Bursalı A., Tekin Ş. (2009). First molecular detection and characterization of deformed wing virus (DWV) in honeybees (*Apis mellifera* L.) and mite

- (*Varroa destructor*) in Turkey. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (16), pp. 3698-3702.
- Gümüşova S.O., Albayrak H., Kurt M., Yazici Z., (2010). Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. Veterinarski Arhiv, 80(6), 779-785.
- Haddad, N., Brake, M., Migdadi, H., and de Miranda, J. R. (2010). First detection of honey bee viruses in Jordan by RT-PCR. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 4(3).
- Hamiduzzaman, M. M., Emsen, B., Hunt, G. J., Subramanyam, S., Williams, C. E., Tsuruda, J. M., and Guzman-Novoa, E. (2017). Differential Gene Expression Associated with Honey Bee Grooming Behavior in Response to Varroa Mites. Behavior Genetics, 47(3), 335-344.ISO 690
- Harbo, J. R., and Harris, J. W. (2009). Responses to Varroa by honey bees with different levels of Varroa Sensitive Hygiene. Journal of apicultural research, 48(3), 156-161.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome research, 6(10), 986-994.
- Highfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C., Laure, M. L. N., Hall, M. J., Martin, S. J., and Schroeder, D. C. (2009). Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. Applied and environmental microbiology, 75(22), 7212-7220.
- Hou, C., Rivkin, H., Slabezki, Y., and Chejanovsky, N. (2014). Dynamics of the presence of israeli acute paralysis virus in honey bee colonies with colony collapse disorder. Viruses, 6(5), 2012-2027.
- Huang, W. F., Mehmood, S., Huang, S., Chen, Y. W., Ko, C. Y., and Su, S. (2017). Phylogenetic analysis and survey of Apis cerana strain of Sacbrood virus (AcSBV) in Taiwan suggests a recent introduction. Journal of Invertebrate Pathology, 146, 36-40.
- Ifantidis, M. (1983). Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni in worker and drone honeybee brood cells. Journal of Apicultural Research 22(3), 200–206.
- Iqbal, J., and Mueller, U. (2007). Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 274(1617), 1517-1521.
- Jiang, S., Robertson, T., Mostajeran, M., Robertson, A. J., and Qiu, X. (2016). Differential gene expression of two extreme honey bee (*Apis mellifera*) colonies showing varroa tolerance and susceptibility. Insect molecular biology, 25(3), 272-282.ISO 690
- Johnson, B. R. (2003). Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1511), 147-152.

- Johnson, B. R. (2008). Global information sampling in the honey bee. *Naturwissenschaften*, 95(6), 523-530.
- Johnson, B. R. (2008). Within-nest temporal polyethism in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(5), 777-784.
- Johnson, R. (2010). Honey bee colony collapse disorder (pp. 7-5700). Washington: Congressional Research Service.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J., and Hill, V. R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of virological methods*, 131(1), 65-71.
- Kaftanoğlu, O., Kumova, U., Yeninar, H. (1992). Varroa M¼cadelesinde Son Geliřmeler. Doğu Anadolu B¼lgesi I. Arıcılık Semineri. 3-4 Haziran 1992. Erzurum.
- Kajobe, R., Marris, G., Budge, G., Laurenson, L., Cordoni, G., Jones, B., ... and Brown, M. A. (2010). First molecular detection of a viral pathogen in Ugandan honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 104(2), 153-156.
- Karacaoğlu, M. (2005). Anadolu arısı Ege ekotipi (*A. m. anatoliaca*) ve İtalyan arısı (*A. m. ligustica*)XEge ekotipi melezi arılarının morfolojik özellikleri. *ADÜZiraat Fak¼ltesi Dergisi*. 1 (2):41-46
- Karacaoğlu, M. ve Uçak, A. 2003. Güney Ege koşullarında farklı dönemlerdeyeti ř tirilen ana arılar ile oluşturulan kolonilerin geli ř imi. III. Ulusal ZootekniKongresi, 14-16 Ekim 2002, s:181-189. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fak¼ltesiZootekni Bölümü, Ankara.
- Kevan, P. G., Hannan, M. A., Ostiguy, N., and Guzman-Novoa, E. (2006). A summary of the Varroa-virus disease complex in honey bees.
- Khoei, A. N. (2012). İnan Bal Arıları (*Apis Mellifera Meda*)'Nın Varroa Paraziti (*Varroa Destructor*)'Ne Karşı Korunma Yeteneđinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 5s.
- Korbie, D. J., and Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452-1456.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N, (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27: 95-125.
- Kukielka, D., and Sánchez-Vizcaıno, J. M. (2009). One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *Journal of virological methods*, 161(2), 240-246.
- Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., and Sánchez-Vizcaıno, J. M. (2008). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of virological methods*, 147(2), 275-281.

- Kumova, U. (2003). Varroa ile Mücadele Yöntemleri. Marmara II. Arıcılık Kongresi Bildirileri. 28- 30 Nisan 2003. Yalova
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., ... and Davis, B. S. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), 4066-4071.
- Lanzi, G., De Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M. and Rossi, C. (2006). Molecular and biological characterization of Deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Virol* 80, 4998–5009.
- Lermi, U.(2010). Bartın Yöresi Bal Arısı (*Apis Mellifera* L.) Zararlıları Ve Hastalıkları, Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi, Bartın, 9-20 arası s.
- Lin, Z., Page, P., Li, L., Qin, Y., Zhang, Y., Hu, F., ... and Dietemann, V. (2016). Go East for Better Honey Bee Health: *Apis cerana* Is Faster at Hygienic Behavior than *A. mellifera*. *PloS one*, 11(9), e0162647.
- Lindauer M. (2017). *Encyclopædia Britannica*. Hymenopteran file online. <https://www.britannica.com/animal/hymenopteran> (Son erişim tarihi: 03.01.2018)
- Locke, B., Forsgren, E., and de Miranda, J. R. (2014). Increased tolerance and resistance to virus infections: a possible factor in the survival of *Varroa destructor*-resistant honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 9(6), e99998.
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., and de Miranda, J. R. (2012). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied and environmental Microbiology*, 78(1), 227-235.
- Logan J, Edwards K, (2009). An overview of PCR platforms. In: Logan J, Edwards K, Saunders N eds, *Real Time PCR: Current technology and applications*. Caister Academic Pres; p 8.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., ... and Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3428-3438.
- Martin, S. J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* 18(2), 87–100.
- Martin, S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1082-1093.

- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., and Schroeder, D. C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.
- McAfee, A., Collins, T. F., Madilao, L. L., and Foster, L. J. (2017). Odorant cues linked to social immunity induce lateralized antenna stimulation in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Scientific Reports*, 7.
- McMahon D.P., Fürst M.A., Caspar J., Theodorou P., Brown M.J.F., Paxton R.J. (2015). A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *Journal of Animal Ecology*, 84, 615–624.
- McMenamin, A. J., and Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 121-129.
- Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S80-S95.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study* (Vol. 73, No. 87379). Harvard University Press. ISO 690
- Mingxiao, M., Jinhua, L., Yingjin, S., Li, L., and Yongfei, L. (2013). TaqMan MGB probe fluorescence real-time quantitative PCR for rapid detection of Chinese Sacbrood virus. *PloS one*, 8(2), e52670.
- Mingxiao, M., Ming, L., Jian, C., Song, Y., Shude, W., and Pengfei, L. (2011). Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comparative and functional genomics*, 2011.
- Mondet, F., Alaux, C., Severac, D., Rohmer, M., Mercer, A. R., and Le Conte, Y. (2015). Antennae hold a key to Varroa-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific reports*, 5.
- Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D. J., and Ryabov, E. V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor-infested honeybee colonies. *Journal of General Virology*, 92(1), 156-161.
- Moore, P. A., Wilson, M. E., and Skinner, J. A. (2015). Honey bee viruses, The Deadly Varroa Mite Associates. *Bee Health*, 19, 2015.
- Morse, R. A., Laigo, F. M. 1969. The Potential and Problem of Beekeeping in Philippines. *Bee World*. 50. 9-14.
- Möckel, N., Gisder, S., and Genersch, E. (2011). Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *Journal of General Virology*, 92(2), 370-377.
- Muli, Elliud, et al. "Evaluation of the distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) populations in East Africa." *PLoS one* 9.4 (2014): e94459.

- Muz, D., and Muz, M. N. (2009). Survey of the occurrence of Deformed Wing Virus and multiple parasites of queens (*Apis mellifera* L.) in apiaries with collapsed colonies in Hatay, Turkey. *Journal of apicultural research*, 48(3), 204-208.
- Muz, D., ve Muz , M. N. (2017). Tekirdağ'da “Koloni Kaybı Sendromu” Benzeri Kayıp Görülen Arıliklarda Bazı Patojenlerinin Araştırılması. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10(1), 21-28.
- Nasr, M. E. (1998). Technology transfer of improved honey bee stocks and management practices to beekeepers in Ontario. Annual Report for 1997–1998. ABA, Bayfield, Ontario, Canada.
- Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., and Paxton, R. J. (2016). Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. *Behavioral ecology and sociobiology*, 70(7), 1019-1031.
- Nazzi, F., Brown, S. P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., ... and Pennacchio, F. (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS pathogens*, 8(6), e1002735.
- Neumann, P., and Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. ISO 690
- Nganso, B. T., Fombong, A. T., Yusuf, A. A., Pirk, C. W., Stuhl, C., and Torto, B. (2017). Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees—New damage categories in *Varroa destructor*. *PloS one*, 12(6), e0179329.
- Nielsen, S. L., Nicolaisen, M., and Kryger, P. (2008). Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39(3), 310-314.
- Nordström, S., Fries, I., Aarhus, A., Hansen, H., and Korpela, S. (1999). Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie*, 30(6), 475-484.
- Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O, Dubois E, Tordo N, Thiéry R, Houlgatte R, Ribière M. (2008). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* 132:59–68. 10.1016/j.virusres.2007.10.014.
- Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribière, M., and Gauthier, M. (2008). In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of virological methods*, 153(2), 232-237.
- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., ... & Ribiere, M. (2008). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus research*, 132(1-2), 59-68.

- Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., and van Oers, M. M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85(12), 3747-3755.
- Organtini, L. J., Shingler, K. L., Ashley, R. E., Capaldi, E. A., Durrani, K., Dryden, K. A., ... and Hafenstein, S. (2017). Honey Bee Deformed Wing Virus Structures Reveal that Conformational Changes Accompany Genome Release. *Journal of virology*, 91(2), e01795-16.
- Oskay, D. (2008). Bal Arısı Irklarının Çeşitliliğinin Korunması, Kolonilerin Yönetimi ve Genetik Yapılarının İstenen Yönde Geliştirilmesi Üzerine Model Oluşturulması. *Uludağ Arıcılık Dergisi* , 2008 (2).
- Otis GW (1996). Distribution of recently recognized species of honeybees (Hymenoptera: Apidae: Apis) in Asia. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 69: 311-333.
- Overton, H. A., Buck, K. W., Bailey, L., & Ball, B. V. (1982). Relationships between the RNA components of chronic bee-paralysis virus and those of chronic bee-paralysis virus associate. *Journal of General Virology*, 63(1), 171-179.
- Özkırım, A., and Schiesser, A. (2013). Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Turkish bees. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 56-57.
- Öztürk, A. D. (2001). Bal arısı hastalıkları. *Muğla'da Tarım*. 1(5): 57-59.
- Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodriguez, E. M., Del Hoyo, M. L. and Bedascarrasbure, E. L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie*. vol. 31, pp. 471-478.
- Palmer, M.R., Smith, D.R., Kaftanoğlu, O., (2000). Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *J. Hered.* 91:42-46.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaffl, M. W., and Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23(4), 275-282.
- Pritchard, D. J. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research*, 55(1), 38-48.
- Ghosh, R. C., Ball, B. V., Willcocks, M. M., & Carter, M. J. (1999). The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6), 1541-1549.
- Rangel, J., Keller, J. J., and Tarpy, D. R. (2013). The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. *Insectes sociaux*, 60(1), 65-73.

- Regge, N. D., Deblauwe, I., Deken, R. D., Vantieghem, P., Madder, M., Geysen, D., ... and Cay, A. B. (2012). Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transboundary and emerging diseases*, 59(6), 471-475.
- Rehm, S. M. and Ritter, W. (1989). Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie* 20(4), 339-343.
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Tizzano, M. A., Fuentealba, N., Galosi, C. M., and Pecoraro, M. R. (2011). First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 43(2).
- Ribbands, C. R. (1953). *The behaviour and social life of honeybees*. Bee Research Association Limited.; London.
- Rivière, M., Faucon, J. P., and Pépin, M. (2000). Detection of chronic honey bee (*Apis mellifera* L.) paralysis virus infection: application to a field survey. *Apidologie*, 31(5), 567-577.
- Rivière, M., Lallemand, P., Iscache, A. L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., ... and Faucon, J. P. (2007). Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7711-7716.
- Rivière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J. P., and Pépin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie*, 33(3), 339-351.
- Rinderer, T. E., & Green, T. J. (1976). Serological relationship between chronic bee paralysis virus and the virus causing hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(3), 403-405.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., and 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(6), e20656.
- Ruttner, F. (1984). *Races of Bees*. Ed. Dadant and Sons. The Hive and the Honey Bee, p. 19-38. A Dadant Publication, Dadant and Sons. Inc. Illinois, USA.
- Ruttner, F. (1988a). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer, Verlag, Berlin. p:284.
- Ruttner, F. (1988b). *Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee*. British Isles Bee Breeders' Association (1988), 152 pp. ISBN 0-905369-07-6
- Rüstemoğlu M., ve Sipahioğlu H.M., (2016). Occurrence and Molecular Characterization of Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) in Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies in Hakkari Province. *YYÜ Tar Bil Derg.*, 26(2): 174-182.

- Ryabov, E. V., Fannon, J. M., Moore, J. D., Wood, G. R., and Evans, D. J. (2016). The Iflaviruses Sacbrood virus and Deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission. *PeerJ*, 4, e1591.
- Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., ... and Evans, D. J. (2014). A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS pathogens*, 10(6), e1004230.
- Sanpa, S., and Chantawannakul, P. (2009). Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *Journal of invertebrate pathology*, 100(2), 116-119.
- Santillan-Galicia, M. T., Carzaniga, R., Ball, B. V., and Alderson, P. G. (2008). Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *Journal of general virology*, 89(7), 1685-1689.
- Scannapieco, A. C., Lanzavecchia, S. B., Parreño, M. A., Liendo, M. C., Cladera, J. L., Spivak, M., and Palacio, M. A. (2016). Individual precocity, temporal persistence, and task-specialization of hygienic bees from selected colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 63.
- Scannapieco, A. C., Mannino, M. C., Soto, G., Palacio, M. A., Cladera, J. L., and Lanzavecchia, S. B. (2017). Expression analysis of genes putatively associated with hygienic behavior in selected stocks of *Apis mellifera* L. from Argentina. *Insectes Sociaux*, 64(4), 485-494.
- Schneider, P. and Drescher, W. (1987). The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight at emergence, development of weight and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 18(1), 101-109.
- Seeley, T. D. (1978). Life history strategy of the honey bee, *Apis mellifera*. *Oecologia*, 32(1), 109-118.
- Seeley, T. D. (1979). Queen substance dispersal by messenger workers in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 5(4), 391-415.
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4), 287-293.
- Seeley, T. D. (2007). Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie*, 38(1), 19-29.
- Shah, K. S., Evans, E. C., and Pizzorno, M. C. (2009). Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Virology journal*, 6(1), 182.
- Shan, L., Liuhaio, W., Jun, G., Yujie, T., Yanping, C., Jie, W., and Jilian, L. (2017). Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150, 63-69.

- Shen, L., Guo, Y., Chen, X., Ahmed, S., and Issa, J. (2007). Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques*, 42(1), 48.
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D. and Cui, L. (2005b). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342, 141–149
- Shimanuki, H., Calderone, N. W. and Knox, D. A. (1994). Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am Bee J* 134, 827–828.
- Siede, R., König, M., Büchler, R., Failing, K., and Thiel, H. J. (2008). A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie*, 39(6), 650-661.
- Silici, S.,(2009). *Bal Arısı Biyolojisi ve Yetiştiriciliği*. Eflatun Yayınevi. Ankara, 16,17,30 s.
- Simeunović, P., Stevanović, J., Vidanović, D., Nišavić, J., Radović, D., Stanišić, L., and Stanimirović, Z. (2014). A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR. *Acta Veterinaria*, 64(1), 81-92.
- Singh, R., Levitt, A. L., Rajotte, E. G., Holmes, E. C., Ostiguy, N., Lipkin, W. I., ... and Cox-Foster, D. L. (2010). RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One*, 5(12), e14357.
- Smith, D. R. 2002. Genetic diversity in Turkish honey bees. *Uludağ Bee Journal* August 2002 3(2):10-17.
- Smith, D.R., Slaymaker, A., Palmer, M., Kaftanoğlu, O., (1997). Turkish honeybees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie* 28:269-274.
- Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., ... and Suarez, D. L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3256-3260.
- Sumpter, D. J., and Martin, S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 51-63.
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., and Terio, V. (2015). Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. *Italian journal of food safety*, 4(3).
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., ... and Bergoin, M. (2006). Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37(1), 41-50.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in

- Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (12), 7185–7191.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. F., and Bergon, M. (2005). Prevalence and seasonal variations of six bee M. Shen et al. *Virology*, 342, 141-149.
- Tolon, B. (1999). Yaban arılarında sosyal yaşam. *Hayvansal Üretim*, 39(40), 120-127. ISO 690
- Tozkar, C. Ö., Kence, M., Kence, A., Huang, Q., and Evans, J. D. (2015). Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies. *Frontiers in genetics*, 6, 100. doi: 10.3389/fgene.2015.00100
- Traynor, K. S., Andree, M., Lichtenberg, E. M., Chen, Y., Saegerman, C., and Cox-Foster, D. L. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PloS one*, 12(7), e0179535.
- Trumbo, S. T., Huang, Z. Y., and Robinson, G. E. (1997). Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(3), 151-163.
- Tuncer P., Yeşilbağ K., (2009). Viral Diseases of Honey Bees. *Uludag Bee Journal*, 9(4): 149-161.
- Tutkun, E., Bosgelmez, A. (2003). Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teshis ve Tedavi Yöntemleri. Bizim Büro Basımevi. Ankara.
- Tutkun, E., İnci, A. (1992). Bal Arısı Zararlıları Hastalıkları ve Tedavi Yöntemleri. Demircioğlu Matbaacılık Yenişehir/ANKARA.
- Uçak Koç, A. ve Karacaoğlu, M. (2005). Anadolu arısı Ege ekotipi (*Apis mellifera anatoliaca*) ana arılarında üreme özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(1):73-77
- Valles, S. M., Chen, Y., Firth, A. E., Guérin, D. A., Hashimoto, Y., Herrero, S., ... and Ryabov, E. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Iflaviridae. *Journal of General Virology*, 98(4), 527-528.
- Van Engelsdorp, D., Hayes, J., and Pettis, J. (2009). Preliminary results: A survey of honey bee colonies losses in the US between September 2008 and April 2009. Apiary Inspectors of America (AIA) and USDA-ARS Beltsville Honey Bee Lab.
- Vanbergen, A. J. (2013). Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(5), 251-259.
- Velthuis, H. H. W. (1972). Observations on the transmission of queen substances in the honey bee colony by the attendants of the queen. *Behaviour*, 41(1), 105-128.
- Wacker, M. J., and Godard, M. P. (2005). Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 16(3), 266.

- Ward, L., Waite, R., Boonham, N., Fisher, T., Pescod, K., Thompson, H., ... and Brown, M. (2007). First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie*, 38(2), 181-190.
- White, G. F. (1917). Sacbrood (No. 431). US Department of Agriculture.
- Williams, G. R., Rogers, R. E., Kalkstein, A. L., Taylor, B. A., Shutler, D., and Ostiguy, N. (2009). Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging queen. *Journal of invertebrate pathology*, 101(1), 77-79.
- Wu Y, Dong X and Kadowaki T (2017) Characterization of the Copy Number and Variants of Deformed Wing Virus (DWV) in the Pairs of Honey Bee Pupa and Infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae*. *Front. Microbiol.* 8:1558. doi: 10.3389/fmicb.2017.01558
- Yang, X. and Cox-Foster, D. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 134, 405–412.
- Ye S, Xia H, Dong C, Cheng Z, Xia X et al. Identification and characterization of Iflavirus 3C-like protease processing activities. *Virology* 2012;428:136–145.
- 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(12), 3419-3424.
- Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., and Genersch, E. (2007). Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of General Virology*, 88(8), 2329-2336.
- Zhang, Q., Yang, Y., Liang, Y., Lu, X., & Zhang, J. (2002). Study on structure of the Chinese Sacbrood Virus[^] nucleic acid. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 21(3), 331-334.
- Zanni, V., Galbraith, D. A., Annoscia, D., Grozinger, C. M., and Nazzi, F. (2017). Transcriptional signatures of parasitization and markers of colony decline in *Varroa*-infested honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Zhao, N., and Wurst, H. (2001). U.S. Patent No. 6,300,073. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Zioni, N., Soroker, V., and Chejanovsky, N. (2011). Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. *Virology*, 417(1), 106-112.

8. EKLER

8.1. Gruplara Göre Total RNA'ların Bio Drop Ölçüm Sonuçları

Çizelge 8. 1. Hijyenik davranış bakımından ıslah edilmiş pupa bal arılarının bio drop ölçüm sonuçları

A230	A260	A280	A320	A260/A230	A260/A280	Yoğunluk	Örnek
0,254	0,097	0,089	0,028	0,305	1,131	55,200	1
0,677	0,235	0,252	0,080	0,260	0,901	124,000	2
1,851	0,274	0,437	0,050	0,124	0,579	179,200	3
0,134	0,060	0,056	0,014	0,383	1,095	36,800	4
0,087	0,077	0,054	0,008	0,873	1,500	55,200	5
0,569	0,112	0,135	0,018	0,171	0,803	75,200	6
0,268	0,129	0,148	0,033	0,409	0,835	76,800	7
0,058	0,064	0,036	0,003	1,109	1,848	48,800	8
0,043	0,105	0,041	0,002	2,512	2,641	82,400	9
3,253	1,124	1,471	0,405	0,252	0,674	575,200	10
0,344	0,119	0,123	0,044	0,250	0,949	60,000	11
0,086	0,056	0,042	0,010	0,605	1,437	36,800	12
0,196	0,112	0,094	0,041	0,458	1,340	56,800	13
2,286	0,419	0,616	0,088	0,151	0,627	264,800	14
0,280	0,103	0,097	0,036	0,275	1,098	53,600	15
0,184	0,062	0,058	0,009	0,303	1,082	42,400	16
0,053	0,086	0,043	0,004	1,673	2,103	65,600	17
-0,027	-0,039	-0,052	-0,070	0,721	1,722	24,800	18
3,155	1,177	1,195	0,440	0,271	0,976	589,600	19
0,009	0,011	-0,026	-0,068	1,026	1,881	63,200	20
1,594	0,569	0,610	0,179	0,276	0,905	312,000	21
0,256	0,007	0,026	-0,061	0,215	0,782	54,400	22
-0,022	-0,003	-0,037	-0,067	1,422	2,133	51,200	23
3,047	0,968	1,559	0,179	0,275	0,572	631,200	24
0,017	-0,011	-0,022	-0,067	0,667	1,244	44,800	25
0,089	0,011	-0,007	-0,051	0,443	1,409	49,600	26
-0,033	0,003	-0,042	-0,076	1,837	2,324	63,200	27
1,081	0,100	0,193	-0,044	0,128	0,608	115,200	28
2,679	0,496	0,800	0,051	0,169	0,594	356,000	29
2,755	0,667	0,867	0,149	0,199	0,721	414,400	30
2,711	0,571	0,789	0,108	0,178	0,680	370,400	31
2,452	0,322	0,618	-0,029	0,141	0,543	280,800	42
0,038	-0,024	-0,031	-0,059	0,361	1,250	28,000	43
1,529	0,338	0,395	0,085	0,175	0,816	202,400	44
0,509	0,084	0,103	-0,009	0,180	0,830	74,400	45
0,415	0,053	0,078	-0,050	0,222	0,805	82,400	46
2,923	0,938	1,027	0,326	0,236	0,873	489,600	47
1,479	0,798	0,856	0,282	0,431	0,899	412,80	48
0,759	0,087	0,145	-0,044	0,163	0,693	104,800	49
1,999	0,468	0,540	0,091	0,198	0,840	301,600	50

Çizelge 8. 2. Hijyenik kolonilerin işçi arılarında bio drop ölçüm sonuçları

A230	A260	A280	A320	A260/A230	A260/A280	Yoğunluk	Örnek
1,083	0,209	0,259	0,046	0,157	0,765	130,400	1
1,315	0,203	0,284	0,034	0,132	0,676	135,200	2
2,103	0,382	0,518	0,113	0,135	0,664	215,200	3
0,596	0,135	0,150	0,031	0,184	0,874	83,200	4
0,906	0,163	0,206	0,027	0,155	0,760	108,800	5
2,557	0,591	0,738	0,177	0,174	0,738	331,200	6
0,192	0,087	0,064	0,010	0,423	1,426	61,600	7
1,416	0,253	0,323	0,062	0,141	0,732	152,800	8
1,308	0,270	0,329	0,079	0,155	0,764	152,800	9
0,618	0,213	0,201	0,068	0,264	1,090	116,000	10
3,222	1,117	1,255	0,490	0,230	0,820	501,600	11
2,754	0,580	0,882	0,151	0,165	0,587	343,200	12
2,042	0,338	0,476	0,056	0,142	0,671	225,600	13
1,608	0,330	0,398	0,081	0,163	0,785	199,200	14
1,975	0,455	0,535	0,156	0,164	0,789	239,200	15
0,878	0,180	0,211	0,039	0,168	0,820	112,800	16
1,171	0,258	0,303	0,071	0,170	0,806	149,600	17
0,681	0,135	0,157	0,023	0,170	0,836	89,600	18
1,778	0,318	0,420	0,081	0,140	0,699	189,600	19
0,569	0,126	0,143	0,027	0,183	0,853	79,200	20
0,102	0,070	0,046	0,012	0,644	1,706	46,400	21
0,105	0,084	0,058	0,026	0,734	1,813	46,400	22
0,289	0,118	0,097	0,023	0,357	1,284	76,000	23
0,499	0,133	0,133	0,023	0,231	1,000	88,000	24
0,960	0,197	0,236	0,050	0,162	0,790	117,600	25
0,249	0,072	0,065	0,007	0,269	1,121	52,000	26
0,248	0,092	0,081	0,025	0,300	1,196	53,600	27
2,872	0,752	0,947	0,237	0,195	0,725	412,000	28
0,478	0,098	0,108	0,009	0,190	0,899	71,200	29
0,617	0,156	0,168	0,038	0,204	0,908	94,400	30
1,210	0,169	0,249	0,023	0,123	0,646	116,800	31
1,935	0,279	0,442	0,056	0,119	0,578	178,400	42
1,777	0,284	0,398	0,056	0,132	0,667	182,400	43
0,898	0,153	0,192	0,025	0,147	0,766	102,400	44
2,439	0,526	0,671	0,157	0,162	0,718	295,200	45
0,875	0,142	0,185	0,021	0,142	0,738	96,800	46
0,401	0,071	0,085	0,009	0,158	0,816	49,600	47
0,603	0,165	0,175	-0,006	0,281	0,945	136,800	48
0,326	0,094	0,092	-0,019	0,328	1,018	90,400	49
0,459	0,133	0,133	0,023	0,231	1,000	88,000	50

Çizelge 8. 3. Kontrol grubu pupa örneklerinde bio drop ölçüm sonuçları

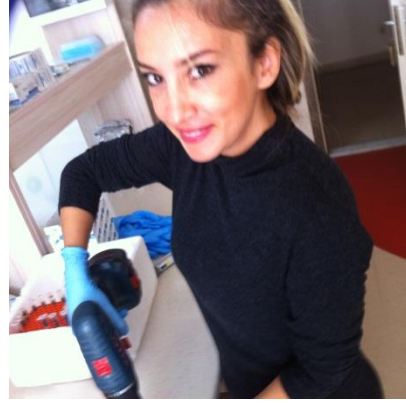
A230	A260	A280	A320	A260/A230	A260/A280	Yoğunluk	Örnek
0,090	0,101	0,056	0,012	1,141	2,023	71,200	1
0,079	0,070	0,052	0,025	0,833	1,667	36,000	2
0,284	0,089	0,084	0,009	0,291	1,067	64,000	3
0,670	0,158	0,176	0,044	0,182	0,864	91,200	4
0,414	0,322	0,233	0,107	0,700	1,706	172,000	5
2,785	0,897	0,964	0,392	0,211	0,883	404,000	6
0,457	0,087	0,117	0,017	0,159	0,700	56,000	7
0,057	0,038	0,024	0,003	0,648	1,667	28,000	8
1,141	0,212	0,278	0,054	0,145	0,705	126,400	9
0,261	0,134	0,109	0,050	0,398	1,424	67,200	1
2,752	0,556	0,934	0,100	0,172	0,547	364,800	11
0,766	0,198	0,218	0,053	0,203	0,879	116,000	12
0,439	0,197	0,185	0,084	0,318	1,119	90,400	13
1,110	0,148	0,242	0,015	0,121	0,586	106,400	14
1,684	0,232	0,378	0,044	0,115	0,563	150,400	15
0,924	0,107	0,183	0,010	0,106	0,561	77,600	16
1,732	0,205	0,376	0,025	0,105	0,513	144,000	17
0,259	0,048	0,064	0,005	0,169	0,729	34,400	18
0,332	0,065	0,077	0,011	0,168	0,818	43,200	19
1,415	0,154	0,289	0,015	0,099	0,507	111,200	20
0,296	0,072	0,079	0,010	0,217	0,899	49,600	21
1,400	0,170	0,296	0,020	0,109	0,543	120,000	22
0,185	0,030	0,039	0,000	0,162	0,769	24,000	23
2,763	0,596	0,883	0,168	0,165	0,599	342,400	24
1,916	0,239	0,423	0,031	0,110	0,531	166,400	25
2,775	0,608	1,150	0,084	0,195	0,492	419,200	26
0,523	0,059	0,101	0,002	0,109	0,576	45,600	27
0,120	0,283	0,127	0,002	2,381	2,248	224,800	28
0,274	0,033	0,053	0,001	0,124	0,630	27,200	29
1,788	0,219	0,379	0,029	0,108	0,543	152,000	30
0,354	0,085	0,094	0,017	0,202	0,883	54,400	31
1,068	0,191	0,252	0,055	0,134	0,690	108,800	39
1,883	0,273	0,432	0,059	0,117	0,574	171,200	40
0,167	0,058	0,057	0,022	0,248	1,029	28,800	41
0,676	0,137	0,173	0,039	0,154	0,731	78,400	42
1,084	0,240	0,300	0,088	0,153	0,717	121,600	43
0,610	0,120	0,149	0,028	0,158	0,760	73,600	44
0,377	0,061	0,086	0,013	0,132	0,658	38,400	45
2,780	0,709	0,886	0,266	0,176	0,715	354,400	46
1,415	0,154	0,289	0,015	0,099	0,507	111,200	47
0,354	0,085	0,094	0,017	0,202	0,883	54,400	48
1,084	0,240	0,300	0,088	0,153	0,717	121,600	49
1,090	0,148	0,242	0,015	0,121	0,586	106,400	50

Çizelge 8. 4. Kontrol grubu işçi bal arılarının bio drop ölçüm sonuçları

A230	A260	A280	A320	A260/A230	A260/A280	Yoğunluk	Örnek
0,871	0,152	0,196	0,031	0,144	0,733	96,800	1
1,046	0,184	0,236	0,039	0,144	0,736	116,000	2
0,443	0,097	0,105	0,014	0,193	0,912	66,400	3
0,114	0,092	0,063	0,021	0,763	1,690	56,800	4
2,445	0,511	0,675	0,134	0,163	0,697	301,600	5
0,196	0,136	0,094	0,026	0,647	1,618	88,000	6
0,679	0,172	0,180	0,042	0,204	0,942	104,000	7
1,291	0,262	0,313	0,053	0,169	0,804	167,200	8
0,151	0,122	0,073	0,014	0,788	1,831	86,400	9
1,547	0,372	0,459	0,137	0,167	0,730	188,000	10
1,163	0,255	0,305	0,081	0,161	0,777	139,200	11
1,362	0,268	0,342	0,065	0,157	0,733	162,400	12
0,073	0,056	0,040	0,017	0,696	1,696	31,200	13
0,115	0,065	0,045	0,009	0,528	1,556	44,800	14
0,155	0,040	0,035	-0,001	0,263	1,139	32,800	15
0,212	0,075	0,062	0,010	0,322	1,250	52,000	16
0,838	0,120	0,162	0,004	0,139	0,734	92,800	17
0,079	0,081	0,039	-0,005	1,024	1,955	68,800	18
1,831	0,324	0,462	0,089	0,135	0,630	188,000	19
0,643	0,081	0,118	-0,003	0,130	0,694	67,200	20
0,949	0,200	0,225	0,030	0,185	0,872	136,000	21
0,138	0,033	0,025	-0,010	0,291	1,229	34,400	22
0,249	0,067	0,058	0,000	0,269	1,155	53,600	23
0,699	0,145	0,167	0,021	0,183	0,849	99,200	24
1,037	0,186	0,237	0,035	0,151	0,748	120,800	25
0,205	0,138	0,095	0,018	0,642	1,558	96,000	26
0,242	0,074	0,066	0,008	0,282	1,138	52,800	27
0,191	0,092	0,076	0,029	0,389	1,340	50,400	28
0,296	0,085	0,074	0,006	0,272	1,162	63,200	29
1,142	0,278	0,317	0,092	0,177	0,827	148,800	30
2,031	0,323	0,460	0,056	0,135	0,661	213,600	31
0,919	0,157	0,199	0,021	0,151	0,764	108,800	32
0,173	0,074	0,046	-0,005	0,444	1,549	63,200	33
0,623	0,141	0,159	0,023	0,197	0,868	94,400	34
0,435	0,139	0,134	0,041	0,249	1,054	78,400	35
0,092	0,129	0,065	0,009	1,446	2,143	96,000	36
0,448	0,147	0,136	0,028	0,283	1,102	95,200	37
0,490	0,110	0,114	0,013	0,203	0,960	77,600	38
1,659	0,284	0,391	0,056	0,142	0,681	182,400	39
1,461	0,339	0,396	0,104	0,173	0,805	188,000	40
0,134	0,104	0,076	0,025	0,725	1,549	63,200	41
2,285	0,422	0,590	0,092	0,150	0,663	264,000	42
0,201	0,096	0,070	0,014	0,439	1,464	65,600	43
2,531	0,763	0,863	0,348	0,190	0,806	332,000	44
0,398	0,157	0,136	0,044	0,319	1,228	90,400	45
0,267	0,129	0,097	0,026	0,427	1,451	82,400	46
0,212	0,124	0,093	0,035	0,503	1,534	71,200	47
1,286	0,205	0,272	0,030	0,139	0,723	140,000	48
0,386	0,200	0,170	0,070	0,411	1,300	104,000	49
1,831	0,324	0,462	0,089	0,135	0,630	188,000	50

ÖZGEÇMİŞ

AYŞE ALEMLİ
aysealemlı@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016-2018	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2012-2015	Lefke Avrupa Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Üretimi ve Pazarlaması, Kıbrıs

ESERLER:

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

KARABAĞ K, TAŞBAŞ Ş, ALEMLİ A, 2017. Phylogenetic Relationships in Terms of mtDNA-CO1 in Commercial and Natural *Bombus Terrestris* Populations in Antalya Region. “International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies” 15-17 May, Kapadokya/TURKEY.