T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİNGÖL İLİ BAL ARILARINDA (*Apis mellifera* L.) SİYAH KRALİÇE HÜCRE VİRÜSÜ, TULUMSU YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ VİRÜSÜ VE AKUT ARI FELÇ VİRÜSÜ'NÜN YAYGINLIĞINI RT-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNELABİDİN KURT

ARI VE ARI ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr.Öğr. Üyesi ABDULLAH GÜLLER

BİNGÖL-2021

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİNGÖL İLİ BAL ARILARINDA (*Apis mellifera* L.) SİYAH KRALİÇE HÜCRE VİRÜSÜ, TULUMSU YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ VİRÜSÜ VE AKUT ARI FELÇ VİRÜSÜ'NÜN YAYGINLIĞINI RT-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Dr.Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER danışmanlığında, Zeynelabidin KURT tarafından hazırlanan bu çalışma 02/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Arı ve Arı Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hakan İNCİ *İmza* :

Üye : Dr. Öğr.Üyesi Abdullah GÜLLER *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Mustafa USTA *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun .../ .../ … tarih ve ……./……...……. nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir. Proje No: BAP-ZF.2020.00-003

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin moleküler kısmında benden yardımlarını esirgemeyen değerli Hocam Doç. Dr. Mustafa USTA'ya (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji anabilim dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca; Arı örneklerinin toplanması konusunda desteğini esirgemeyen PİKOM saha sorumlusu Emrah TOPLUK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında emeği geçen tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

BAP.ZF.2020.00-003 numaralı projeye mali katkılarından sağlayan Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığa'na teşekkür ederim.

Son olarak; Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman ve her konuda beni destekleyen sevgili ailem; Remzi, Nejla, Sena, Yusuf, Seda ve Zeynep KURT'a sonsuz teşekkür ederim.

Zeynelabidin KURT

Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
TABLOLAR LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiii

1. GİRİŞ 1
1.1. Varroa Akarı 3
1.2. Bal Arılarında Koloni Düzeni 4
1.2.1 Koloni Bireyleri ve Görevleri 4
1.2.1.1 Ana Arı ve Görevleri 4
1.2.1.2 İşçi Arı ve Görevleri 5
1.2.1.3. Erkek Arı ve Görevleri 5
1.3. Türkiye ve Dünya Arıcılık Verileri 6
1.3.1. Dünyada Arıcılık 6
1.3.2 Türkiye Arıcılık Verileri 8
1.3.3 Bingöl Arıcılık Verileri 9

2. KAYNAK ÖZETLERİ 11
2.1. Bal Arısı Virüslerinin Taksonomisi 11
2.1.1. Dicistroviridae 11
2.1.2. Iflaviridae 12
2.2. Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (*Sacbrood Virus*; SBV) 12

2.2.1 Genel Özellikleri 12
2.2.2. SBV Virüsünün Genom Organizasyonu 13
2.2.3. SBV'nin Taşınması 13
2.2.4. SBV'nin Oluşturduğu Simptomlar 14
2.3. Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (*Black Queen Cell Virus*; BQCV) 15
2.3.1. Genel Özellikleri 15
2.3.2. BQCV Virüsünün Genom Organizasyonu 16
2.3.3. BQCV'nin Taşınması 16
2.3.4. BQCV'nin Oluşturduğu Simptomlar 17
2.4. Akut Arı Felç Virüsü(*Acut Bee Paralysis Virus*; ABPV) 18
2.4.1. Genel Özellikler 18
2.4.2. ABPV Virüsünün Genom Organizasyonu 19
2.4.3. ABPV'nin Taşınması 19
2.4.4. ABPV'nin Oluşturduğu Simptomlar 20
2.5. Türkiye'de Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar 21
2.6. Dünyada Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar 24
2.7. Arı Virüsleri İle Mücadele Ve Kontrol 27

3. MATERYAL VE YÖNTEM 29
3.1. Materyal 29
3.1.1. Sürvey Alanı 29
3.2. Yöntem 31
3.2.1. Moleküler Test Çalışmaları 31
3.2.1.1 Total RNA (TNA) Ekstraksiyonu 31
3.2.1.2. Spesifik Primer Dizaynı 32
3.2.1.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi 32
3.2.1.4. RT-PCR İle Virüslerin Araştırılması 33
3.2.1.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Boyama Ve Görüntüleme 34
3.2.2. Klonlama Çalışmaları 35

3.2.2.1. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Kesimi Ve Saflaştırılması.....35
3.2.2.2. DNA'nın Plazmide Yerleştirilmesi (Ligasyon).....36
3.2.2.3. Plazmidin Bakteriye Aktarılması (Transformasyon).....36
3.2.2.4. Transforme Olmuş Bakterilerden Kolonilerin Oluşturulması.....38
3.2.2.5. Mavi-Beyaz Kolonilerin Seçimi.....39
3.2.2.6. Plazmitlerin Saflaştırılması.....39
3.2.2.7. Saflaştırılan Rekombinat Plazmitlerin Restriksiyon Enzimleri İle Kontrol Edilmesi.....40
3.2.2.8. Klonlanmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi.....40
3.2.2.9. DNA Dizilerinin Gen Bankasına Veri Tabanına Girilmesi.....41
3.2.2.10. İlgili Dizilere Ait Filogenetik Analiz.....41

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....42
4.1. Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV) İle İlgili Bulgular.....42
4.2. Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) İle İlgili Bulgular.....47
4.3. Akut Arı Felci Virüsü (ABPV) İle İlgili Bulgular.....52

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....54

KAYNAKÇA.....57
EKLER.....65
Ek 1. Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....65
Ek 1.1. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi.....65
Ek 1.2. Naı Solüsyonu.....65
Ek 1.3. Silikanın Hazırlanması (Ph: 2.0).....65
Ek 2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler.....66
Ek 2.1. 50X TAE Koşum Tamponu.....66
Ek 2.2. 1X TAE Koşum Tamponunun Hazırlanması (1 Litre).....66
Ek 3. Klonlama Aşamasında Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması.....66
Ek 3.1. Sıvı LB Hazırlama (1 Litre).....66
Ek 3.2. Katı LB Hazırlama (1 Litre).....66

Ek 3.3. Rekombinat Bakterilerilerin Seçimi 67
Ek 3.3.1 X-Gal 67
Ek 3.3.2. IPTG 67
Ek 3.3.3. SOC Solüsyonu (1 litre) 67
Ek 3.3.4. Kompetan Hücre Hazırlanması 67
Ek 4. Survey Çalışmalarında Toplanılan İşçi Arı Örnekleri 69
ÖZGEÇMİŞ 73

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µl	:Mikrolitre
°C	:Santigrat derece
Da	:Dalton
Dk	:Dakika
Gr	:Gram
kDa	:Kilo dalton
Kg	:Kilogram
Kb	:Kilobaz
M	:Molar
Ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
Mg	:Miligram
Rpm	:Rotation per minute
Sn	:Saniye
V	:Volt
%	:Yüzde
Sa	:Saat

A	:Adenin
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
ABPV	*:Acute bee paralysis virus*
Bç	:Baz çifti
BQCV	*:Black queen cell virus*
C	:Sitozin
CP	:Kılıf protein
DNA	:Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	:Deoksinüklotidtrifosfat
DTT	:Dithiothreitol
Ec2	:Electroporation Cuvette 2mm
EDTA	:Ethylene diamino tetra aceticacid
EtBr	:Ethidium bromide
EtOH	:Etanol
FAO	:Gıda ve Tarım Örgütü
HCl	:Hidrojen Klorür
IPTG	:Isopropyl β-D-1-thio galacto pyranoside
IRES	:Internal Ribosome Entry Site
LB	:Luria Broth
ME	:Mercaptoethanol
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
nt	:Nükleotid
ORF	:Opening reading farme
PCR	:Polymerase Chain Reaction
RNA	:Ribonükleik Asit
RT	:Reverse Transcriptase
RT–PCR	:ReverseTrancriptase-Polymerase Chain Reaction
SBV	*:Sacbrood virüs*
ssRNA	:Tek zincirli RNA
T	:Timin
TAE	:Tris Asetat EDTA
TNA	:Total Nükleik Asit

TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
UTR	:Untranslated region
UV	:Ultraviyole
XGAL	:5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. İşçi arılar ve yavru üzerindeki Varroa akarının görünümü 3
Şekil 1.2. Bal arısı kolonisinde yer alan bireyler 6
Şekil 2.1. SBV 'ye ait genom organizasyonu 13
Şekil 2.2. SBV ile enfekteli larva 15
Şekil 2.3. BQCV'ye ait genom organizasyonu 16
Şekil 2.4. BQCV ile enfekteli rengi kararmış ana arı larvası 17
Şekil 2.5. ABPV'ye ait genom organizasyonu 19
Şekil 2.6. ABPV ile enfekteli işçi arılar 20
Şekil 2.7. ABPV enfekteli ana arı (Mavi ok) 21
Şekil 3.1. Bingöl ilinde sürvey yapılan ilçelerin haritası 29
Şekil3.2. A) İşçi arı örneklerin rastgele toplanması B) Toplanan canlı işçi arı örneklerinin laboratuvar ortamına canlı olarak taşınması C) Araziden toplanmış örneklerin -80°C'de muhafaza edilmesi 30
Şekil 3.3.A) Grinding buffer ve ß-mercaptoetanol eklenmesi B) Ezilen işçi arı örneklerinin 1,5 ml tüplere aktarılması C) 100 µl %10 Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu eklenen örneklerin 70 °C de 10 dk inkübe edilmesi D) Santifrüj sonrası elde edilen üst fazın 500 µl' sinin yeni tüplere aktarılması 31
Şekil 3.4. A) cDNA sentezi aşaması B) Örneklerin numaralandırılması C) PCR sonrası örneklerin buzda inkübe edilmesi 33
Şekil 3.5.A)Örneklerin PCR cihazına yerleştirilmesi B) cDNA'nın PCR karışımına eklenmesi 34
Şekil 3.10.A) Steril pipet ucu ile beyaz kolonini alınması B) Pipet ucunun sıvı LB içeren ortama daldırılması 39
Şekil 4.1. BQCV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri 42
Şekil 4.2. BQCV virüsünü tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bç Marker, 58, 59, 62, 80, 92, 93,

99,86 numaralı Pozitif örnekler, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol. 44
Şekil 4.3.Kolonilerin bir gece 37 °C inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir. 45
Şekil4.4. BQCV Bingöl izolatı (MZ357974) ile dünyadaki BQCV izolatlarının kısmi polyprotein protein geninin nükleik asit dizisi 1000 tekerrürlü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı. 47
Şekil 4.5. SBV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri. 47
Şekil 4.6. SBV virüsünün tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bç Marker 18, 24, 26, 32, 59, 55, 83,66 numaralı Pozitif örnekler, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol. 49
Şekil 4.7. Kolonilerin bir gece 37 °C inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir. 49
Şekil 4.8. SBV'ye ait 66, 59 nolu ve 342 bç uzunluğundaki polyprotein genini taşıyan plazmitlere uygulanan PCR sonucuna ait jel görüntüsü. M:100-3000 bç marker, 1: Birinci koloni plazmit, 2: İkinci koloni plazmit, 3: Pozitif kontrol 50
Şekil 4.9.SBV Bingöl MZ357971 ve MZ357972 izolatları ile dünyadaki SBV izolatlarının polyprotein geninin nükleik asit dizisi 1000 tekerrürlü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı 52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Dünya kovan sayısı (Anonim 2021b)..... 6
Tablo 1.2. Ülkelere göre bal üretim miktarı (Anonim 2021b) 7
Tablo 1.3. Ortalama kovan bal verimliliği (Anonim 2021b)..... 7
Tablo 1.4. Dünyada bal üretim yüzdeleri (Anonim 2021b)..... 8
Tablo 1.5. Türkiye'nin son beş yılın arıcılık verileri (TÜİK, 2019)..... 8
Tablo 1.6. Bingöl ili arıcılık verileri (TÜİK, 2019)..... 9
Tablo 3.1. Survey yapılan il merkezi ve ilçelerdeki işletme, kovan ve toplanan örnek sayıları..... 30
Tablo 3.2. Virüslerin teşhisi kullanılan primer çiftleri 32
Tablo3.3. Bu çalışmada test edilen virüslerin teşhisi için kullanılan RT-PCR döngüleri 33
Tablo 3.4. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları..... 36
Tablo 4.1. BQCV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri. 43
Tablo 4.2. 92 nolu BQCV Bingöl izolatına ait polyprotein geni baz dizisi 45
Tablo4.3. Gen bankası veri tabanında bulunan BQCV virüsüne ait farklı izolatların Erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen ve Nükleotit Benzerliği..... 46
Tablo 4.4. SBV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri. 48
Tablo 4.5. 66 nolu SBV Bingöl izolatına ait polyprotein geni baz dizisi..... 50
Tablo 4.6. Gen bankası veri tabanında bulunan SBV virüsüne ait farklı izolatların erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen, Nükleotit Benzerliği 51
Tablo 4.7. Tekli ve Çiftli virüs infeksiyonlarının tespit edilen sayısı, oranları ve arılıklar..... 53

BİNGÖL İLİ BAL ARILARINDA (*Apis mellifera* L.) SİYAH KRALİÇE HÜCRE VİRÜSÜ, TULUMSU YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ VİRÜSÜ VE AKUT ARI FELÇ VİRÜSÜ'NÜN YAYGINLIĞINI RT-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Yürütülen bu çalışmada Bingöl ili Bal arılarındaki Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV), Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) ve Akut Arı Felci Virüsü (ABPV) infeksiyonları ve yaygınlıkları her virüse özgü primerler kullanılarak RT-PCR metodu ile araştırılmıştır. Buna göre 128 farklı arılıktan rastgele şekilde toplam 384 canlı işçi arı örneği toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir.

Araştırması yapılan virüslerden SBV virüsü 128 arılıktan 9'inde %7,03 infeksiyon oranıyla belirlenirken BQCV virüsü ise 128 arılıktan 15'inde %11,7 infeksiyon oranıyla belirlenmiş, ABPV ise belirlenememiştir. Moleküler teşhis çalışmasında aynı zamanda bir örnekte %0,78 oranında ikili infeksiyon da tespit edilmiştir. Tespiti yapılan her bir virüsten rastgele seçilen bir izolatın kısmi poliprotein gen bölgesi moleküler olarak pGEM T-Easy vektörüne Klonlandı ve nükleotit dizi sırası ortaya çıkarıldı.

SBV için 342 nükleotitlik iki dizi ve BQCV için 700 nükleotit içeren bir dizi sırasıyla MZ357971, MZ357972 ve MZ357974 erişim numaraları ile gen bankasına (NCBI) kaydedilmiştir. Her iki viral genoma ait dizilerin filogenetik ilişkisi gen bankasında yer alan dünya çapındaki diğer izolatlar kullanılarak araştırılmıştır. BQCV- Bingöl izolatı (MZ357974) %96,58 oranında en yüksek nükleotit benzerliği ile Brezilya izolatına, en düşük %75,71 oranda ise İsveç izolatı (KY363519) ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. SBV-Bingöl dizileri ise (MZ357971 ve MZ357972) kendi arasında %100 oranında benzerlik göstermiş olup, her iki dizinin nükleotit benzerliği diğer izolatlar ile %85,96-%92,98 arasında değişmiştir. Ayrıca yapılan filogenetik analizler, her iki izolatın en fazla Türkiye (MH251274) izolatı ile en az ise Çin (JX679488) izolatı ile filogenetik yakınlık içerisinde olduğunu ortaya çıkardı. Bu çalışmada tespiti yapılan SBV ve BQCV virüslerinin varlığı Bingöl ili için ilk kayıt niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Balarısı, Bingöl, BQCV, SBV, ABPV, karakterizasyon, Türkiye.

THE PREVALENCE of *Black queen cell virus*, *Sacbrood virus* and *Acute bee paralysis virus* IN HONEY BEES (*Apis mellifera* L.) USING RT-PCR METHOD IN HONEY BEES IN BİNGÖL PROVINCE AND GENOMIC CHARACTERIZATIONS OF IDENTIFIED ISOLATES

ABSTRACT

In this study, Black queen cell virus (BQCV), Sacbrood virus (SBV), and Acute bee paralysis virus (ABPV) infections and their prevalence were investigated by RT-PCR method using primers specific to each virus in honey bees in Bingöl province. Accordingly, a total of 384 alive worker bee samples were randomly collected from 128 different apiaries and brought to the laboratory.

Among the viruses studied, SBV and BQCV were identifified in 9 with an infection rate of 7.03% and 15 with an infection rate of 11.7% of 128 apiaries, respectively, but ABPV could not be detected in apiaries. In molecular tests, double infection was also detected in a sample with a infection rate of 0.78%. Partial polyprotein gene region of a randomly selected isolate from each detected virus were molecularly cloned into the pGEM T-Easy vector and the nucleotide sequence sequence was revealed.

Two sequences of 342 nucleotides for SBV and a sequence of 700 nucleotides for BQCV were registered in the GenBank (NCBI) under the accession numbers MZ357971, MZ357972 and MZ357974, respectively. The phylogenetic relationship of the sequences of both viral genomes was investigated using other worldwide isolates from the gene bank. BQCV-Bingöl isolate (MZ357974) was found to be similar to the Brazilian isolate with the highest nucleotide similarity of 96.58%, and to the Sweden isolate (KY363519) at the lowest rate of 75.71%. The SBV-Bingöl sequences (MZ357971 and MZ357972) showed 100% similarity among themselves, and the nucleotide similarity of both sequences varied between 85.96% and 92.98% with other isolates. In addition, the phylogenetic analysis showed that both isolates showed the highest phylogenetic affinity with the Turkish isolate (MH251274), while the least phylogenetic affinity with the Chinese (JX679488) isolate. The presence of SBV and BQCV viruses detected in this study is the first record for Bingöl province.

Keywords: Honeybee, Bingöl, BQCV, SBV, ABPV, characterization, Turkey.

1. GİRİŞ

Bilimdeki adı *Apis mellifera* L. olan Avrupa balarısı 1758 yılında ünlü sistematikçi Linnaeus keşfetmiştir. Bal üretimi yapılan Asya, Hindistan uzakdoğu'daki diğer Apis türlerinden ayırt etmek için Avrupa balarısı olarak isimlendirilmiştir (Engel 1999). Avrupa bal arısının taksonomisi;

Âlem: Animalia
Şube: Arthropoda
Alt Şube: Antennata
Sınıf: Insecta
Takım: Hymenoptera
Familya: Apidae
Cins: Apis
Tür: *Apis mellifera* L. (Avrupa bal arısı)

Bal arıları hem ürettikleri ürünler hem de dolaylı olarak bitkisel polinasyona olan katkılarından dolayı gerek insanoğlu gerekse doğa için vazgeçilmez faydaları olan sosyal böceklerdendir. Bal arılarının meydana getirdiği ve doğal ürünlerden olan; bal, arı sütü polen, arı zehri ve propolis gibi ürünlerden gerek insanların beslenmesinde gerekse birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç ya da ilaçların ana maddesi olarak yararlanılmaktadır(Kaftanoğlu vd. 1992).

Arı yetiştiriciliği ekonomik bir uğraş olarak düşünüldüğünde bal arılarının bitkilerde polinasyona neden olarak meydana getirdiği fayda, ürettikleri ürünlerinden dolayı sağlamış oldukları faydanın yaklaşık on katından fazladır. Hem bitkisel üretimdeki katkısı hem de ürettikleri değerli ürünler ile toprağa ihtiyaç duyulmadan yapılan bir faaliyet olduğu için kolay bir istihdam alanı olması nedeniyle arı yetiştiriciliği, nüfusunun büyük bir bölümünün düşük gelirli olduğu Türkiye ve benzer ülkeler için arı yetiştiriciliğinin önemi her geçen gün artmaktadır (Genç ve Dodoloğlu 2002).

Bal arıları bitkisel üretimdeki katkıları ile yabani bitkilerin devamlılığını sağlayarak doğal dengenin korunmasına da önemli katkıları bulunmaktadır. Bal arılarının kültür bitkilerinin polinasyonunda ve ekolojik dengenin sağlamasında rolünün büyük olması, arıların yaşam şekilleri, biyolojik yapıları, davranış ve üreme özellikleri bu doğal dengenin korunmasında önemli rol oynarlar (Akyol ve Camcı 1999).

Kültür bitkilerin büyük bir kısmında polinasyon aracılığıyla kalite ve kantitesinin artmasında bal arıların etkisinin büyük olduğu göz ardı edilemez. Modern tarım uygulamaları ile artan kimyasal kullanımı ve bunun beraberinde getirdiği doğal dengenin bozulması yabani böcek popülasyonun da meydan gelen azalmalar nedeniyle, günümüzde bal arılarının önemini daha da arttırmıştır. Çoğu canlıda olduğu gibi bal arılarında da birçok hastalık ve parazit bulunmaktadır. Bu etmenler bal arılarının doğal dengesini tehdit etmektedirler. Arıların biyolojileri, üreme özellikleri, yaşam şekilleri ve insanların yapmış olduğu yanlış kimyasal uygulamalar, uygun olmayan bakım koşulları ve konargöçer (gezginci) arı yetiştiriciliği arı hastalıkları ve parazitlerinin arı kolonilerinde ve arılıklar arasında kısa sürede yayılmasına neden olmaktadır. Bal arısı hastalıkları ve parazitleri; koloni popülasyonunun gelişimini engelleyen, , doğrudan arı sağlığına etki edebilen, verimliliği azaltan, uygun dönemlerde yeterli bakım yapılmadığında ürün ve kolonilerin sayısının azalmasına hatta yok olmasına sebep olmaktadır (Akyol ve Korkmaz 2005).

Diğer yandan, dünya arıcılığını son derece tehdit eden en önemli arı paraziti *Varroa destructor*, 1904 yılında *Apis cerena'*da ve 1960 yılında da *Apis mellifera* L. bal arılarında yaygın olarak görülen ve arıcılığı ciddi ekonomik sorunlarla karşı karşıya bırakan en büyük virüs taşıyıcısı etmendir (Delfinado 1963). Varroa *Apis mellifera* aracılığıyla ticari amaçlı yapılan arıcılık sayesinde ana arı yetiştirilmesi, oğul verme, arıcılık alet ve ekipmanlarının nakliyesi ve konargöçer arıcılık yolu ile ülke içinde ve ülkeler arasında geniş alanlara yayılmasına neden olmuştur. Varroanın arıcılık yapılan yerlerde hızla yayılması ve yüksek oranda tahripkar olması dünyadaki ve ülkemizdeki arıcılık faaliyetlerini sekteye uğratmaya devam etmektedir (Morse and Laigo 1969; Morse and Gonclaves 1979).

1.1. Varroa Akarı

Varroa paraziti Türkiye'ye ilk kez 1976 yılında Trakya bölgesine Bulgaristan üzerinden geçmiştir ve oradan da bal üretimi yapan konargöçer arıcıların bölgeye gelmesiyle arılıklarına bulaşmış ve Anadolu'ya bu şekilde taşınmıştır. 1977-1978 yıllarında ilk kez Ege bölgesinde tespit edilen parazit daha sonra çam balı üretimi yapmak amacıyla ülkenin tüm bölgelerinden gelen arıcılar özelikle bu bölgeye gelen arıcıların arılıklarına bulaşmıştır. Bütün ülkeye 4-5 yıl gibi bir süre içerisinde yayılmaya başlanmıştır. Varroa akarı ülkemizde bulaştığı ilk yıllarında yaklaşık 600 bin koloninin yok olmasına ve yaklaşık 7000-7500 ton bal kaybına sebep olmuştur. Parazit bugün arıcılığımızın en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Varroa arılarda genelde uzun süreli dikkat çekici klinik belirtiler göstermez. Kısa sürede hayat döngüsünü tamamlayan parazit kolonilerde ciddi hasarlara neden olur. Arının kanını emmek suretiyle ya da bazı kaynaklara göre yağ dokusundan beslenir ve çoğalır (Şekil 1.1). Parazitin yumurtasının gelişimi petek gözlerinde gelişir. Ana arı ilkbaharda yumurta bırakmaya başladıktan sonra dişi akarlar da hemen akabinde bu gözlere yumurta bırakır. Dişi akar gelişmekte olan 5-6 günlük olan larvanın petek gözlerinin içine gözler kapatılmadan 1-2 gün önce girerler ve yumurtlarlar. Yumurtadan çıkan parazitler arı gözlerindeki larvalar üzerinde bir hafta kadar hemolenfi emerek beslenir. 8 ay kadar yasayabilen dişi akarlar, kış mevsimini petek gözleri içerisinde geçirirler. Yazın aylarınada ömürleri daha kısa olup yaklaşık 2-3 aydır (Akyol ve Korkmaz 2005; Tewarson 1983).



Şekil 1.1. İşçi arılar ve yavru üzerindeki Varroa akarının görünümü

1.2. Bal Arılarında Koloni Düzeni

İnsan ve ekolojik denge için önemli olan Avrupa balarısı (*Apis mellifera*) koloni olarak adlandırılan topluluklar halinde yaşayan sosyal böceklerdendir. Koloni çerisinde morfolojileri, fizyolojileri ve görevleri bakımından üç farklı birey olarak ayırt edilmiştir. Bu bireyler sırasıyla ana arı, erkek ve işçi arılardır. Ana arı ve işçi arılar dişidir, döllenmiş yumurtadan meydana gelirler. Erkek arı ise döllenmemiş ana arı yumurtasından oluşur. Bir arının yaşam döngüsü sırasıyla yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere birbirinden tamamen farklı dört gelişme dönemi bulunmaktadır. Petek gözü içerisinde bulunduğu döneme kuluçka süresi denir ve bu dönem de yumurta, larva ve pupa dönemlerini geçirmektedir. Bu süreçler bireyler beslenme durumuna göre farklılık gösterir; ana arı 16 gün, işçi arılar 21 gün, erkek arılar da 24 gün olarak tespit edilmiştir. Yaz aylarında normal bir arı kolonisinde bir tane kraliçe arı, yüzlerce erkek arı ve sayısı kovanın güçlülüğüne göre 20,000-60,000 arasında değişen işçi arı nüfusu bulunur. Kış aylarında yavruya gerek duyulmadığı için erkek arı üretimi yapılmamaktadır ve yaşlı işçi arıların da çoğu ölmektedir (Akyol ve Korkmaz 2005; Seeley 1985; Winston 1987).

1.2.1. Koloni Bireyleri ve Görevleri

1.2.1.1. Ana Arı ve Görevleri

Kraliçe arı ve ece arı olarak da bilinen ana arı normal düzene sahip bir kolonide sadece bir adet bulunur. Yaklaşık 2-5 yıl ömrü olan ana arının asıl görevi yumurtlayarak kolonisinin devamlılığını sağlamaktır. Ana arı dış görünüş olarak ince ve uzundur. Rengi ise diğer işçi ve erkek arılara göre daha açık ve parlaktır (Şekil 1.2.). Beslenmesi, bakıcı işçi arılar tarafından ana arının ağzına arı sütü vermeleri şeklindedir. Ana arı; ana arı memesi olarak adlandırılan özel bir göz içerisinde 16 günde gelişimini tamamlar. Ana arı salgıladığı feromonlarla kolonideki birlik ve düzeni yürütmekten sorumludur. Ayrıca bu kimyasal feromonlar işçi arı yumurtalıklarının olgunlaşmasını baskılar ve kolonide rakip bir ana arı yetiştirilmesini engeller (Akyol ve Korkmaz 2005).

Hayatta kaldığı süre boyunca sadece çiftleşme ve oğul verme amacıyla yuva dışına çıkarlar. Kuluçka dönemini sonunda ana arı kuluçkadan çıkar. Çiftleşme rüzgârsız ve güneşli bir günde gerçekleşir. Ortalama 8-18 erkek arı ile çiftleşen ana arı yuvaya döner.

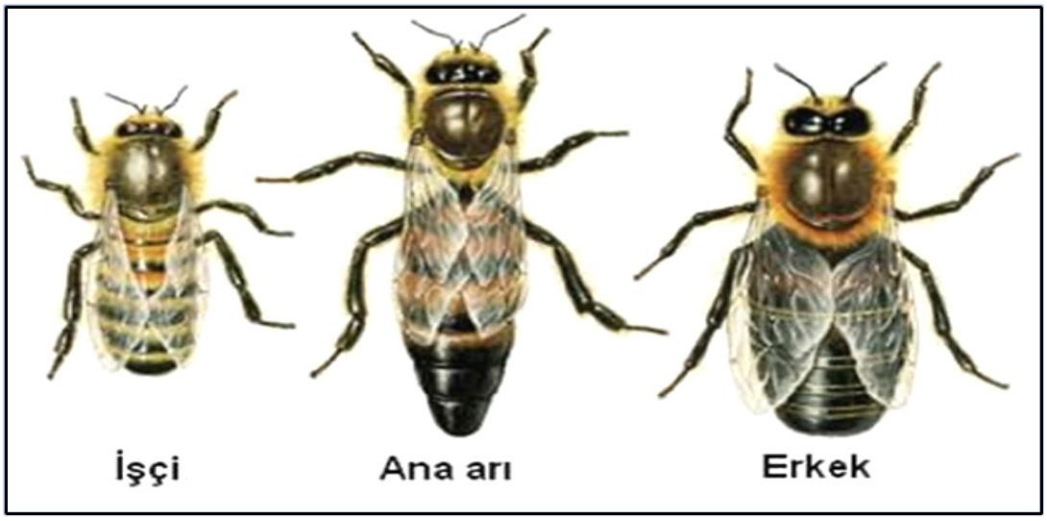
Çiftleştikten anarı yaklaşık günlük 1500-2000 arası döllenmiş ve döllenmemiş yumurta bırakır. Döllenmiş yumurtalarda işçi arılar tarafından sürekli arı sütü ile beslenir ve gözler içerisinde ana arı gelişir (Rangel J. et al. 2013; Akyol ve Korkmaz 2005).

1.2.1.2. İşçi Arı ve Görevleri

Döllenmiş yumurtadan meydana gelen işçi arılar diğer kolloni bireylerine göre daha küçük vücuda sahiptir (Şekil 1.2). Koloninin gücüne ve mevsime bağlı olarak kolonideki işçi arı sayısı ilkbahar ve yaz aylarında 20,000-60,000 kış aylarında ise 10,000-15,000 arasında değişir. Normal koşullarda yumurtlama hariç kolonide ki işçi arıları ana arı bakımı, yavru bakımı, kovan temizliği, kovanın havalandırılması, kovanın bekçiliği, petek örme, nektar toplama, bal mumu salgılama, sutaşıma ve bunları ağzındaki tükürük bezlerini sayesinde ile bala dönüştürür, arı sütü üretme ve bitkilerden propolis, polen toplama işlerinden sorumludur. Yaşam süreleri kısa olan işçi arılar, çalışma temposuna bağlı olarak normalden daha hızlı yıpranması nedeniyle ilkbahar-sonbahar arasındaki dönemde 35-40 gün gibi kısa bir süre hayatta kalır. Kış dönemindeki işçi arıların çalışma temposu düştüğü için ömürleri 6-8 aya kadar çıkabilmektedir (Seeley 1985; Winston 1987; Akyol ve Korkmaz 2005).

1.2.1.3. Erkek Arı ve Görevleri

Erkek arılar döllenmemiş yumurtalardan gelişir ve diğer arılara göre yarım takım kromozoma sahiptir. Erkek arıların boyu işçi arılardan ve ana arıdan daha kısa ve geniştir (Şekil 1.2.). Erkek arıların beslenme hortumu kısa olduğu için çiçeklerden nektar alamazlar, hazır balla beslenirler bu da kovana yük demektir. Erkek arıların ömrü ortalama 30 gündür. İşçi arılar, ergin erkek arıları koloniden atarak erkek arı popülasyonunun sınırlı sayıda tutarlar. Geç sonbahar ve kış aylarında ise sayıları yok denecek kadar azalır. Erkek arıların tek görevi ana arılarla çiftleşmektir. Erkek arıların sperma miktarı ve kalitesi beslenmesine göre değişebilir (Seeley 1985; Winston 1987; Akyol ve Korkmaz 2005).



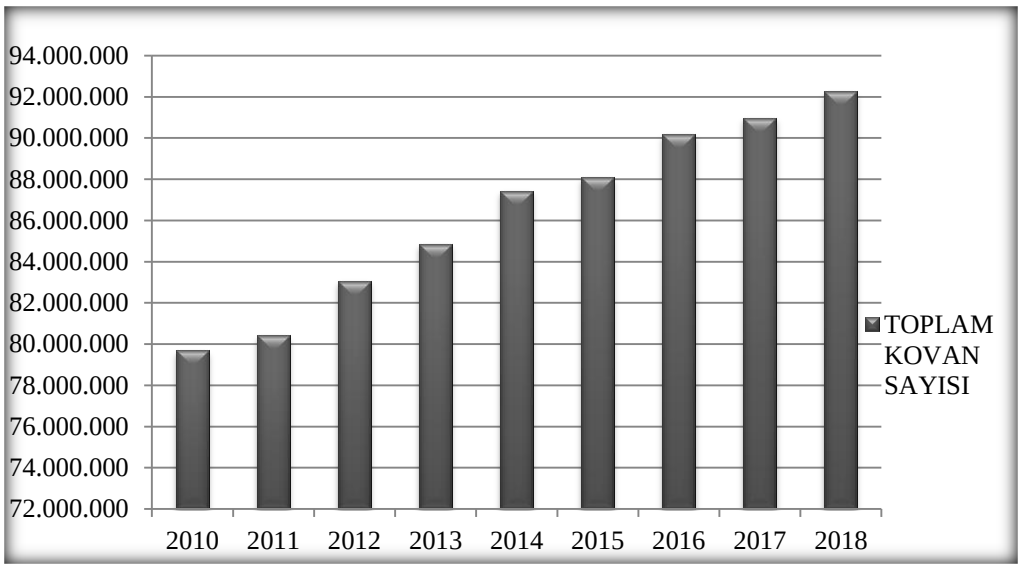
Şekil 1.2. Bal arısı kolonisinde yer alan bireyler

1.3. Türkiye ve Dünya Arıcılık Verileri

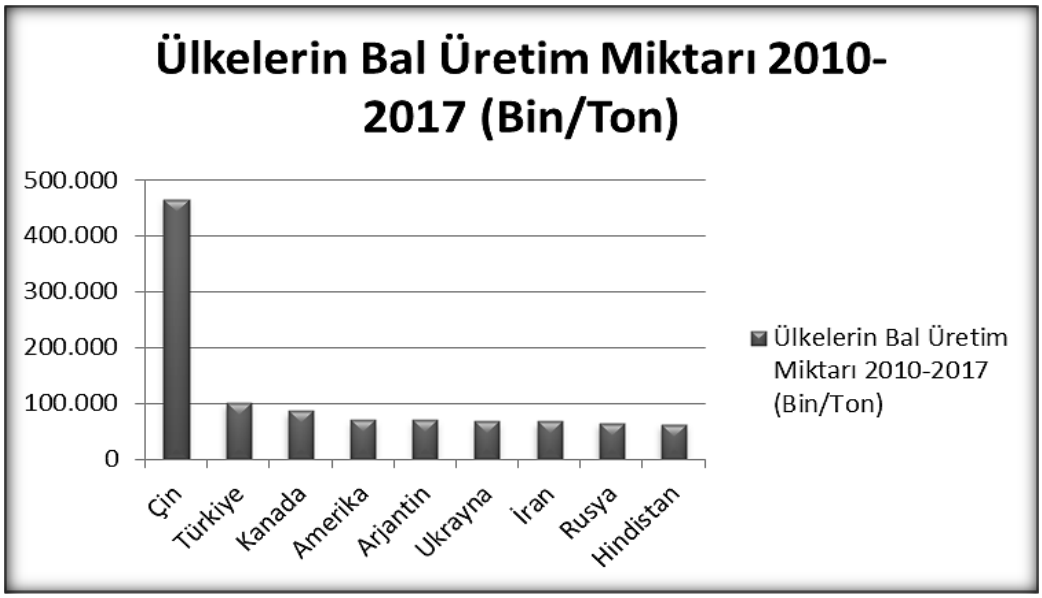
1.3.1. Dünyada Arıcılık

Arıcılık dünya geneline yaygın olarak yapılan önemli bir tarımsal faaliyettir. 2018 yılı itibarıyla dünyada toplamda 92,265,141 arı kovanı ve yaklaşık 1,850,868 ton bal üretimi yapılmaktadır. Kovan başına bal ortalaması ise 20,1 kg'dır. Dünyada üretilen balın %90'ı 20 dolayındaki bal üreticisi ülkeden yapılmaktadır (Anonim 2021a).

Tablo 1.1. Dünya kovan sayısı (Anonim 2021b)

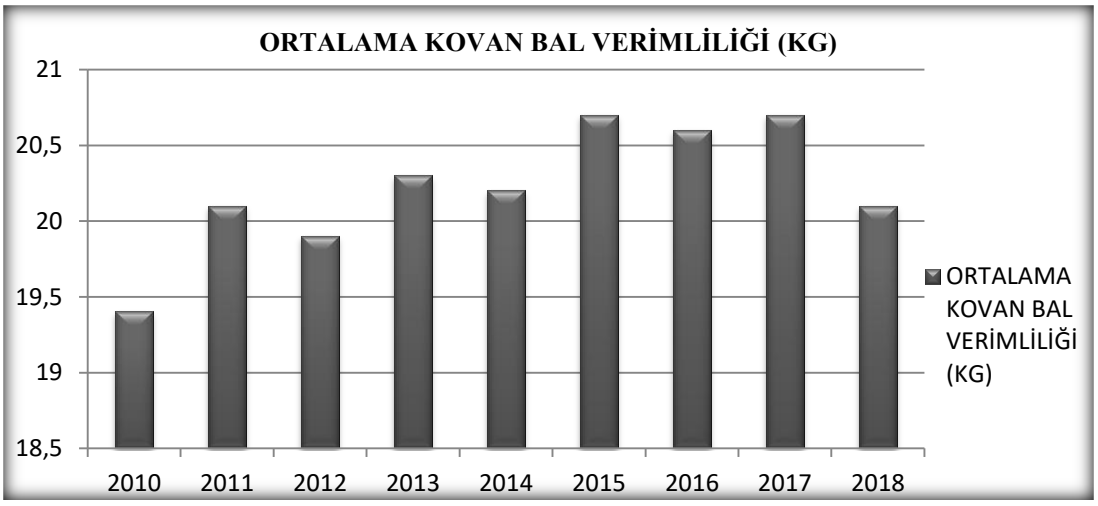


Tablo 1.2. Ülkelere göre bal üretim miktarı (Anonim 2021b)



Dünyada bal üretiminde 457,203 ton ile ilk sıradaki ülke Çin'dir. Bal verimi oranında kovan başına 49,80 kg ile dünya ortalamasının üzerindedir.

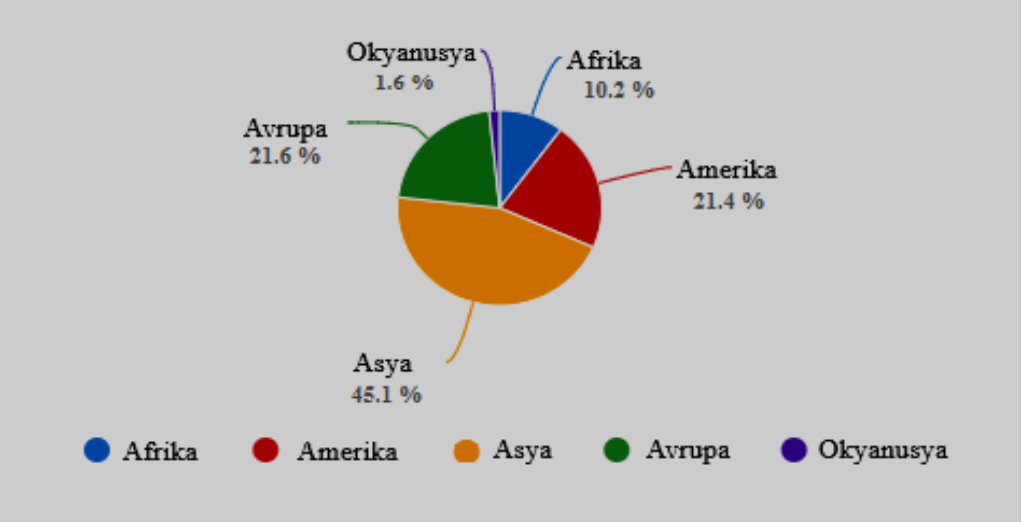
Tablo 1.3. Ortalama kovan bal verimliliği (Anonim 2021b)



Ülkelerdeki ortalama bal üretimin tablosu incelendiğinde Çin, Kanada ve Türkiye'nin bal üretimi dikkat çekicidir. Türkiye bal üretim miktarında dünyada 2. sırada yer almasına rağmen kovan başına bal üretim miktarı 14,40 kg ile dünya ortalamasında son sıralardadır. Dünyada en çok bal üreten ülkeler; ABD, Japonya, Fransa, İsviçre, Almanya, Avusturya ve İtalya'dır. Gelişmiş ülkelerde arıcılıktan, bal ve bal ürünleri elde etmenin

yanı sıra polinasyon ile tarımsal faaliyetlere katkıda bulunmak amacıyla da faydalanılmaktadır (Anonim 2021a).

Tablo 1.4. Dünyada bal üretim yüzdeleri (Anonim 2021b).



1.3.2. Türkiye Arıcılık Verileri

Türkiye, bal üretimi ve arı kolonisi varlığı bakımından dünya sıralamasında ön sıralarda yer alır. Bitki türü çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir. Bu türlerin yaklaşık %40'ı endemiktir ve ülkemiz çok sayıda farklı bal arısı türüne sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda Türkiye'de beş farklı arı ırkı tespit edilmiş olup bunlar: *Apis mellifera* anotolica, *Apis mellifera* causica, *Apis mellifera* carnica, *Apis mellifera* ve *Apis mellifera* meda'dır. Bu çeşitliliğe rağmen bal verimi konusunda dünya ortalamasının altındadır (Anonim 2021a).

Tablo 1.5. Türkiye'nin son beş yılın arıcılık verileri (TÜİK, 2019)

Yıl	İşletme sayısı	Kovan Sayısı (1000 adet)	Bal Üretimi (Bin/ton)	Ortalama Kovan Bal Verimi (Kg)
2014	81,108	7,083	103,525	14,62
2015	83,475	7,748	108,128	13,96
2016	84,047	7,900	105,727	13,38
2017	83,210	7,991	114,471	14,32
2018	81,830	8,108	107,920	13,31
2019	80,675	7,929	109,330	13,78

TÜİK verilerine baktığımızda 2019 yılındaki bal üretimi 109,330 tondur. Kovan sayısı yıllar içerisinde sürekli artmıştır. Kovan başına bal verimliliğe bakıldığında, kovan sayısındaki artış bal üretimindeki etkisinin az olduğu gözlemlenmiştir.

1.3.3. Bingöl Arıcılık Verileri

Türkiye ve Bingöl ili bitki tür çeşitliliği ve koloni sayısı fazla olmasına rağmen bal ve diğer ürünlerinin üretiminde kendileri ile benzerlik gösteren bitki tür çeşitliliği ve koloni sayısına sahip olan ülke ve şehirlere göre, bal ve diğer bal ürünleri bakımından daha az oranda bulunuyor. Bunun temel sebeplerinden biri de bal arısı kolonilerinin çok sayıda hastalık için uygun bir ortamın bulunmasıdır.

Ülkeler arasında arı, arıcılık malzemeleri ve arı ürünleri ticareti ile arı hastalık ve parazitleri kısa süre içerisinde dünya geneline yayılmasına sebep olmaktadır. Dünyada önemli bir bal üreticisi olan ve içerisinde önemli bir bal arısı populasyonu barındıran ülkemizde, arılarda önemli hastalıklara yol açan ve bal üretimini miktarını önemli derecede azaltan arı patojenleri mevcuttur.

Tablo 1.6. Bingöl ili arıcılık verileri (TÜİK, 2019)

İlçeler	İşletme sayısı	Toplam kovan	Bal üretimi (ton)
Merkez	316	54,702	747,422
Adaklı	39	5,337	36,76
Genç	81	19,542	248,88
Solhan	78	18,033	236,43
Karlıova	66	12,800	103,7
Yedisu	35	3,519	41,179
Kiğı	78	12,197	100,591
Yayladere	22	5,660	16,2
Toplam	**715**	**31,790**	**1531,162**

Bu patojenler arasında bal arısı virüsleri önemli yer tutmaktadır. Bal arısı virüslerinin tespiti ve mücadelesiyle ilgili ülkemizde sınırlı çalışmanın yapılması diğer ülkelere kıyasla ülkemiz ve Bingöl ilindeki arıcılık ürünlerinin yeterli seviyede olmayışının sebepleri arasında gösterebilir. Bizim bilgilerimize göre, Bingöl ilinde Siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV), Akut arı felç virüsü (ABPV) ve Tulumsu yavru çürüklüğü virüsü (SBV) etmenlerinin varlıklarının moleküler olarak ortaya çıkarılması ile ilgili herhangi

bir çalışma bulunmamaktadır. Yürütülen bu sürvey çalışmasında, Bingöl ilinde bulunan bal arıları kolonilerinde dünya çapında yaygın olarak belirlenmiş üç virüsün varlığı RT-PCR yöntemi ile araştırılması ve bölgedeki yayılış alanları ile mevcut infeksiyon oranlarının ortaya koyulması hedeflenmiştir. Ayrıca Bingöl ilinde tespit edilen virüslere ait spesifik gen dizisi, moleküler klonlama yoluyla ortaya çıkarılması ve bu dizilere dayanarak dünyadaki diğer viral etmenlerle olan filogenetik ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bal arısı dünya genelinde geniş coğrafyalar da yaygın olarak yetiştirildiğinden dolayı bal arasında bu güne kadar çok sayıda virüs hastalığı rapor edilmiştir. Bunlarda birkaçı ekonomik önem taşımakta ve bal arısı kolonisinde zararlara neden olmaktadır. Tez konusu kapsamında belirlenen bu virüslerin bal arısı virüslerinin dünya literatürüne göre isimlendirmeleri ve genel özellikleri aşağıdaki gibidir.

- ✓ *Acute bee paralysis virus* (ABPV)
- ✓ *Black queen cell virus* (BQCV)
- ✓ *Sacbrood virus* (SBV)

2.1. Bal Arısı Virüslerinin Taksonomisi

Bal arısı virüsleri arasında *Apis mellifera filamentous virus* (AmFV) ve *Apis iridescent virus* (AIV) virüsleri dsDNA genomu sahipken geriye kalan bal arısı virüsleri ssRNA virüsü olup genelde Picornavirales takımına ait Iflaviridae ve Dicistroviridae familyalarına ait türlerdir (de Mirada et al. 2013).

2.1.1. Dicistroviridae

Dicistroviridae familyasındaki bal arısı virüslerinde 9-10 kb uzunluğunda bir birinden ayrılan iki ORF bölgesi (opening reading frame) bulunur. IRES (internal ribosome entry site) olarak görev yapan bölgenin genomu 3' ucunda kalan bölgenin translasyonunu bu noktadan itibaren başlatır (Wilson et al. 2000). Bu familya ait virüslerin kılıf proteini (VP1, VP2, VP3 ve bazı virüs türlerinde bulunan VP4) 3' ucu kısımda bulunan ORF (opening reading frame) genomu ile kodlanırken yapısal olmayan proteinler ise 5' ucunda bulunan ORF (opening reading farme) genomu tarafından kodlanmaktadır (Gordon and Waterhouse 2006).

Dicistroviridae familyası ismini RNA genomunun iki farklı ORF'nin bir IRES ile ayrılması ile bu familya tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında bulunan ABPV Dicistroviridae familyasının *Aparavirus* genusunda yer alırken BQCV ise aynı familyanın *Cripavirus* genusunda yer almaktadır (Anonim 2021c).

2.1.2. Iflaviridae

Picornovirales takımında yer alan sadece *Iflavirus* genusuna sahip bu familyada genusunda dokuz virüs türü bulunmaktadır. Araştırmamızın konusu olan SBV, bu genusun bir üyesidir (Anonim 2021c). Bu familya kapsamındaki virüsler bir ORF (opening reading frame) içeren ssRNA(+) ve 8,8-9,7 kb uzunluğunda RNA genomuna sahiptirler. Genomun 5' ucuna Vpg proteini bağlı olurken, 3' ucunda ise poly-A uzantısı bulunmaktadır. 5' ucunda uzun bir UTR (untranslated region) bulunduran familya üyeleri aynı zamanda bu UTR bölgesi içerisinde bir IRES (internal ribosome entry site) sahiptir. Genomun 3' ucu tarafında yapısal olmayan genler bulunurken 5' ucunda yapısal olan genler bulunur. Bu genom sadece bir IRES bölgesi içerdiği için bütün proteinler tek bir polipeptit halinde üretilir (Chen and Siede 2007).

2.2. Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (*Sacbrood virus*; SBV)

2.2.1. Genel Özellikleri

Ülkemizde tulumsu veya torba yavru çürüklüğü hastalığı adıyla bilinen, *Sacbrood virus* ilk kez 1913 yılında ABD'de tespit edilmiş olmasına rağmen (White GF 1917), SBV bir virüs ajanı olarak ilk kez 1964 yılında karakterize edilmiştir. SBV en yaygın bal arısı virüsü infeksiyonuna neden olduğunu, bu virüs larvaları veya yetişkin bal arılarını enfekte edebildiğini ve ergin arıların infeksiyona karşı duyarlılığının yüksek olduğu yaygın arı virüslerindendir (Bailey et al. 1964).

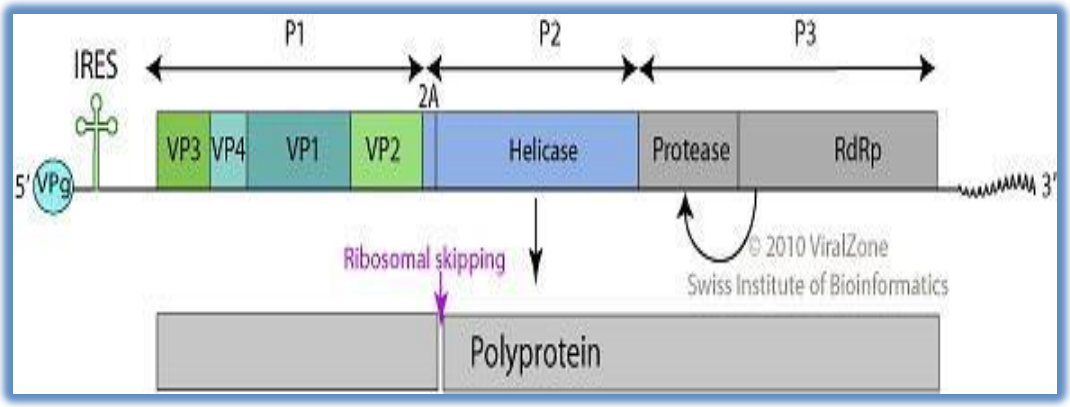
SBV özellikle larva hastalığı olarak tanımlanmıştır. İnfeksiyon döneminde larvanın 4. gününe kadar olan süreç larvaların hastalığa karşı en hassas oldukları dönemdir. Larvaların yaşı ilerledikçe infeksiyona karşı duyarlılıkları azalır. Yetişkin arılar, görülebilir simptomlar göstermeden, yalnızca hasta arıların sağlıklı arılara oranla kısalan yaşam süresiyle karakterize edilen gizli bir infeksiyon geliştirir (Grabensteiner et al. 2001; Berenyi et al. 2006).

SBV infeksiyonu sezona bağlı olarak bir dağılım gösterir. Öncelikle ilkbahar ve yaz aylarında sonbahar aylarına oranla daha fazla görülmektedir. SBV infeksiyonunun sıklığı, yavrulama mevsiminin başladığı ve çok sayıda duyarlı larva ve genç yetişkinin bulunduğu ilkbaharda yüksek düzeye ulaşabileceğini saptamışlardır. Aslında; sezon boyunca zengin polen ve nektar kaynakları yavrulamayı teşvik eder.

Enfeksiyonunun mevsimsel değişimi hem yetişkin arılarda hem de pupalarda gözlemlenir ayrıca polen kalitesi gibi durumlardan da etkilenir (Anderson and Gibbs 1988). SBV virüsün dünya genelinde birçok ülkede görünüşte sağlıklı olan kolonilerde sıklıkla görülen bal arılarının yaygın infektif bir etmen olduğunu tespit etmişlerdir (Allen and Ball 1996).

2.2.2. SBV Virüsünün Genom Organizasyonu

SBV genomu 2858 aminoasit uzunluğunda bir poliprotein sentezleyen 179-8752 nt aralığında bir ORF (open reading frame) içeren 8832 nt uzunluğunda ve ssRNA(+) RNA'dan oluşmaktadır (Şekil 2. 1). Yapısal genler genomun 5' ucunda, yapısal olmayan genler ise 3' ucunda olmasından dolayı Picornavirus olarak değerlendirilmiştir (Ghosh et al. 1999).



Şekil 2.1. SBV'ye ait genom organizasyonu

2.2.3. SBV'nin Taşınması

SBV infeksiyonu, *V. destructor* tarafından istila edilen arı kovanlarından çok sayıda yetişkin arıda tespit edilmiştir. Dış parazitlerin özellikle ağız kısımlarında ve sindirim sistemlerinde tespit edilmiş ve yüksek miktarda virüs varlığı saptanmıştır. Akar

örneklerinde SBV yayılması ile yetişkin arı örneklerinde SBV varlığı arasındaki pozitif ilişki tespit edilmiştir. Aynı zamanda etkenin Varroa parazitinde de tespit edilmesi, Varroanın virüsü koloniler arasında taşıyabileceğini düşündürmektedir. Hastalığın yayılmasında diğer önemli bir faktör de kovanı şaşıran erkek arılardır (Tutkun ve Boşgelmez 2003; Ball et al. 1989; Kevan et al. 2006).

SBV polende tespit edilmesi, virüsün işçi arılardan kolonideki bakıcı arılara besin takviyesi aracılığıyla olası bulaşmasını doğrulamaktadır. Bu durum; SBV'nin arıların hastalıklı kolonilerden toplanan bal veya polen yoluyla beslenerek koloniler arasında etmenin bulaşması da mümkündür kılmıştır (Shen et al. 2005).

SBV virüsü nedeniyle ölmüş larvaların bulunduğu petek gözlerini kovandan uzaklaştıran bakıcı işçi arılar da infeksiyona yakalanırlar. Etmen arıların hipofarengeal bezlerine yapışır ve bakıcı arılar larvaları besleme esnasına virüsü bulaştırır ve infeksiyon yayılır (Maramorosch and Shatkin 2007).

Shen et al. (2005), kolonideki bakıcı arıların virüsü besleme yoluyla diğer yetişkin arılara bulaştırdığını saptamışlardır. SBV'nin; hastalıklı kolonilerden toplanan bal veya polenle arıların beslenmesi sonucu koloniler arasında bulaştırabilmesi de mümkündür. SBV partikülleri aynı zamanda ana arının ovaryumunda birikebilmekte ve ana arının yumurta bırakması sonucunda yeni çıkacak olan yavrulara geçebilmektedir (Chen et al. 2006b).

2.2.4. SBV'nin Oluşturduğu Simptomlar

SBV virüsü, ergin bal arılarını ve larvaları enfekte eder. İnfeksiyona karşı larvalar daha hassastır. SBV büyük oranda larva ölümüyle sonuçlanan önemli morfolojik değişikliklere neden olan yüksek viral replikasyon sayesinde larvaları etkiler (Berenyi et al. 2006).

SBV enfekteli bal arısı larvası, larva aşamasından pupa aşamasına geçemeden petek gözü içinde derisi değiştiremeden ve vücudu ile deri arasında ektosial sıvının birikmesi sonucu petek gözüne yapışmış bir şekilde dik konumda ölür. SBV ile enfekte olmuş larva derinin baş kısmından ayrılmadığı zaman ekdisial sıvının deri ve vücut arasında birikmesiyle torba görünümü alması nedeniyle *Sacbrood virus*; SBV (Tulumsu yavru çürüklüğü virüsü) olarak isimlendirilmiştir (Cordoni 2011).

Enfekte olmuş larvaların pupa aşamasına geçmediğini ve SBV partikülleri açısından zengin ektosial sıvı, hastalığın adlandırıldığı keseyi oluşturan sindirilmemiş parçaların altında biriktiğini ve enfekte olmuş larvaların renklerini inci beyazından soluk sarıya değiştirdiğini ve ölümden hemen sonra larvaların kuruduğu ve koyu kahverengi kese şekline dönüştüğünü saptamışlardır (Bailey et al. 1964).



Şekil 2.2. SBV ile enfekteli larva

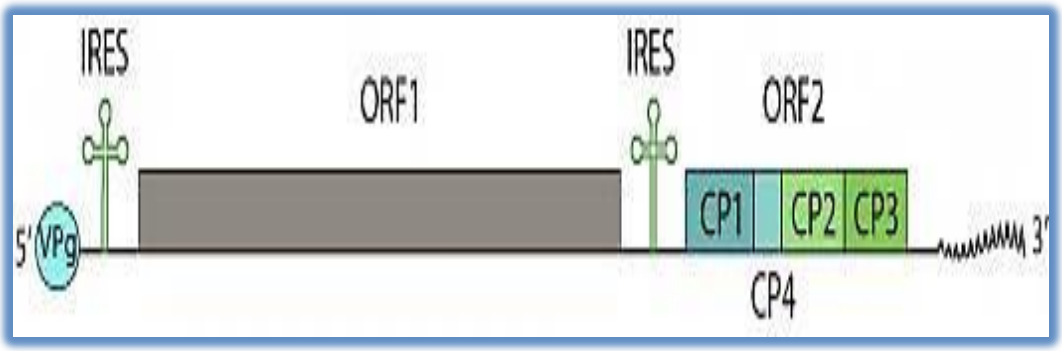
2.3. Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (*Black queen cell virus*; BQCV)

2.3.1. Genel Özellikleri

BQCV hem *A. mellifera* ve hem de *A. cerena* bal arılarını infekteleme yeteneğinde olan riskli bir patojendir (Chen et al. 2021). BQCV bal arılarında özellikle de ana arı larvalarını etkileyen bir virüstür. Adından da anlaşılacağı üzere bu virüs, enfektelenmiş pupa içeren petek hücrelerinin duvarlarındaki karartılmış alanlardan izole edildiği için bu isimle özdeşleşmiştir. Aynı çalışmada yapılan elektron mikroskobu ve genom incelemeleri sonuçları etmenin 30 nm çapında isometrik bir RNA virüs olduğunu ilk kez ortaya konulmuştur (Bailey and Woods 1977). Her ne kadar ana arı pupasında tanımlanmışsa da daha sıklıkla ergin bal arılarında da bahar ve yaz aylarında infeksiyona sebep olmaktadır (Tentcheva et al. 2004).

2.3.2. BQCV Virüsünün Genom Organizasyonu

BQCV, Dicistroviridae ailesi ve *Cripavirus* genusunda yer almaktadır (Mayo 2002). Genomu 8550 nükleotid uzunluğunda ve ssRNA(+) yapılı virüsün genomu, iki tane ORF bölgesine sahiptir. Genomun 5' ucundaki ORF1 bölgesi yapısal olmayan proteinler olan Helikaz, RdRp (RNA'ya bağlı RNA polimeraz) ve Proteaz gen bölgesini barındıran 4968 nükleotit uzunluğundadır. 3' ucunda bulunan ORF2 bölgesi ise 2562 nt uzunluğundadır ve ORF1 bölgesinden 208 nt uzunluğundaki intergenik bölge ile ayrılmıştır. ORF2 bölgesi kapsit proteinini oluşturan CP1, CP2, CP3, CP4 ve 6 kDa büyüklüğünde yapısal proteinlerinden sorumludur (Leat et al. 2000; Benjeddou et al. 2001; 2002).



Şekil 2.3. BQCV'ye ait genom organizasyonu

2.3.3. BQCV'nin Taşınması

Varroa ile yüksek seviyede enfekte bir kolonide, hasta veya ölü arılarda yoğun miktarda BQCV virüsünün görülmesi; Varroa, virüsün çoğalmasını tetiklediğini, hastalık ya da ölümlerin meydana gelmesine neden olduğu tespitini desteklemektedir (Maramorosch and Shatkin 2007). Ayrıca; parazitlerin arıda oluşturduğu yaralar virüsün arıda daha fazla infeksiyon yapmasına olanak sağlar. Bu şekilde hastalık iyice yoğunlaşır ve virüsün öldürücü seviyelere ulaşmasına sağlar (Sammataro and Avitabile 1998). Virüs, ana arının bağırsak dokularının yanısıra dışkıda da tespit edildiği rapor edilmiştir. Ancak, BQCV kısmen yetişkin arıların sindirim sisteminde meydana getirdiği infeksiyon nedeniyle birincil olarak *Nosema apis* protozoal etmeni ile bağlantılıdır (Chen et al. 2006b; Bailey et al. 1983).

Bailey and Woods (1974), BQCV'nin yetişkin arıların orta bağırsak dokusunu enfekte ettiğini ve bu bölgenin infeksiyona duyarlılığını arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca, bahar ve yaz aylarında infeksiyon yoğunluğu olan bal arısı kolonilerinde BQCV ve *N. apis* oranı arasında önemli bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında BQCV'nin bu parazit ile enfekte olmuş arıların yüksek ölüm hızının görülmesinde önemli rol oynayabileceği söylenebilir. Ayrıca literatürde yer alan bazı kaynaklarda bu virüsün varroa ektoparaziti ile de taşınabileceği belirtilmiştir (Kevan et al. 2006).

2.3.4. BQCV'nin Oluşturduğu Simptomlar

BQCV ile ilgili yapılan önceki araştırmalarda her ne kadar pupadan izole edilip tespit edilmişse de BQCV'ü genellikle ergin bal arılarında bahar ve yaz aylarında daha sık rastlanmıştır (Tentcheva et al. 2004). Virüsün görüldüğü kolonilerdeki karakteristik belirtiler ishal, şişmiş karın, bağırsakta ödem oluşumu ve içinde bulunan şeffaf sudan dolayı genişlemiş rektumdur (Higes et al. 2007). Yanısıra tipik olarak kraliçe arı pupa ve prepupaları da doğal rengini kaybederek kahverengi renge dönmektedir (Benjeddou et al. 2001; Mayo 2002).



Şekil 2.4. BQCV ile enfekteli rengi kararmış ana arı larvası

Klinik olarak virüsün birincil konukçusunu oluşturan ana arı larvalarını ve ana arı pupalarını etkilemesine rağmen bu larvalar, SBV infeksiyonunun neden olduğu

simptomlara benzer şekilde, soluk sarı bir görünüm ve sert bir kese benzeri deri görüntüsü verdiğini ve ölen pupalar içinde çok sayıda viral partiküllerin toplandığı saptanmıştır (Bailey and Woods 1974).

Kraliçe arılarda BQCV'nin ovaryumda tespit edilmesi yumurtlama yoluyla da bulaşabileceği göstermektedir. Yapılan araştırmalarda etmen aynı zamanda dışkıda ve bağırsaklarda da belirlenmiştir (Chen et al. 2006a; 2006b).

N. apis ile enfekteli kolonilerde BQCV daha çok görülmesinden dolayı yapılan çalışmalarda BQCV'ün *N.apis* ile daha çok ilişkili olduğu ve diğer kolonilere geçiş yolağı oluşturabileceği rapor edilmiştir (Chen and Siede 2007). Ayrıca BQCV viral genomu arıların yanısıra balda da tespit edilmiştir (Milićević et al. 2018).

2.4. Akut Arı Felç Virüsü(*Acut bee paralysis virus*; ABPV)

2.4.1. Genel Özellikler

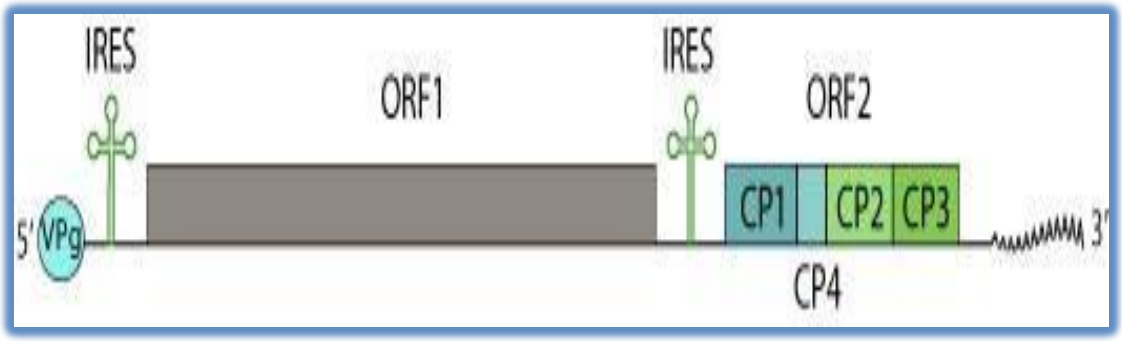
İlk kez 1963 yılında ergin bal arılarında yapılan çalışma sırasında ABPV simptom göstermeyen bir hastalık olarak teşhis edilmiştir. İnfekteli bal arılarında gözlemlenen felç ve titreme gibi belirtilerin nedeninin araştırılması esnasında CBPV ile ilişkili olarak teşhis edilmiştir. ABPV ile enfekteli bal arılarının, CBPV ile enfekteli bal arılarına oranla daha kısa sürede öldüğü görülmüştür. ABPV enfekteli arılar 2-3 gün boyunca titreme ve felç belirtileri gösterdikten sonra öldüğü tespit edilmiştir (Bailey et al. 1963).

ABPV'nin bal arılarının tüm dönemlerinde zararlı olacağını, ancak virüs çoğalması için en uygun dönemin pupa dönemi olduğunu tespit etmişlerdir. ABPV ile enfekte arıların dışkısında ABPV gibi başka birçok virüs tespit edilmiştir (Sanpa and Chantawannakul 2009; Bailey and Gibbs 1964). Bu etmen bal arılarının hem ergin arılarda hem de larva döneminde hasara yol açan etmen genellikle ergin arılarda ve yaz aylarında görülmektedir (Allen and Ball 1996; Maramorosch and Shatkin 2007).

ABPV patojeni her ne kadar arıların tüm vücudunda yer alsa da yapılan serolojik testler virüsün özellikle beyin ve hipofarengeal bezlerden izole edildiğini göstermektedir (Bailey and Milne 1969).

2.4.2. ABPV Virüsünün Genom Organizasyonu

ABPV *Dicistroviridae* familyasında yer alır (De Miranda et al. 2010). Dicistroviridae familyasının tipik özellikleri taşıyan viral etmen ssRNA(+) genomuna sahiptir. Genomda iki ORF (açık okuma bölgesi) yer alır ve aralarında bir IRES (Ribozom giriş bölgesi) bulunur. 5' ucunda bulunan ORF1 bölgesi Non-structural protein (ORF1) yapısal olmayan genleri içerir ve 3' ucunda yer alan ORF2 ise yapısal olan structual protein genlerini kapsar (Govan et al. 2000; Maori et al. 2007b).



Şekil 2.5. ABPV'ye ait genom organizasyonu

2.4.3. ABPV'nin Taşınması

İnfeksiyonun yayılmasında arı kolonisinin farklı sınıflarına ait bireylerinin (erkek, işçi arı) yanısıra bal arısının her gelişim döneminde (yumurta, larva, pupa, ergin) ABPV rastlandığı bildirilmiştir (de Miranda et al. 2013). ABPV, yetişkin arıların tükürük bezi salgıları yoluyla ve bu salgıların bulaştığı besin maddeleri ile kovan içerisinde yayılır (Ball 1985). ABPV etmeninin yayılmasında ve varlığında *V. destructor* etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Tentcheva et al. 2004; Kevan et al. 2006).

Amerika ve Avrupa'daki çoğu koloninin sönmesinde ABPV'nin Varroa ile birlikte infeksiyona enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir (Antúnez et al. 2006; Berényi et al. 2006). Arı kolonilerinde ABPV etmenin bulunduğu fakat kolonide Varroa'nın tespit edilmediği kolonilerde bu etmenin görülmüş olması, etmenin çoğalmasını tetikleyen başka faktörlerin de olabileceğini göstermektedir. Ayrıca etmenin spermada saptanması hastalığın genital yolla da bulaşabileceğini göstermektedir (Yue et al. 2006).

2.4.4. ABPV'nin Oluşturduğu Simptomlar

Saflaştırılmış akut arı felç virüsünün arılara inokule edilmesi sırasında hayvanların ölmeden 5-7 gün önce titremeye başladığı ve uçamadıkları gözlenmiştir. Böylece ekstrakttaki virüs akut arı felç virüsü olarak tanımlanmıştır. ABPV hem larva hem de erişkin arılarda infeksiyon oluşturabilmesine karşın hastalık genellikle erişkin arılarda ve yaz aylarında ortaya çıkmaktadır. Enfekte erişkin arıların tükürük bezlerindeki etkenin larvalara beslenme sırasında geçtiği düşünülmektedir. Larvalar, enfekteli erişkin arılara dönüşebilirler fakat içerdikleri çok miktarda virüs partikülü kısa sürede ölüm gerçekleşir (Maramorosch and Shatkin 2007).

ABPV' nin yetişkin arılardaki tipik simptomları; titreme, uçamama, göğüs ve karın gölgesinde koyulaşma, tüylerin dökülmesi (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7) sonucu parlak bir görünüm dâhil olmak üzere hızla ilerleyen bir felç etkisiyle yetişkin arıların ani ölümü ile karakterize edilmiştir (Ribière et al. 2008; De Miranda et al. 2010a).



Şekil 2.6. ABPV ile enfekteli işçi arılar



Şekil 2.7. ABPV enfekteli ana arı (Mavi ok)

2.5. Türkiye'de Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Ülkemiz iklimi ve topoğrafik yapısıyla arıcılık için önemli bir potansiyeldir. Ülkemiz arı ve arı ürünleri bakımından önemli bir ticari potansiyele sahip olmasına rağmen bal verimi konusunda dünya ortalamasının altındadır. Bal arısı kolonisinde arı hastalık, zararlı ve virüs enfeksiyonlarının ekonomik açıdan önem arz eden bu tehdit unsurlarına ile ilgili yapılan çalışmalar yeterli değildir. Ülkemizde hangi bölgede hangi arı virüsünün varlığı yapılan birkaç çalışma dışında detaylı olarak bilinmemektedir. Türkiyede arı yetiştiriciliği yapılan yerlerde tespit edilen sınırlı sayıdaki virüs enfeksiyonları özet halinde aşağıda verilmiştir.

BQCV virüsü, Türkiye'de (Gümüşova vd. 2010; Oğuz vd. 2017; Karapınar vd. 2018; Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2019; Kalaycı vd. 2020;) tarafından belirli bölgelerde tespit etmişlerdir. Gümüşova vd. (2010), Doğu Karadeniz bölgesinde (Sinop, Samsun, Amasya, Giresun, Trabzon, Rize) illerinde yürüttükleri çalışmada BQCV'ye özgü 700 bp ve Structural polyprotein gen bölgesi çoğaltılarak %21,42 oranında enfeksiyon tespit etmişlerdir.

Oğuz vd. (2017), Van ilinde ki Nosema türlerinin yaygınlığının belirlenmesi amacıyla, Van ilinde yetiştirilen bal arılarında (*Apis mellifera*) siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV) ve tespit edilen izolatların moleküler özelliklerinin RT-PCR metodu belirlenmesini

amaçlandı. Bu amaçla, 2015 Nisan ve Mayıs aylarında Van iline ait 5 arılık lokasyonundaki 26 koloniden toplam 260 yetişkin işçi arı toplandı. Örnekler mikroskobik olarak incelendi ve pozitiflik durumu spor tanımlama ve multipleks PCR ile yapıldı. Mikroskobik incelemeler 26 koloninin 8'inde *Nosema spp.* (%32,5) sporlarının varlığını ortaya çıkardı. Multiplex PCR testleri ise toplanan tüm örneklerin *Nosema ceranae* bakımından pozitif olduğunu ortaya koyarken, *Nosema apis* hiçbir örnekte tespit edilemedi. Sonuç olarak, toplam 26 koloninin 23'ünde %88,52 oranında BQCV virüsü tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Karapınar vd. (2018), Van bölgesinde yürüttükleri çalışmada BQCV virüsüne structural poliprotein gen bölgesine ait 700 bp nükleotit dizisini moleküler olarak amplifiye ederek bu bölgedeki BQCV yaygınlığının %88,46'sında (23/26) oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), Hakkâri bölgesinde yürüttükleri çalışmada BQCV virüsüne ait kılıf protein (CP) gen bölgesine ait 567 bp nükleotit dizisini moleküler olarak amplifiye ederek bu bölgedeki BQCV yaygınlığının %16,6 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Kalaycı vd. (2020), Türkiye'deki arılıklarından koloni kaybı ile ilgili gelen şikâyetler üzerine 2016-2018 yıllarında Adana, Aydın, Bursa, Izmir, Kütahya, Muğla ve Manisa illerinde toplamda 76 arılıktan 2280 örneği BQCV virüsüne karşı test ettiler. Koloni kaybı yaşanan arılıklarda bu virüsün polyprotein genine özgü 532 bp gen kısmı çoğaltılmış ve %28,9 oranında BQCV pozitif sonuç elde edilmiştir. Usta vd. (2020), Burdur bölgesinde yürüttükleri çalışmada BQCV'ye özgü 514 bp uzunluğundaki bölgeyi RT-PCR yöntemi ile çoğaltarak %25,81 oranında infeksiyon tespit etmişlerdir.

SBV virüsünün Türkiye'deki varlığı Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), Cagırgan vd. (2020) ve Kalaycı vd. (2019, 2020) tarafından yaptıkları sürveyler ile araştırılmıştır. Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), Hakkari bölgesinde gerçekleştirdikleri çalışmada SBV yaygınlığını virüs kılıf proteinine spesifik 429 bp uzunluğundaki bölgeyi hedef alarak araştırmışlar ve bu bölgedeki infeksiyon oranını %12,2 oranında tespit etmişilerdir. Diğer bir çalışmada, Cagırgan vd. (2020), Burdur bölgesinde polyprotein genine ait 342 bp nükleotit dizisini çoğaltarak SBV infeksiyon oranını %33,3 olarak hesaplamışlardır.

Muğla bölgesinde yürütülen başka bir çalışmada, Kalaycı vd. (2019), etmenin 342 bp büyüklüğündeki polyprotein genini amplifiye ederek bu bölgedeki SBV varlığını ortaya

Koymuşlardır. Kalaycı vd. (2020), Adana, Aydın, Bursa, İzmir, Kütahya, Muğla ve Manisa bölgelerinde gerçekleştirdikleri çalışmada SBV virüsünün polyprotein genine ait 342 bp uzunluğundaki bölgeyi çoğaltarak bu bölgedeki SBV infeksiyonunu %22,3 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016), Hakkâri ili arılıklarında yaptıkları sürveylerde ABPV'nin Türkiye'deki varlığını %2,2 yaygınlık oranıyla ilk kez bu çalışma ile ortaya koymuşlardır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yürütülen çalışmalarda ABPV tespit edilmemesi veya düşük oranlarda tespit edilmesi ABPV'nin Türkiye'deki varlığının düşük seviyelerde olduğu göstermektedir.

Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016), Hakkâri ilinde 2014 yılı Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında 90 arılıktan yapılan sürvey çalışmasında Akut arı paraliz virüsünün yaygınlığı ve varlığı araştırılmıştır. RT-PCR metodu ile yapılan bu çalışmada, 90 arılığın sadece ikisinde ABPV infeksiyonu görülmüş ve virüsün Hakkâri ili bal arısı kolonilerinde yaygın bir virüs olmadığı belirlenmiştir. Tespiti yapılan ABPV'nin dünyada tanınan diğer ırklar ve izolatlar ile olan genetik benzerliğini araştırmak için viral genomundan çoğaltılmış fragmentlerin moleküler klonlaması yapılmış ve mevcut DNA nükleotit dizisinin Gen bankasında kayıtlı olan dünyadaki diğer izolatlar ile %85 ile 97 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Kalayci vd. (2020), Adana, Aydın, Bursa, İzmir, Kütahya, Muğla ve Manisa illerinde 2016-2018 yılları arasında 2280 örnek üzerinde gerçekleştirdiği araştırmada en yaygın bal arısı virüsünün DWV (%44,7) ve ardından da (%35,5) ABPV'nin olduğunu tespit etmişlerdir. Koloni sönmesi görülen arılıklarda aynı zamanda CBPV ve IAPV yaygınlığı ise sırasıyla %18,4 ve %6,5 olarak tespit edilmiştir. Yapılan parazitolojik incelemelerde 10 arılıkta Nosema belirlenirken, 21 arılıkta ise Varroa tespit edilmiştir. Belirlenen yedi arılıkta ise hem Varroa hem de Nosema tespit edilmiştir. Bazı kovanlarda ikili, üçlü ve dörtlü karışık infeksiyonlar da yer almıştır. Sonuç olarak, koloni kayıplarına neden açabilecek birçok faktör bulunmaktadır ama öncelikle virüsler ve bunların neden olduğu çoklu infeksiyonların çöken kolonilerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Usta vd. (2020), Burdur ili arılıklarında yaptıkları sürveylerde ABPV virüsüne ait 900 bp uzunluğundaki bölgeyi RT-PCR yöntemi ile çoğaltarak bu bölgedeki infeksiyon oranının %74,19 olduğunu tespit etmişlerdir.

2.6. Dünyada Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

SBV virüsünün dünyadaki yaygınlığı ABD (Chen et al. 2004c; Chen et al. 2006a; Welch et al. 2009), Uruguay (Antunez et al. 2006), Brezilya (Freiberg et al. 2012), Güney Afrika (Grabensteiner et al. 2001), Arjantin (Reynaldi et al. 2010, 2013), Hindistan, Almanya, Avusturya, Nepal (Berenyi et al. 2006; Grabensteiner et al. 2007),), İngiltere (Baker and Schroeder 2008), İspanya (Antunez et al. 2012), Ürdün (Haddad et al. 2008), Yunanistan (Bacandritsos et al. 2010), Danimarka (Nielsen et al. 2008) ve Kuzey Tayland (Sanpa and Chantawannakul 2009) gibi birçok ülkede rapor edilmiştir.

BQCV virüsü dünya genelinde Güney Afrika (Leat et al. 2000; Benjeddou et al. 2002), Fransa (Tentcheva et al. 2004), Uruguay (Antunez et al. 2006), Avusturya (Berenyi et al. 2006; Grabensteiner et al. 2007), Brezilya (Teixeira et al. 2008), İspanya (Higes et al. 2007; Antunez et al. 2012), İngiltere (Baker and Schroeder 2008), Danimarka (Nielsen et al. 2008), Kuzey Tayland (Sanpa and Chantawannakul 2009), Yunanistan (Bacandritsos et al. 2010), Arjantin (Reynaldi et al. 2010, 2013), Çin (Li Zhigou et al. 2016), ABD (Chen et al. 2004c; Welch et al. 2009; Zhang et al. 2012), Suriye (Kubaa et al. 2018), Sırbistan (Milićević et al. 2018) ve Meksika (Guzman-Novoa et al. 2013)'da tespit edilmiş olup bazı çalışmalarda yüksek oranda arı ölümlerine sebep olduğu ortaya koyulmuştur.

Bal arısı virüslerinin (BQCV, DWV, VdMLV ve AmFV) ve *Nosema spp*. parazitinin dağılımının belirlenmesi amacıyla, Suriye (Şam)'de koloni kayıpları, deforme olmuş kanatlar ve rengi siyahlaşmış arıların bulunduğu beş bal arısı kolonisinden toplanan 96 bal arısı örneği PCR yöntemi ile testlendi. Örneklerde Siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV) %29,2 oranında tespit edilirken aynı örnekte iki, üç ve dört virüsün bir arada olduğu eşzamanlı infeksiyonlar bulundu. Saptanan patojenlerin filogenetik analizleri, dünya çapında tespit edilmiş diğer izolatlar ile yüksek nükleotid benzerliği gösterdi. Bu çalışma, Suriye'de infeksiyon şüphesi olan *A. mellifera* kolonilerinde BQCV, DWV, VdMLV, AmFV ve *N. ceranae*'nin varlığını ve moleküler karakterizasyonunu rapor eden ilk çalışmadır (Kubaa et al. 2018).

Sırbistan'da yapılan başka bir çalışmada, bal arısı virüslerinden BQCV ve Kashmir bee virus (KBV) virüsünü araştırmak amacıyla canlı ve ölü arıların yanısıra dört arı

kovanından alınan bal dâhil olmak üzere 40 numune test edilmiş ve 24 yerli bal örneğinde BQCV etmenine rastlanırken 1 ithal bal örneğinde KBV virüsünün genomuna rastlanmıştır. Tespit edilen 24 BQCV izolatının polyprotein genindeki nükleotid sekansları, Avrupa arıları ile en yüksek oranda benzerlik (%86,4) gösterirken, Sırp izolatları birbirleri arasında %98,5 benzerlik gösterdi. Farklı tipteki örnekler karşılaştırıldığında, dört arı kovanından üçünde BQCV genomu hem arılarda hem de balda tespit edildi. Balın, aynı kovandaki canlı, ölü arı ve balın aynı anda test edilmesiyle viral hastalığın tespiti için başarıyla kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Milićević et al. 2018).

Reynaldi et al. (2013), Arjantinin Buenos Aires eyaletinde yaptıkları araştırmada *Bombus atratus* arılarında BQCV, SBV ve DWV viral etmenlerinin varlığını incelemişlerdir. Bu amaçla koloni kaybı olan bölgelerden örnekler alınıp multipleks PCR metodu ile testlenmiştir. Analiz edilen tüm numuneler üç virüs bakımından da pozitif sonuçlar vermiştir. Çinin Fujian şehrinde yürütülen ilginç bir çalışmada, Li et al. (2016) Buffalo Kurdu (*Alphitobius diaperinus*) böceğinde BQCV virüsünü tespit etmişlerdir.

Dünya çapında ABPV virüsü hemen hemen her kıtadaki varlığı rapor edilmiştir. Uruguay'da %9 (Antunez et al. 2006), Fransa'da %58 (Tentcheva et al. 2004), Kuzey Tayland'da %20 (Sanpa and Chantawannakul 2009), İngiltere'de %29 (Baker and Schroeder 2008), Avusturya'da %68 (Berenyi et al. 2006), Ürdün'de %16 (Haddad et al. 2008), Brezilya'da %27,1 (Weinstein-Teixeira et al. 2008), Macaristanda %12,2 (Bakonyi et al. 2002a, 2002b) ve Danimarka'da %11 (Nielsen et al. 2008) oranlarında tespit edilmiştir.

Bakonyi et al. (2002a, 2002b), Macaristan bal arısı kolonileri üzerinde yaptıkları araştırmada, sağlıklı görünen toplam 114 koloni örneğinden 14'ünde ABPV virüsünün varlığını tespit ettiler. Arı kovanlarının üçte ikisinin %12,2 infeksiyon oranında ABPV ile enfekte olduğunu belirlendi. Araştırılan diğer sekiz arı kovanından yedisinde ani bir koloni çöküşünün ardından %87,5 oranında virüsün varlığı tespit edildi. Ayrıca bu kolonilerin *Nosema apis* veya *Varroa* akarı ile infekteli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen ABPV izolatının GeneBank veri tabanında depolanan ABPV sekanslarıyla %93 oranında benzerlik gösterdiği ortaya çıktı.

Azzami et al. (2012), Almanya'da yürüttükleri çalışmada bal arılarının farklı yaşam evrelerinin ABPV virüsü ile kontrollü infeksiyonları sağlanarak bireylerin verdikleri tepkiler araştırıldı. Yetişkin arılara, ABPV virüsüne ait 10^2 partikül enjekte edilmiş ve ergin bireylerin herhangi bir belirti göstermeden 96 saatten fazla yaşadığı görülürken, 10^3 ile 10^4 miktarlarda ABPV virüs partikülü enjekte edilen ergin bireylerin ise doz artışına bağlı olarak yüksek oranda viral belirtiler gösterdiği ve 72 saat içinde öldükleri saptanmıştır. Larva dönemindeki bireylerde ise 10^2 partikül ABPV virüs enjekte edilmiş ve larvaların yarısı 24 saate ölürken, 10^3 partikül enjekte edilmiş larvaların tamamı öldüğü görülmüştür.

Tentcheva et al. (2004), Fransa'da 2002 yılı boyunca ilkbahar, yaz ve sonbaharda PCR tekniği kullanarak yaptıkları araştırmada, görünüşte sağlıklı arı kolonilerinde ve geniş bir coğrafi ölçekte 36 arı kovanından yetişkin arı ve pupa örnekleri toplayarak altı arı virüsüyle ilgili kapsamlı bir araştırma yaptılar. Yetişkin arı bulunan kovanların %97'sinde DWV, %86'sında SBV,%28'inde CBPV, %58'inde ABPV, %86'sında BQCV ve %17'sinde KBV virüsleri belirlendi. Kovandaki pupalar için ise aşağıdaki değerler tespit edildi: DWV, arı kovanlarının %94'ünde, SBV %80'inde, ABPV %23'ünde, BQCV %23'ünde ve KBV %6'sında tespit edildi. CBPV arı kovanlarının hiçbirinde belirlenemedi. Varroa istilası olan kovanlarda ise DWV; arı kovanlarının %100'ünde, SBV %45'inde, ABPV %36'sında ve KBV ise %5'i tespit edildi. Yukarıdaki bulgular Varroa akarının bu virüslerin kritik bir taşıyıcısı olduğunu desteklemektedir. Bu viral infeksiyonların şiddeti akar istilası, bakteriyel infeksiyonlar, tarımda kullanılan kimyasallar ve çevre kirliliği gibi arılar üzerinde stres oluşturan faktörler nedeniyle daha da yıkıcı olabilir.

Grabensteiner et al. (2007) tarafından Avusturya bal arısı kolonilerinden toplanan arı numuneleri üzerinde Multipleks RT-PCR testi kullanılarak test yapılmıştır. Çalışmada bal arıları kolonilerinde üç virüs (ABPV, BQCV ve SBV) de tespit edilmiştir. Allen and Ball (1996) ve Maramorosch and Shatkin (2007), ABPV virüsünü Bombus arıları ve kraliçe arılarında tespit etmiştir. Bu çalışma, ABPV virüsünün arı virüsleri içerisinde kendi doğal konukçusu haricinde başka bir konukçuda da tespit edildiğini gösteren önemli bir çalışmadır.

2.7. Arı Virüsleri ile Mücadele ve Kontrol

Bal arısı virüslerinin bulaşması ana arı kaynaklı, yağmacılık, steril olmayan alet ekipmanların kullanımı ve arı ürünlerinin kovanlar arasında değişim yapılması nedeniyle olabilmektedir. Ayrıca kolonilerde ya da arılıklarda yoğun gerçekleşen hastalık ve parazitler de koloni çöküşlerine neden olmaktadır. Bal arılardaki viral hastalıklar, bağışıklık sistemini zayıflatabilir veya stres seviyelerini bir koloninin virüsle baş edemeyecekleri bir noktaya kadar yükseltebilir. Bal arısı virüslerinin tekrar tekrar ortaya çıkması, viral hastalıkların akar istilası ile ilişkili olduğundan, *V. destructor*'a karşı sürdürülebilecek etkili bir tedavi metodu viral hastalıklarla baş etmenin en iyi yoludur. Günümüzde varroa ile mücadelede birçok organik ve sentetik madde, biyoteknik ve biyolojik mücadele aktif olarak kullanılmakta ve yeni çözüm arayışı devam etmektedir (Chen 2011).

Bal arısı kovanlarında sürdürülen parazit mücadelesi hem arının var olan direncinin arttırılması hem de parazitlerle bulaşan virüs hastalıklarının bulaşma gücünün kırılması açısından son ederece önemlidir (Usta ve Yıldırım 2020). Aynı zamanda virüslere karşı dayanıklı arı hatlarının tespit edilmesi ve kullanılması, yoğun miktarda hastalık görülen bölgelerde, klinik belirti gösteren kolonilerdeki kraliçe arının sağlıklı kolonilerden elde edilen bir kraliçe arı ile değiştirilmesi hastalığın ortadan kalkmasına fayda sağlar. Arıların gelişim evreleri ve hayati fonksiyonlarının sağlıklı sürdürülebilmesi için polen ve nektar önemlidir. Bu açıdan polen diyetlerinin kalitesi ve çeşitliliği de arı beslenmesi açısından önem arz etmektedir (Di Pasquale et al. 2013).

Virüs hastalıkları ile mücadelenin en etkili yolu kovanların bakımlarının iyi ve zamanında yapılması, kovanların güçlü tutulması, bakımdan önce alet ekipmanların steril olması, kovanların yerden yaklaşık 50 cm yükseğe konularak nemden uzak tutulması, kovanların güneş görecek şekilde ve rüzgara kapalı alanların tercih edilmesi ve bulaşık kovanlardan petek, bal, çıta gibi ürünlerin kovanlar arasında değiştirilmemesi virüsün enfeksiyonuna neden olan patojenler ile mücadelede önemli hususlardır. Varroa, nosema ve diğer hastalıklar ile yapılan mücadele sayesinde aynı zamanda arı virüsleri ile de mücadele edildiği unutulmamalıdır.

Bal arısında ortaya çıkan virüs hastalıklarıyla mücadelede en umut verici gelişmelerden biri, bitkiler ve hayvanlar gibi gerçek dokusu olan ökaryot hücrelerde bulunan gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesidir. Bu yöntemde gen susturma yolundan yararlanmak için küçük enterferans yapan RNA'yı (small interfering RNA, siRNA) kullanan RNAi (RNA interference) yaklaşımıdır. Elbette birçok virüs, siRNA tarafından kontrol edilen bu sistemden kurtulmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Ancak laboratuvar koşullarında yürütülen bir çalışmada, IAPV'ye yönelik RNAi yaklaşımının, bal arısındaki IAPV (*Israel acut paralysis virus*) enfeksiyonunu susturmada ve önlemede başarılı olduğunu gösterilmiştir (Glover et al. 2011). Bununla birlikte, bu yeni tekniğin başarısı, siRNA'nın tüm enfekteli organlara hedeflenmesinin mümkün olup olmayacağına ve taşıma sırasında siRNA'nın bozulmasının önlenmesine bağlı olacaktır. Öte yandan, bu başarı aynı zamanda viral nükleik asitlerin arılara verilmesinin hassas arıcılık endüstrisi ve bal içindeki muhtemel herhangi bir nükleik asit kontaminasyonundan korkan tüketici tarafından kabul görüp görmeyeceğine de bağlı olacaktır. Ayrıca bu yeni teknolojinin maliyeti düşünüldüğünde arıcılar için çok uygun olabileceği söylenemez.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sürvey Alanı

Bu çalışma, 2020 yılı Nisan-Eylül ayları arasında bal arılarısı yetiştiriciliği yapılan Bingöl ili Merkez, Genç, Karlıova, Solhan, Adaklı, Yayladere, Yedisu ve Kiğı ilçe ve köylerinde yürütülmüştür (Şekil 3. 1).



Şekil 3.1. Bingöl ilinde sürvey yapılan ilçelerin haritası

Bal arılarının yetiştirildiği kovan sayısına bağlı olarak ilçeleri temsil edecek şekilde her arılıktan 3 tane canlı işçi arı olmak üzere totalde 128 arılıktan 384 örnek toplanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Survey yapılan il merkezi ve ilçelerdeki işletme, kovan ve toplanan örnek sayıları

İl/İlçe	Toplam işletme sayısı	Toplam kovan sayısı	İncelenen arılık sayısı	Toplanan örnek sayısı
Merkez	316	54,702	44	132
Solhan	78	18,033	19	57
Genç	81	19,542	17	51
Adaklı	39	5,337	12	36
Karlıova	66	12,800	10	30
Kiğı	78	12,197	11	33
Yayladere	22	5,660	4	12
Yedisu	35	3,519	11	33
Toplam	**715**	**13,1790**	**128**	**384**

Örnekleme yapılırken kovan etrafında sürünen, ayrık kanatlara sahip ya da kanat deformasyonu gibi anormal morfoloji sergileyen arıların yanısıra simptom göstermeyen arılardan da örnekleme yapılmıştır. Toplanılan canlı işçi arı örnekleri delinmiş plastik pet şişelere konularak laboratuvara getirilmiş, polietilen poşetlerde hızlı bir şekilde numaralandırılması yapılarak tasnif edilmiş ve moleküler çalışmalar başlayıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. A) İşçi arı örneklerin rastgele toplanması B) Toplanan canlı işçi arı örneklerinin laboratuvar ortamına canlı olarak taşınması C) Araziden toplanmış örneklerin -80°C'de muhafaza edilmesi

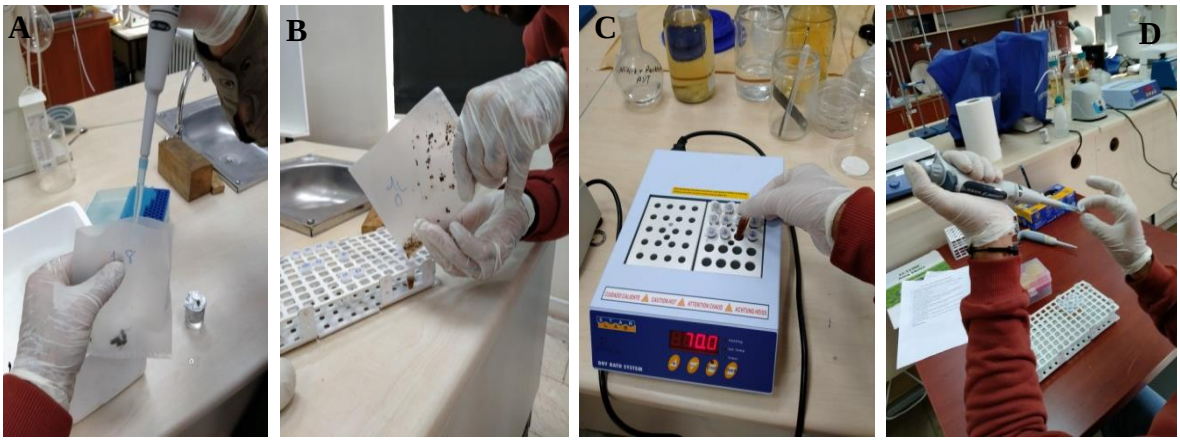
3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Test Çalışmaları

Toplanan işçi arı örneklerinin ABPV, BQCV ve SBV virüsleri için teşhisleri total RNA Ekstraksiyonu (TNA), tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1 Total RNA (TNA) Ekstraksiyonu

Araştırılan virüslerin tamamı (+) ssRNA virüsleri oldukları için toplanan işçi arı örneklerine TNA Eksraksiyonu (Foissac et al. 2001) yöntemine göre uygulanmıştır. Yapılan bu çalışma yönteminde her arılığı temsilen üç adet işçi arı örneği, 1 ml ezme tamponu (Ek 1.1) ve 10 µl ß-mercaptoetanol ile polietilen poşet içeresinde ezilerek homojen hale getirilmiştir. Bu ekstraktan 500 µl alınarak 1,5 ml tüpelere aktarılarak üzerine 100 µl %10 sarcosyl solüsyonu ilave edildi. Tüpler ara sıra ters düz yapmak koşulu ile 10 dakika 70°C de inkube edilmiş ve daha sonra 5 dk buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 10 dakika 14.000 rpm'de santifrüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstte biriken sıvı fazın 500 µl'sini boş steril olan 1,5 ml tüpe aktarılmış ve üzerine 150 µl etanol, 35 µl silika (Ek 1.3) ve 300 µl 6M NaI (Ek 1.2) ilave edilmiştir. Sallayıcı (shaker) üzerinde 10 dk inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılmış ve 500 µl yıkama tamponu ile pelletler 2 tekrar yapılarak temiz RNA elde etmek için yıkama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. A) Grinding buffer ve ß-mercaptoetanol eklenmesi B) Ezilen işçi arı örneklerinin 1,5 ml tüplere aktarılması C) 100 µl %10 Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu eklenen örneklerin 70 °C de 10 dk inkübe edilmesi D) Santifrüj sonrası elde edilen üst fazın 500 µl' sinin yeni tüplere aktarılması

Altta biriken pelletlere 100 µl RNase-free su eklenerek iyice eriyinceye kadar vortekslenip çözdürülmüştür. Daha sonra 70 °C'de 4 dk thermo blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Tüpler 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni tüplerine aktarılmıştır. Böylece elde edilen yaklaşık 100 µl total RNA'lar, cDNA yapılıncaya kadar –20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Spesifik Primer Dizaynı

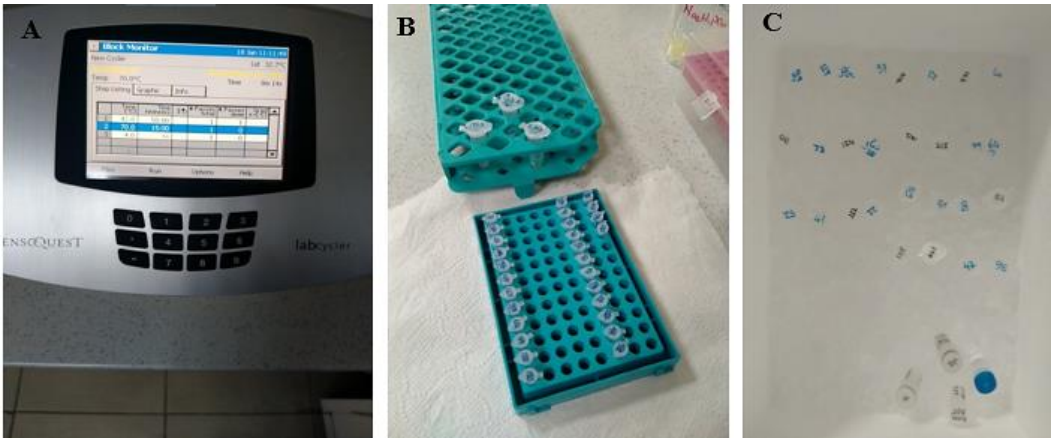
Bingöl ili bal arısı virüslerinin varlığını ve infeksiyon oranlarını tespit etmek için spesifik primer dizileri kullanılmıştır (Tablo 3.2). Primerler, NCBI gen bankasında yer alan referans dizilerin erişim numaraları temel alınarak oluşturulmuştur. Buna göre BQCV için AF183905, SBV için AF092924 ve ABPV için AF150629 erişim numaraları referans alınmıştır. Primer sentezi (Sentebiolab, Ankara) firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.2 Virüslerin teşhisinde kullanılan primer çiftleri

Virüs	Kullanılan primerler (5'→3')	Baz çifti	Gen bölgesi	Kaynak
BQCV	F- TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC R-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	700 bç	Structural Polyprotein geni	Benjeddou et al. 2001
SBV	F-CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATT R-AGATTCCTTCGAGGGTACCTCATC	342 bç	Polyprotein geni	Sguazza et al. 2013
ABPV	F-TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA R-GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT	900 bç	CP	Benjeddou et al. 2001

3.2.1.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

Tamamlayıcı DNA sentezi, cDNA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nükleaz-free tüpe içeeisine bir örnek için tasarlanmış random primerden 1 µl, 3 µl total RNA, 1 µl dNTP karışımı eklenmiştir. RNAase free su ile 12 µl'ye tamamlanarak karışım köpürtülmeden vortekslendi. Karışım 65 °C 5 dakika PCR cihazında inkübe edildikten sonra buza daldırılarak soğutuldu (Şekil 3. 4). Soğutma işlemi sonrası hazırlanan bu karışım (4 µl 5X RT Reaksiyon buffer, 2 µl 0.1M DTT ve 1 µl RT enzimi eklenerek) 20 µl ye tamamlandı. Tüpler kısa bir vorteksleme işleminden sonra, PCR cihazında 42°C' de 50 dakika inkübe edilerek transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra PCR cihazında 15 dk ve 70°C de bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Kullanıma hazır olan cDNA' lar PCR işlemi yapılıncaya kadar -20 °C de muhafaza edildi.



Şekil 3.4. A) cDNA sentezi aşaması B) Örneklerin numaralandırılması C) PCR sonrası örneklerin buzda inkübe edilmesi

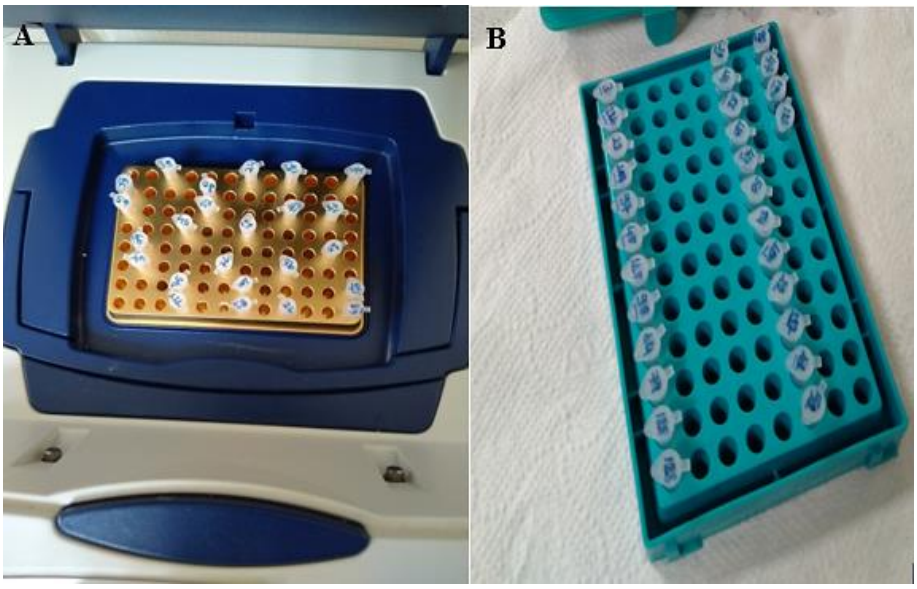
3.2.1.4. RT-PCR ile Virüslerin Araştırılması

RT-PCR ile işçi arı virüslerinin teşhisi için steril PCR tüpüne aşağıdaki bileşenler konulmuştur; 18.3 µl RNAse free su, 2.5 µl 10X PCR tampon solüsyonu, spesifik olarak tasarlanan 0.5 µl ileri primer ve 0.5 µl geri primer,1.5 µl 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 µl 10 mM dNTPs ve 0.2 µl *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve 3 µl cDNA eklenerek hazırlandı (Şekil 3.5). PCR tüplerine hazırlanan karışımdan 24 µl eklendi ve daha sonra 1 µl cDNA'dan eklenerek tüpler 2-3 sn vortesklenmiştir. Bu çalışmaya özgü tasarlanan primerlerin cDNA uzunlukları dikkate alınarak bağlanma sıcaklıkları ve her virüse ait sıcaklık döngüsü oluşturulmuştur (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Bu çalışmada test edilen virüslerin teşhisi için kullanılan RT-PCR döngüleri

Virüsler	Sıcaklık döngüleri
BQCV **ABPV**	94°C 2dk 94°C 30sn 55°C 1dk 68°C 2dk (40 döngü) 72°C 5dk
SBV	94 °C 2dk 94°C 20sn 56°C 30sn 68°C 30sn (40 döngü) 72°C 5dk

Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek virüslerin istenilen bölgelerinin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. A) Örneklerin PCR cihazına yerleştirilmesi B) cDNA'nın PCR karışımına eklenmesi

3.2.1.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Boyama ve Görüntüleme

PCR işlemi ile çoğaltılan DNA fragmanları %1'lik agaroz jel'de elektroforez yapılarak görüntülenmiştir. Buna göre 1 g agaroz 100 ml 1X TAE (Ek 2.2) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürüldü. Soğutulan 1X karışımı jel tankına döküldü ve 5 µl EtBr eklenerek pipet ucu ile karışım içerisinde iyice eritilmiştir. Jelin katılaştıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin yüzeyini tamamen kapatacak şekilde 1X TAE tamponu tankın içerisine eklendi ve jelin üzerindeki tarak çıkarıldı.

Toplamda 25 µl olarak hazırlanan PCR ürününün 15µl ile 5 µl yükleme tamponunu homojen bir şekilde karıştırılarak jelin çukurlarına numaralandırılarak yüklenmiştir. İlk jel çukuruna 5 µl DNA Ladder yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra elektroforez tankı 110 V' luk elektrik akımı 50 dk koşturma işlemi yapılmıştır. Yüklenen örnekler elektroforez yöntemiyle koşulduktan sonra jel görüntüleme odasında görüntülendi ve pozitif bant içeren jeller fotoğraflandı (Şekil 3.6).

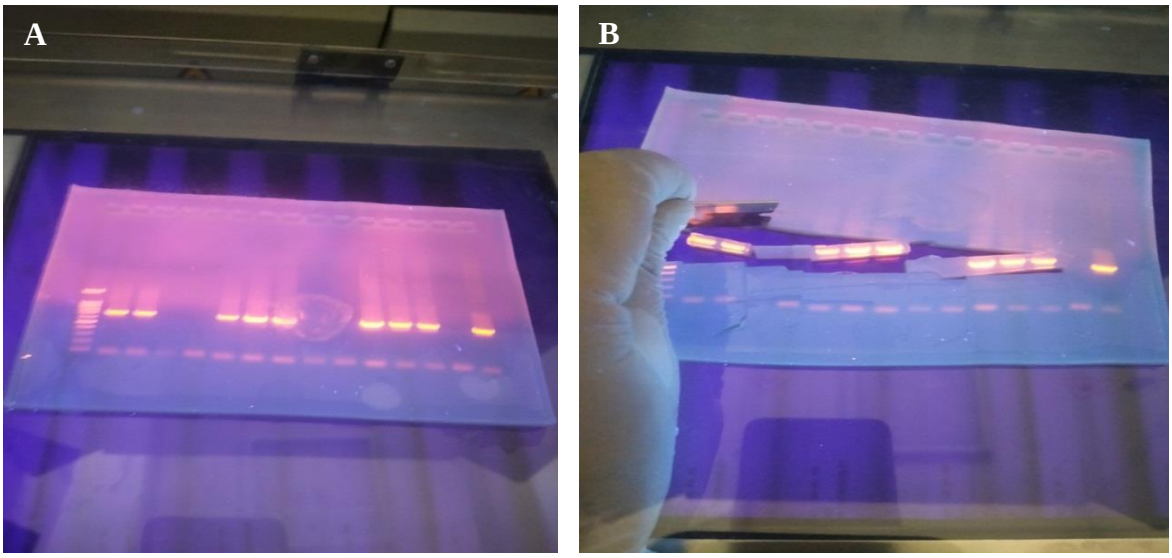
3.2.2. Klonlama Çalışmaları

3.2.2.1. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Kesimi ve Saflaştırılması

UV altında, çoğaltılmış olan DNA bantları kontrol edilerek steril bisturi ile kesim yapılarak çıkartılmıştır (Şekil 3.6). UV altında kesilen DNA bantları steril 2 ml eppendorf tüplerine konarak jel saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırma işlemi GeneJET kiti ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem kit protokolüne göre yapılmıştır.

Buna göre;

- ✓ UV altında DNA fragmanlarını steril bisturi ile en az jel kesilecek şekilde bantlara en ince kesim yapıldı ve 2 ml tüpüne yaklaşık 100 µl PCR ile çoğaltılmış DNA ürünü aktarılmıştır.



Şekil 3.6. A) Çoğalan DNA'ların ultraviole ışık altında görüntülenmesi B) DNA'ların kontrolü bir şekilde bistüri ile kesilmesi

- ✓ 2 ml tüplere konulan jel tartıldı ve aynı miktarda (1/1) oranında Binding Buffer ilave edilmiş ve 58 °C'de jelin tamamı çözünene kadar eritilmiştir.
- ✓ DNA fragmanlarını içern jelden iyice eritildikten sonra sıvının tamamı bitinceye kadar GeneJET kolonuna eklenip 13000 rpm de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda altta biriken sıvı faz atılmıştır.
- ✓ Sıvı faz boşaltılan toplama tüpüne 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 1dk santrifüj yapıldı. Bu aşamadan sonra tüp içerisindeki etanolü tamamen uzaklaştırmak için maksimum hızda 1 dk boş şekilde santrifüj yapıldı.

- ✓ Steril 1,5 ml lik yeni ependorf tüpüne yerleştirilen saflaştırma kolonun üzerine 20 µl Elution Buffer filtrenin membranın üzerine boşaltıldı ve maksimum hızda 1dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış DNA fragmanları ligasyon aşamasında kullanılmak üzere -20' °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. DNA'nın Plazmide Yerleştirilmesi (Ligasyon)

PCR yöntemiyle çoğaltılan DNA ürünü pGEM-T Easy plazmit vektörüne bağlanması aşaması T4 DNA ligaz enzimi ile yapılmıştır. Bu aşamada pGEM-T Easy vektörü kullanılmıştır. Plazmit, buffer, ligaz enzimi ve insert DNA dan oluşacak şekilde eppendorf tüpünde karışım hazırlandı (Tablo 3. 4). Daha sonra 4°C de 24saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda elde edilen rekombinant plazmitler transformasyon aşamasında kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3. 4. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları

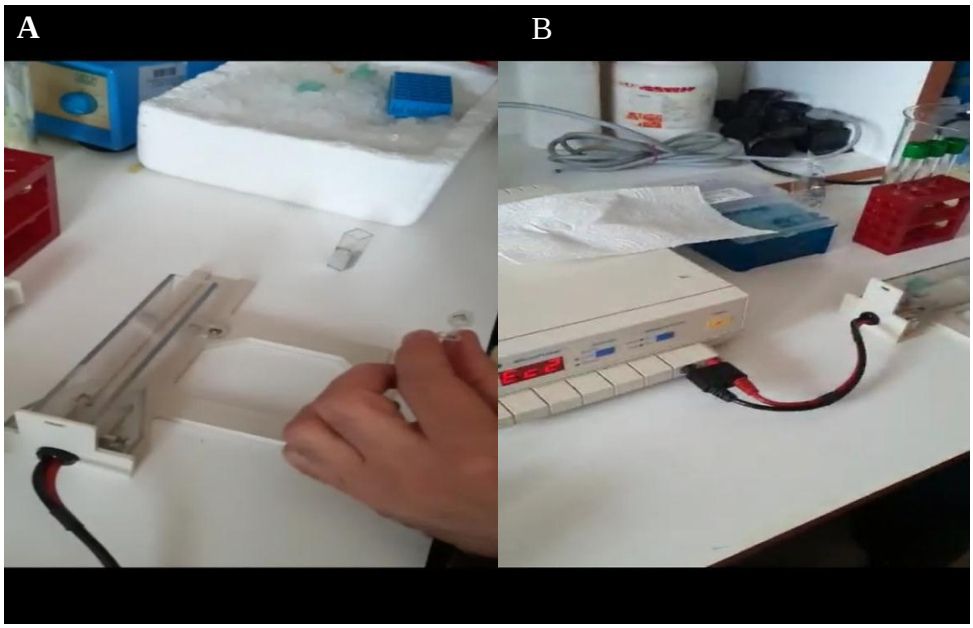
Ligasyon bileşenler	**Miktar**
pGEM-T Easy vektör	1 µl
2x Rapid ligation buffer	5 µl
DNA ligaz enzimi	1 µl
PCR ürünü DNA (insert)	5 µl

3.2.2.3. Plazmidin Bakteriye Aktarılması (Transformasyon)

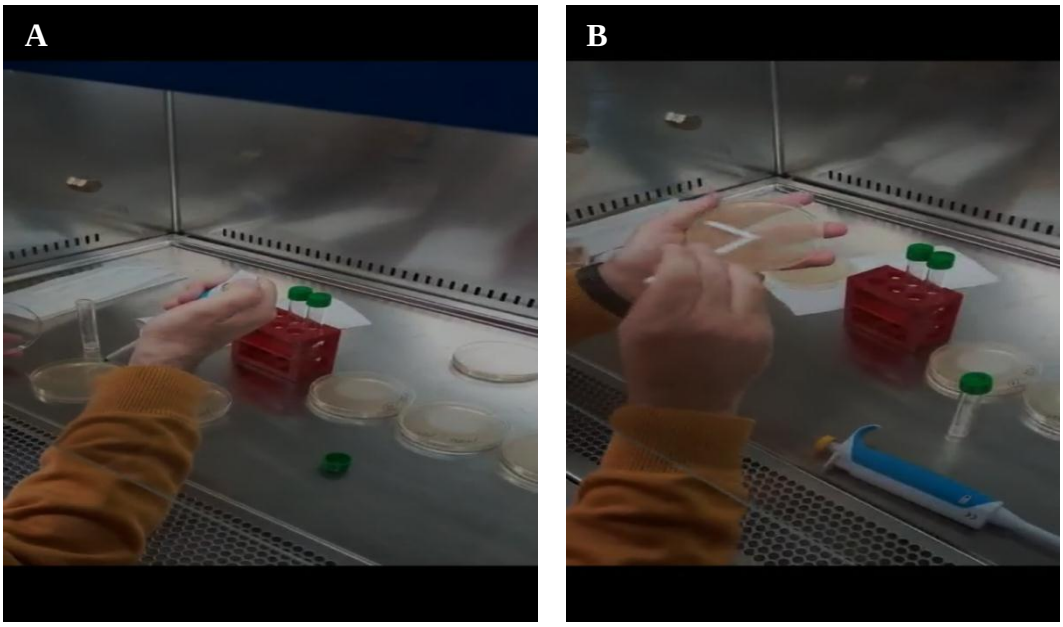
Plazmidin aktarılması amacıyla *E.coli* bakterisinin JM-109 suşuna elektroşok uygulaması ile transformasyon işlemi yapılmıştır. Bu aşamada, 100µl bakteri ile 5µl rekombinant plazmit karıştırıldı. Bu karışım daha önceden soğutulmuş küvetlere konularak elektrik akımı uygulaması Micro-pulser cihazı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Şok aşamasından sonra küvetteki bakteriler üzerine 900 µl SOC (Ek 3.3.3) solüsyonu eklendi ve bu karışım 2 sa boyunca 180 rpm de 37°C de sallayıcıda geliştirilmiştir.

Ayrıca, daha önceden hazırlanan ampisilin, X-GAL (Ek 3.3.1) ve IPTC (Ek 3.3.2) içeren LB petrilere 1 saat 37 °C inkubatörde ekime hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan petrilere bakteri süspansiyonundan 100 µl ve 300 µl olmak alınarak her bir numune için iki petri

olacak şekilde petrilerin yüzeylerine pipet ile ekim yapılmış ve drigaski çubuğu ile petri yüzeyine yayılması sağlanmıştır (Şekil 3.8). Petriler bir gece 37 °C'de ters çevrilip inkübasyona bırakılarak beyaz ve mavi koloniler geliştirilmiştir.



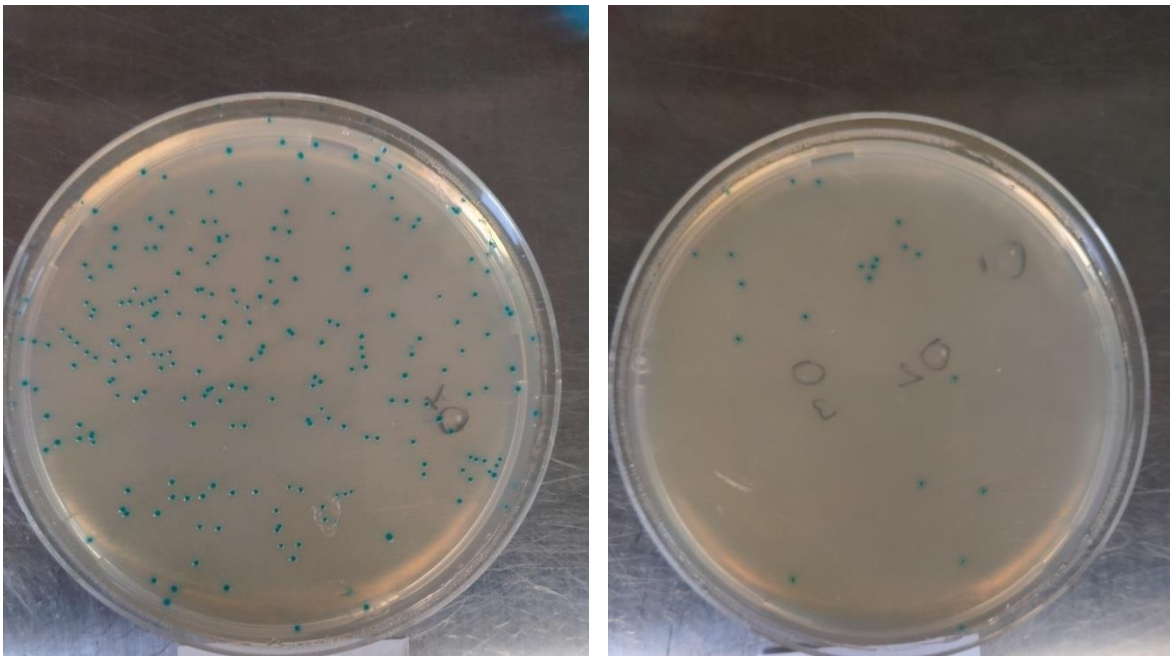
Şekil 3.7. A) Küvetlere Rekombinant plazmit ve bakteri karışımı eklenmesi B) Micropulser cihazı ile Ec2 programında elektrik akımının uygulanması



Şekil 3.8. A) Transformasyon sonrasında çalkalayıcı aletinde 180 rpm ve 2 saat 37 °C de çoğalan bakteri süspansiyonlarının petriye eklenmesi B) Ampsilin, X-gal ve IPTG içeren LB'nin drigaski çubuğu ile petriye yayılması

3.2.2.4. Transforme Olmuş Bakterilerden Kolonilerin Oluşturulması

Bu aşamada kullanmış olduğumuz kompetant JM-109 bakterisinde ampisiline dayanıklılık geni bulunmamaktadır. Bundan dolayı transformasyon aşamasında ampisiline içeren besi ortamına ekilen bakterilerden bünyesinde yalnızca plazmid bulunduran bakteriler ampsilinden etkilenmeyecektir. Ampisilin içeren LB ortamında sadece iki renk koloni gözlemlenecektir. Bu renkler, beyaz ve mavi olan kolonilerdir (Şekil 3.9). Beyaz koloniler; hedef DNA'yı içeren plazmidi bünyesine alan bakteriler, mavi koloniler ise, hedef DNA'yı içermeyen bakterilerdir.

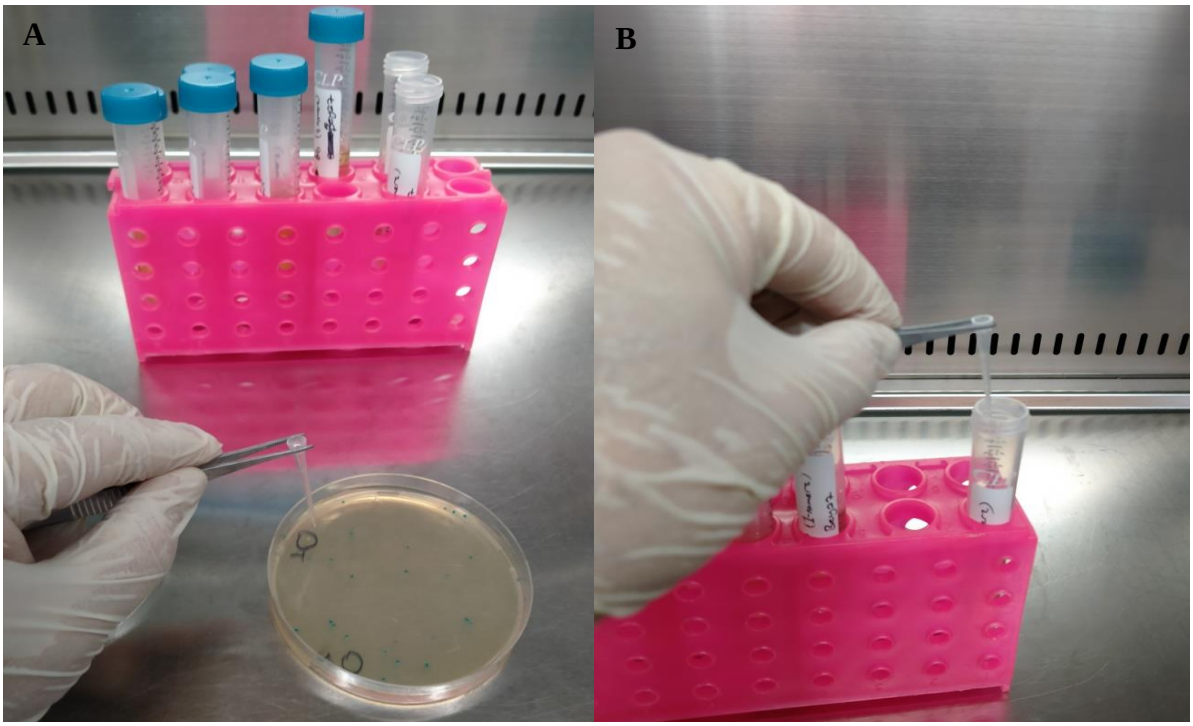


Şekil 3.9. Transformasyon sonucu beyaz ve mavi koloni oluşan BQCV ve SBV virüslerine ait insert DNA'lar

DNA plazmite aktarılmış ise bu insert DNA plazmitin Lac-Z bölgesine yerleşmiş ve Lac-Z bölgesi bozulduğundan dolayı bakterinin içerisinde bulunan X-Gal ve IPTG kimyasallarının; Beta-galaktosidazın glikoz ve galaktoza dönüşümü engellediği için beyaz renkli oluşur. Plazmitin bünyesinde bulunan bakteriler Lac-Z bölgesi zarar görmediğinden X-Gal ve IPTG kimyasallarını etki etmekte ve mavi koloniler oluşmaktadır. Bundan dolayı beyaz olan koloniler seçilerek çoğaltılmıştır.

3.2.2.5. Mavi-Beyaz Kolonilerin Seçimi

Transformasyon sonucu oluşan beyaz kolonilerden steril pipet ucu değdirilerek, önceden hazırlanmış ampisilin ve glycerol içeren 10 ml LB (Ek 1) bulunan 15 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.10). Steril tüplerin etiketlenmesi yapıldıktan sonra 180 rpm de 37 °C'de 16-24 saat inkübe edildi. Bu çalışma steril kabinde yapılmıştır.



Şekil 3.6. A) Steril pipet ucu ile beyaz kolonini alınması B) Pipet ucunun sıvı LB içeren ortama daldırılması

3.2.2.6. Plazmitlerin Saflaştırılması

Süre sonunda, 10 ml LB (sıvı) içine transforme olmuş bakterilere plazmit saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Plazmitlerin saflaştırılması, GeneJET Plasmid Miniprep Kit ile saflaştırma protokolü uygulanmıştır.

Bu protokole göre;

- ✓ 15 ml sıvı LB ortamında çoğaltılan bakteriler 2 ml'lik steril tüpüne aktarıldı ve bakteri hücrelerini 8000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Pelletler; 250 µl resuspend buffer ile çözdürülmüştür.
- ✓ Eppendorf tüpüne 250 µl Lyzis Buffer ilave edildi ve tüpler 2-3 sn ters düz edilerek karıştırıldı.

- ✓ Eppendorf tüpüne 350 µl nötralizasyon tamponu eklendi ve tüpler 2-3 sn ters düz edilerek karıştırıldı. Sonra 14000 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
- ✓ 2 ml'lik tüpü içerisine yerleştirilen spin kolon 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı.
- ✓ Spin kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu ilave edildi ve 14000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde biriken sıvı faz boşaltılmıştır.
- ✓ Etanolün iyice uzaklaşması için kolesiyon tüpleri 14000 rpm de 1 dakika boş olarak santrifüj yapılmış ve altta biriken sıvı dökülmüştür.
- ✓ Koleksiyon tüpü 1,5 ml yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 55 µl elüsyon buffer eklenmiş ve 2 dk bekletildikten sonra 12000 rpm de 2 dk santifrüj edilmiştir.
- ✓ Son aşamada 1,5 ml tüpte bulunan 55 µl saflaştırılmış plazmid -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.7. Saflaştırılan Rekombinat Plazmitlerin Restriksiyon Enzimleri İle Kontrol Edilmesi

Enzimatik kesimde *EcoRI* restriksiyon enzimi Promega firmasının önerdiği protokole göre kullanılmıştır. Enzimin kestiği bölge klonlamada kullanılan pGEM-T Easy vektörün çoklu klonlama bölgesinin her iki ucunda da bulunmaktadır. Enzimatik kesim yapılabilmesi için aşağıdaki bileşenler verilen oranlarda alınmıştır.

Buna göre steril bir PCR tüpü içerisine;

- ✓ 2 µl plazmid DNA
- ✓ 1 µl *EcoRI* enzimi
- ✓ 1 µl *EcoRI* tamponu
- ✓ 6 µl steril su
- ✓ 0.5 µl BSA eklenerek bir karışım elde edilir.

Hazırlanan bu karışım 37 °C de 3-4 saat inkübe edilerek kesime tabi tutlmuştur. Enzimatik kesime maruz bırakılan plazmidin bünyesinde ilgili genin olup olmadı düşük konsantrasyonda dökülen %1'lik agaroz jelde 110V'da 45 dk koşulması sonucu görüntülenmiştir.

3.2.2.8. Klonlanmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

Rekombiant plazmid üzerindeki DNA dizilerini tespit etmek için 50 µl saflaştırılan plazmid örneği (Sentebiolab/Ankara) firmasına gönderilmiştir. Gönderilen her örneği

plazmid için dizileme hatasını en aza indirmek için çift yönlü dizileme yapılmıştır. Dizi analizi sonrası elde edilen genom bilgileri gen bankasında ilgili virüslere ait olup olmadıkları BLAST yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2.9. DNA Dizilerinin Gen Bankasına Veri tabanına Girilmesi

DNA dizileri sekans analizi sonrası elde edilen sonuçlar, NCBI Gen bankası veri tabanına kayıtları yapılmıştır.

3.2.2.10. İlgili Dizilere Ait Filogenetik Analiz

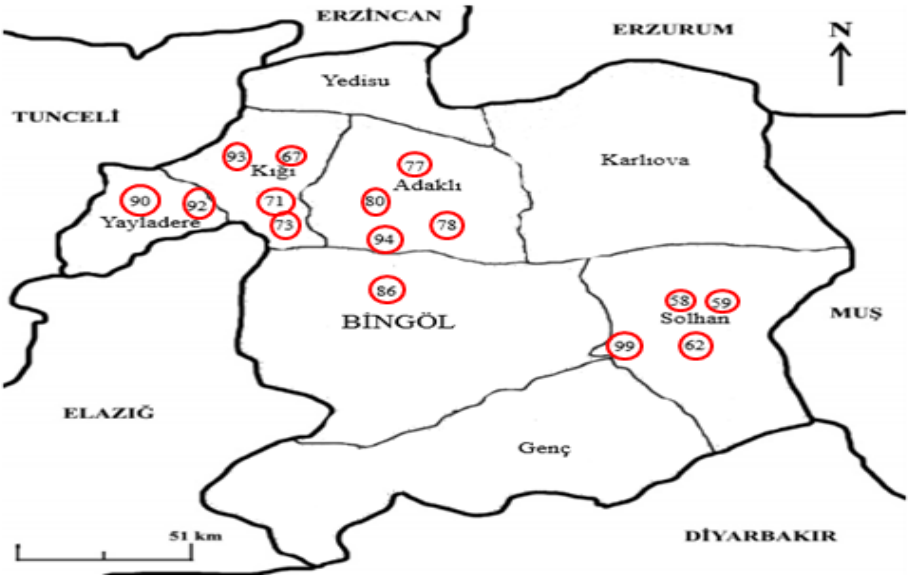
Bingöl ilinde tespit edilen virüs izolatlarına ait nükleotit dizileri kullanılarak filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Genetik uzaklık modeli Tamura-Nei algoritması uygulanan ağaç yapım metodu ve neighbor-joining yöntemiyle filogenetik ağaclar oluşturulmuştur. Oluşturulan ağaçlar sayesinde Bingöl ilinde tespit edilen virüs izolatlarının dünyadaki diğer izolatlar ile genetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Dizi analizi sonrası elde edilen genom bilgileri farklı biyoinformatik programlar ile CLC Main Workbench 6.7.1, Snap Gene, Mega 7 programları ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bingöl ilinde yürütülen bu çalışmada toplamda 128 arılıktan 384 işçi bal arısı örneği toplanmıştır. Toplanan işçi arı örneklerine ABPV, BQCV ve SBV virüsleri için spesifik primerler sentezletilmiş ve sırasıyla Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu (TNA), tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve klonlama aşamalarından oluşan süreçler uygulanmıştır. Gerçekleştirilen süreçler sonucunda SBV ve BQCV virüslerine ait pozitif DNA fragmanları elde edilmiş ve bu fragmanların dizileri ortaya çıkarılarak filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Bingöl ili 128 arılıktan 24 arılıkta inceleme kapsamındaki 3 virüsten ikisinin varlığına rastlanmış ve genel infeksiyon oranı %18,75 olarak hesaplanmıştır.

4.1. Siyah Kraliçe Hücre Virüsü (BQCV) İle İlgili Bulgular

Bingöl ilinde, 2020 yılında 128 arılıktan 384 işçi bal arısı numunesi ile yaptığımız çalışmada 700 bp DNA fragmenti üreten structural polyprotein geni çoğaltılmış ve arılıkların 15'inde %11,7 oranıyla BQCV enfeksiyonunun varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. BQCV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri

BQCV, bu oranla çalışma kapsamında araştırılan üç virüs içerisinde en sık rastlanılan arı virüsü olarak tespit edilmiştir. BQCV içeren bal arılarının bulunduğu arılıklar Bingöl İl Merkezi ile Solhan, Adaklı, Yayladere ve Kiğı ilçeleri olup infeksiyon oranı ilçeler arasında farklılıklar göstermiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1).

Tablo 4.1. BQCV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri

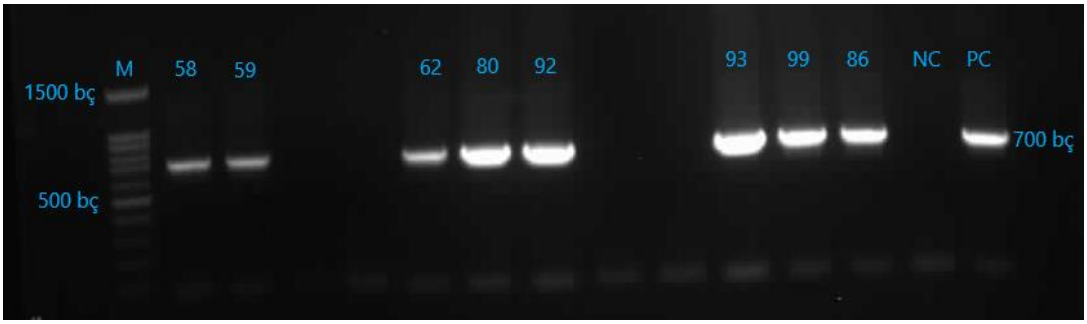
Bölgeler	**BQCV'nin araştırıldığı arılık sayısı**	**BQCV pozitif örnek sayısı**	**BQCV pozitif örnek oranı**	**Pozitif örnek numaraları**
Merkez	44	1	%2,27	86
Karlıova	19	0	0	0
Solhan	17	4	%23,5	58, 59, 62, 99
Genç	12	0	0	0
Yedisu	10	0	0	0
Adaklı	11	4	%45,4	77, 78, 80, 94,
Yayladere	4	2	%50	90, 92
Kiğı	11	4	%36,36	67, 71, 73, 93
Toplam	**128**	**15**	**%11,7**	**86, 58, 59, 62, 99, 77, 78, 80, 94, 90, 92, 67, 71, 73, 93**

Gümüşova vd. (2010), BQCV'nin Türkiye'deki varlığı ilk kez 2010 yılında tespit edilmiştir ve infeksiyon oranı %21,42 olarak belirlenmiştir. Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), BQCV'nin Doğu Anadolu'daki varlığı ise ilk kez 2019 yılında %16,6 oranı ile Hakkâri ilinde tespit edilmiştir. Oğuz vd. (2017), Van ilinde yetiştirilen bal arılarında, toplam 26 koloninin 23'ünde %88,52 oranında BQCV virüsü tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Karapınar vd. (2018), Van bölgesinde yürüttükleri çalışmada BQCV virüsüne structural poliprotein gen bölgesine ait 700 bp nükleotit dizisini moleküler olarak amplifiye ederek bu bölgedeki BQCV yaygınlığının %88,46'sında (23/26) oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), Hakkâri bölgesinde yürüttükleri çalışmada BQCV virüsüne ait kılıf protein (CP) gen bölgesine ait 567 bp nükleotit dizisini moleküler olarak amplifiye ederek bu bölgedeki BQCV yaygınlığının %16,6 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

Kalaycı vd. (2020), yıllarında Adana, Aydın, Bursa, Izmir, Kütahya, Muğla ve Manisa illerinde 2280 örneği BQCV virüsüne karşı test ettiler. 532 bp gen kısmı çoğaltılmış ve %28,9 oranında BQCV pozitif sonuç elde edilmiştir. Usta vd. (2020), Burdur bölgesinde

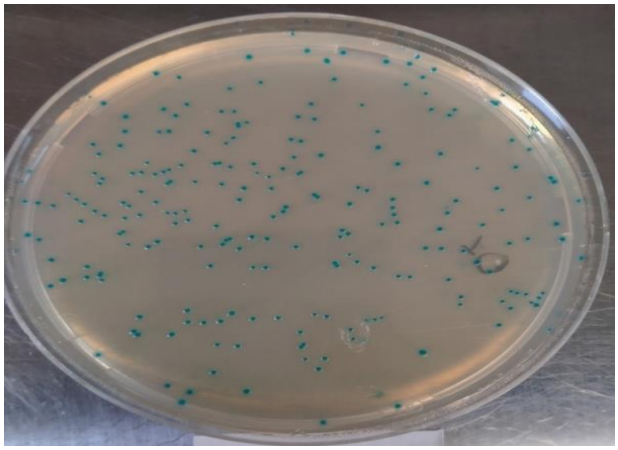
yürüttükleri çalışmada BQCV'ye özgü 514 bp uzunluğundaki bölgeyi RT-PCR yöntemi ile çoğaltarak %25,81 oranında infeksiyon tespit etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında, BQCV' nin Bingöl ilindeki varlığı ilk defa bu çalışma ile 700 bp nükleotit dizisinin polyprotein geni çoğaltılmış ve %11,7 oranında BQCV pozitif sonuç elde edilmiştir. Farklı bölgelerde önceden yapılmış olan bazı çalışmalara oranla fazla örnek sayısı ve düşük infeksiyon oranı ortaya konulmuştur. RT-PCR testleri sonucunda pozitif olarak net bant oluşturan 92 numaralı örnek jelden saflaştırılarak klonlama ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. BQCV virüsünü tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bç Marker, 58, 59, 62, 80, 92, 93, 99,86 numaralı Pozitif örnekler, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol

BQCV'ye ait jelden saflaştırılan bantlar pGEM T-Easy plazmidine materyal ve yöntemde belirtildiği gibi ligasyonu yapılmış ve transformasyon işlemleri uygulanmıştır. Transformasyon sonrası katı besi yerinde rekombinant bakterilerin oluşturduğu beyaz kolonilerin gelişmesi sağlanmıştır. Koloniler içerisinde rekombinant plazmiti taşıdığını düşünülen beyaz kolonilerden rastgele biri işaretlenmiş ve sıvı besi yerine ekimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4. 3).



Şekil 4.3. Kolonilerin bir gece 37 °C inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir

PCR sonucu pozitif sonuç veren 92 nolu örnekten rastgele 1 beyaz koloni seçilerek sıvı besi yerine ekilmiş ve bir gece boyunca 37 °C de 180 rpm çalkalayıcı platform üzerinde inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır. Rekombinant plazmid taşıyan bakteriler çöktürülüp plazmit saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmit klonlamanın başarısı için 92 numaralı örneğe ait polyprotein genini içeren plazmitin çift yönlü DNA dizilemesi yaptırılmış ve 700 nükleotit içerdiği tespit edilmiştir (Tablo 4. 2).

Tablo 4.2. 92 nolu BQCV Bingöl izolatına ait polyprotein geni baz dizisi

Baz Sıralası (bç)	**Nükleik asit baz dizisi**
1	TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAACATAGTAGCGGAGATGTACGCGCTTTATCGAGGAG
51	GAGTTCGAGTTAAAGTAGTCACTGAGAAAGGTGTGGATTTCGTCAGAGCTACGGTAA
99	GTCCTCAACAGACTTACGGTAGTGATGTCGCTCCCACGACCCATATCAGTACTCCTTT
149	GGCAATAGAACAAATACCAATAAAGGGAGTCGCAGAGTTCCAAATACCGTACTATGC
199	TCCATGTTTGTCATCTTCGTTTAGAGCGAATTCAGAAACATTTTACTATAGTTCAGGTC
250	GGAATAATCTCGATATAGCCACTTCACCTCCCACTGTCAATCGCTATTATGCGGTCGG
300	TGCGGGAGATGATATGGACTTTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCCCTGTATTCATGCAT
350	CTCAGACGGCTCAGTTTACCAAAATAAAACAAGGTAAAGTGTATGATTTGAGGTATG
401	ATCAGTATGACCCTTTCCGGGAAGTCCAGGACGGTACGGCTTTCCTCAATGCTCGAAG
451	TATTGAGGACAGCGATTTGTTGTGAGCTCCTTTAGAGGGAGGGCTCACTTTATCTATT
501	GCTTAATTCGGTAAGCCACAAATTTTTCTAAGTGTCATGAGTTTCTTCTCGGTTCTTCT
551	CATGATAACTAATCGAACCGTGTGTAGAGTCAGAATGTTGTGGTTTACGTTTCTTCTTG
700	T

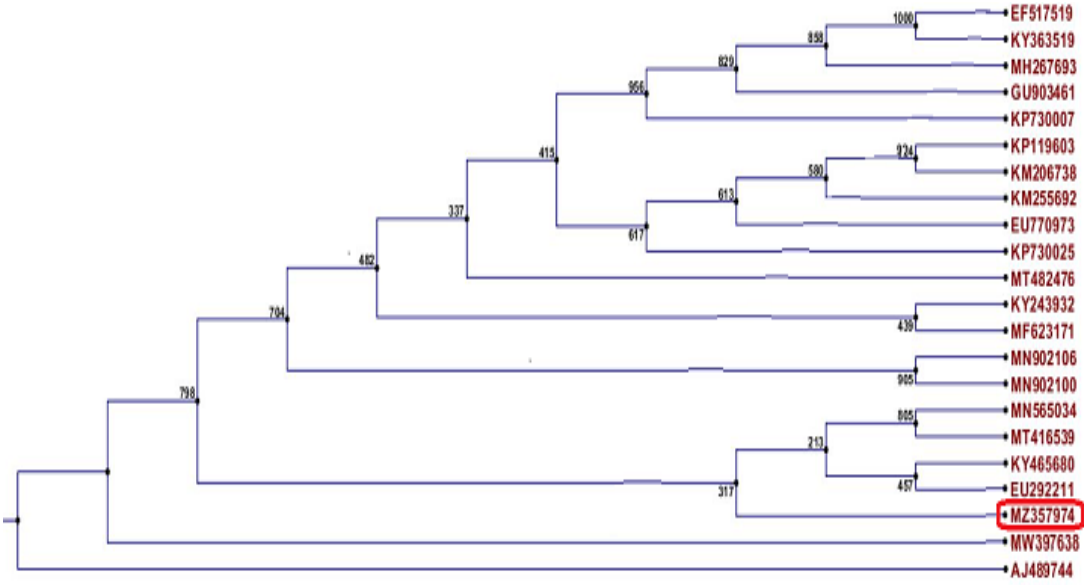
DNA dizisi elde edilen BQCV izolatı MZ357974 ulaşım numarası ile NCBI Gen Bankası veri tabanına eklenmiştir. Gen Bankası veri tabanına daha önce dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilerek girilmiş 20 farklı izolat seçilmiştir (Tablo 4.3). Yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmaları sonucunda BQCV Bingöl izolatının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile %96,58-75,71 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Tablo 4.3. Gen bankası veri tabanında bulunan BQCV virüsüne ait farklı izolatların Erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen ve Nükleotit Benzerliği

Erişim No.	**Ülke**	**Virüs**	**Konukçu**	**Gen**	**Nükleotit Benzerliği**
EU292211	Brezilya	BQCV	*Apis mellifera*	Capsid protein	%96,58
MN565034	Fransa	BQCV	*Vespa velutina*	Structural polyprotein	%96,43
KP730025	Tayland	BQCV	*Apis florea*	Capsid protein	%96,29
EU770973	Güney Kore	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%96,01
MN902100	Amerika	BQCV	*Bombus impatiens*	Structural polyprotein	%96,01
MT416539	İtalya	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%96,01
KP119603	Çin	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%96
KY243932	Çek Cumh.	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%95,86
KM206738	Çin	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%95,86
MN902106	Amerika	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%95,59
MF623171	Avustralya	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%95,58
KM255692	Çin	BQCV	*Apis mellifera*	Capsid protein	%95,58
MT482476	Papua Gine	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%95,43
MW397638	İsrail	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%94,80
KY465680	Avustralya	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%94,59
KP730007	Tayland	BQCV	*Apis cerana*	Capsid protein	%94,43
MH267693	İsveç	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%93,43
GU903461	İngiltere	BQCV	*Apis mellifera*	Capsid protein	%91,44
EF517519	Polonya	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%82,86
KY363519	İsveç	BQCV	*Apis mellifera*	Structural polyprotein	%75,71

Nükleotit benzerlik analizlerine göre BQCV Bingöl izolatı %96,58 oranı ile en çok Brezilya izolatı (EU292211) ile en düşük ise %75,71 oranında İsveç izolatı (KY363519) ile benzerlik göstermiştir. Oluşturan filogenetik ağaç MZ357974 Bingöl izolatının

Brezilya (EU292211), Fransa (MN565034), Avustralya (KY465680) ve İtalya (MT416539) ülkelerinden izole edilen aynı virüs izolatlarıyla genetik yakınlık içerisinde olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. BQCV Bingöl izolatı (MZ357974) ile dünyadaki BQCV izolatlarının kısmi polyprotein protein geninin nükleik asit dizisi 1000 tekerrürlü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı

4.2. Tulumsu Yavru Çürüklüğü Virüsü (SBV) İle İlgili Bulgular

Bingöl ilinden toplanan 128 arılığın 9'unda %7,03 infeksiyon oranı SBV virüsü tespit edilmiştir. Virüs oranı yoğun olarak Merkez, Genç, Solhan ve Kiğı ilçelerindeki sürvey merkezlerinde tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5. SBV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri

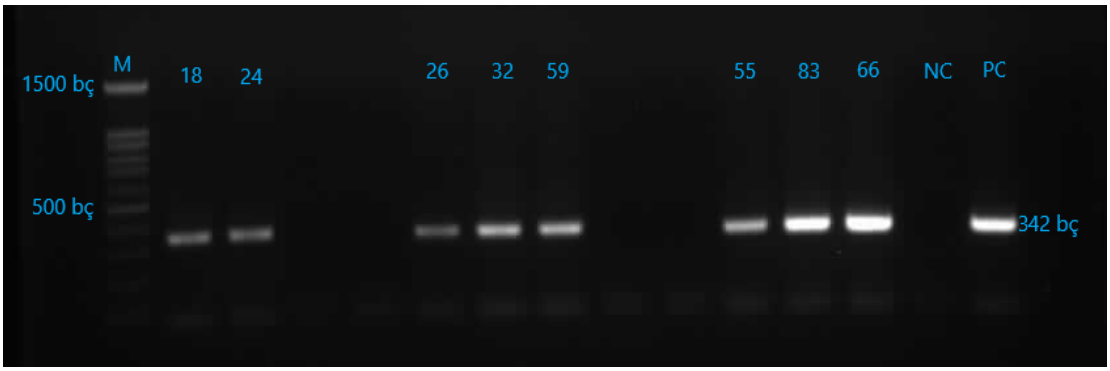
Tespit edilen bölgeler ve bölgelere özgü infeksiyon oranları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 4. 4 ve Şekil 4. 5).

Tablo 4. 4. SBV ile enfekteli arılıkların Bingöl ili ve ilçelerindeki lokaliteleri

Merkezler	SBV'nin araştırıldığı arılık sayısı	SBV pozitif örnek sayısı	SBV pozitif örnek oranı	Pozitif örnek numaraları
Merkez	44	4	%9,1	18, 24, 26, 32
Karlıova	19	0	0	0
Solhan	17	1	%5,8	59
Genç	12	1	%8,3	55
Yedisu	10	0	0	0
Adaklı	11	1	%9,1	83
Yayladere	4	0	0	0
Kığı	11	2	%18,2	66, 69
Toplam	**128**	**9**	**%7,03**	**18, 24, 26, 32, 59, 55, 83, 66, 69**

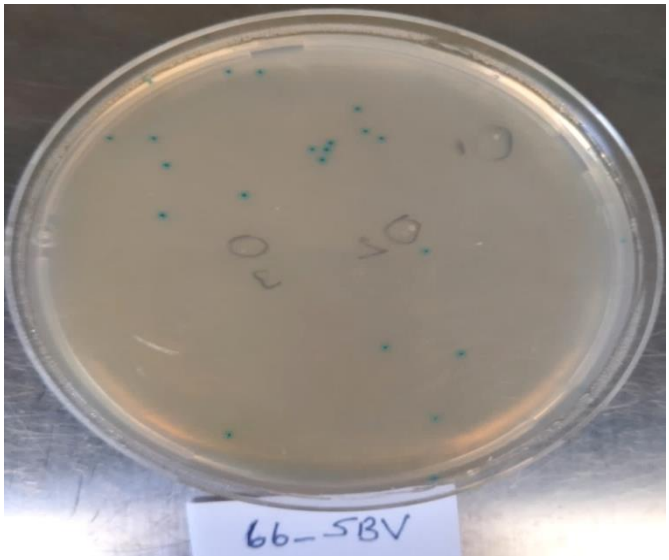
Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2019), Hakkâri bölgesinde gerçekleştirdikleri çalışmada SBV yaygınlığını 429 bp uzunluğundaki bölgeyi hedef alarak araştırmışlar ve bu bölgedeki infeksiyon oranını %12,2 oranında tespit etmişilerdir. Cagırgan vd. (2020), Burdur bölgesinde polyprotein genine ait 342 bp nükleotit dizisini çoğaltarak SBV infeksiyon oranını %33,3 olduğunu belirtmişlerdir. Kalaycı vd. (2019), Muğla bölgesinde yürütülen başka bir çalışmada, etmenin 342 bp büyüklüğündeki polyprotein genini amplifiye ederek bu bölgedeki SBV varlığını ortaya koymuşlardır. Kalaycı vd. (2020), Adana, Aydın, Bursa, İzmir, Kütahya, Muğla ve Manisa bölgelerinde gerçekleştirdikleri çalışmada SBV virüsünün polyprotein genine ait 342 bp uzunluğundaki bölgeyi çoğaltarak bu bölgedeki SBV infeksiyonunu %22,3 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, tespit edilen virüslere özgü viral polyprotein geninin 342 bp kısmı RT-PCR testi ile çoğaltılmış ve dizi analizinin yapılması için moleküler klonlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. SBV virüsünün Bingöl ilindeki varlığı %11,7 oranı ile ilk defa bu çalışmayla kanıtlanmıştır. RT-PCR testleri sonucunda pozitif sonuç veren örneklerden rastgele seçilen 66 ve 59 numaralı örnekler klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere jelden saflaştırılmıştır.



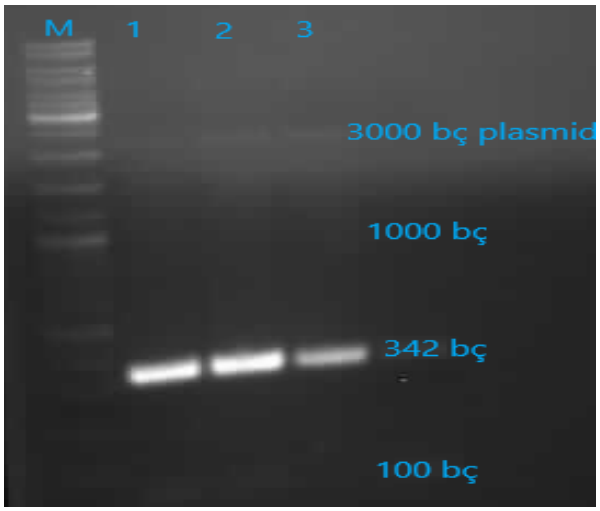
Şekil 4.6. SBV virüsünün tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bç Marker 18, 24, 26, 32, 59, 55, 83,66 numaralı Pozitif örnekler, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol

Saflaştırılan plazmide sırasıyla yukarıda anlatıldığı gibi ligasyon ve bakteriyel transformasyon işlemleri uygulanmıştır. Transformasyon sonrası katı LB ortamında rekombinant plazmidlerden mavi-beyaz koloni oluşumuna bağlı olarak rekombinant plazmiti taşıdığı düşünülen beyaz kolonilerden bakteriyel çoğaltım gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kolonilerin bir gece 37 °C inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir

PCR sonucu pozitif sonuç veren 66 ve 59 örneklerden rastgele 3 beyaz koloni seleksiyonu yapılarak sıvı LB ortamına ekimi yapıldı ve 37 °C de 180 rpm de 16-24 sa aralığında çalkalayıcı platform üzerinde bekletilerek çoğalması yapıldı. Daha sonra rekombinant plazmidler içeren bakteriler saflaştırıldı ve klonlamanın doğruluğu enzimatik kesim reaksiyonu ile kontrol edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SBV 'ye ait 66, 59 nolu ve 342 bç uzunluğundaki polyprotein genini taşıyan plazmitlere uygulanan PCR sonucuna ait jel görüntüsü. M:100-3000 bç marker, 1: Birinci koloni plazmit, 2: İkinci koloni plazmit, 3: Pozitif kontrol

Doğrulama sonrası her iki örneğe ait rekombinant plazmitler çift yönlü DNA sekans analizine gönderilmiş ve nükleotit dizisi ortaya çıkarılmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. 66 nolu SBV Bingöl izolatına ait polyprotein geni baz dizisi

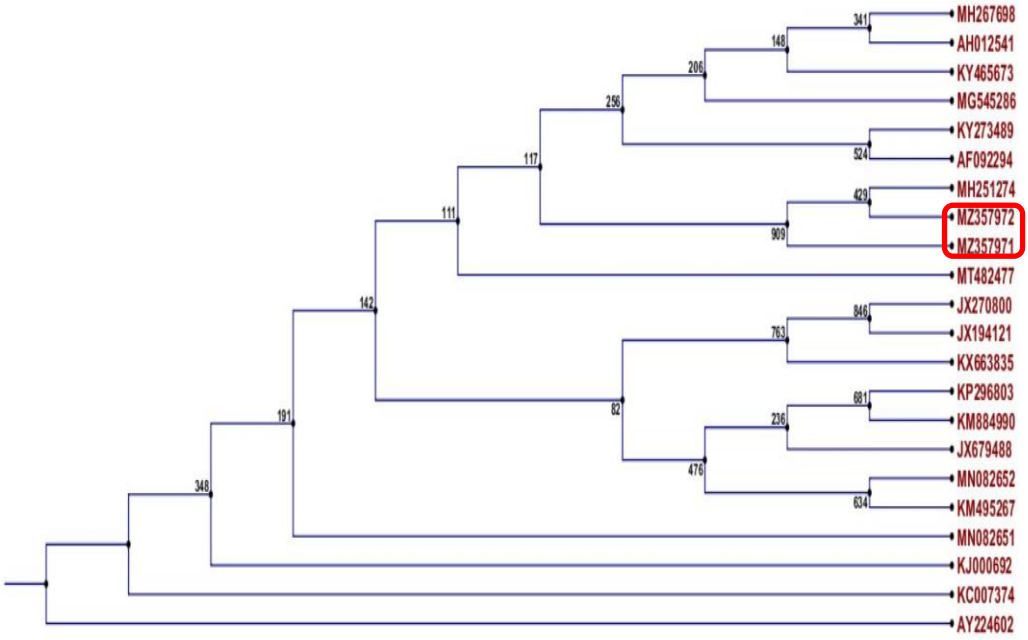
Baz Sıralaması(bç)	**Nükleik Asit Baz Dizisi**
1	CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATTATCTACAATCCTTGCCTCTAGTAAGAAGAC
56	ATTTGATACAGTGGGCTCTTATACCGATTTGTTTAATGGTTGGGTTTCTGGTAT
101	GTACGTGGATAAAAATGTCCACTACACCGAAATGTCCAGTGATGAGAGTGGAC
151	GAAGAATCTGGAATGTTAGGCGCGCAGTGTCAATTAAGACCGCAGAAGGAAC
200	TTTAGTGTGGCGAAAAGTAATATCCTCTTACAGTTGTAAAGTGGCTTCCGAGCT
250	AGCAGCTAAGAGTATCTTAGTACAGTTTACAGGTCCGATAAGGACTCAGAGTG
342	ATGAGGTACCCTCGAAGGAATCT

Sekans analizi sonucunda klonlanmış olan DNA'nın dizisinin 342 bç uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. DNA dizisi elde edilen iki SBV izolatı MZ357971 ve MZ357972 erişim numarası ile NCBI Gen Bankası veri tabanına kaydedilmiştir. Filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla NCBI veri tabanından dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilen 20 farklı SBV izolatı seçildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Gen bankası veri tabanında bulunan SBV virüsüne ait farklı izolatların erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen, Nükleotit Benzerliği

Erişim No.	**Ülke**	**Virüs**	**Konukçu**	**Gen**	**Nükleotit benzerliği**
MZ357971	Türkiye	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%100
MZ357972	Türkiye	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%100
MH251274	Türkiye	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%92,98
MG545286	ABD	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%92,40
MH267698	İsveç	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%92,40
KY465673	Avusturalya	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%92,11
AH012541	Fransa	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%91,81
MT482477	Gine	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%91,23
MN082651	Tayvan	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%90,94
KC007374	Vietnam	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%90,94
KY273489	Çek Cumh.	SBV	*Apis mellifera*	Polyprotein	%90,06
KJ000692	Çin	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%90,06
JX194121	Hindistan	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%90,06
KX663835	Hindistan	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%90,06
MN082652	Tayvan	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%89,77
KM884990	Vietnam	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%89,47
JX270800	Hindistan	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%89.18
KM495267	Çin	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%89.18
KP296803	Güney Kore	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%88,89
JX679488	Çin	SBV	*Apis cerena*	Polyprotein	%85,96

Filogenetik analiz sonucunda SBV Bingöl izolatlarının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile %92,98-85,96 arasında değişen oranlarda nükleotit benzerliği gösterdiği ve ayrıca SBV Bingöl izolatlarının kendi aralarında %100 oranında nükleotit benzerliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Her iki izolat, en düşük (%85,96) oranda Çin izolatı (JX679488) ile ve en yüksek (%92,98) Türkiye izolatı (MH251274) ile nükleotit benzerliği göstermiştir. Ayrıca filogenetik ağaç SBV Bingöl izolatlarının Türkiye izolatı ile aynı kümede olduğunu ve genetik yakınlık içerisinde olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SBV Bingöl MZ357971 ve MZ357972 izolatları ile dünyadaki SBV izolatlarının polyprotein geninin nükleik asit dizisi 1000 tekerrürlü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı

4.3. Akut Arı Felci Virüsü (ABPV) İle İlgili Bulgular

Bingöl ili arı kolonilerinden toplanan 384 canlı işçi arı örneği üzerinde yapılan moleküler test çalışmaları sonucunda ABPV virüsü açısından herhangi bir infeksiyona rastlanılmamıştır. ABPV virüsü ile enfekteli arılarda 3-5 gün gibi kısa bir zamanda ani ölümler meydana gelmektedir. Bu durum virüsün teşhisini ve infeksiyon oranını tespit etmeyi zorlaştıyor. Çalışma konusu kapsamındaki üç virüsünde ssRNA' ya sahip olmalarından dolayı bu virüsler ile enfekteli ölü arılarda bulunan virüs partikülleri uzun süre canlılığını koruyamamaktadır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yürütülen çalışmalarda ABPV virüsü tespit edilmemesi veya düşük oranlarda tespit edilmesi ABPV'nin Türkiye'deki varlığının düşük seviyelerde olduğu göstermektedir.

Rüstemoğlu ve Sipahioğlu (2016), Hakkâri ilinde 2014 yılı Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında 90 arılıktan yapılan sürvey çalışmasında Akut arı paraliz virüsünün yaygınlığı ve varlığı araştırılmıştır. RT-PCR metodu ile yapılan bu çalışmada, 90 arılığın sadece ikisinde (%2,2) ABPV infeksiyonu görülmüş ve virüsün Hakkâri ili bal arısı kolonilerinde yaygın bir virüs olmadığı belirlenmiştir. ABPV'nin Türkiye'deki varlığını yaygınlık oranıyla ilk kez bu çalışma ile ortaya koymuşlardır. Kalayci vd. (2020), Adana,

Aydın, Bursa, İzmir, Kütahya, Muğla ve Manisa illerinde 2280 örnek üzerinde gerçekleştirdiği araştırmada (%35,5) ABPV'nin olduğunu tespit etmişlerdir. Cagırgan vd. (2020), Burdur ili arılıklarında yaptıkları sürveylerde ABPV virüsüne ait 900 bp uzunluğundaki bölgeyi RT-PCR yöntemi ile çoğaltarak bu bölgedeki infeksiyon oranının %86,66 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında, ABPV' nin Bingöl ilindeki varlığı tespit etmek için 900 bp nükleotit dizisinin kılıf protein (CP) geni çoğaltılmış ve ABPV virüsüne ait pozitif bant elde edilememiştir.

4.4. Karışık İnfeksiyonlar

Bingöl ilinde yapılan bu çalışmada, virüslerin tekil infeksiyonlarının yanısıra karışık infeksiyonları da tespit edilmiştir. Arılıklarda yürütülen çalışmalarda 128 arılıkta 24 arılıkta tekli infeksiyon görülşürken sadece bir arılıkta BQCV+SBV karışık infeksiyonu %0,78 oranında belirlenmiştir (Tablo 4.7). Üçlü ve daha fazla infeksiyon tespit edilememiştir.

Tablo 4.7. Tekli ve Çiftli virüs infeksiyonlarının tespit edilen sayısı, oranları ve arılıklar

Tekli infeksiyonlar	**İnfeksiyon oranı**	**Pozitif arılık numarası**
BQCV (15/128)	%11,7	58, 59, 62, 67, 71,73,77,78,80, 86,90,92,93,94,99
SBV (9/128)	%7,03	18,24,26,32,55, 59,66, 69, 83
Çiftli infeksiyonlar		
BQCV+ SBV (1/128)	%0,78	59

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bingöl ili bal arısı kolonilerindeki viral infeksiyonlar arasında Siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV), Tulumsu yavru çürüklüğü virüsü (SBV) ve Akut arı felç virüsü (ABPV) varlıklarını ve yaygınlıklarını tespit etmek amacı ile 2020 yılının Nisan-Eylül aylarında survey çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada arı kolonilerindeki viral hastalık etmenlerinin tespiti için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Araştırma kapsamında dizayn edilen spesifik primerler ile yürütülen test çalışmalarında toplam 128 arılıktan 384 işçi bal arısına ait örnekler test edilmiş ve %11,7'sinde BQCV, %7,03'ünde SBV ve %0,78'inde ise SBV+BQCV karışık infeksiyonları tespit edilmiştir. Testlenen örneklerin hiçbirinde ABPV enfeksiyonu tespit edilmemiştir. Koloni düzeyinde incelendiğinde 128 arılıktan 15'inde BQCV, 9'unda SBV ve 1'inde SBV+BQCV belirlenmiştir.

Bingöl ilinde tespiti yapılan SBV ve BQCV virüslerinden rastgele seçilen virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Moleküler test sonuçları dünyadaki diğer izolatlarla karşılaştırıldığında, SBV'nin %85-100 ve BQCV'nin %96-75 arasında nükleotit benzerliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca oluşturulan filogenetik ağaca göre Bingöl BQCV izolatı Avustralya, Brezilya, İtalya ve Fransa izolatlarıyla aynı kümede yer alırken, Bingöl SBV izolatı en yakın Türkiye izolatı ile yakın ilişki içerisinde olmuştur.

RT-PCR sonucu tespit edilen ve moleküler karakterizasyonları yapılan BQCV ve SBV virüslerinin literatür araştırmasına göre Bingöl ili için ilk kayıt niteliği taşımaktadır.
Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular ışığında;

- ✓ Dünya genelindeki bal arısı kolonilerinde ekonomik zararın önemi ele alındığında en fazla zararlı olan bal arısı virüsleri arasında bulunan BQCV ve SBV virüslerinin Bingöl ilindeki varlıklarını ve infeksiyon oranlarının tespit edilmesi bu ilde yapılan arıcılık faaliyetleri açısından önem arz etmektedir. Elde edilen

- ✓ sonuçlar hem Bingöl ili için hemde Türkiye'deki arı ve arı sağlığı araştırıcıları, araştırma enstitüleri ve arıcılara ışık tutacağı kanaatindeyiz.
- ✓ Bingöl'deki varlıkları daha önce tespit edilmeyen iki önemli bal arısı virüsünün BQCV ve SBV varlıkları moleküler yöntemler ile güvenilir biçimde tespit edilmiştir.
- ✓ Bu çalışma kapsamında sentezletilen (Sentebiolab/Ankara) spesifik primerler ve bu çalışmaya özgün PCR sıcaklık ve döngüleri ile RT-PCR'ın kullanımı açısından diğer araştırıcılara kolaylık ve fayda sağlayacaktır. Bal arısı virüslerini diğer teşhis yöntemlerine (Elektron mikroskobu, İmmünodifüzyon testi, ELISA vb.) göre RT-PCR yöntemi daha güvenilir ve hızlı şekilde teşhisi yapılabilecektir.
- ✓ Bal arısı viral hastalıkları Bingöl' de bazı virüsler açısından tehlikeli olabilecek bir noktaya yaklaşmaktadır. Özellikle Adaklı, Yayladere, Solhan ve Kiğı ilçelerinde yaygınlığı %20'nin üzerinde olan BQCV ve SBV virüsleri tehdit noktasında yer almaktadır. ABPV ve diğer virüslerinin varlıklarının ülkemizde tespit edilmiş olması ileriki zamanlarda Bingöl'de ilinde de bulaşmanın görülmesi ve arı ölümlerine neden olabilecek potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.
- ✓ Ana arı bağırsak dokularında ve dışkıda Siyah kraliçe hücre virüsü tespit edilmiştir. Dışkıda görülmesi de dışkı yoluyla olası bulaşmayı düşündürüyor. Ancak, BQCV kısmen yetişkin arıların sindirimdeki infeksiyonu nedeniyle *Nosema apis'e* bağlantılı olduğu düşünülüyor. Bu nedenle nosema ile ilgili gerek kültürel gerekse de kimyasal mücadele yöntemlerine ağırlık verilmelidir.
- ✓ SBV, ABPV ve BQCV bal arısı virüslerinin Varroa parazitinde de görülmesi, Varroanın her üç virüse vektörlük ettiği ve koloniler arasında taşıyabildiğini göstermektedir. Benzer şekilde ektoparazir varroa ile mücadee konusunda arıcıların bilgilendirilmesi hem arı hastalıkları ile mücadele hem de bal üretiminin artırılması açısından hayati önem taşımaktadır.
- ✓ Bal arısı virüsleri ile mücadelede dayanıklı arı türleri tercih edilmelidir. Virüse dayanıklı ve virüsten ari ana arıdan yararlanılarak sağlıklı koloniler elde edilmelidir. Bu durum da ana arı ile buluşan virüslerin engellenmesi koloni için önemli bir gelişme sağlayacaktır. İşçi ve erkek arıların salgılarında bu virüslerin bulunması bu bulaşma yolarına da önemli ölçüde etki edecektir.
- ✓ Virüs hastalıkları ile mücadelede kültürel önemler son derece önemlidir. Bu bakımdan kovanların bakımlarının zamanında yapılması, güçlü tutulması, alet

ekipmanların dezenfekte edilmesi, kovanların yerden 50 cm yükseğe konularak nemden uzak tutulması, kovanların güneş görecek şekilde ve rüzgara kapalı alanların tercih edilmesi ve bulaşık kovanlardan petek, bal, çıta vb ürünleri kovanlar arasında değiştirilmemesi önemli hususlardır.

- ✓ Varroa, nosema ve diğer hastalıklar ile yapılan mücadelenin aynı zamanda arı virüsleri ile mücadele edildiği anlamına geldiği unutulmamalıdır.

Bal arısı kolonilerinde hastalığa neden olan en önemli yaygın yedi virüsün ikisinin varlığı ve yaygınlıklarının tespit edildiği bu çalışma sonrasında, diğer arı virüslerinin de varlık ve yaygınlıklarının arıcılık sektörü açısından Türkiye genelinde de daha kapsamlı araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut zengin florasından dolayı konargöçer arıcıların tercih ettiği Bingöl iline giriş yapacak olan arı kolonilerinin Tarım ve Orman İl Müdürlükleri ya da Üniversiteler tarafından hızlı ve güvenilir bir teşhis aracı olan RT-PCR testine tabi tutularak bölgeye alınması, arı virüslerinin Bingöl ilinde daha fazla yayılmalarını önleyebilir ve infeksiyonları daha ciddi şekilde kontrol altına alınabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKÇA

Akyol E, Camcı Ö (1999) Arıcılığın bitkisel üretimdeki yeri ve önemi. GAP 1. Tarım Kongresi. Şanlurfa, Türkiye 2: 1157-1164

Akyol E, Korkmaz A (2005) Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) zararlısı *Varroa destructor'*un biyolojisi. Uludağ Arıcılık Dergisi 5(3): 122-127

Allen MF, Ball BV (1996) The incidence and world distribution of the honeybee viruses. Bee World 77: 141-62

Anderson DL, Gibbs AJ (1988) Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Australia. Journal Gen Virology 69: 1617-25

Anonim (2021a) https://www.ordutb.org.tr/wp-content/uploads/2020/10/Aricilik Raporu.pdf. (Erişim tarihi; 10.06.2021)

Anonim (2021b) Food and Agriculture Organization of The United Nation, "FAO Statistical Databases /Agriculture".http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E. (Erişim tarihi: 10.06.2021)

Anonim (2021c) International Committee on Taxonomy of Viruses. http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20130611, Edinburg. (Erişim tarihi: 12.06.2021)

Antunez K, Anido M, Garrido-Bailon E, Botias C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Martín-Hernández R, Higes M (2012) Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. Research in Veterinary Science 93: 1441-1445

Antunez K, Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P (2006) Honeybee viruses in Uruguay. Journal of Invertebrate Pathology 93: 67-70

Antunez K, Alessandro B, Corbella E, Zunino P (2005) Detection of *Chronic bee paralysis virus* and *Acute bee paralysis virus* in Uruguayan honeybees. Journal of Invertebrate Pathology 90: 69-72

Azzami K, Beier H, Ritter W, Tautz J (2012) Infection of honey bees with *Acute bee paralysis virus* does not trigger humoral or cellular immune responses. Archives Virology 157: 689-702

Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Gallina A, Mutinelli F, Falcaro C (2010) Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. Journal of Invertebrate Pathology 105: 335-340

Bailey L (1975) Recent research on honey bee viruses. Bee World 56: 55-64

Bailey L, Ball BV, Perry JN (1983) Association of viruses with two protozoal pathogens of the honeybee. Annals of Applied Biology 103: 13-20

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD (1963) Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* L.). Virology 21: 390–395

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD (1964) *Sacbrood virus* of the larval honeybee (*Apis mellifera* L.). Virology 23: 425-9

Bailey L, Milne RG (1969) The multiplication regions and interaction of *acute* and *chronic bee paralysis viruses* in adult honeybees. Journal of General Virology 4: 9-14

Bailey L, Woods RD (1974) Three previously undescribed viruses from the honeybee. Journal of General Virology 25: 175-86

Bailey L, Woods RD (1977) Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on *sacbrood* and *acute bee-paralysis viruses*. Journal of General Virology 37: 175-182

Baker AC, Schroeder DC (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: 239-242

Bakonyi T, Farkas R, Szendroi A, Dobos-Kovacs M, Rusvai M (2002a) 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: 63-74

Bakonyi T, Grabensteiner E, Kolodziejek J, Rusvai M, Topolska G, Ritter W, Nowotny N (2002b) Phylogenetic analysis of *Acute bee paralysis virus* strains. Applied and Environmental Microbiology 68: 6446-6450

Ball BV (1985) *Acute paralysis virus* isolates from honeybee colonies in-fested with *Varroa jacobsoni*. Journal of Apicultural Research 24: 115–119

Ball BV (1989) *Varroa jacobsoni* as a virus vector. In Cavalloro R. (ed.) Present status of varroatosis in Europe and progress in *varroa mite* control. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, p. 241-244

Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S (2001) Detection of *Acute Bee Virus* and *Black Queen Cell Virus* from honeybees by reverse transcriptase Applied and Environmental Microbiology 67: 2384-2387

Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S (2002) Development of infectious transcripts and genome manipulation of *Black queen cell virus* of honey bees. Journal of General Virology 83(12): 3139-3146

Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglberger H, Nowotny N (2006) Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian Apiaries. Applied and Environmental Microbiology 72: 2414-20

Cagırgan AA, Yıldırım Y, Usta A (2020) Phylogenetic analysis of *deformed wing virus*, *black queen cell virus* and *acute bee paralysis viruses* in Turkish honeybee colonies. Veterinary Medicine 76(8): 480-484

Chen YP, Evans JD, Feldlaufer M (2006a) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera* L. Journal of Invertebrate Pathology 92: 152-159

Chen G, Wu Y, Deng J, Wen Z, Wang S, Chen Y, Zu F, Zheng H (2021) Seasonal variation of viral infections between the eastern honey bee (Apis cerana) and the western honey bee (*Apis mellifera*). Microbiology Open 10(1): 1162

Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF (2006b) Prevalence and transmission of honey bee viruses. Applied and Environmental Microbiology 72: 606-611

Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. Advances in Virus Research 70*:* 33-80

Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF (2004c) Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. Journal of Invertebrate Pathology 87: 84-93

Chen Y (2011) Viruses and Viral Diseases of the Honey Bee, *Apis*. Recent Advances in Entomological Research: From Molecular Biology to Pest Management, p. 105

Cordoni G (2011) Epidemiology and Taxonomy of Honey Bee Viruses in England and Wales. (Doktora tezi), University of Surrey, Environment Food and rural Affares (DEFRA). Birleşik Krallık, p. 37

De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge G, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthıer L, Genersch E, De Graaf D, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, Van Der Steen JJM (2013) Standard Methods for Virus Research in *Apis mellifera*. The Coloss Beebook, Standard Methods for *Apis mellifera* Pest and Pathogen Research, Volume II. (Editors: V Dietemann; J D Ellis; P Neumann), Journal of Apicultural Research. 52(4): 1-55

De Miranda JR, Cordoni G, Budge G (2010) The *Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus* complex. Journal of Invertebrate Pathology 103: 30-47

Delfinado MD (1963) Mites of Honeybee in South-East Asia. Journal of Apicultural Research 2: 113-114

Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: DoPollen Quality and Diversity Matter. PLoS ONE. 8(8)

Engel MS (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). Journal of Hymenoptera research 8*:* 165-196

Foissac L, Gentit P, Svanetia-Dumas L, Dulucq MJ, Candresse T (2001) Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo, and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (pdo rt-pcr). Acta Horticulturae 550: 37-43

Freiberg M, De Jong D, Message D, Cox-Foster D (2012) First report of *Sacbrood virus* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. Genetics and Molecular Research 11(3): 3310-3314

Genç F, Dodoloğlu A (2002) Arıcılığın Temel Esasları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı 26: 715-722

Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ (1999) The nucleotide sequence of *Sacbrood virus* of the honey bee: an insect picorna-like virus. Journal of General Virology 80: 1541-1549

Glover RH, Adams IP, Budge G, Wilkins S, Boonham N (2011) Detection of honey bee (*Apis mellifera*) viruses with an oligonucleotide microarray. Journal of Invertebrate Pathology 107(3): 216-219

Gordon KHJ, Waterhouse PM (2006) Small RNA viruses of insects: Expression in plants and RNA silencing. Advances in Virus Research 68: 459-502

Govan VA, Leat N, Allsopp M, Davison S (2000) Analysis of the complete genome sequence of *Acut bee paralysis virus* shows that it belongs to the Novel group of Insect-Infecting-RNA viruses. *Virology* 277(2): 457-463

Grabensteiner E, Ritter W, Bakonyi T, Pechhacker H, 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: 222-225

Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, 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: 93-104

Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Correa-Benitez A, Espinosa-Montano LG, Uribe-Rubio JL (2013) A scientific note on the first detection of *Black queen cell virus* in honey bees (*Apis mellifera*) in Mexico. *Apidologie* 44(4): 382-384

Gümüşova SO, Albayrak H, Kurt M, Yazıcı Z (2010) Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. Veterinarski Arhiv 80(6): 779-785

Haddad N, Brake M, Migdadi H, De Miranda JR (2008) First detection of honey bee viruses in Jordan by RT- PCR. Jordan Journal of Agricultural Sciences 4(3): 242-247

Higes M, Esperon F, Sanchez-Vizcaino JM (2007) Short communication. First report of *Black queen cell virus* detection in honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 5(3): 322-325

Hunter W, Ellis J, vanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D, Paldi N (2010) Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae) PLoS Pathogens. 6(12)

Kaftanoğlu O, Kumova U, Yeninar H (1992) Varroa Mücadelesinde Son Gelişmeler. Doğu Anadolu Bölgesi 1. Arıcılık Semineri. Erzurum, Türkiye s.127-139

Kalaycı G, Çağırgan AA, Pekmez K, Özkan B, Kaplan M (2019) Molecular Detection And Phylogenetic Analysis Of The Honeybee (*Apis mellifera*) *Sacbrood virus* in Turkey. Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences 43: 551-554

Kalaycı G, Cagırgan AA, Kaplan M, Pekmez K, Beyazıt A, Ozkan B, Yesıloz H, Arslan F (2020) The Role of Viral and Parasitic Pathogens Affected By Colony Losses in Turkish Apiaries. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 26(5): 671-677

Kevan PG, Hannan MA, Ostiguy N, Guzman E (2006) A summary of the Varroa-virus disease complex in honeybees. American Bee Journal 146: 694-697

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

Leat N, Ball B, Govan V, Davison S (2000) Analysis of the complete genome sequence of *black queen cell virus*, a picorna-like virus of honeybees. Journal of General Virology 81: 2111-2119

Li Z, Huang S, Huang WF, Geng H, Zhao Y, Li M, Chen Y, Su S (2016) A scientific note on detection of honeybee viruses in the darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*, Coleoptera: Tenebrionidae), a new pest in *Apis cerana* cerana colonies. Apidologie 47(6): 759–761

Maori E, Tanne E, Sela I, (2007b) Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. Virology 362: 342-349

Maramorosch K, Shatkin A (2007) Honey bee viruses. Advances in Virus Research. Academic Press, p. 33-80

Mayo MA (2002) Virus Taxonomy—Houston 2002. 2002. Archives of Virology 147: 1071-1076

Milićević V, Radojičić S, Kureljušić J, Šekler M, Nešić K, Veljović L, Zorić JM, Radosavljević V (2018) Molecular detection of *black queen cell virus and Kashmir bee* virus in honey. AMB Express 8: 128

Morse RA, Gonclaves LS (1979) Varroa Disease a Threat to World Beekeeping. Gleanings in Bee Culture 179-181

Morse RA, Laigo FM (1969) The Potential and Problem of Beekeeping in Philippines. Bee World 50: 9-14

Nielsen SL, Nicolaisen M, 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: 310-314

Oğuz B, Karapınar Z, Dinçer E, Değer MS (2018) Molecular detection of *Nosema* spp. and *black queen cell virus* in honeybees in Van Province, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 41: 221-227

Öncüer C, Benlioğlu K (1998) Balarısı Zararlıları, Hastalıkları ve Zehirlenmeleri. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları no:3

Rangel J, Keller JJ, Tarpy DR (2013) The effects of honey bee (Apis mellifera L.) queen reproductive potential on colony growth. International Union for the Study of Social Insects 60: 65–73

Reynaldi FJ, Sguazza GH, Albicoro FJ, Pecoraro MR, Galosi CM (2013) First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. Brazilian Journal of Microbiology volume 73(4): 797-800

Reynaldi FJ, Sguazza GH, Pecoraro MR, Tizzano MA (2010) First report of viral infections that affect argentine honeybees. Environmental Microbiology Reports 2: 749-751

Ribiere M, Ball BV, Aubert M (2008) Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In Virology and the honey bee (eds M Aubert, BV Ball, I Fries), Luxembourg City, Luxembourg: EEC Publications, European Commission, p. 15–84

Rüstemoğlu M, Sipahioğlu H (2016) Occurrence and Molecular Characterization of *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV) in Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies in Hakkâri Province. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi 26(2): 174-182

Rüstemoğlu M, Sipahioğlu HM (2019) Occurrence and prevalence of six honey bee viruses in Hakkâri (Turkey) and their genomic divergence. Munis Entomology & Zoology 14(2): 574-583

Sammataro D, Avitabile A (1998) The beekeeper's handbook. 3th edition

Sanpa S, Chantawannakul P (2009) Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. Journal of Invertebrate Pathology 100: 116–119

Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, Pecoraro MR (2013) Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. Journal of Virological Methods 194: 102-106

Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D (2005) Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (*Kashmir bee virus and sacbrood virus*) with the honeybee host and the parasitic *varroa mite*. Journal of General Virology 86: 2281-9

Seeley TD (1985) Honeybee Ecology. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA. p. 201

Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD (2008) Virus infections in Brazilian honeybees. Journal Invertebrate Pathology 99: 117-9

Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M (2004) Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and

Varroa destructor mite populations in France. Applied and Environmental Microbiology 70: 7185-7191

Tewaron NC (1983) Nutrition and Reproduction in the Ectoparasitic Honey Bee (*Apis sp.*) Mite, *Varroa jacopsoni*. (Eberhard-Karls-Universitat, Tübingen) p. 35

Tutkun E, Boşgelmez A (2003) Bal arısı zararlıları ve hastalıkları teshis ve tedavi yöntemleri. Bizim Büro Basımevi, Ankara, s. 27

TUİK (2019) Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). www.tuik.gov.tr (Erişim: 17.12.2020).

Usta A, Yıldırım Y (2020) Bal Arılarının Viral Hastalıkları. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi 35(1): 57-66

Welch A, Drummond F, Tewari S, Averill A, Burand JP (2009) Presence and prevalence of viruses in local and migratory honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. Applied And Environmental Microbiology 75(24): 7862-7865

White GF (1917) *Sacbrood virus*. US Department of Agriculture Bulletin.(Editors: Howard, L. O.), 431. Washinton D.C. 1-55

Wilson JE, Powell MJ, Hoover SE, Sarnow P (2000) Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites, Molecular and Cellular Biology 20: 4990-4999

Winston ML (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA. p. 281

Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E (2006) Detection of viral sequences in semen of honeybees (Apis mellifera): evidence for vertical transmission of viruses through drones. Journal of Invertebrate Pathology 92: 105-108

Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP (2012) New evidence that *Deformed wing virus and Black queen cell virus* are multi-host pathogens. Journal of Invertebrate Pathology 109:156-159

EKLER

Ek 1. Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

Ek 1.1. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi

✓ Guanidine Thiocyanate	4M	23.64gr/50ml
✓ NaOAc (pH 5.2)	0.2M	1.36 gr/50 ml
✓ EDTA	25mM	0.465 gr/50 ml
✓ KOAc	1.0 M	4.9 gr/ 50 ml
✓ PVP-40	%2.5 wt/vol	1.25 gr/50ml
✓ %1 2-ME (Mercaptoethanol)		

50 ml hacimde hazırlanacak olan çözelti için yukarıda belirtilen miktarlardaki kimyasallar saf su içerisinde çözdürülür ve otoklav edildikten sonra kullanım süresince 4 ºC'de muhafaza edilir.

Ek 1.2. NaI Solüsyonu

✓ NaI (Sigma S8379)	36 gr
✓ Na_2SO3	0.75 gr

Bileşimler eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra %50 oranında Ethanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanır. Ethanol eklendikten sonra solüsyon 4 °C'de muhafaza edilir.

Ek 1.3. Silikanın Hazırlanması (pH: 2.0)

✓ Silica (Sigma %12 S5631)	60 gr

Mezür kabına eklenen 500 ml saf su içersine 60 gr silika tartılıp koyulur ve iyice karıştırıldıktan sonra 24sa bekletilir. Üstte biriken 470 ml sıvı uzaklaştırılır ve 500 ml'ye

tamamlandıktan sonran iyice karıştırılır. Hazırlanan bu karışım 5sa bekletilir ve üstte biriken 440 ml sıvı atılır, kalan 60 ml karışımın pH'ı 2.0 olana kadar HCl eklenir.

Ek 2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler

Ek 2.1. 50X TAE Koşum Tamponu

- ✓ Glacial Asetic acid (CH3COOH) 57.1 gr
- ✓ Tris-base (C4H11NO3) pH (8.0) 242 gr
- ✓ 0.5 M EDTA (C10H14N2O8Na2.2H2O) 100 ml

Ek 2.2. 1X TAE Koşum Tamponunun Hazırlanması (1 Litre)

- ✓ 50X TAE stok solüsyondan 20 ml alınarak steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TAE solüsyonu elde edilir.

Ek 3. Klonlama Aşamasında Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Ek 3.1. Sıvı LB Hazırlama (1 Litre)

- ✓ 5 g NaCl (Sigma)
- ✓ 5 g Bacto yeast (Applichem)
- ✓ 10 g Bacto tryptone (Fisher BioReagents BP1421 500g)

Yukarıda verilen bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak 1 litrelik erlene konur ve üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanır. 121 °C de 20-25 dakika otoklavda steril edilir. Karşım 50-55 °C dereceye kadar soğuması sağlanır. Bu aşamada, çalışmanın amacına uygun olarak ampisilin, IPTG ya da X-gal gerekli miktarlarda eklenebilir. Kompetan hücreler için hazırlanan sıvı LB ortamına Ampisilin, IPTG ve X-gal katılmamaktadır.

Ek 3.2. Katı LB Hazırlama (1 Litre)

- ✓ 5 g NaCl
- ✓ 10 g Bacto tryptone
- ✓ 5 g Bacto yeast extract
- ✓ 15 gr Agar (Katılaşması için)

Yukarıdaki kimyasallar belirtilen miktarlarda tartılıp erlene konulur ve üzeri steril saf su ile 1 lt tamamlanır. 121 °C de 20-25 dk otoklavda steril edilir. Otoklav bittikten sonra oda sıcaklığında 55 °C ye kadar soğumaya bırakılır.

Ek 3.3. Rekombinat Bakterilerilerin Seçimi

Ek 3.3.1 X-Gal

20 mg X-Gal tartıldıktan sonra 1 ml Dimethyl formamide içersinde çözdürülür. X-gal ışıktan korumak için eppendorf tüpü alüminyum folyo ile sarılır. Hazırlanan X Gal -20 °C de muhafaza edilmeli.

Ek 3.3.2. IPTG

100 mg IPTG tartılarak 1 ml'lik steril saf su içerisinde çözdürülür. IPTG'yi ışıktan korumak için eppendorf tüpü alüminyum folyo ile sarılır. Hazırlanan IPTG, -20 °C de muhafaza edilmeli.

Ek 3.3.3. SOC Solüsyonu (1 Litre)

- ✓ 20 ml of 1M glucose
- ✓ 10 ml of 1M MgCl2
- ✓ 2 ml of 5M NaCl.
- ✓ 5 g Bacto Yeast Extract
- ✓ 20 g Bacto Tryptone
- ✓ 2.5 ml of 1M KCl
- ✓ 10 ml of 1M MgSO4

Erlen içerisine yukaradaki belirtilen bileşenler tartılıp steril saf su ile 1 litreye tamamlanır. 121 °C de 20-25 dk otoklavda steril edilir. Otoklav sonrası, oda sıcaklığında 55 °C dereceye kadar soğuması sağlanır. Daha sonra 4 °C de buzdolabında saklanır.

Ek 3.3.4. Kompetan Hücre Hazırlanması

Ticari olarak tedarik edilen kompetan hücreler, steril kabin içerisinde hazırlanan katı LB ortamına bir öze yardımı ile zigzag çizgiler şeklinde ekim yapılır. 1 gece inkübatörde

(37^oC) petriler ters çevrilerek gelişmeye bırakılır. Ertesi gün oluşan beyaz tek kolonilerden seçilerek taze hazırlanmış 10 ml sıvı LB ortamına ekim yapılır. 1 gece sallayıcı platformda (37°C de, 200 rpm) inkübe edildikten sonra 1 litre sıvı LB ortamına ilave edilir. Karışım 37°C de 200 rpm' de OD 0.6-0.9 aralığında oluncaya kadar gelişmeye bırakılır. Sonraki aşamalar aşağıdaki gibidir;

- ✓ Bakteri çoğalmasının durması için erlen buza daldırılır. Sonrasında bakteri süspansiyonları, falkon tüplerine ilave edilerek 6.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası, oluşan üst sıvı (supernant) boşaltılır. Geri kalan bakteri pelletleri, 5 ml soğuk su ilave edilerek çözdürülür ve daha sonra soğuk su ilave edilerek 50ml'ye tamamlanır.
- ✓ Falkon tüpleri, 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Oluşan supernant (üstvsıvı) atılır ve 5-10 ml soğuk su ile katılıp vortekslendikten sonra steril soğuk su ile 50 ml'ye tamamlanır.
- ✓ Tekrardan 6.000 rpm' de 15 dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonucu supernatant atılarak 5-10 ml soğuk su ile resuspanse edilir. Vorteksleme ile çözündürüldükten sonra bu sefer tüpler toplamda yarım litre olacak şekilde yarıya kadar soğuk su ile doldurulur ve 6.000 rpm' de santrifuj edilerek üst sıvı atılır.
- ✓ Bu aşamadan sonra falkon tüpleri 20 ml %10'luk soğuk glycerol ile resuspanse edilir. 6000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı atılır ve tüpler yaklaşık 2-3 ml %10'luk glycerol ile sulandırılır. Gliserol ilavesi sonrası voktekslenerek homojenizasyon sağlanır.
- ✓ Elde edilen süspansiyon 100 µl' lik kısımlar halinde 500 µl' lik tüplere paylaştırılır. Oluşturulan kompetan hücreler 6 ay boyunca -80 °C de derecede saklanabilir.

Ek 4. Survey Çalışmalarında Toplanılan İşçi Arı Örnekleri

Ek 4.1. Survey çalışmalarında toplanılan işçi arı örneklerine ait lokalite, numune alma şekli ve toplanma tarihleri

No	Lokalite	Örnekleme şekli	Tarih
1	Merkez/Çapakçur	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
2	Merkez/Çapakçur	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
3	Merkez/Çapakçur	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
4	Merkez/Çapakçur	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
5	Merkez/Çapakçur	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
6	Merkez	Kovan önünden rastgele	17.04.2020
7	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.04.2020
8	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.04.2020
9	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.04.2020
10	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.04.2020
11	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
12	Merkez	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
13	Merkez/ Sarıçiçek	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
14	Merkez/ Sarıçiçek	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
15	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
16	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
17	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
18	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
19	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
20	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	18.05.2020
21	Merkez/ Ilıca yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
22	Merkez/Ekin yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
23	Merkez/ Göltepesi	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
24	Merkez/ Kervansaray	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
25	Merkez/ Kervansaray	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
26	Merkez/ Kervansaray	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
27	Merkez/ Ekin yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
28	Merkez/ Ekin yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020

29	Merkez/ Ekin yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
30	Merkez/ Ekin yolu	Kovan önünden rastgele	01.06.2020
31	Merkez/Sarıçiçek	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
32	Merkez/Yeniköy	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
34	Merkez/Yeniköy	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
35	Merkez/Çeltik suyu	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
36	Merkez/Çeltik suyu	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
37	Merkez/Tek ören	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
38	Merkez/Tek ören	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
39	Merkez/Çayağzı	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
40	Merkez/Kumgeçidi	Kovan önünden rastgele	02.06.2020
41	Genç/Sağan Köyü	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
42	Genç/Sağan Köyü	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
43	Genç/Sağan Köyü	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
44	Genç/Sağan Köyü	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
45	Genç/Çaytepe	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
46	Genç/Çaytepe	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
47	Genç/Çaytepe	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
48	Genç/Dilektaş	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
49	Genç/Süğütlü	Kovan önünden rastgele	20.06.2020
50	Genç/Doğanca	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
51	Genç/Yamaç	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
52	Genç/Düz yayla	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
53	Genç/Köprü	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
54	Genç/Köprü	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
55	Genç/Köprü	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
56	Genç	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
57	Genç Yolu	Kovan önünden rastgele	21.06.2020
58	Solhan/ Serban	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
59	Solhan/ Serban	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
60	Solhan/ Serban	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
61	Solhan/ Serban	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
62	Solhan/ Serban	Kovan önünden rastgele	29.06.2020

63	Solhan/ Yazıcıoğlu	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
64	Solhan/ Yazıcıoğlu	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
65	Solhan/ Yazıcıoğlu	Kovan önünden rastgele	29.06.2020
66	Kığı/Merkez	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
67	Kığı/Merkez	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
68	Kığı/Seyit kasım	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
69	Kığı/Güney ağıl	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
70	Kığı/Güney ağıl	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
71	Kığı yolu	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
72	Kığı/Çiçek tepe	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
73	Kığı yolu	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
74	Kığı/ Çukur bağ	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
75	Kığı/ Çukur bağ	Kovan önünden rastgele	12.07.2020
76	Adaklı/Merkez	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
77	Adaklı/ Haspalar	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
78	Adaklı/ Su düğünü	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
79	Adaklı/Sütlaç	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
80	Adaklı/ Sarı dibek	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
81	Adaklı/Sarı dibek	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
82	Adaklı/Dolu tekne	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
83	Adaklı yolu	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
84	Adaklı yolu	Kovan önünden rastgele	21.07.2020
85	Merkez/ Haserek	Kovan önünden rastgele	02.08.2020
86	Merkez/ Haserek	Kovan önünden rastgele	02.08.2020
87	Merkez/ Uğur ova	Kovan önünden rastgele	02.08.2020
88	Merkez/ Kartal	Kovan önünden rastgele	02.08.2020
89	Yayladere yolu	Kovan önünden rastgele	09.08.2020
90	Yayladere yolu	Kovan önünden rastgele	09.08.2020
91	Yayladere/ Hasköy	Kovan önünden rastgele	09.08.2020
92	Yayladere/ Hasköy	Kovan önünden rastgele	09.08.2020
93	Kığı/ Merkez	Kovan önünden rastgele	09.08.2020
94	Adaklı/ Seyitcar	Kovan önünden rastgele	17.08.2020
95	Adaklı/Merkez	Kovan önünden rastgele	17.08.2020

96	Adaklı/Merkez	Kovan önünden rastgele	17.08.2020
97	Solhan/ Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
98	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
99	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
100	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
101	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
102	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
103	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
104	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
105	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
106	Solhan/Merkez	Kovan önünden rastgele	25.08.2020
107	Karlıova/ Kantar kaya	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
108	Karlıova/ Merkez	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
109	Karlıova/ Kıraçtepe	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
110	Karlıova/ Kıraçtepe	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
111	Karlıova/ Haçlar	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
112	Karlıova/Çukurtepe	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
113	Karlıova/Çatak	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
114	Karlıova/Kızılçubuk	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
115	Karlıova/Kızılçubuk	Kovan önünden rastgele	28.08.2020
116	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
117	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
118	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
119	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
120	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
121	Yedisu/ Merkez	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
122	Yedisu/ Dinarbey	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
123	Yedisu/ Dinarbey	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
124	Yedisu/ Dinarbey	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
125	Yedisu/ Dinarbey	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
126	Yedisu/ Dinarbey	Kovan önünden rastgele	02.09.2020
127	Karlıova	Kovan önünden rastgele	05.09.2020
128	Solhan	Kovan önünden rastgele	10.09.2020

ÖZGEÇMİŞ

Zeynelabidin KURT, 12.06.1992 yılında Kavaklıbağ Mah. Sur/Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kavaklıbağ Mah/Sur, Lise öğrenimini Fatih Lisesi Bağlar/ Diyarbakır'da tamamladı. 2011 yılında girdiği Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden Haziran 2015'te mezun oldu. 2019 yılında başladığı Bingöl Üniversitesi, Arı ve Arı Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini 2021 yılında tamamladı.