

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

**BİNGÖL İLİ BAL ARILARINDA KRONİK ARI FELCİ VİRÜSÜ VE DEFORME
KANAT VİRÜSÜNÜN ARAŞTIRILMASI VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adnan BALKAYA

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 KRONİK ARI FELCİ VİRÜSÜ VE DEFORME
KANAT VİRÜSÜNÜN ARAŞTIRILMASI VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER danışmanlığında, Adnan BALKAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 19/11/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Arı ve Arı Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mustafa USTA *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Hakan İNCİ *İmza* :

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

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma; BÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından
BAP-ZF.2020.00-004 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

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

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sunulması aşamalarında çalışmanın tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren, tez konusunun belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, deneysel çalışmaların yapılması ve yorumlanması esnasında yardımlarını ve bilgi birikimlerini esirgemeyen çalışmamı tamamlamam için bana gerekli tüm desteği veren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER'e gösterdiği yakın ilgi, vermiş olduğu destek ve emeklerinden dolayı saygılarımı ve şükranlarımı sunuyorum.

Kapılarını bizlere açıp laboratuvar çalışmalarımızın belli bir kısmını yürütmemizi sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde görevli Doç. Dr. Mustafa USTA'ya teşekkür ederim. Desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne, Fen Bilimler Enstitüsü Müdürlüğüne, Arı ve Arı ürünleri Ana Bilim Dalı Koordinatörü Prof. Dr. Ramazan MERAL beyin şahsında tüm hocalarıma, beraber ders aldığımız öğrenci arkadaşlarıma ve laboratuvarında beraber çalıştığımız Zeynel Abidin KURT ve Gözdenur ÇAKAR'a teşekkür ederim.

BAP.ZF.2020.00-004 numaralı projeye mali katkılarından dolayı Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bingöl İl Tarım ve Orman Müdürlüğünde görev yapan Koordinasyon ve Tarımsal Veriler Şube Müdürü Ali BEÇENE'nin şahsında şubede görev yapan tüm mesai arkadaşlarıma ayrıca desteklerinden dolayı Veteriner Hekim Safiye ERGİN KAYA hanıma teşekkür ederim.

Benim üzerimde çok büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan ve dualarını benden esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime ve tezin hazırlanması sırasında gösterdiği sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı eşime özellikle şükranlarımı sunuyorum.

Adnan BALKAYA
Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
1.2. Balarısı Kolonisi, Koloni Bireyleri ve Görevleri	2
1.2.1. Ana Arı	2
1.2.2. İşçi Arı.....	2
1.2.3. Erkek Arı	3
1.3. Türkiye ve Dünya Arıcılık Verileri	4
1.3.1 Dünyada arıcılık	4
1.3.2 Türkiye arıcılık verileri	7
1.3.3 Bingöl arıcılık verileri	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
2.1. Bal Arısı Virüslerinin Taksonomisi	11
2.1.1. Dicistroviridae	11
2.1.2. Iflaviridae	12
2.2. Deforme Kanat Virüs (<i>Deformed Wing Virus</i> ; DWV)	12
2.2.1. Genel Özellikleri	12
2.2.2. DWV Virüsünün Genom Organizasyonu	13
2.2.3. DWV'nin Taşınması	13
2.2.4. DWV'nin Oluşturduğu Simptomlar	14
2.3. Kronik Arı Felç Virüsü (<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i> ; CBPV)	14

2.3.1. Genel Özellikleri	14
2.3.2. CBPV Virüsünün Genom Organizasyonu.....	15
2.3.3. CBPV'nin Taşınması.....	16
İÇİNDEKİLER Oluşturduğu Simptomlar	16
2.4. Türkiye’de Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	17
2.5. Dünyada Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar	19
2.6. Arı Virüsleri ile Mücadele ve Kontrol	20
 3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Sürvey Alanı.....	21
3.1.2. Hayvansal Materyal.....	21
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Survey Çalışmaları	22
3.2.2. Viral Enfeksiyonların Araştırılması	23
3.2.2.1. Total nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu	23
3.2.2.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA)’nın Sentezi.....	25
3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları	25
3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Boyanması ve Görüntülenmesi	26
3.2.2.5. Karakterize Edilen Virüslerin İlgili Dizileri İçin Primer Dizayını.....	27
3.2.3. Virüs İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonlarının Yapılması.....	27
3.2.3.1. DNA Fragmentlerinin Agaroza Jelden Saflaştırılması	27
3.2.3.2. DNA’nın Plazmide Yerleştirilmesi (Ligasyon)	29
3.2.3.3. Rekombinant Plazmidin Bakteriye Aktarılması (transformasyon)	29
3.2.3.4. Plazmide Aktarılmış Bakterilerden Koloni Oluşturma.....	29
3.2.3.5. Mavi-Beyaz Seleksiyon ve Transforme Olmuş Kolonilerin Çoğaltımı	30
3.2.3.6. Rekombinant Plazmitlerin Saflaştırılması.....	31
3.2.3.7. Klonlanmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi.....	32
3.2.3.8. DNA Dizisinin Gen Bankasına Girilmesi	32
3.2.4. İlgili Diziye Ait Filogenetik Analiz	32
 4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Deforme Kanat Virüsü (<i>Deformed wing virus</i> , DWV) İle İlgili Bulgular	34
4.2. Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV) İle İlgili Bulgular	42

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKÇA.....	46
İÇİNDEKİLER.....	53



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
nM	:Nanometre
mm	:Milimetre
mM	:Milimolar
mg	:Miligram
rpm	:Rotation per minute
sn	:Saniye
V	:Volt
sa	:Saat
A	:Adenin
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
DWV	: <i>Deformed wing virus</i>
ARK.	:Arkadaşları
Bp	:Baz çifti
CBPV	: <i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>
C	:Sitozin
CP	:Kılıf protein
dATP	:Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	:Deoksicitozintrifosfat
dGTP	:Deoksiguanozintrifosfat
DNA	:Deoksiribo Nükleik asit
DNase	:Deoksiribonükleaz
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	:N�kleotid
ORF	:Opening reading frame
PCR	:Polymerase Chain Reaction
RdRp	:RNA-dependent RNA polymerase
RNA	:Ribon�kleik Asit
RT	:Reverse Transcriptase
RT-PCR	:Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
ssRNA	:Tek zincirli RNA
T	:Timin
TAE	:Tris Asetat EDTA
TNA	:Total Nükleik Asit
T���K	:Türkiye İstatistik Kurumu
UTR	:Untranslated region
UV	:Ultraviyole
XGAL	:5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Bal arısı koloni bireyleri	4
Şekil 1.2. 2018 Yılı Dünya Arıcılık Verileri (Anonim 2021a).....	5
Şekil 1.3. 2018 Yılı Ülkeler Bazında Bal Üretimi (Anonim 2021a).....	5
Şekil 1.4. 2018 Yılı Ülkeler Bazında Bal Verimi (Anonim 2021a).....	6
Şekil 1.5. 2004-2020 yılları arası Türkiye de üretilen bal miktarının yıllara göre değişimi (Anonim 2021b).....	6
Şekil 1.6. 2004-2020 yılları arası Türkiye’de bulunan arı kovan sayısının yıllara göre değişimi (Anonim 2021b).....	8
Şekil 1.7. 2004-2020 Bingöl'de bal üretimi (TÜİK, 2019)	8
Şekil 1.8. Bingöl ilçeler bazında 2004-2020 yılları arasında faaliyet gösteren arıcılık işletme sayıları (TÜİK, 2019).....	9
Şekil 1.9. Bingöl İlçeler Bazında 2004-2020 Arıcılık İşletme Sayıları (TÜİK, 2020)	9
Şekil 2.1. DWV’nin genom organizasyonu	13
Şekil 2.2. DWV ile infekteli arıların görünümü.....	14
Şekil 2.3. CBPV 'nin genom organizasyonu	15
Şekil 2.4. CBPV ile infekteli ergin arıların görünümü.....	17
Şekil 3.1. Survey yapılan Bingöl İli ve ilçeleri haritası.....	21
Şekil 3.2. A)Toplanan örneklerin pet şişelerle taşınması B) Araziden toplanmış örneklerin derin dondurucuda steril tüplerde saklanması.....	23
Şekil 3.3. A) Bal arısı örneklerinin ezme tanponu ile plastik torba içerisinde ezilmesi, B) Örneklere ezme tamponunun eklenmesi	24
Şekil 3.4. A) PCR karışımlarının hazırlanması B) Hazırlanmış karışımların PCR cihazına yerleştirilmesi	26
Şekil 3.5. DNA bantlarının bisturi ile jelden kesilmesi.....	28
Şekil 3.6. Transformasyon sonucu beyaz ve mavi koloni oluşan DWV virüslerine ait insert DNA’lar.....	30

Şekil 3.7. A) Steril pipet ucu ile beyaz kolonini alınması B) Pipet ucunun sıvı LB i ç ortama daldırılması	31
Şekil 4.1. Bingöl ili ve ilçelerinde survey çalışmaları sonucu toplanılan bal arısı örneklerinin ait oldukları arılıkların bulunduğu lokaliteleri gösteren harita	34
Şekil 4.2. Genel survey alanlarımız, Deforme kanat virüsü (DWV) ile ilgili bulgular yeşil renkler pozitif örnekleri, kırmızı renkler negatif örnekleri ifade etmektedir	38
Şekil 4.3. DWV virüsünün tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bp Marker 18, 25, 50, 80, 118 numaralı Pozitif örnekler, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol	39
Şekil 4.4. Kolonilerin 37 °C de 24 saat inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir	39
Şekil 4.5. DWV Bingöl MZ357973 izolatu ile dünyadaki DWV izolatlarının CP geninin nükleik asit dizisi 1000 tekrürlü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı	42

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. Dünya arıcılık 2018 verilerine göre bal üretim miktarları bakımından ilk yirmi ülke sıralaması (Anonim 2021a)	7
Tablo 3.1. Survey yapılan il merkezi ve ilçelerdeki işletme, kovan ve toplanan örnek sayıları	22
Tablo 3.2. Bal arısı virüslerin teşhisinde kullanılan amplifikasyon ürünlerinin bant uzunluğu	27
Tablo 3.3. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları	29
Tablo 4.1. DWV ile infekteli örneklerin Bingöl il ve ilçelerindeki lokaliteleri	35
Tablo 4.2. 118 nolu DWV Bingöl izolatına ait CP geni baz dizisi	40
Tablo 4.3. Gen bankası veri tabanında bulunan DWV virüsüne ait farklı izolatların erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen, Nükleotit Benzerliği	41

BİNGÖL İLİ BAL ARILARINDA KRONİK ARI FELCİ VİRÜSÜ VE DEFORME KANAT VİRÜSÜNÜN ARAŞTIRILMASI VE TESPİT EDİLEN İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI

ÖZET

Bu çalışmada, Bingöl ili bal arılarındaki Deforme Kanat Virüsü (DWV) ve Kronik Arı Felç Virüsü (CBPV) infeksiyonları ve yaygınlıkları her virüse özgü primerler kullanılarak RT-PCR metodu ile test edilmiştir. Survey çalışmalarında, 128 farklı arılıktan rastgele toplanan 384 canlı işçi arı örneği laboratuvara getirilmiştir.

Araştırması yapılan virüslerden DWV virüsü 128 arılıktan 28'inde %21,87 infeksiyon oranıyla belirlenirken CBPV virüsü ise tespit edilememiştir. Tespit edilen DWV virüsleri arasından rastgele seçilen bir izolatın kısmi kılıf protein gen bölgesi moleküler olarak pGEM T-Easy vektörüne klonlanmış ve nükleotit dizi sırası ortaya çıkarılmıştır.

DWV virüsü için 702 nükleotit içeren nükleotit dizi, MZ357973 erişim numarası ile gen bankasına (NCBI) kaydedilmiştir. DWV genoma ait dizinin filogenetik ilişkisi gen bankasında yer alan dünya çapındaki diğer aynı izolatlar kullanılarak karşılaştırılmıştır. DWV- Bingöl izolatı (MZ357973) %98,45 oranında en yüksek nükleotit benzerliği ile Türkiye izolatına (MW962982) ve en düşük %77,22 oranda ise İtalya izolatı (MT747987) ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada tespiti yapılan DWV virüsünün varlığı Bingöl ili açısından ilk rapor niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Balarısı, Bingöl, DWV, CBPV, karakterizasyon, Türkiye.

INVESTIGATION OF *CHRONIC BEE PARALYSIS VIRUS* AND *DEFORMED WING VIRUS* IN HONEY BEES IN BINGÖL PROVINCE AND THE MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF THE ISOLATES DETECTED

ABSTRACT

In this study, *Deformed Wing Virus* (DWV) and *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV) infections and prevalences in honey bees in Bingöl province were tested by RT-PCR method using primers specific to each virus. In survey studies, 384 live worker bee samples collected randomly from 128 different apiaries were brought to the laboratory.

Among the viruses studied, DWV virus was detected in 28 of 128 apiaries with an infection rate of 21.87%, while CBPV virus could not be detected. Among the detected DWV viruses, the partial coat protein gene region of a randomly selected isolate was molecularly cloned into the pGEM T-Easy vector and the nucleotide sequence sequence was revealed.

The nucleotide sequence containing 702 nucleotides for DWV was registered in the gene bank (NCBI) with the accession number MZ357973. The phylogenetic relationship of the sequence of the DWV genome was compared using other worldwide identical isolates in the gene bank. It was determined that DWV-Bingöl isolate (MZ357973) showed similarity to Turkey isolate (MW962982) with the highest nucleotide similarity of %98.45 and to Italy isolate (MT747987) at the lowest rate of %77.22. The presence of the DWV virus detected in this study is the first report for the province of Bingöl.

Keywords: Honeybee, Bingöl, DWV, CBPV, characterization, Turkey.

1. GİRİŞ

Avrupa bal arısı (*Apis mellifera* L.) 1758 yılında Linnaeus tarafından keşfedilmiştir (Engel 1999). Avrupa bal arısının taksonomideki yeri aşağıdaki gibidir.

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

Bal arıları, hem arı ürünleri açısından ekonomik olarak hem de bitkilerin tozlaşmasını gerçekleştirmesi açısından ekolojik anlamda son derece faydalı böceklerdir. Dolayısıyla bal arıları, bitkisel biyolojik çeşitliliği koruyarak ve tozlaşma yoluyla sürdürülebilir tarım ve gıda güvenliğini sağlayarak karasal ekosistemlerde hayati rol oynamaktadır. Bitkilerde meyve ve tohum oluşabilmesi için yeterli derecede tozlaşmanın sağlanması gerekmektedir özellikle açık alanlarda en iyi tozlaşmayı sağlayan böcekler bal arılarıdır (Akyol ve Camcı 1999). Yeni tarım uygulamaları ile artan pestisit kullanımı sonucunda birçok yabancı böceğin yok olmasından dolayı azalan polinasyon sonucunda ekolojik dengenin bozulmasına neden olmuştur. Yabancı böcek yoğunluğunun azalması ile bal arılarının önemini daha da artırmıştır (Akyol ve Korkmaz, 2005).

Bütün canlılarda olduğu gibi bal arısı kolonilerinde de birçok hastalık ve parazit ekonomik zarara neden olmaktadır. Arıların biyolojileri, üreme özellikleri ve yaşam şekilleri yanlış tarım uygulamaları ve konargöçer arıcılık sonucunda bu hastalık ve zararlıların arılıklarda hızla yayılmasına neden olmaktadır.

Bal arısı parazitleri ilk zamanlarda ülkemizde çok fazla zarar yaparak 600 bin civarında koloninin sönmesine ve 7000 -7500 ton bal kaybına neden olmuştur. Parazitlerin ülkede

görüldüğü yıllarda kovanların yaklaşık %50'sinin ilkel olması kolonilerdeki zarar seviyesinin daha fazla olmasına sebebiyet vermiştir (Akyol ve Korkmaz, 2005).

1.2. Balarısı Kolonisi, Koloni Bireyleri ve Görevleri

1.2.1. Ana Arı

Ana arı vücut yapısı itibariyle uzun ince olup diğer bireylere göre rengi açık ve parlaktır. Kanatlar kısa olup uçuş yetenekleri azdır sadece çiftleşme uçuşuna çıkarlar. Bacaklarında polen sepeti yoktur dilleri çok kısa olup iğneleri yoktur. Kendi kendini besleyemez. Beslenmeleri, bakıcı işçi arılar tarafından larva döneminden hayatlarının sonuna kadar arı sütü ile beslenen tek bireylerdir. Ana arı hayatı boyunca yalnızca oğul vermek ve çiftleşmek üzere kovandan çıkar. Temel görevi neslin devamını sürdürmek ve koloni sürekliliği için yumurtlayarak yeni nesiller meydana getirmektir. Kolonideki tüm bireyler ana arının yumurtladığı yumurtalardan gelişirler. Ana arı, 16 gün içerisinde ana arı hücresi veya anaarı yüksüğü içinde gelişerek ortalama 1 hafta sonra güneşli bir havada öğleden sonra erkek arılarla çiftleşme uçuşu gerçekleştirir. Daha sonra kovana dönerek 2-3 gün içerisinde yumurtlar. Ana arılar günde ortalama 2000-3000 yumurta bırakabilirler. Salgıladıkları feromonlarla kolonideki düzeni sağlarlar (Akyol ve Korkmaz, 2005; Powell et al., 2018).

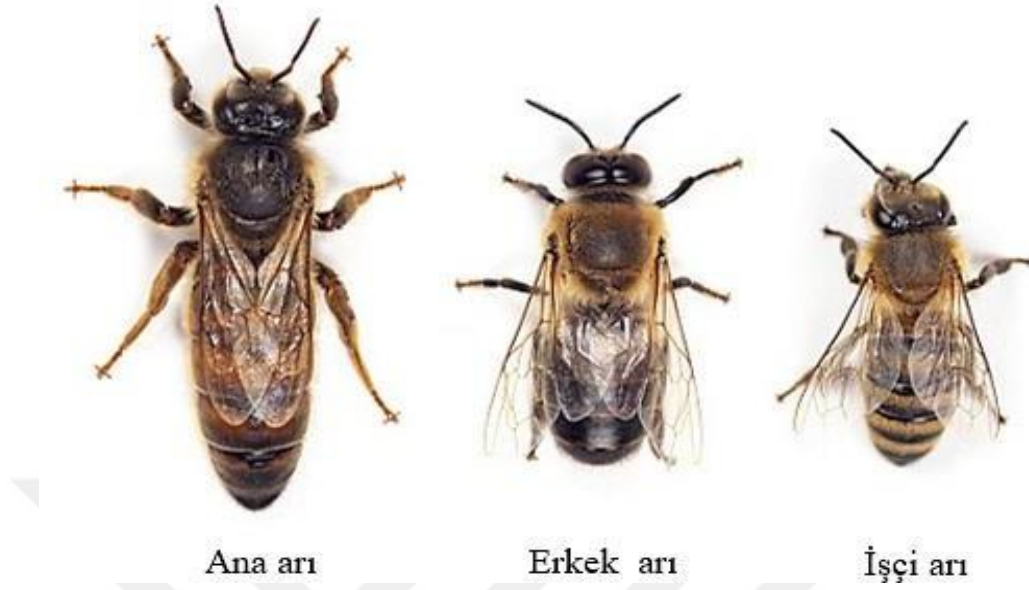
1.2.2. İşçi Arı

İşçi arılar döllenmiş yumurtadan meydana gelirler. Yumurta, larva ve pupadan toplam 24 gün içinde çıkarlar. Koloninin en küçük bireyi olup kanatları abdomen kısmını tamamen kapatır. Bazı faktörlere bağlı olarak kolonideki sayıları farklılık arz etmekte olup ilkbahar ve yaz mevsimlerinde 60-80 bin arasında değişmektedir. Kış aylarında ise bu sayı ortalama 10-15 bin arasındadır. Ömürleri kısadır ilkbahar ve yaz mevsimlerinde çok yoğun çalıştıklarından ortalama ömürleri 45-50 gündür. Kış mevsiminde bu süre birkaç ayı bulmaktadır. Kış mevsiminde kovanda yalnızca işçi arılar ve ana arı bulunur. Yumurtalıkları köreldiği için yumurtlama yetenekleri yoktur. Daha çok kovan içinde ve dışında görev alırlar. Koloninin tüm işlerini yerine getiren bireylerdir. Ana arıyı besleme, nektar toplama, su toplama, propolis toplama, polen toplama, petek örme, kovanın güvenliği, kovan temizliği vb. tüm iş ve işlemleri işçi arılar yerine getirir. Yaz döneminde

45-50 gün olan ömürlerinin ilk 21 günü kovanın içindeki işleri yaparlar. Bu görevler; larvaların beslenmesi, ana arının beslenmesi, kovanın havalandırılması, bekçilik, petek örme, mum salgılama vb. görevlerdir. Genç arılar, bal mumu ve arı sütü salgılayana kadar ilk etapta kovandaki iş ve işlemlerde görev yaparlar. Sonraki günlerde ise tarlacı arı olarak kovan dışında görev alıp nektar, salgı, polen, su ve propolis toplarlar (Akyol ve Korkmaz, 2005; Powell et al., 2018).

1.2.3. Erkek Arı

Kolonideki sayıları mevsime göre değişen özellikle oğul verme döneminde sayıları artan bireylerdir. Ana arıdan küçük işçi arılardan daha büyük bir yapıya sahipler. İşçi arıların getirdiği polen ve ürettiği bal ile beslenir. Çiftleşme organları dışında diğer arılarda bulunan hiçbir özelliğe sahip olmadıklarından kolonideki tek görevi kraliçe arıyı çiftleşme uçuşu sırasında dölemektir. Ortalama 30 günlük ömürleri vardır. 8 günde cinsel olgunluğa ulaşırlar. Erkek arı çiftleşme sırasında vücudunun alt tarafı koptuğu için ölür. Kolonideki varlığı mevsime göre değişkenlik gösteren özellikle oğul verme döneminde sayıları çoğalan ortalama sayıları 500-2000 arasında değişen bireylerdir. Kış mevsiminde yalnızca dişi arılar bulunduğundan erkek arılar ya kovan dışına atılır ya da ölürler. İşçi arılar, kış mevsiminin bitmesiyle erkek petek hücrelerini örmeye başlarlar. Ana arı bu hücrelere erkek arıları oluşturacak döllenmemiş yumurtalarını bırakır. Mayıs ayından itibaren erkek arılar çıkmaya başlar (Akyol ve Korkmaz, 2005; Powell et al., 2018).

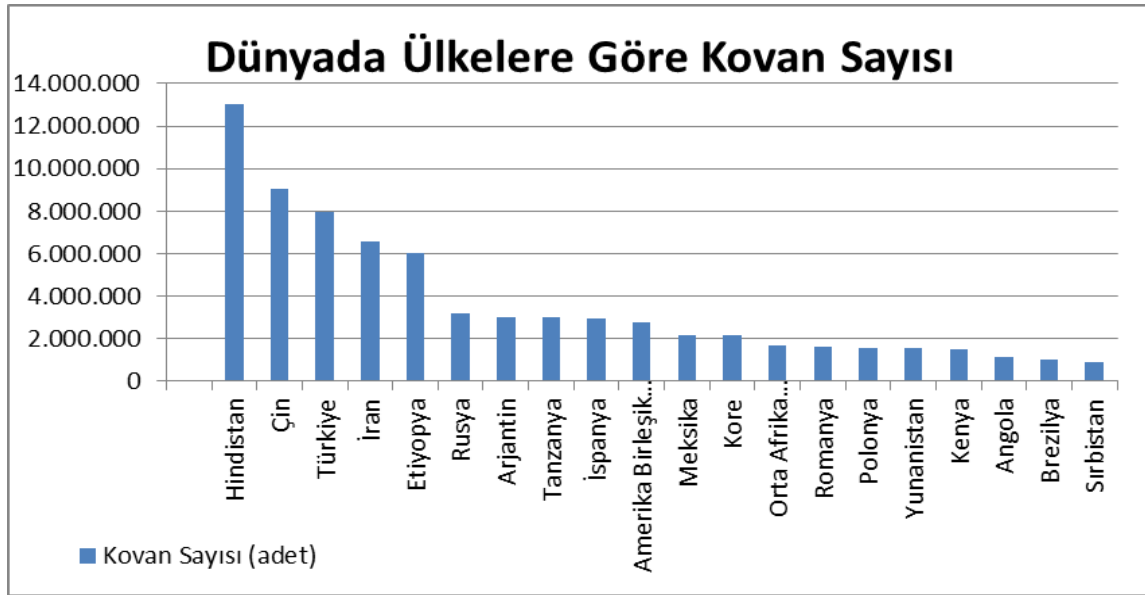


Şekil 1.1. Bal arısı koloni bireyleri

1.3. Türkiye ve Dünya Arıcılık Verileri

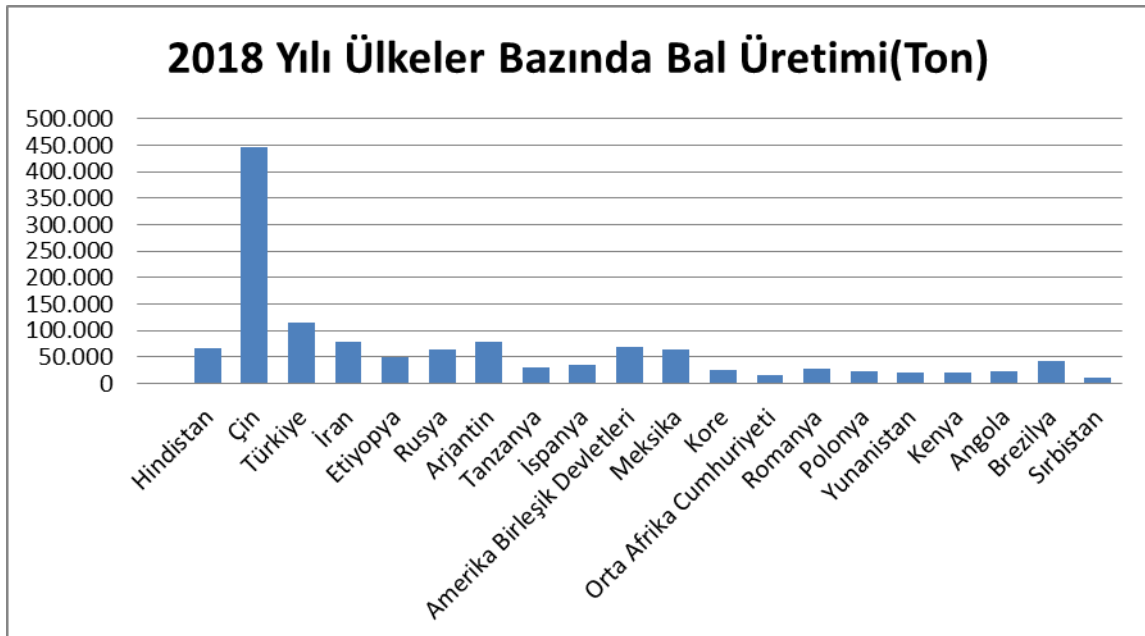
1.3.1. Dünyada arıcılık

Arıcılık dünya çapında yaygın olarak yapılan tarımsal bir faaliyettir. 2018 yılı itibarı ile dünya genelinde yaklaşık 92 milyon arı kolonisinin bulunduğu ve bunlardan yaklaşık 2 milyon ton bal üretildiği bildirilmektedir. Dünyada arılı kovan sayısı bakımından 2018 verilerine göre 13 milyonun üzerinde koloni ile Hindistan ilk sırada yer alırken, yaklaşık 8 milyonun üzerinde koloniye sahip olan Çin ikinci sırada 6 milyon kovan ile İran ve Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır. Dünyada üretilen bal miktarına bakıldığında 450 bin tonla Çin birinci sırada, yıllık 70 bin ile 100 bin ton arasındaki bal üretimleriyle Türkiye, Arjantin, İran ve ABD izlemektedir.



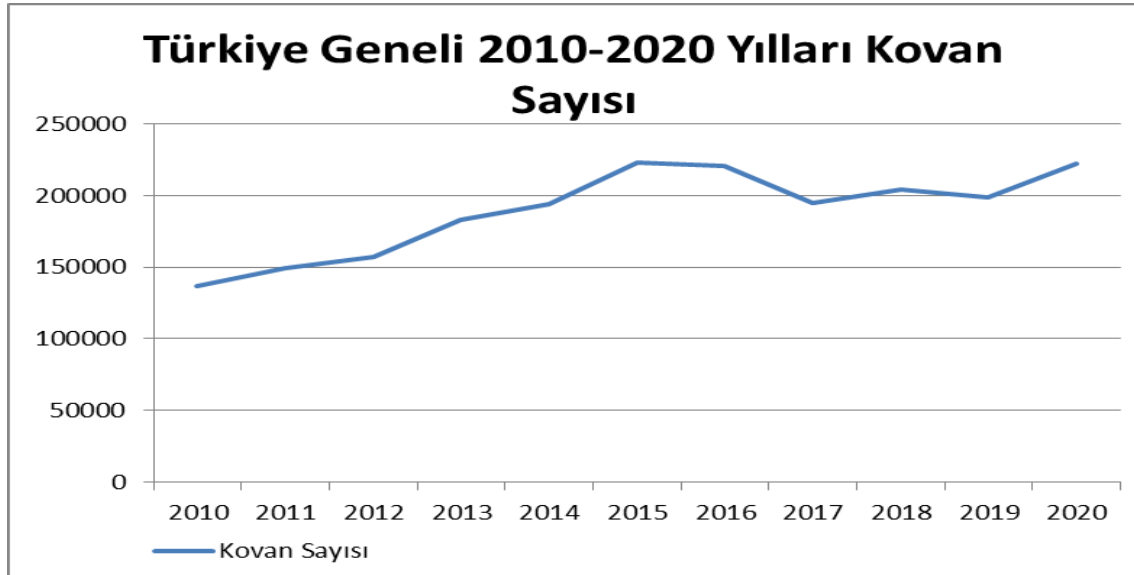
Şekil 1. 2. 2018 Yılı Dünya Arıcılık Verileri (Anonim 2021a)

Türkiye’de ortalama kovan sayısı Arjantin’in 3 katı olmasına rağmen verim bakımından ise Arjantin’in gerisinde olması, ülkemizdeki arıcılığın verim bakımından ciddi sıkıntıları olduğu aşıkardır (Şekil 1.2- Şekil 1.4).

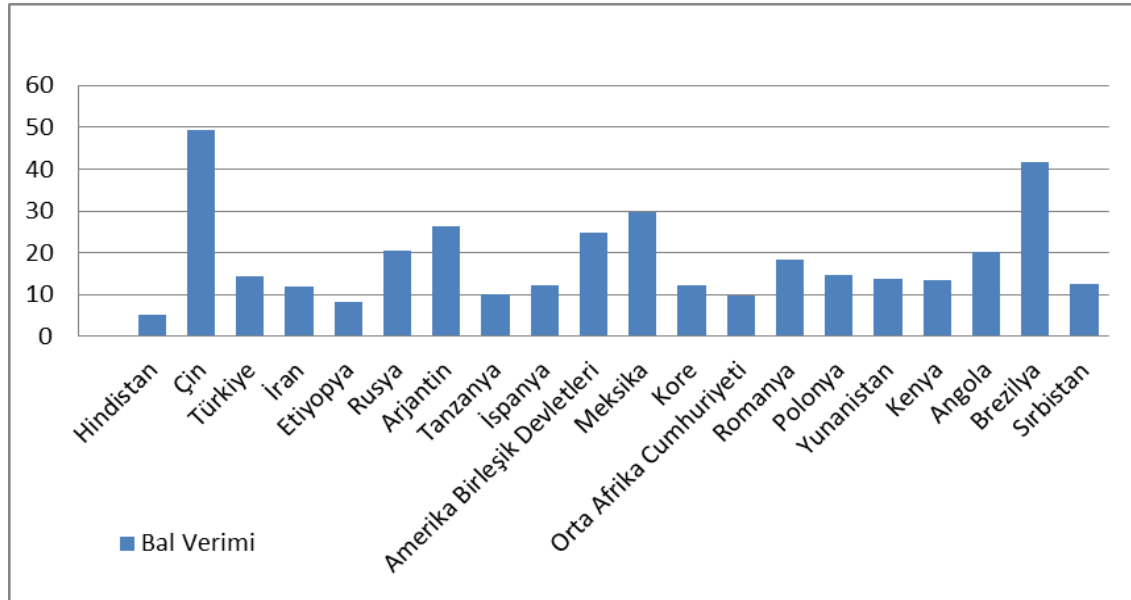


Şekil 1. 3. 2018 Yılı Ülkeler Bazında Bal Üretimi (Anonim 2021a)

Türkiye’de 2017 yılı itibari ile bal üretimindeki düşüşe rağmen kovan sayısında genel anlamda bir artış olsa da bu iki grafiğin tam bir paralellik göstermemesi ve uyuşmazlığı bu yıllarda arı sağlığı ve bakımı ile ilgili ülkemizde sıkıntı olabileceğini göstermiştir (Şekil 1.4, Şekil 1.6).



Şekil 1. 4. Türkiye Geneli 2010-2020 Yılları Kovan Sayısı



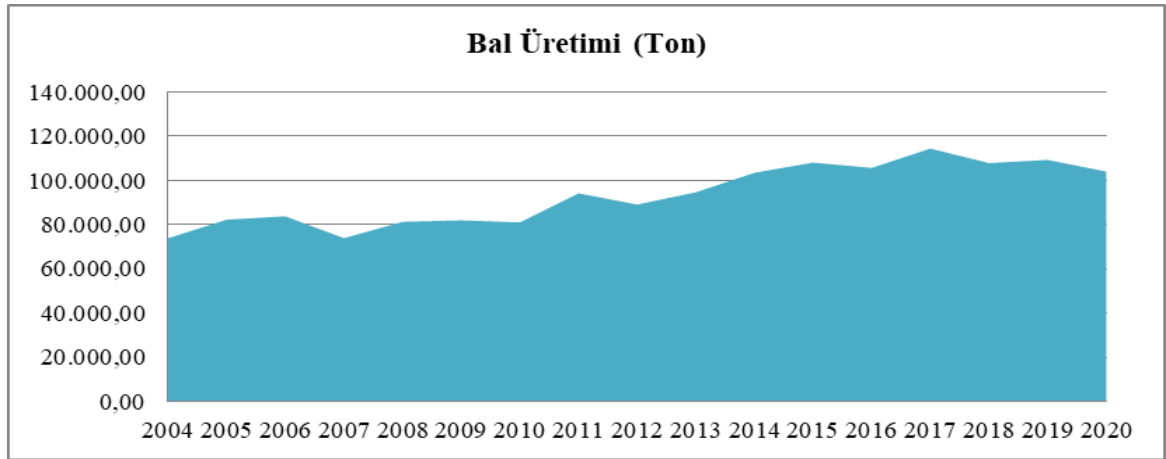
Şekil 1. 5. 2018 Yılı Ülkeler Bazında Bal Verimi (Anonim 2021a)

Tablo 1.1. Dünya arıcılık 2018 verilerine göre bal üretim miktarları bakımından ilk yirmi ülke sıralaması (Anonim 2021a)

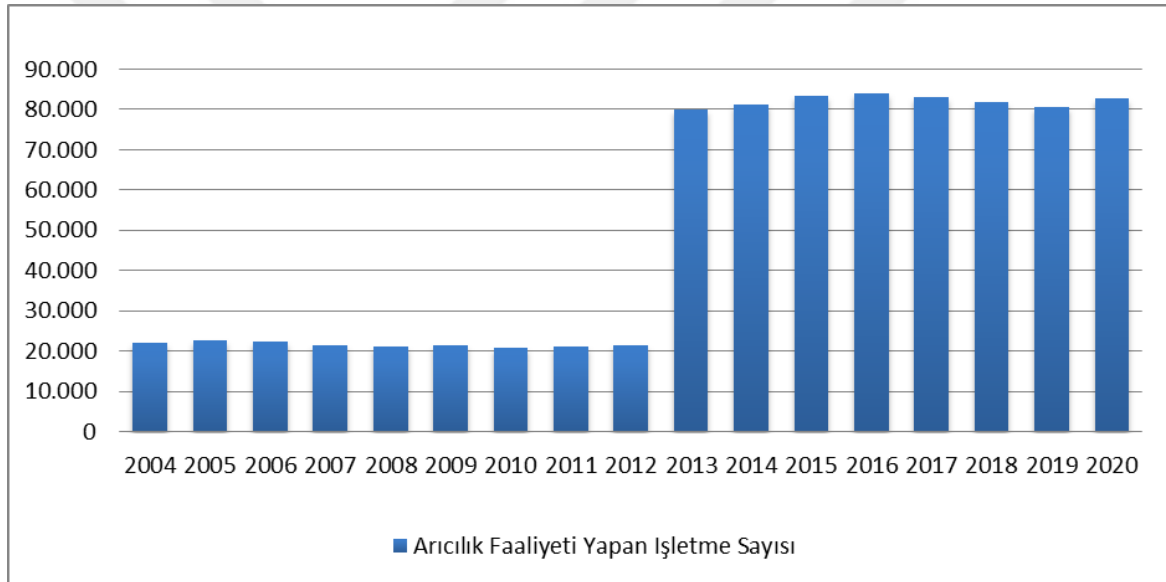
Sıra	Ülke	Kovan Sayısı (adet)	Bal Üretimi (ton)	Bal Verimi (kg/kovan)
1	HİNDİSTAN	13.048.275	67.442	5,17
2	ÇİN	9.048.546	446.900	49,39
3	TÜRKİYE	7.947.687	114.113	14,36
4	İRAN	6.601.394	77.567	11,75
5	ETİYOPYA	6.018.223	50.000	8,31
6	RUSYA	3.182.399	65.006	20,43
7	ARJANTİN	3.020.370	79.468	26,31
8	TANZANYA	3.019.784	30.584	10,13
9	İSPANYA	2.965.557	36.394	12,27
10	ABD	2.803.000	69.104	24,65
11	MEKSİKA	2.172.107	64.253	29,58
12	KORE	2.165.616	26.720	12,34
13	AFRİKA	1.679.762	16.200	9,64
14	ROMANYA	1.602.453	29.162	18,20
15	POLONYA	1.586.063	23.472	14,80
16	YUNANİSTAN	1.556.404	21.400	13,75
17	KENYA	1.533.668	20.525	13,38
18	ANGOLA	1.153.618	23.411	20,29
19	BREZİLYA	1.017.506	42.346	41,62
20	SİRBİSTAN	914.134	11.427	12,50

1.3.2. Türkiye Arıcılık Verileri

Türkiye'nin yılda dört mevsim yaşaması ve aynı anda farklı mevsimlere sahip bölgelerin olması ve zengin floranın varlığıyla gezginci arıcılık için uygun bir alan sunmasına rağmen kovan başı ortalama bal miktarının dünya standartlarının çok altında kalması Türkiye arıcılığında arı sağlığı ve bakımda problemlerin olduğu aşikârdır. Türkiye’de 2004-2020 yılları arasındaki bal üretimi (Tablo 1.5.) artan arı kovanı sayısına (Tablo 1.6) oranla daha fazla dalgalanma gösterip ciddi farklılıklar göstermektedir.



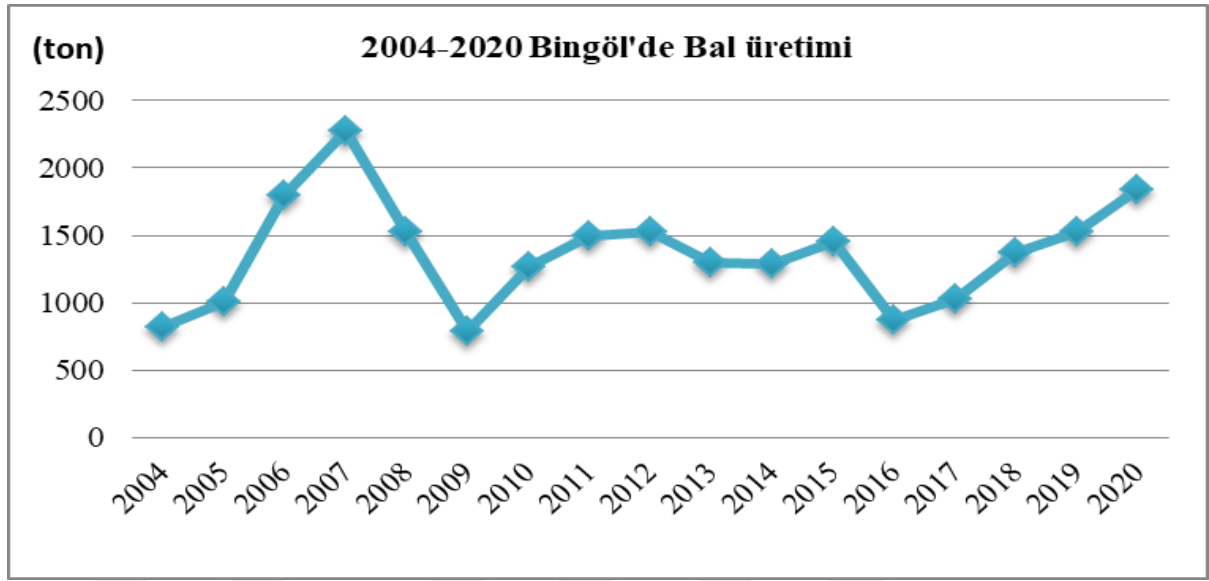
Şekil 1. 6. 2004-2020 yılları arası Türkiye de üretilen bal miktarının yıllara göre değişimi (Anonim 2021b)



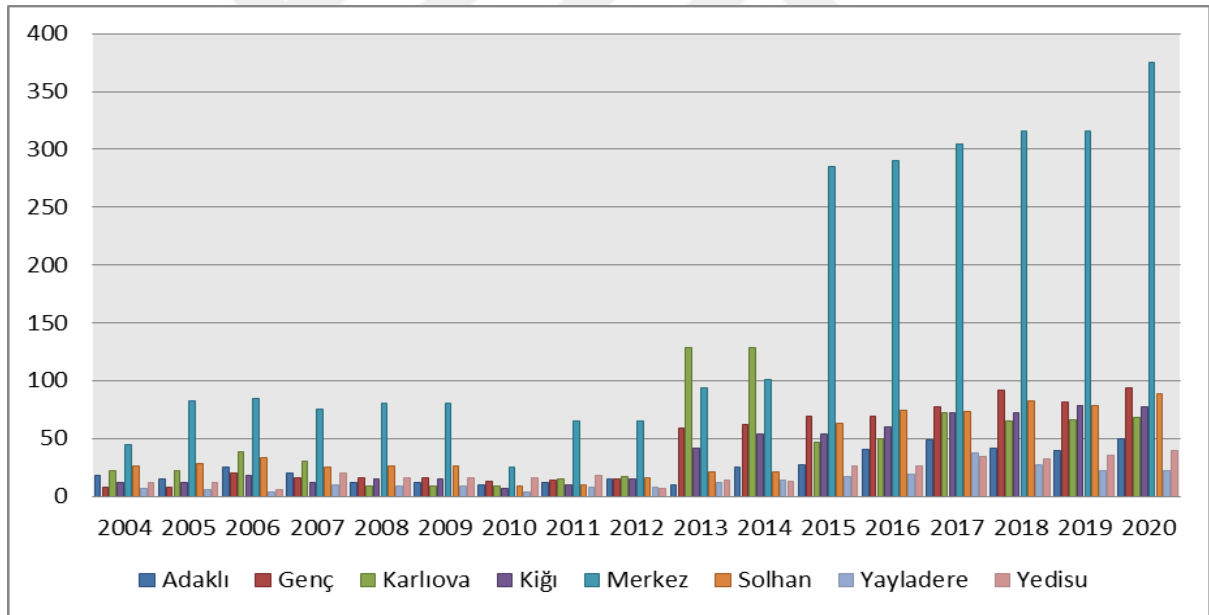
Şekil 1. 7. 2004-2020 yılları arası Türkiye’de bulunan arı kovan sayısının yıllara göre değişimi (Anonim 2021b)

1.3.3. Bingöl Arıcılık Verileri

Bingöl ilinin zengin bir floraya sahip olması arıcılık açısından ciddi bir potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır. Bingöl ilinin gerek mevcut su kaynakları, elverişli iklimi, verimli toprakları ile ve zengin bitki florasıyla arıcılık faaliyetleri bakımından doğal bir alt yapıya sahiptir. Bu özellikleri ile arıcılığa benzersiz fırsatlar sunan Bingöl ili bal üretiminde (Şekil 1.8.) ciddi miktarda dalgalanmaların olduğu ve 16 yıllık ortalamasının ise 2020 yılındaki bal üretimi ile neredeyse aynı doğrultuda olduğu görülmüştür.



Şekil 1. 8. 2004-2020 Bingöl'de bal üretimi (TÜİK, 2020)



Şekil 1. 9. Bingöl'de İlçeler Bazında 2004-2020 Arıcılık İşletme Sayıları (TÜİK, 2020)

Bingöl ili arıcılık işletmelerinden anlaşıldığı üzere koloni varlığı çok olmasına rağmen (Şekil 1.10.) bal üretiminde ve verim bakımından birçok ilden daha geri sıralardadır. Bu durumun ana sebepleri arasında bal arılarının birçok hastalık etmenini meydana getiren elverişli ortamların oluşmasıdır.

Dünyadaki bal arası ürünlerinin ticareti, kıtalar ve ülkeler arasında hızlı ulaşımı arı hastalıklarının kısa sürede tüm dünyada yaygın enfeksiyona neden olmuştur.

Bal üretimi ve bal arısı popülasyonunda önemli bir yere sahip olan ülkemizde, bal arılarda önemli hastalıklara sebep olan ve bal verimini önemli ölçüde azaltan arı patojenleri mevcuttur. Bu patojenlerin varlığı ilgili ülkemizde yeterince çalışma konusu olmadığı ve Bingöl ilindeki arı ürünlerinin daha düşük olmasının sebepleri arasında gösterilebilir.

Bingöl ilinde bal arılarının Deforme kanat virüsü (*Deformed wing virus*; DWV) ve Kronik arı felç virüsü (*Chronic bee paralysis virus*; CBPV) etmenlerinin neden olduğu viral hastalıklar ile ilişkili şu ana kadar herhangi bir çalışmanın yapılmadığı literatür taraması ile belirlenmiştir. Bu çerçevede, bu çalışmada bal arısı kolonilerinde ölümcül enfeksiyona neden olan iki virüs hastalığının RT-PCR yöntemi ile tespit edilmesi ve enfeksiyon oranının belirlenmesi amaçlanmıştır. İlaveten Bingöl iline ait tespit edilen viral izolatların ilgili genom dizileri klonlanarak nükleotit dizilerinin belirlenmesi ve bu dizilere dayanarak filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Arıcılık dünya genelinde yaygın olarak yapılan tarımsal bir faaliyet olduğundan dolayı bal arıları arasında bu güne kadar çok sayıda virüs hastalığı tespit edilmiştir. Bu virüslerden bazıları hem ekonomik zarara neden olup hem de bal arısı kolonilerinde tahripkâr olmaktadır. Bu çalışma kapsamında araştırılması yapılacak virüslerin dünya literatürüne göre isimlendirmeleri ve genel özellikleri aşağıdaki gibidir.

- *Deformed wing virus* (DWV)
- *Chronic bee paralysis virus* (CBPV)

2.1. Bal Arısı Virüslerinin Taksonomisi

Bal arısı virüsleri arasında *Apis mellifera filamentous virus* (AmFV) ve *Apis iridescent virus virüsleri* (AIV) dsDNA genomu sahipken diğer tüm bal arısı virüsleri ssRNA genomuna sahip olup Picornavirales takımına ait Iflaviridae ve Dicistroviridae familyalarına ait türlerdir (Mirada et al. 2013).

2.1.1. Dicistroviridae

Dicistroviridae familyasındaki bal arısı virüslerinde 9-10 kb uzunluğunda birbirinden ayrı iki açık okuma çerçevesi (ORF, 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 genomu ile kodlanırken yapısal olmayan proteinler ise 5' ucunda bulunan genomu tarafından kodlanmaktadır (Gordon and Waterhouse 2006). Dicistroviridae familyası ismini RNA genomunun iki farklı ORF'nin bir IRES ile ayrılması ile bu familya tanımlanmıştır.

2.1.2. Iflaviridae

Picornovirales takımında yer alan sadece Iflavirus genusuna sahip bu familyada genusunda dokuz virüs türü bulunmaktadır. Araştırmamızın konusu olan DWV, 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).

Çalışma konusunu oluşturan virüslerden DWV virüsü Iflaviridae familyasının Iflavirus genusun da yer almaktadır. Ancak CBPV virüsü henüz taksonomik olarak bir guruba dahil edilmemiştir (Anonim 2021c).

2.2. Deforme Kanat Virüs (*Deformed Wing Virus; DWV*)

2.2.1. Genel Özellikleri

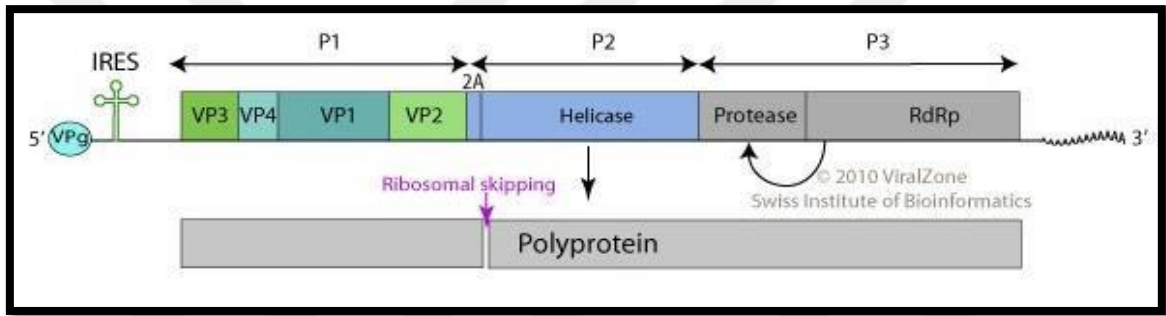
Deforme kanat virüsü, bal arılarının en önemli zararlısı olarak kabul edilen *Varroa destructor* paraziti tarafından istila edilmiş bir koloniden ilk kez 1980'lerin başında Japonya'da teşhis edilmiştir (Bailey ve Ball 1991). DWV şüana kadar tespiti yapılan bal arıları virüsleri arasında dünyada en yaygın bulunan arı virüsüdür (Roberts et al. 2017; Cirkovic et al., 2018).

DWV virüsü yaygın olarak ergin arılarda bulunmasına rağmen yumurta, larva ve pupa dönemlerinde de enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda sonbahar ve yaz aylarında etmenin koloni kayıplarına yol açtığı ve bu mevsimlerde görülme sıklığının arttığı tespit edilmiştir (Tentcheva et al., 2004).

DWV normalde gizli enfeksiyonlara neden olur ancak ektoparazitik *Varroa* akarı tarafından bulaştırıldığından morfolojik bozukluğa neden olarak hatta ölümüne sebebiyet verecek yıkıcı etkilere neden olabilir (Genersch et al., 2005).

2.2.2. DWV Virüsünün Genom Organizasyonu

DWV, Iflaviridae familyasının Inflavirus genusunda bulunan pozitif, tek iplikçikli 10,144 nükleotit uzunluğunda genoma sahip bir viral etmendir (Berenyi et al., 2006). Bu etmen polipeptit kodlayan 328 kDa büyüklüğünde uzun bir ORF içermektedir. Polipeptitte yapısal ve yapısal olmayan iki protein içerir. Yapısal olanı VP1 (44 kDa), VP2 (32 kDa), VP3 (28 kDa) ve VP4 olmak üzere dört tane protein alt biriminden oluşur. Yapısal olmayan kısımda ise RNA helikaz, RNA polimeraz ve proteaza protein alt birimlerinden oluşur (Şekil 2.1). Yapısal proteinler poliproteinin 5' ucunda yer alırken yapısal olmayan proteinler ise 3' ucunda yer alır (Lanzi et al., 2006).



Şekil 2.1. DWV'nin genom organizasyonu

2.2.3. DWV'nin Taşınması

DWV, *Varroa* akarı ile birlikte ektoparazit olarak enfeksiyona neden olur. *Varroa destructor* arılar arasında patojenin taşınmasında oldukça etkili bir vektör olmasının nedenlerinden biri, Varroa akarında arı virüslerinin tespit edilmesi ile bu parazitin virüsü aktif bir şekilde bal arılarına aktardığı öne sürülmektedir (Shen et al., 2005; Berenyi et al., 2006).

DWV virüsünün bal arılarına pupa ve larva dönemdeki bireylerin ergin arılar tarafından beslenmesi sonucunda bulaşma gerçekleşir. Larvalarda virüsün yoğun olmasıyla kovan dışına atılması sırasında virüs etmeninin ergin bireylere bulaştığı rapor edilmiştir. DWV etmeni arıların hipofarengial bezlerine yapışır ve bakıcı arılar larvaları besleme esnasına virüsü bulaştırır ve enfeksiyon yayılır. DWV virüsü üreme organlarında lokalize olan

yumurtalarda, semende tespit edilmesi hastalığın genital yolla da bulaşabileceğini göstermektedir (Yue et al., 2005; Maramorosch and Shatkin 2007).

2.2.4. DWV'nin Oluşturduğu Simptomlar

Kanatların deformasyonu (körelmiş veya deforme), karın kısmı şişmiş ve kısalmış olup ergin arılarda hızlı ölümün ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Abdomenin kısalması, şişkinliği ve rengin koyulaşması DWV virüsünün bilinen belirtileri olup bunlarla beraber çok sayıda bal arısının ölmesi ile karakterize edilir. Aynı zamanda DWV ile bulaşık bal arıları belirti göstermeyebilir (Chen ve Siede 2007).



Şekil 2. 2. DWV ile infekteli arıların görünümü

2.3. Kronik Arı Felç Virüsü (*Chronic Bee Paralysis Virus; CBPV*)

2.3.1. Genel Özellikleri

Kronik arı felç virüsü (CBPV), bal arısı kolonilerinde önemli kayıplara neden olabilen yaygın bir tek sarmallı RNA virüsüdür. İlk olarak 1963 yılında hastalık belirtisi olan bal arısı kovanlarından izole etmişlerdir. Bu enfeksiyonun yaygınlığı herhangi bir mevsimsel döneme bağlı kalmayıp tüm mevsimlerde enfeksiyon yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Bailey et al., 1963; Tentcheva et al., 2004). CBPV virüsü bal arılarının

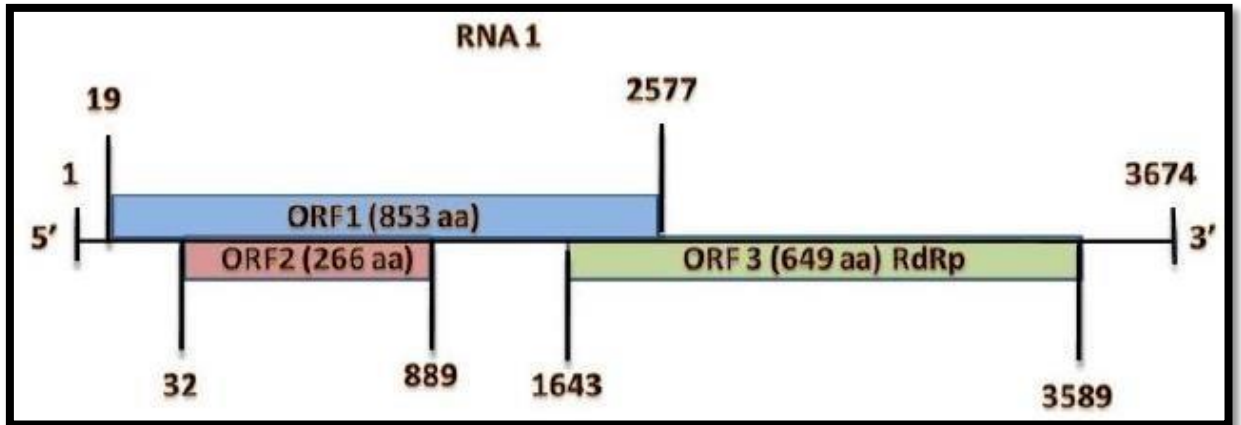
bütün bireylerinde tüm gelişim evrelerinde (ergin, pupa, larva ve yumurta evreleri) izole edilmiştir (Chen et al., 2006b).

CBPV ile infekteli kolonilerden yıl boyunca felçli arı olmakla birlikte genellikle yaz aylarında daha fazla ölüm gerçekleşir. CBPV virüsünden ciddi şekilde etkilenen koloniler, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde koloni çöküşüne neden olmaktadır (Ribiere et al., 2007).

Beslenmenin yetersiz olması, kışlamanın olumsuz geçmesi veya erken yaz dönemindeki olumsuz hava koşulları bu salgınları artırdığını öngörmüşlerdir (Allen ve Ball, 1996; Bailey et al., 1983).

2.3.2. CBPV Virüsünün Genom Organizasyonu

CBPV genomu, iki parçalı, tek zincirli pozitif anlamlı RNA' dır. Bu iki ayrı parça RNA1 ve RNA2 olarak isimlendirilip, RNA1 3674 nt içermekte (Şekil 2.3) RNA2 ise 2305 nt sahip olup 5' ucunda adenin kuyruğu içermemektedir RNA1 içindeki ORF 3'ün dizisi diğer arı virüslerinin RdRp enzimlerine ait dizilere benzemektedir (Olivier et al., 2008a; Ribiere et al., 2010).



Şekil 2. 3. CBPV 'nin genom organizasyonu

2.3.3. CBPV'nin Taşınması

CBPV bal arılarına enjeksiyon, püskürtme ve beslenme yoluyla bulaştığı rapor edilmiştir (Ball, 1999a). CBPV bal arısının besin kaynakları arasından polende rastlanmış ancak balda ve arı sütünde rastlanılmamıştır (Chen et al., 2006a). CBPV, bal arıları (*A. mellifera*) dışında akar (*V. destructor*) ve karıncalarda (*Camponotus vagus*, *Formica rufa*) rastlanmıştır (Celle et al., 2008).

CBPV virüsü enfekteli arıların dışkısında tespit edilmiştir. Gıda kaynaklı bulaşmanın diğer bulaşma yollarına göre daha büyük istatistiksel öneme sahip olduğunu öngörülmüştür (Chen et al., 2006a).

2.3.4. CBPV'nin Oluşturduğu Simptomlar

CBPV virüsü bulaşmış bal arıları iki farklı semptom göstermektedir. Birinci gruptaki belirtilerde arıların rengi koyulaşıp abdomen kısmı parlak ve pürüzsüz bir hal almaktadır. Bu arılar kolonideki görevlerini yerine getirmedikleri gibi belirtilerden dolayı morfolojileri değiştiğinden bekçi işçi arıların saldırılarına uğramaktadırlar. İkinci grup semptom gösteren arılarda ise titreme oluşur, uçamazlar ve en sonunda şiddetli felç belirtileri gösterip, ölmektedir (Ribière et al., 2000).

CBPV en yaygın olan enfeksiyonu şu şekilde karakterize edilmiştir; vücudun ve kanatların anormal titremesi, şişmiş karın bölgesi ve kısmen ayrılmış “K” şeklinde uçamamaya neden olan kanatlar. Karın şişkinliğinin sonucunda meydana gelen ishal belirtisi ve enfekteli bal arıların enfeksiyon başlangıcını takiben 2-3 gün içinde ölmesiyle karakterize etmişlerdir (Ribière et al., 2007). Ana arılarda ve yumurtalar dahil tüm yavrularının gelişim aşamalarında CBPV' nin tespiti etmişlerdir (Blanchard et al., 2007; Ribière et al., 2010).



Şekil 2. 4. CBPV ile infekteli ergin arıların görünümü

2.4. Türkiye’de Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

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 unsurları ile ilgili yapılan epidemiyolojik 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.

DWV virüsü, Türkiye’de (Muz ve Muz 2009; Gümüşova vd., 2010; Karapınar vd., 2018; Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2019; Cagırgan vd., 2020; Rüstemoğlu 2020; Kalaycı vd., 2020; Güller vd., 2021) tarafından farklı bölgelerde tespit etmişlerdir. Doğu Karadeniz Bölgesi’nde yapılan çalışmada %25 oranında DWV tespit edilmiştir (Gümüşova vd., 2010). Aydın, Bursa, İzmir, Kütahya, Manisa, Muğla ve Adana illerinden koloni kaybı şikayeti olan 2016 yılından 9, 2017 yılından 38 ve 2018 yılından ise 29 arılıklarından örnekler alınarak teste tabi tutulmuştur. Bu örneklerin %18,4 (14/76)’de CBPV tespit edilmiştir (Kalaycı vd., 2020).

Karapınar vd., (2018), Van ilinde 26 arı kovanından 260 yetişkin bal arısı test edilmiş ve DWV ve BQCV’nin viral enfeksiyonları sırasıyla %69,23 ve %88,46 oranlarında tespit

edilmiştir. Rüstemoğlu (2019), RT-PCR testi kullanılarak, Şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin, Siirt ve Şırnak illerinde alınan 24 bal arısı örneğinden %37,75 oranında DWV enfeksiyon tespit edildi.

Kalaycı vd, (2020), Bursa, Kütahya, Manisa, İzmir, Aydın, Muğla ve Adana'dan koloni kaybı şikayetleri ile toplanılan 76 arılıktan örnekler test edilmiştir. DWV virüsü %44.7 oranıyla en yaygın virüs olarak rapor edildi. Ayrıca, diğer virüsler sırasıyla ABPV %35,5, BQCV %28,9, SBV %22,3, CBPV %18,4'ü ve IAPV %6,5'inde tespit edilmiştir. Yürütülen diğer bir çalışmada, DWV'nin 484 bp uzunluğundaki helikaz gen bölgesi çoğatılmış ve Burdur ilinde 15 arılığın 13'ünde DWV tespit edilmiştir. Ayrıca nükleotid dizisi karakterize edilen iki izolat arasında %98 benzerlik tespit edilmiştir (Cagırgan vd., 2020).

Gülmez vd., (2009), Ordu ilinde yaptıkları çalışmada toplamda 5 farklı arı kolonisinden işçi ve erkek arı örnekleri toplanmış ve moleküler testler uygulanmıştır. Bu testler sonucunda DWV'ye özgü 395 bp uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir. Güller vd., (2021), 2020 kasım ayında Erzincan ilinden toplanan ve virüs şüphesi olan bal arısı örneklerine, DWV enfeksiyonunun tespiti için moleküler testler uygulanmış ve bu testler sonucunda 12 örneğin 6'sında (%50) 700 bp büyüklüğünde DNA pozitif bandı elde edilmiştir.

CBPV virüsü, Türkiye'de (Gümüşova et al., 2010; Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2019; Kalaycı vd., 2020) farklı bölgelerde ve farklı oranlarda enfeksiyon tespit edilmiştir. Gümüşova vd., (2010), Karadeniz bölgesinde (Sinop, Samsun, Amasya, Giresun, Trabzon, Rize) yaptıkları bu çalışma kapsamında 28 arılıktan 280 işçi arı örneği RT-PCR ile test edilmiş ve sonuç olarak, CBPV virüsü ait enfeksiyon oranı %25 olarak rapor edilmiştir.

2015 yılında Hakkari ilinde toplam 90 arı kolonisinde bal arılarında CBPV ve DWV enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlıkları RT-PCR yöntemi ile ilk defa araştırılmıştır. Çalışmada rastgele toplanan arı örneklerinin %23'ünde DWV ve %9'unda CBPV viral enfeksiyonu tespit edilmiştir (Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2019). Kalaycı vd (2020), Bursa, Kütahya, Manisa, İzmir, Aydın, Muğla ve Adana illerinde yürüttükleri çalışmada

totalde 76 arılıktan toplanılan örnekler testlenmiş ve CBPV virüsü yayılımının %18,4 oranında olduğu rapor edilmiştir.

2.5. Dünyada Arı Virüsleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

DWV ile ilgili çalışmalar dünya çapında geniş araştırma alanını oluşturmaktadır. Virüs birçok ülkede farklı frekansta olduğu bildirilmiştir. Mevcut literatür taramalarına göre DWV ABD’de yaklaşık %60 (Chen et al., 2004b; Welch et al., 2009), Avusturya’da % 91 (Berenyi et al., 2006), Brezilya’da %20,3 (Weinstein-Teixeira et al., 2008), Danimarka’da %55 (Nielsen et al., 2008), Fransa’da %97 (Tentcheva et al., 2004), İngiltere’de (Baker ve Schroeder, 2008), İspanya’da %18,6 (Antunez et al., 2012), Kuzey Tayland (Sanpa ve Chantawannakul, 2009), Tayland’da %33 (Sanpa ve Chantawannakul, 2009) Uruguay’da %100 (Antunez et al., 2006), Ürdün’de %92 (Haddad et al., 2008), Yunanistan’da %87 (Bacandritsos et al., 2010) enfeksiyon oranına sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bal arılarının CBPV enfeksiyonu da kapsamlı bir şekilde rapor edilmiştir. Dünya genelinde Büyük Britanya (Bailey et al., 1981), Fransa (Ribiere et al., 2002; Tentcheva et al., 2004), Uruguay (Antunez et al., 2005; 2006), ABD (Chen et al., 2006a; 2006b), Yunanistan (Bacandritsos et al., 2010), Avusturya (Berenyi et al., 2006), Yeni Zelanda (Todd et al., 2007), Danimarka (Nielsen et al., 2008), Brezilya (Weinstein-Teixeira et al., 2008), ve Polonya, İspanya, Belçika, Macaristan, İsviçre (Blanchard et al., 2009) gibi birçok ülkede bu virüsün varlığı belirlenmiştir.

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 yapmışlardır. Araştırma sonuçları yetişkin arı bulunan kovanların %97’sinde DWV ve %58’inde CBPV virüsünün varlığını göstermiştir. Kovandaki pupalarda %94 oranında DWV enfeksiyonu belirlenirken CBPV ise kovanlarının hiçbirinde belirlenememiştir. Aynı çalışmada varroa istilası olan kovanların %100’ünde DWV virüsüne rastlanmıştır.

2.6. Arı Virüsleri ile Mücadele ve Kontrol

Bal arısı virüslerinin yaygınlaşması, arı ve arı ürünlerinin kovandan kovana değişimi sırasında ve aynı zamanda steril olmayan alet ve ekipmanların kullanımı büyük bir oranda neden olmaktadır. Viral hastalıklar arıların bağışıklık sistemlerini zayıflatarak strese sokar ve hastalıkla mücadele edemeyecek bir seviyeye düşürerek koloni çöküşüne sebebiyet verebilir. Viral hastalıkların vektörü olan varroa akarı istilasına karşı yapılabilecek etkili bir mücadele aynı zamanda viral hastalıklara karşı yapılan en iyi mücadele yöntemidir (Chen 2011).

Kovanların nemden korunması için yerden yükseğe konulması gerekir. Kovanların güneş alacak şekilde konumlandırılması, rüzgârdan korunaklı alanların tercih edilmesi ve enfeksiyonlu arılıklardan ya da kovanlardan bal, çıta, petek, gibi arı ürünleri ve arıcılık malzemelerinin değiş tokuşu yapılmaması viral enfeksiyonlara neden olan patojenler ile mücadelede önemli hususlardır. Varroa ve diğer hastalık/zararlılar ile yapılan mücadele sayesinde aynı zamanda arı virüsleri ile de mücadele edildiği unutulmamalıdır.

Arı kolonilerinin stres faktörlerinden korunması için kış şartlarına hazırlayarak koloninin güçlü tutulması aynı zamanda viral enfeksiyonlardan korunmasında önemli bir etkidir. Viral etmenler, koloni nakilleri sırasında veya ana arı yoluyla yayılarak koloni kayıplarına sebebiyet vermektedir. Bu kayıpların önlenmesi için sadece kimyasal mücadele yetersiz kalmaktadır. Ayrıca virüslere karşı dayanıklı arı ırklarının seçilmesi, hastalığın yoğun olduğu kolonilerde belirti gösteren ana arının sağlıklı kolonilerden elde edilen bir ana arı ile değiştirilmesi hastalığı ortadan kaldırır (Di Pasquale et al., 2013).

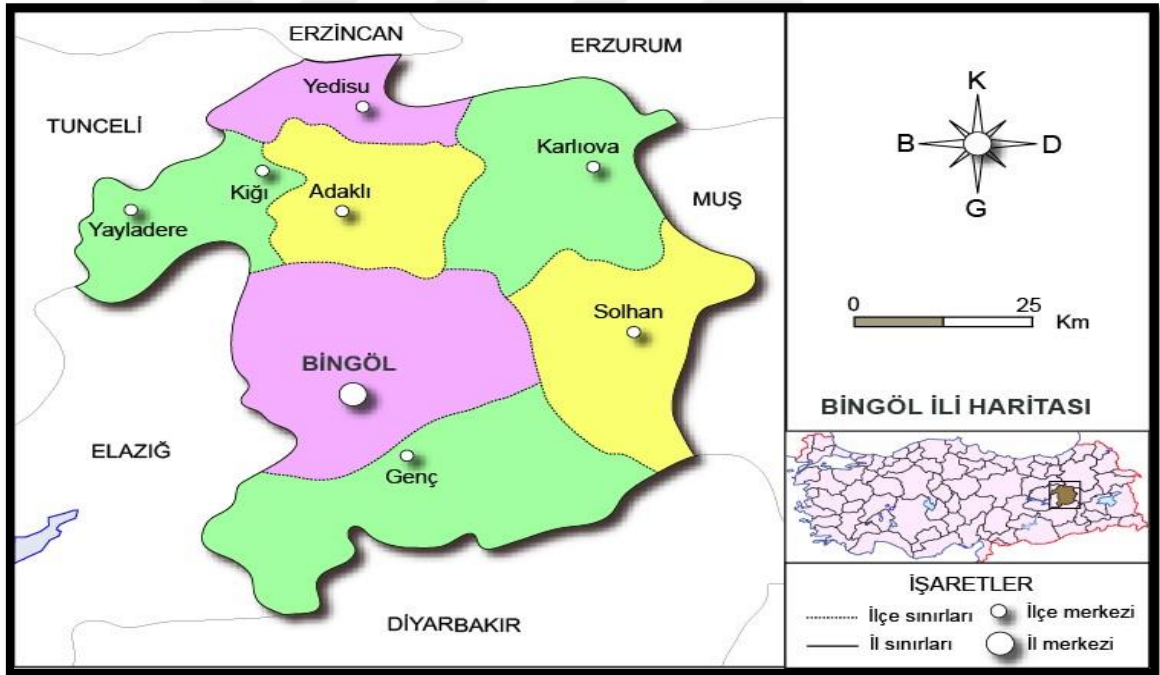
Arı kolonilerinde parazitlerle mücadele, arıların hastalıklara karşı doğal direncin artmasına aynı zamanda parazitlerle yapılan enfeksiyonların azalmasında oldukça önemlidir. Varroa ile mücadelede fiziksel, kimyasal, biyolojik, bitkisel, hormonal ve genetik mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Aksi takdirde yanlış mücadele yöntemleri veya yanlış ilaç kullanımı varroa akarının kimyasal maddelere karşı daha direncini arttırmasına sebep olabilir. Arı ölümlerinin görüldüğü popülasyonlarda enfeksiyonel mikroorganizmalara bağlı hastalıkların doğru teşhisi yapılarak ona göre mücadele ve kontrol programları uygulanmalıdır (Usta ve ark., 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sürvey Alanı

2020 yılında Bingöl ili Merkez ile Solhan, Genç, Karlıova, Yedisu, Adaklı, Kiğı ilçe merkez ve köyleri çalışmamızın survey alanını oluşturmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Survey yapılan Bingöl İli ve ilçeleri haritası

3.1.2. Hayvansal Materyal

2020 yılında Nisan, Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında Bingöl ili ve ilçelerinden arılıkları temsil edecek şekilde arı örnekleri toplanmıştır. Survey

çalışmalarımızda belirti gösteren ve belirti göstermeyen bal arılarından toplanan canlı işçi arılara ait örnekler çalışmamızın ana materyallerini oluşturmuş olup örneklerin toplandığı yer ve tarih aşağıdaki tabloda (EK-1) belirtilmiştir. Örnekleme her arılıktan en az 5-10 örnek olacak şekilde, arılığı olabildiğince temsil edebilecek biçimde arılığın farklı bölgelerinden yapılmıştır. Örneklemede simptom gösteren ve göstermeyen kovanlardan rastgele arı numuneleri toplanmıştır. Toplanan arı örnekleri pet şişelere konularak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve total RNA ekstraksiyonu yapılncaya kadar -80°C de saklanmıştır.

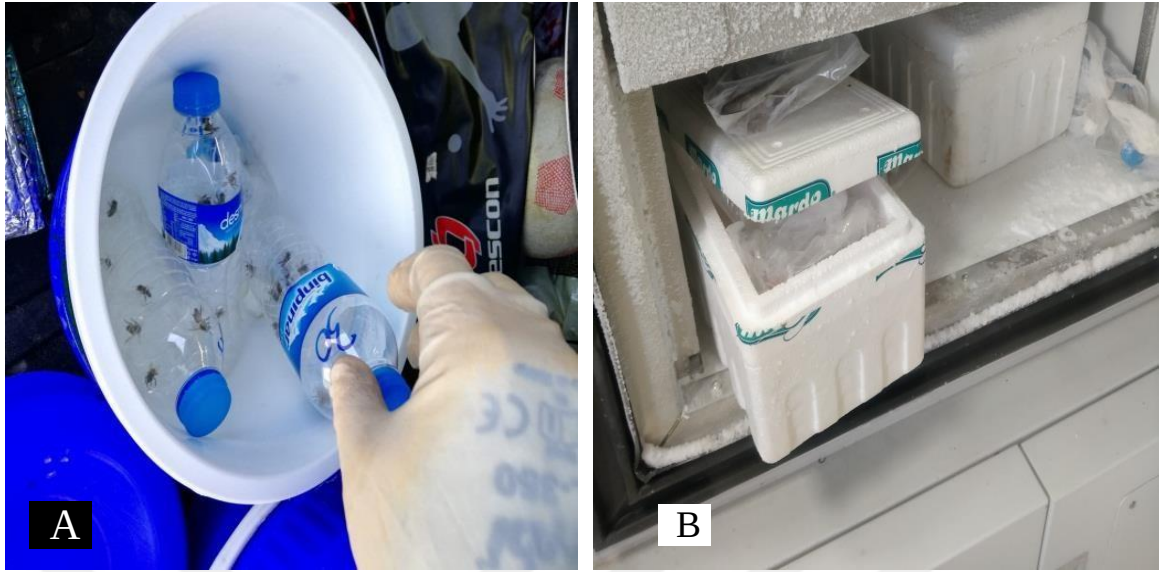
3.2. Yöntem

3.2.1. Survey Çalışmaları

Survey çalışmaları Bingöl Tarım ve Orman Müdürlüğü Arıcılık Birimi ve Arıcılar Birliği ile koordineli çalışılarak alınan bilgi doğrultusunda arıcıların arılık yerleri dikkate alınarak arıcılığın yoğun olarak yapıldığı Bingöl ili merkez ve köylerinde, Solhan, Genç, Karlıova, Yedisu, Adaklı, Kiğı ilçe merkez ve köylerinde yürütülmüştür. Alınan arı örnekleri arıcıların şikâyet ettikleri ani koloni çökmesi, felç, arıda renk koyulaşması, kanat deformasyonu, diyare ve tüy dökmesi gibi belirtilerin olduğu kolonilerden ve belirti göstermeyen arılıklardan rastgele toplanmıştır. Her bir arılıktan 3 adet örnek olmak üzere 128 arılıktan totalde 384 bal arısı örneği toplanmıştır (Tablo 3.1).

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

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



Şekil 3.2. A) Toplanan örneklerin pet şişelerle taşınması B) Araziden toplanmış örneklerin derin dondurucuda steril tüplerde saklanması

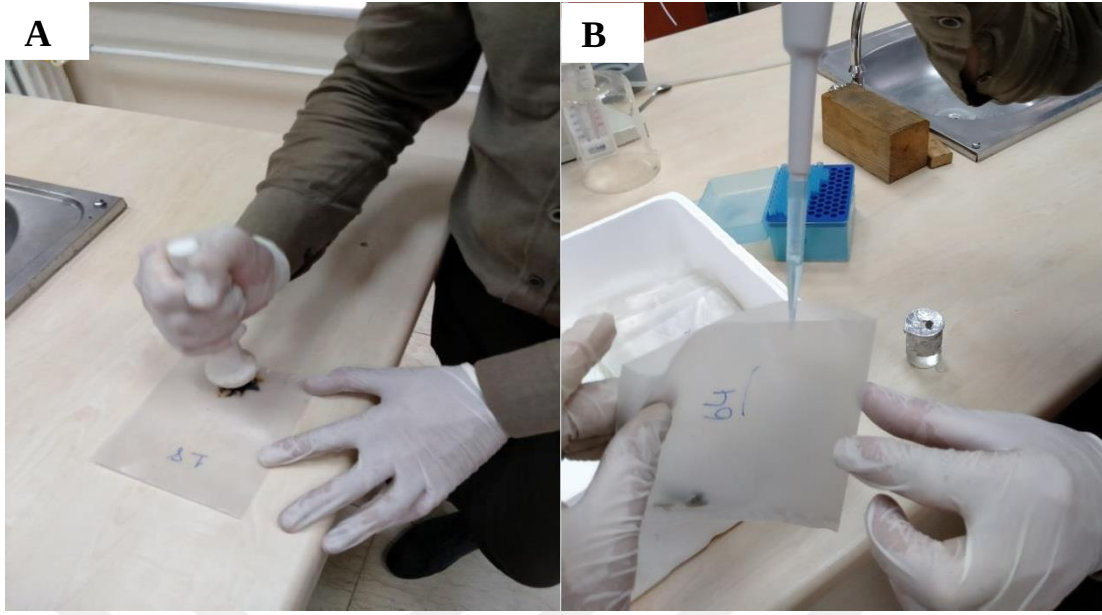
3.2.2. Viral Enfeksiyonların Araştırılması

Toplanan işçi arı örnekleri DWV ve CBPV virüsleri için Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu (TNA), Komplementer DNA (cDNA) sentezi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Moleküler Karakterizasyon adımlarından oluşan aşamalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Total nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu

Bingöl ilinden toplanan bal arısı örneklerinde RNA yapılı DWV ve CBPV virüs enfeksiyonlarını belirlemek için total nükleik asit ekstraksiyonu Foissac ve ark. (2001) tarafından rapor edilen silika temelli metoda göre yapılmıştır.

Buna göre her arılıktan alınan 3 örnek, 1 ml ekstraksiyon tamponu (grinding buffer) eklenerek plastik torba içerisinde ezilmek suretiyle homojenize hale getirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. A) Bal arısı örneklerinin ezme tanponu ile plastik torba içerisinde ezilmesi, B) Örneklere ezme tamponunun eklenmesi

Homojenize edilen örneklerden 500 μ l tüplere alınıp, üzerine 100 μ l %10 Sarcosyl solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler 2-3 sn vortekslenerek 10 dakika süreyle 70°C de inkübe edildikten sonra 5 dakika süreyle buza daldırılarak bekletilmiştir. 13.000 rpm’de 10 dk santrifüjün ardından üst fazdan 500 μ l alınarak yeni bir 1,5 ml’lik yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 30 μ l silika, 150 μ l etanol ve 300 μ l NaI eklenmiştir. Yeni karışım, oda sıcaklığında sallayıcı (shaker) üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler 6.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş, üstteki sıvı (supernatant) atılmış ve yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama işleminde, tüplere 500 μ l yıkama tamponu (wash buffer) ilave edilerek vorteks ile çözündürme işlemi uygulanmış ve 6.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve yıkama işlemi bir kez daha gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrasında tüpün dibinde kalan silika 100 μ l RNase-free su ile çözündürüldükten sonra ve 4 dakika 70°C de kuru blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildikten sonra supernatant yeni tüplere aktarılmıştır. Elde edilen her örneğe ait RNA’lar komplemanter DNA elde edinceye kadar -20 °C’ de saklanmıştır.

3.2.2.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın Sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez aşamasında Pcr tüpü içerisine, Nükleaz-free su 8 µl, revers primerden 1'er µl, 1 µl dNTP karışımı ve 2 µl total RNA eklenerek karışım 12 µl'ye tamamlanmıştır.

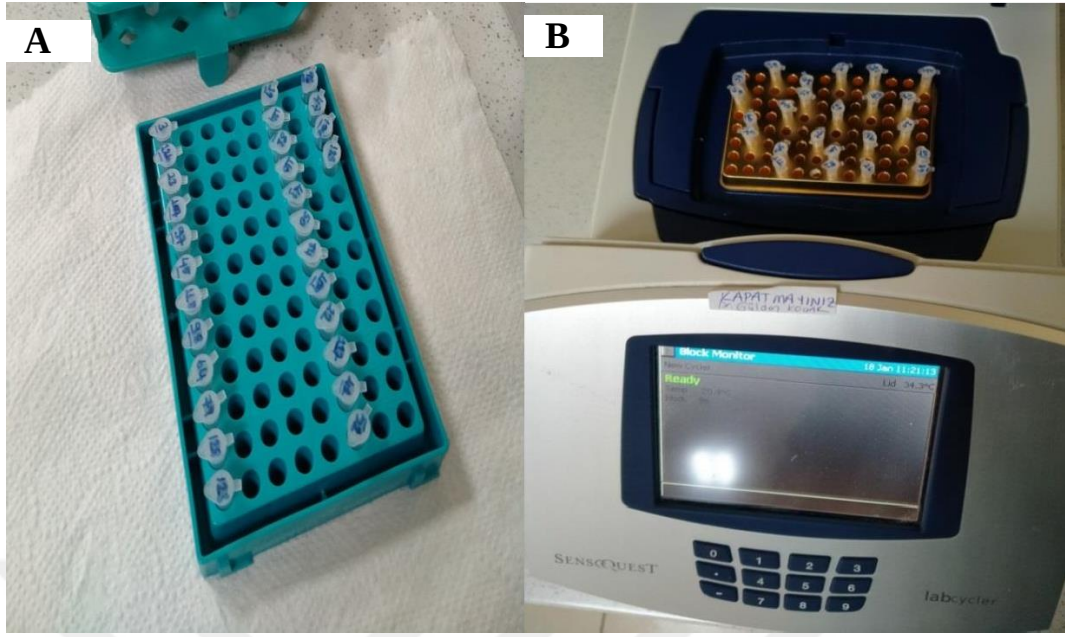
Hazırlanan bu karışım 5 dakika 65 °C de PCR cihazında inkübe edildikten sonra soğutulması için buzda bekletilmiştir. Daha sonra 4 µl 5X buffer, 1 µl RNase, 2 µl DTT ve 1 µl RT enzimi eklendi ve her bir tüpe 8 µl bu karışımdan eklenerek toplam hacim 20 µl ye tamamlanmıştır. Daha sonra PCR cihazında 42°C' de 50 dk inkübe edilmiştir. Son olarak PCR cihazında 70 °C de 15 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA' lar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları

RT- PCR ile bal arısı virüslerinin teşhisinde yapılması için steril bir PCR tüpüne her bir örnek için aşağıdaki bileşenler karıştırılmıştır.

- 18.3 µl RNase free su,
- 2.5 µl 10X PCR tampon solüsyonu,
- 1.5 µl 2.5 mM MgCl₂,
- 0.5 µl 10 mM dNTPs,
- 0.5 µl 20 pmol/µl Forward(İleri) primer,
- 0.5 µl 20 pmol/ µl Reverse (geri) primer,
- 0.2 µl *Taq* DNA Polimeraz enzimi
- 3 µl cDNA

Karışım her bir PCR tüpüne 25 µl konularak tüpler vorteksenerek PCR cihazına yerleştirilmiştir. Her iki virüsün moleküler testlerinde aynı PCR döngüleri kullanılmıştır. Buna göre, PCR cihazı sırasıyla 94°C de 2 dakika ön denaturasyondan sonra 40 döngüden oluşacak (94°C de 30sn denaturasyon, 55°C de 1 dk de bağlanma, 68 °C de 2 dk uzama ve son olarak 72 °C de 5 dakika) sıcaklık aralıklarına göre programlanarak çalıştırılmıştır. Bu sayede ilişkili virüslerin istenilen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri elektroforez işlemi gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. A) PCR karışımlarının hazırlanması B) Hazırlanmış karışımların PCR cihazına yerleştirilmesi

3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Boyanması ve Görüntülenmesi

PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde elektroforez yapılarak analiz edilmiştir. Buna göre 1 gr agaroz 100 ml 1X TAE (Tris-Asetikasıit– EDTA) tamponuna eklenerek mikrodalga fırında 5 dk süre ile çözdürülmüş ve yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra tarak yerleştirilmiş elektroforez tankına hazırlanan jel dökülmüş ve yaklaşık 5 µl EtBr çözeltisinden eklenerek mikropipet ucu ile jelle beraber homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. 20-25 dk süre ile hazırlanan jelin katılaşması için beklenmiştir. Jel üzerindeki tarak çıkarılarak yükleme çukurları oluşturulmuştur.

İlk boşluğa 2 µl DNA ladder, diğer çukurlara ise 15 µl PCR ürünü ve 5 µl yükleme tamponu ile parafilm üzerinde homojen bir şekilde karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 110 V ile 50 dk yürütülmüştür. Örnekler görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenip fotoğraflanmıştır.

3.2.2.5. Karakterize Edilen Virüslerin İlgili Dizileri İçin Primer Dizaynı

Bu diziler için (Bkz. Tablo 3.1.)’teki primerler kullanılmıştır. Primer dizaynı için daha önce gen bankasına girilmiş tüm genomu ortaya çıkarılmış DNA dizilerinden faydalanılmıştır. Faydalanılan diziler sırasıyla: DWV primerleri için NC004830 NCBI erişim numaralı, CBPV primerleri için AF461061 NCBI erişim numaralı izolatlardır. Bu izolatlara ait diziler kullanılarak (Sentebiolab, ANKARA) firmasına sentezletilmiştir.

Tablo 3. 2. Bal arısı virüslerin teşhisinde kullanılan amplifikasyon ürünlerinin uzunluğu

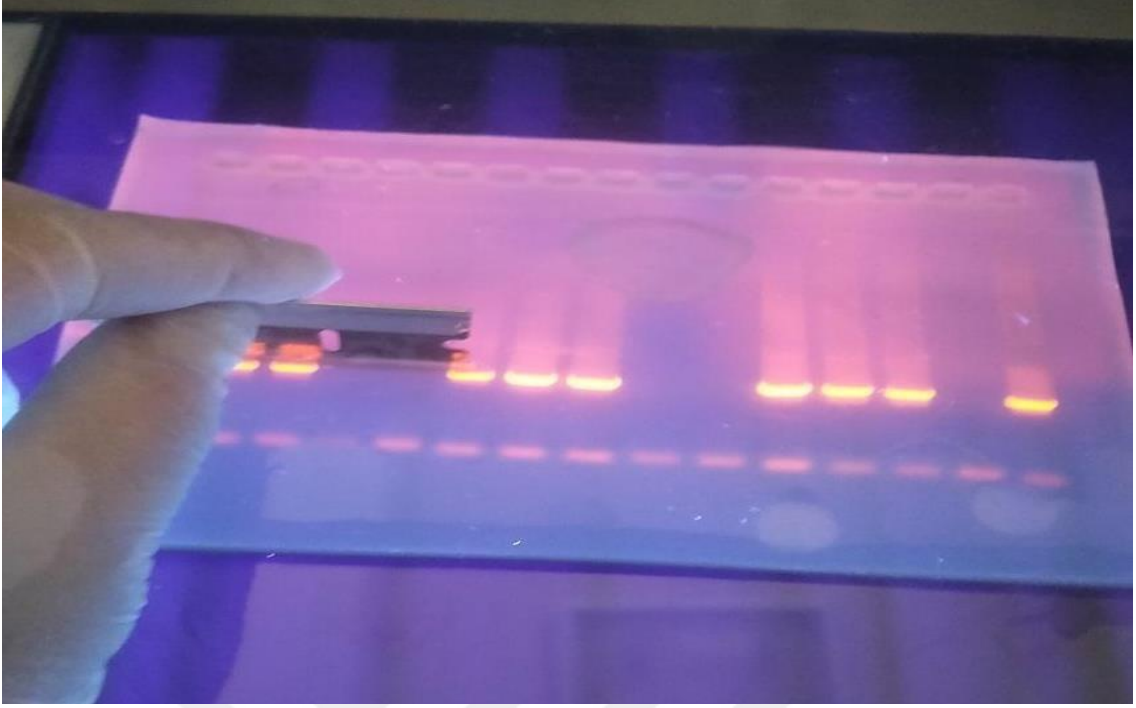
Virüs	Primer	Bç	Gen bölgesi	Kaynak
DWV	F-5’-ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA-3’ R-5’-TCGACAATTTTCGGACATAC-3’	702	CP	Chen et al.,(2004a)
CBPV	F- 5’-AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG-3’ R- 5’-TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG-3’	455		Ribiere et al.,(2002)

3.2.3. Virüs İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonlarının Yapılması

Yapılan RT-PCR testleri sonucunda pozitif sonuç veren bantlardan birer izolat seçilerek karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. DWV ile CBPV ait CP kodlayan genin kısmi dizileri klonlanıp karakterize edilmiştir.

3.2.3.1. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Çoğaltılan DNA bantlarının parlaklığı ve kalınlığı kontrol edilerek steril bisturi ile kesilmiştir (Şekil 3.5.). Kesilen DNA bantları eppendorf tüplerine konularak DNA saflaştırılması yapılmıştır. DNA saflaştırılması Thermo firmasına ait GeneJET Gel Extraction Kit (Katalog no: K0692) ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem kit protokol işlemine yapılmıştır.



Şekil 3. 5. DNA bantlarının bisturi ile jelden kesilmesi

Buna göre;

- DNA bantları steril bisturi ile istenilen bantlar en az jel içerecek şekilde bantlar kesilmiş ve steril 2 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
- Tüplere aktarılan jeller tartılarak 1/1 oranında Bağlanma tamponu (Binding Buffer) ilave edildi ve kuru blok ısıtıcıda tamamen eriyinceye kadar 50-60 °C'de inkübe edilmiştir.
- GeneJET saflaştırma kolonuna çözdürülen jelden 800 µl yüklenip 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Aynı tüpe yerleştirilen GeneJET saflaştırma kolonuna 700 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) eklenerek 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Etanolü tamamen uzaklaştırmak için saflaştırma kolonu boş olarak 1 dk süre ile maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Yeni eppendorf tüpüne yerleştirilen steril GeneJET saflaştırma kolonun üzerine 55 µl Elution Buffer filtrenin membranının üzerine dökülecek şekilde boşaltılmış ve 1

dk maksimum hızda santrifüj yapılmıştır. Elde edilen DNA ürünleri klonlamada kullanılmak üzere -20' °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. DNA'nın Plazmide Yerleştirilmesi (Ligasyon)

Saflaştırılması yapılan DNA ürünleri pGEM-T Easy vektörü ile bağlanması T4 DNA ligaz ile yapılmıştır. Ligasyon işlemi, Promega firmasının pGEM-T Easy vector sistemi (Katalog No, A1360) kullanılmıştır. Steril eppendorf tüpüne; 2X buffer, plazmit ve ligaz enzimi karışımı hazırlanmış bu karışıma insert DNA eklenmiştir (Tablo 3.3.). Karışım daha sonra bir gece 16-24 sa ve +4 °C de inkübe edilerek rekombinant plazmitler oluşturulmuştur. Rekombinant plazmitler -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler	Miktar
2x Rapid ligation buffer	5 µl
pGEM-T Easy vektör	1 µl
PCR ürünü DNA (insert)	4 µl
T4 DNA ligaz enzimi	1 µl

3.2.3.3. Rekombinant Plazmidin Bakteriye Aktarılması (transformasyon)

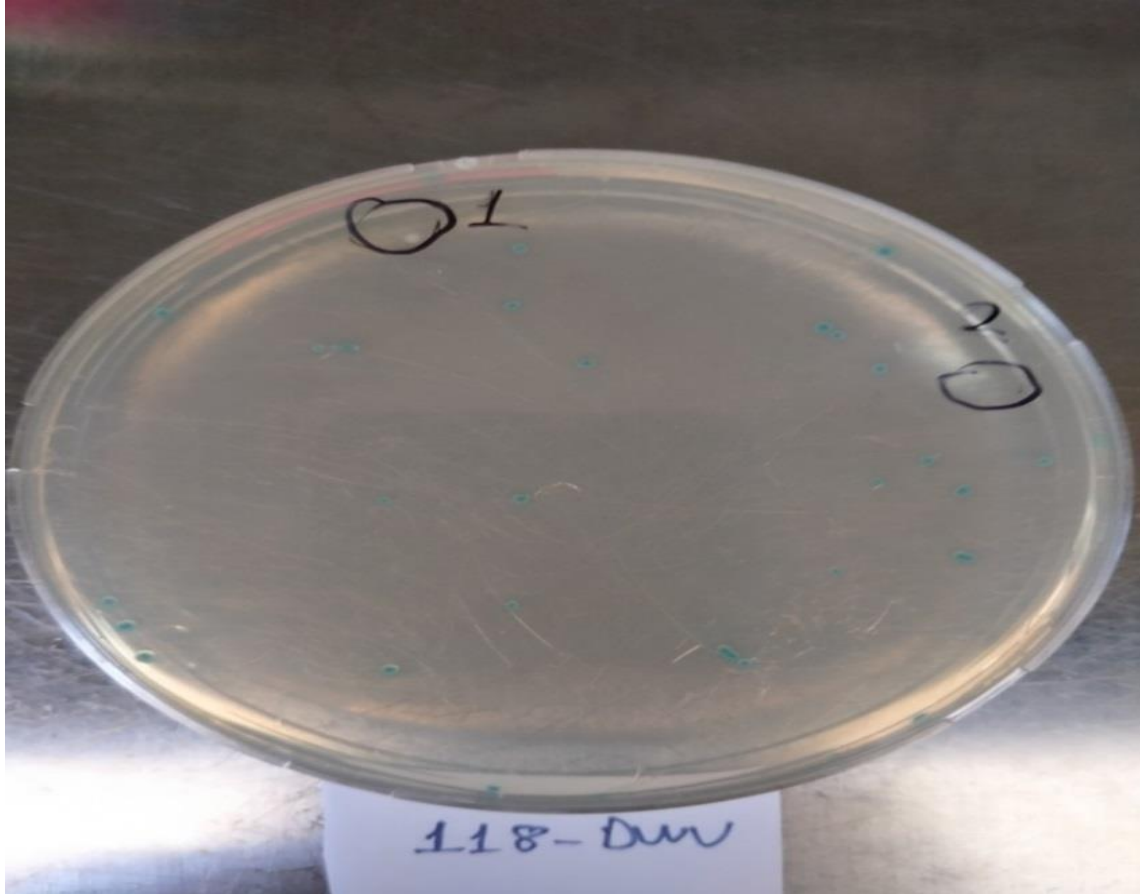
DNA fragmentinin Plazmide aktarılmasıyla elde edilen rekombinant plazmidler (JM109 suşuna) elektrik şoku ile *Escherichia coli* bakterisine transforme edilmiştir. Daha sonra 100 µl bakteri süspansiyonu ile 5 µl rekombinant plazmit buzda soğutulan küvetlere konularak Micropulser cihazı (BioRad) ile elektrik akımı uygulanmıştır.

Transformasyonda kullanılan küvetler steril saf su ile dezenfekte edilmiştir. Küvetlere rekombinant plazmit ve bakteri karışımı eklendikten sonra cihazın elektrik akımı uygulanmıştır. Küvetteki bakteriler, içersinde 900 µl SOC solüsyonu bulunan tüplere eklenmiş ve 37 °C de 2 sa 150 rpm de çalkalayıcı platformda çoğalması sağlanmıştır.

3.2.3.4. Plazmite Aktarılmış Bakterilerden Koloni Oluşturma

Bu aşamada kullanmış olduğumuz kompetant JM-109 bakterisinde ampiciline dayanıklılık geni bulunmamaktadır. Bundan dolayı transformasyon aşamasında ampisilin içeren besi

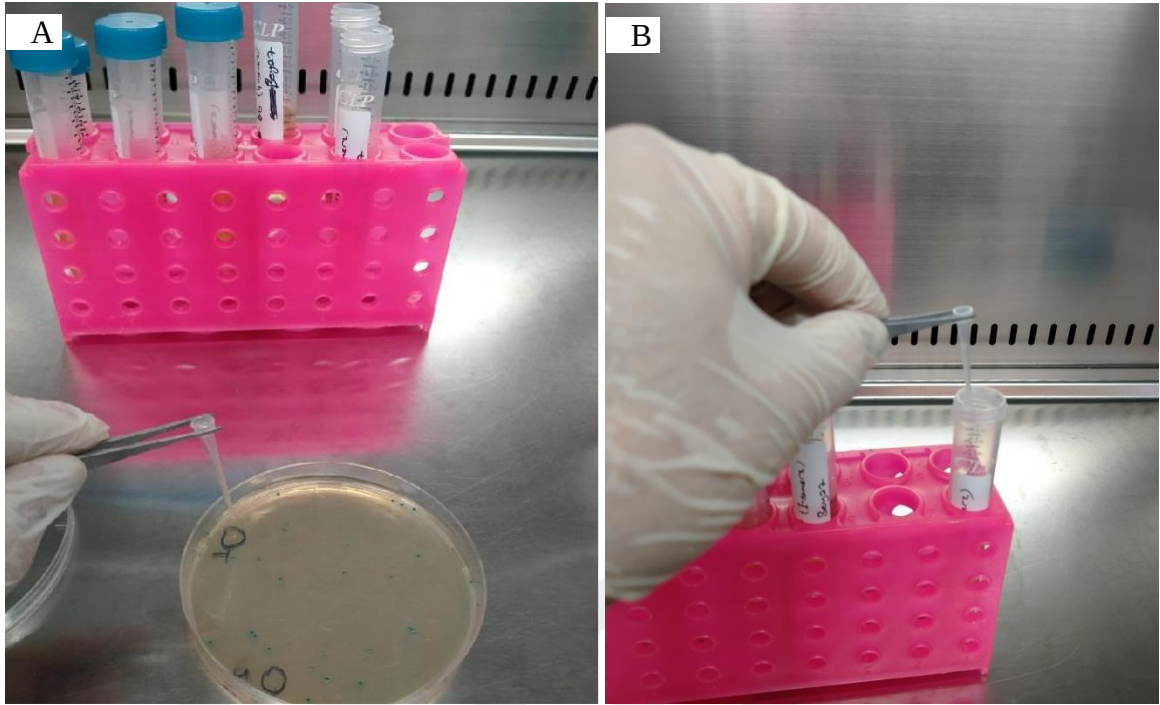
ortamına ekilen bakterilerden bünyesinde yalnızca plazmid bulunduran bakteriler ampisilinden etkilenmeyecektir. Ampisilin içeren LB ortamında sadece iki renk koloni gözlemlenecektir. Bu renkler, beyaz ve mavi olan kolonilerdir. Beyaz koloniler hedef DNA'yı içeren plazmidi bünyesine alan bakteriler, mavi koloniler ise hedef DNA'yı içermeyen bakterilerdir.



Şekil 3.6. Transformasyon sonucu beyaz ve mavi koloni oluşan DWV virüslerine ait insert DNA'lar

3.2.3.5. Mavi-Beyaz Seleksiyon ve Transforme Olmuş Kolonilerin Çoğaltımı

Transformasyon sonucu oluşan beyaz kolonilerden steril pipet ucu değdirilerek, önceden hazırlanmış 100 µl/ml ampisilin ile %0,8 glycerol içeren 10 ml sıvı LB bulunan 15 ml'lik kapaklı steril tüplere daldırılmıştır. Steril tüplerin etiketlenmesi yapıldıktan sonra 37 °C'de 220 rpm hızda bir gece inkübe edilmiştir. Bu çalışmalar steril kabinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. A) Steril pipet ucu ile beyaz kolonini alınması B) Pipet ucunun sıvı LB içeren ortama daldırılması

3.2.3.6. Rekombinat Plazmitlerin Saflaştırılması

10 ml sıvı LB içinde transforme olmuş kolonilerden geliştirilen kültür plazmite saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Plazmitlerin saflaştırılması, Thermo firmasının GeneJET Plasmid Miniprep Kit ile saflaştırma protokolü uygulanmıştır.

Bu protokole göre;

- ✓ 10 ml sıvı LB ortamında çoğaltılan bakteriler 2 ml'lik steril eppendorf tüpüne transfer edilmiş ve bakteri hücrelerini pellet haline getirmek için 8000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Pelletler; 250 µl resuspend buffer ile çözündürülmüştür.
- ✓ Tüplere 250 µl Lysis Buffer ilave edilmiş ve tüpler 4-6 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır.
- ✓ Tüplere 350 µl nötralizasyon tamponu eklenmiş ve tekrar tüpler 4-6 defa ters düz edilerek karıştırıldı ve 14000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ 2 ml'lik koleksiyon tüpü içerisine yerleştirilen GeneJET spin kolona santrifüj sonrası oluşan sıvı faz transfer edilmiş ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

- ✓ GeneJET spin kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu(Wash buffer) ilave edilmiş ve 14000 rpm de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası tüpün dibinde biriken sıvı faz atılmış ve kolon, yeniden koleksiyon tüpü içerisine yerleştirilmiş ve bu yıkama aşaması bir daha tekrar edilip sıvı faz boşaltılmıştır.
- ✓ Etanolün iyice uzaklaşması için koleksiyon 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 iyice emilimi için 2 dk bekletildikten sonra 12000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Son aşamada 1,5 ml tüpte bulunan 55 µl saflaştırılmış plazmid, diğer çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.7. Klonlanmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

Rekombiant plazmid üzerindeki DNA dizilimini tespit etmek için 50 µl saflaştırılan plazmid örneği Sentebiolab (Ankara-Türkiye) 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.

3.2.3.8. DNA Dizisinin Gen Bankasına Girilmesi

Bingöl ilinde belirlenen virüslere ait DNA dizi bilgileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen bankasına kaydı gerçekleştirilmiştir.

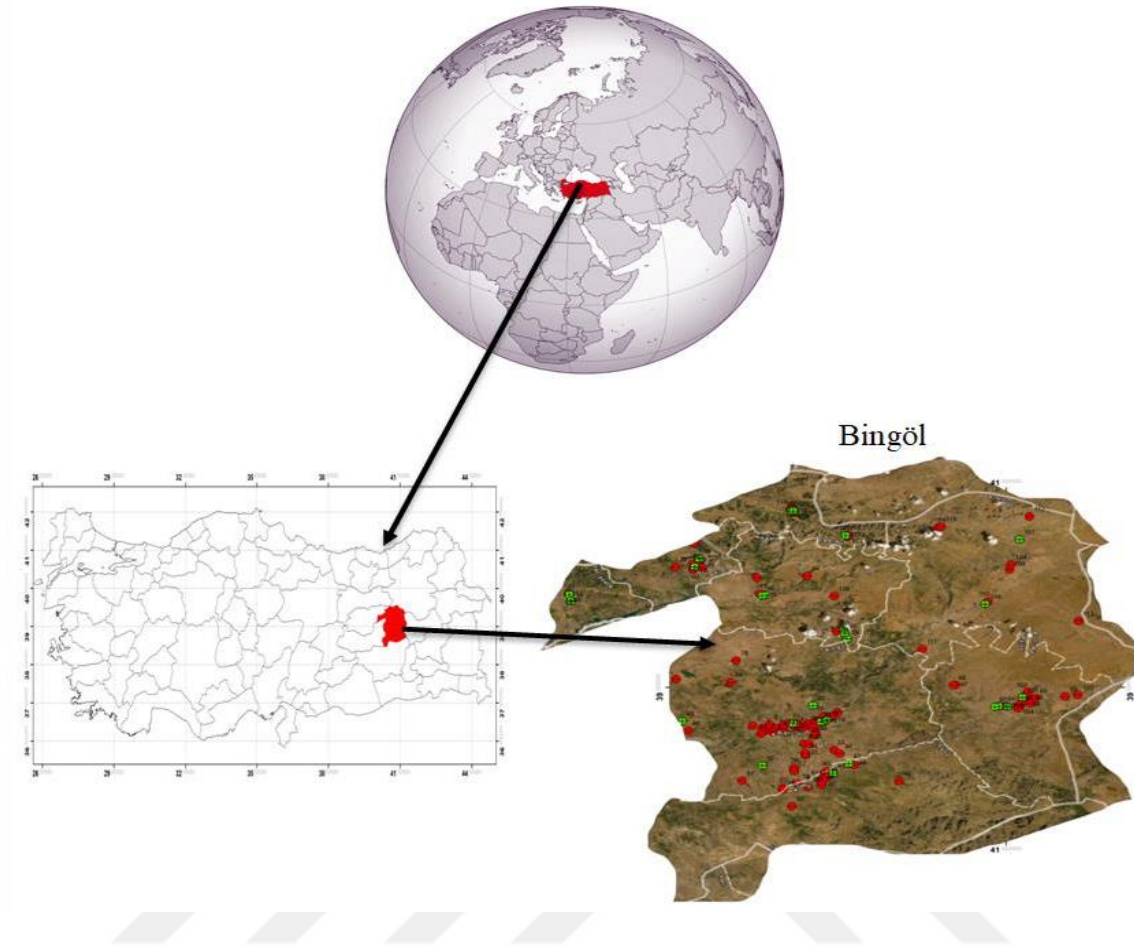
3.2.4. İlgili Diziye Ait Filogenetik Analiz

Bingöl ilinde varlığı tespit edilen DWV virüsünün rastgele seçilen izolatının filogenetik analizi yapılmıştır. Filogenetik analizler Geneious 6.1.8 programında çoklu karşılaştırma (multiple align) yapılmıştır. Neighbor-joining yöntemiyle filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Bingöl DWV izolatı ile dünyadaki diğer izolatların yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Türkiye’de olduğu gibi dünyada da bal arısı virüsleri geniş çalışma alanı oluşturmaktadır. *A. mellifera* ve *A. cerena* dışında *Apis mellifera jemenitica*, *Apis mellifera carnica*, *Bombus atratus* gibi farklı arı ve ırklarını da konukçu edinebilen (Haddad et al., 2017; Toplak et al., 2012; Choi et al., 2010) bal arısı virüsleri arasında sıklıkla ekonomik öneme sahip beş farklı viral etmen tespit edilmiştir. Özellikle DWV şu anda bal arılarında en yaygın virüstür ve 32 ülkede kolonilerin/arılıkların en az ortalama %55'ine bulaşmıştır (Martin and Brettell, 2019).

Bingöl ilinde yürütülen bu çalışmada toplamda 128 arılıktan 384 işçi bal arısı örneği toplanmıştır. Toplanan işçi arı örneklerine DWV ve CBPV virüsleri için sırasıyla total nükleik asit ekstraksiyonu (TNA), tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve klonlama aşamalarından oluşan süreçler uygulanmıştır. Gerçekleştirilen süreçler sonucunda DWV virüsüne ait pozitif DNA fragmanları elde edilmiş ve bu fragmanların dizileri ortaya çıkarılarak filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Bingöl ili 128 arılıktan 28 arılıkta inceleme kapsamındaki 2 virüsten DWV virüsünün varlığına rastlanmış ve genel infeksiyon oranı %21,87 olarak hesaplanmıştır. Yapılan testler sonucunda hiçbir arılıkta CBPV etmeni belirlenmemiştir.



Şekil 4.1. Bingöl ili ve ilçelerinde survey çalışmaları sonucu toplanılan bal arısı örneklerinin ait oldukları aralıkların bulunduğu lokaliteleri gösteren harita

4.1. Deforme Kanat Virüsü (*Deformed wing virus, DWV*) İle İlgili Bulgular

Bu çalışmada, 128 arılığın 28'inde %21,87 enfeksiyon oranıyla DWV etmeninin poliprotein genine karşılık gelen beklenen 702 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiştir (Şekil 4.3). DWV enfeksiyonunun varlığı Bingöl il merkezi ve bütün ilçelerinde tespit edilmiş ve enfeksiyon oranları survey alanlarında farklılık göstermiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2). Test sonuçlarına göre Bingöl ili ve ilçeler bazındaki enfeksiyon oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4. 1. DWV ile infekteli örneklerin Bingöl il ve ilçelerindeki lokaliteleri

Bölgeler	DWV'nin araştırıldığı arılık sayısı	DWV'nin pozitif örnek sayısı	DWV'nin pozitif örnek oranı	Pozitif örnek numaraları
Merkez	44	5	% 11,3	23,25 85,10,18
Karlıova	19	2	% 10,5	107,109
Solhan	17	5	% 29,4	62,63,64,101,106
Genç	12	3	% 25,0	45,47,50
Yedisu	10	4	% 40,0	117,118,120,125,
Adaklı	11	5	% 45,4	76,79,80,81,84
Yaylader e	4	2	% 50,0	91,92
Kiğı	11	2	% 18,18	75,66
Toplam	128	28	% 21,87	23,25,85,10,18,107,109,62, 63,64,101,106,45,47,50,117,11 8,120,125,76,79,80,81,84, 91,92, 75,66

Sırbistan'ın farklı bölgelerinde 55 bal arısı kolonisi, TaqMan temelli real-time RT-PCR testi kullanılarak Deforme Kanat Virüsü (DWV) ve Akut Arı Felç Virüsü (ABPV) varlığı açısından araştırılmış ve arılıklardaki DWV frekansının %76,4 ve ABPV frekansının ise %61,8 olduğu tespit edilmiştir (Simeunović et al., 2014). Çin'in sekiz bölgesinde 45 arılıkta yürütülen 1 yıllık büyük ölçekli bir survey çalışmasında, Siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV), Deforme kanat virüsü (DWV), İsrail akut felç virüsü (IAPV) ve Tulumsu yavru çürüklüğü (SBV)'nün hem *A. mellifera* hem de *A. cerana*'da yaygın olduğunu gösterilmiştir (Chen et al., 2021). Rodríguez et al., (2014) tarafından Şili'de 2010-2011 yıllarında yürütülen çalışmada 60 arı kolonisinden pupa ve yetişkin arılar toplanarak RNA virüsleri, ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) yöntemiyle testlenmiştir. Çalışmada, arılıkların %2'sinde Akut arı felci virüsü (ABPV), %10'unda Siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV) ve %42'sinde Deforme kanat virüsü (DWV) tespit edilmiştir. Burdur ilinde deforme kanat virüsü (DWV), siyah kraliçe hücre virüsü (BQCV) ve akut arı paraliz virüsü (ABPV) enfeksiyonlarının varlığını ve yaygınlığını belirlemek için 15 arıcılık işletmesinden 31 ergin arı ve petek örneği alınmıştır. Farklı primer setlerinin kullanıldığı çalışmada DWV'ye ait 269 bp büyüklüğünde DNA bantları edilmiştir. Survey gerçekleştirilen bölgelerdeki DWV, BQCV, ABPV enfeksiyonlarının yaygınlığı sırasıyla %74,19, %25,81 ve %74,19 olarak tespit edilmiştir (Usta ve Yıldırım, 2021). Karapınar ve vd. (2018), Van ilinin beş ilçesinden 26 farklı arı kovanda yürüttükleri çalışmada bal arılarında ve ektoparazit varroada ABPV, CBPV, BQCV ve DWV etmenlerinin varlığı RT-PCR metodu ile test edilmiştir. Arılarda DWV ve BQCV enfeksiyonu sırasıyla

%69,23 (18/26) ve %88,46 (23/26) oranında tespit edilirken, hiçbir arılıkta ABPV ve CBPV tespit edilememiştir. Elde edilen DWV ve BQCV dizileri genbankasındaki benzer dizilere %94-100 arasında benzerlik göstermiştir. Ayrıca çalışmada varroa prevalansı 26 arılığında 23'ünde belirlenmiştir. Cagırgan ve Yazıcı, (2021) tarafından Türkiye'nin Ege Bölgesinde (İzmir, Aydın, Muğla, Manisa, Kütahya, Uşak, Denizli) yaygın olan 7 bal arısı virüsü (IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, CBPV, KBV) multipleks RT-PCR metodu kullanılarak araştırılmıştır. Farklı primer setlerinin kullanıldığı çalışmada, 111 arılığın 22'sinde DWV virüsüne özgü 618 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiş ve infeksiyon oranı %19,8 olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda 2 arılıkta CBPV etmenine özgü 1525 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiş ve infeksiyon oranı %1,8 olarak hesaplanmıştır.

Hakkâri ilinde kapsamlı bir şekilde yürütülen arılık surveylerinde BQCV, IAPV, DWV, KBV, SBV ve CBPV varlığı ve prevalansını belirlemek amacıyla toplam 90 arılık ziyaret edilmiştir. Çalışmada, KBV ve IAPV tespit edilmezken, BQCV, DWV, SBV ve CBPV etmenleri %32, %23, %12 ve %9 dağılım oranlarıyla tespit edilmiştir. Bazı arılıklarda ise farklı virüslerin karışık infeksiyonları da tespit edilmiştir. RT-PCR metodunun kullanıldığı testlerde DWV etmeninin yapısal olmayan protein geni ve CBPV etmeninin RdRp genine özgü sırasıyla 488 bp ve 434 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri elde edilmiştir. NCBI veri tabanında yürütülen BLAST analizine göre, Hakkâri izolatlarının nükleotit dizileri diğer izolatlar ile %77-99 arasında değişen dizi benzerliği göstermiştir (Rüstemoğlu ve Sipahioğlu, 2019).

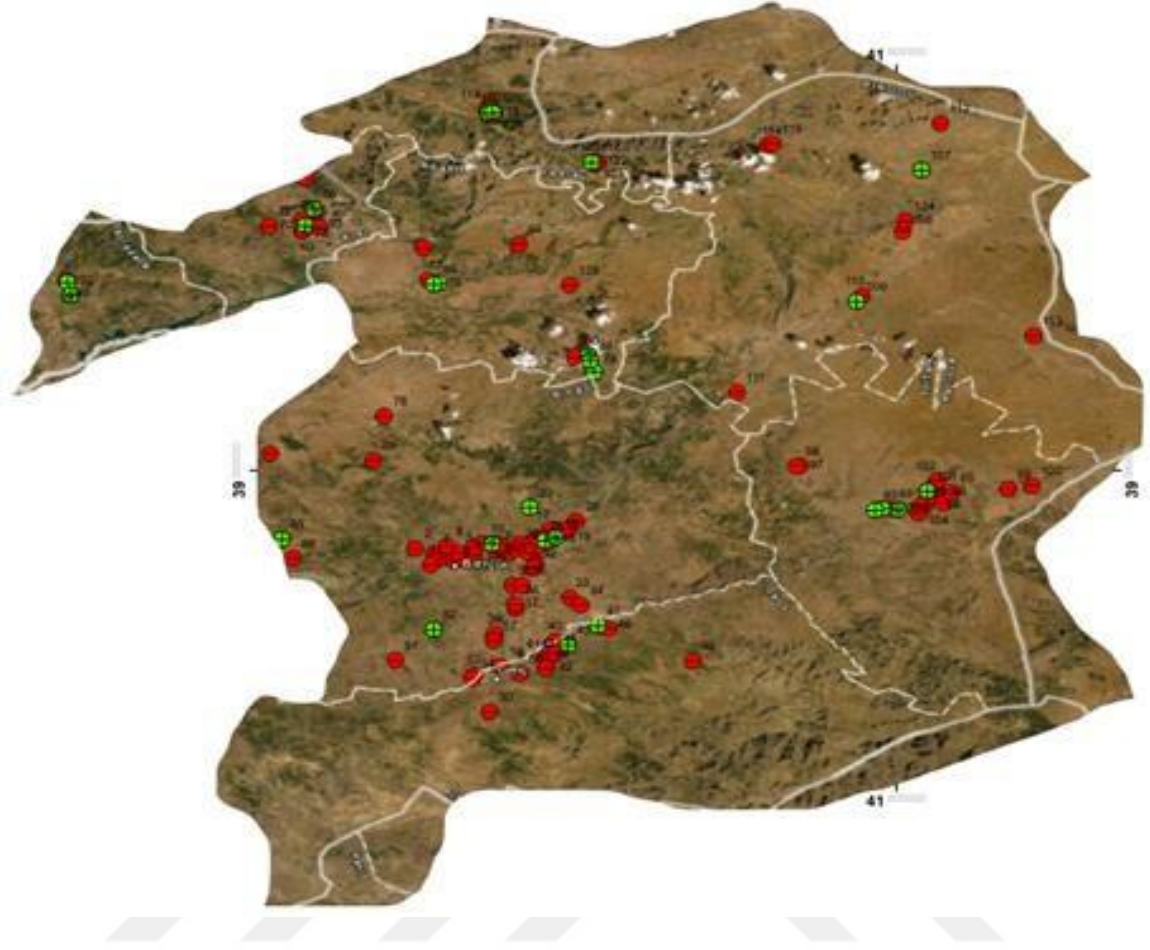
Deforme kanat virüsü sadece bal arılarını değil aynı zamanda sekiz böcek takımı ve üç Arachnida takımı kapsayan 65 eklem bacaklı türünde DWV infekteleyebilmektedir (Martin and Brettell, 2019). Dolezal et al. (2016). Geniş konukçu aralığına sahip virüs aynı zamanda bal arısı olmayan yabancı arı türlerinde (*Colletes inaequalis* ve *Megachile rotundata*) (Dolezal et al., 2016), karıncada (*Messor concolor*) (Rüstemoğlu, 2020) de enfeksiyonu tetiklemektedir.

Dünya çapındaki araştırmalarda bal arısı virüslerinin kovan içi ya da dışında bazı parazitler tarafından transmisyon sağlandığı rapor edilmiştir. Avalos et al. (2019) tarafından Arjantin'de yürütülen çalışmada ABPV ve DWV etmenleri bir arı biti türü olan *Braula schmitzi*'deki varlığı araştırıldı. Çalışma sonucunda, arı biti bulunan

kolonideki arılarda her iki virüs tespit edilirken, arı bitinde sadece ABPV varlığı ilk kez moleküler olarak rapor edilmiştir. Toplak et al. (2013) tarafından yürütülen *in vitro* bal arılarının protozoon hastalığı *Nosema ceranae* ile CBPV'nin bal arılarının ölümü açısından sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Celle et al. (2008), CBPV etmenini bal arılarını kolonileri istila eden varroa (*V. destructor*) ve kovan etrafından topladıkları karıncalarda (*Formica rufa* ve *Camponotus vagus*) tespit etmişler ve bu parazitlerin CBPV için potansiyel bir ikincil konakçı veya rezervuar olabilecekleri ve virüs transmiyonunda etkili olabileceğini rapor etmişlerdir.

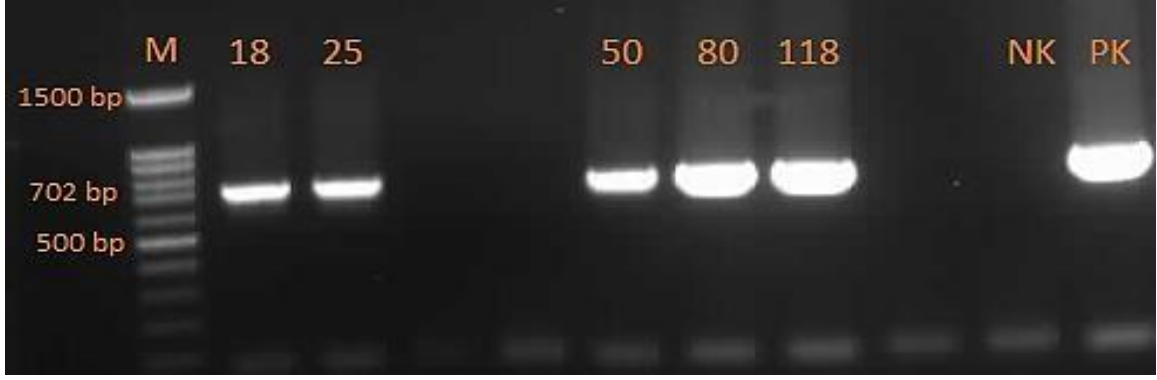
2012'de Japonya' da *Apis cerana japonica* kolonilerinde yürütülen çalışmada büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvalarında İsrail Akut Felç Virüsü (IAPV) ve Siyah kraliçe hücre virüsü RT-PCR yöntemi kullanılarak pozitif olarak test edilmiştir (Traiyasut et al., 2016). Bunların dışında bal arısı viral etmenlerinden BQCV ve IAPV *Alphitobius diaperinus*'ta (Li et al., 2016), Moku virüs eşek arılarında (*Vespa spp*) (Highfield et al., 2020) ve DWV küçük kovan böceğinde (Eyer et al., 2009) tespit edilmiştir.

Bingöl ilinde *Nosema* ve *Varroa*'nın varlığı Kutlu ve Gül (2020) ile Kutlu ve Ekmen (2003) tarafından rapor edilmiş olup, inceleme alanlarımızda karınca, *Vespa* ve küçük kovan böceği varlığı gözlemlenmiştir. Bizim survey gözlemlerimizde de kovan etrafı ve içinde karınca, *vespa* ve küçük kovan böceği gibi yabancı ziyaretçilere rastlanmıştır. Yukarıda bahsi geçen literatürler ışığında virüs kontrolü açısından arılıklarda bu tür böcek türlerinin popülasyonu ile mücadele yapılması sürdürülebilir arıcılık faaliyetleri açısından önemlidir.



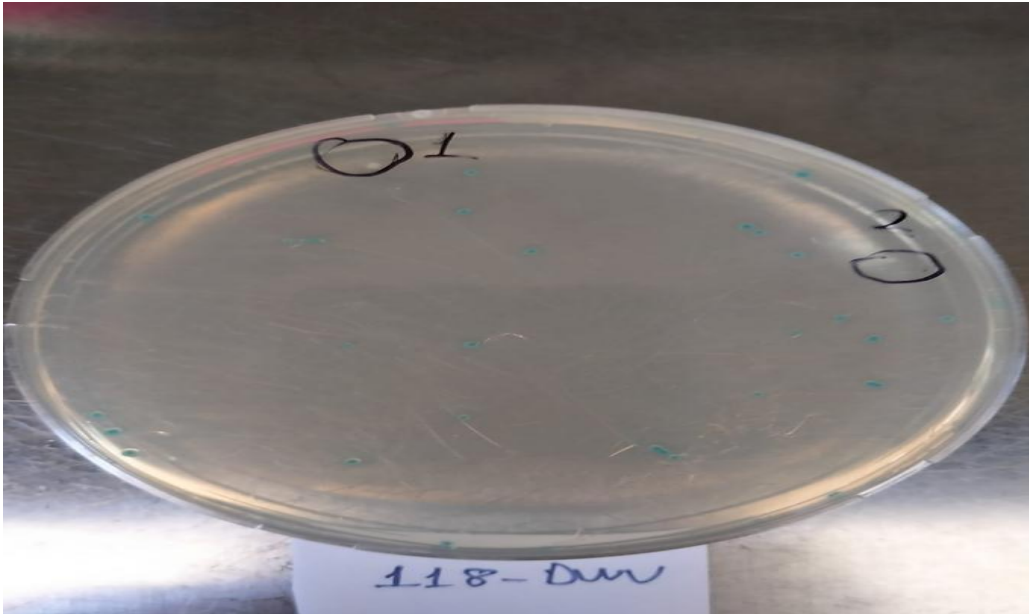
Şekil 4.2. Genel survey alanlarımız, Deforme kanat virüsü (DWV) ile ilgili bulgular; Yeşil renkler pozitif örnekleri, Kırmızı renkler negatif örnekleri ifade etmektedir

Bu çalışma kapsamında, 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 118 numaralı örnek jelden saflaştırılarak klonlama, dizileme ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.3. DWV virüsünün tespiti için Bingöl ili örneklerine uygulanan RT-PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M: 100-1500 bp Marker, Pozitif örnekler: 18, 25, 50, 80, 118 numaralı bantlar, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol

DWV'ye ait jelden saflaştırılan DNA fragmentleri bakteriyel klonlama vektörü 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 4.2).



Şekil 4.4. Kolonilerin 37 °C de 24 saat inkübe edilmesi sonucu gelişen kolonilerde beyaz renkli koloni işaretlenmiştir

Sıvı besiyerinde 118 nolu viral genomu taşıyan rekombinant bakterilere plazmid purifikasyonu yapılmış, sekans analizine gönderilmiş ve nükleotit dizisi ortaya çıkarılmıştır.

Tablo 4. 2. 118 nolu DWV Bingöl izolatına ait CP geni baz dizisi

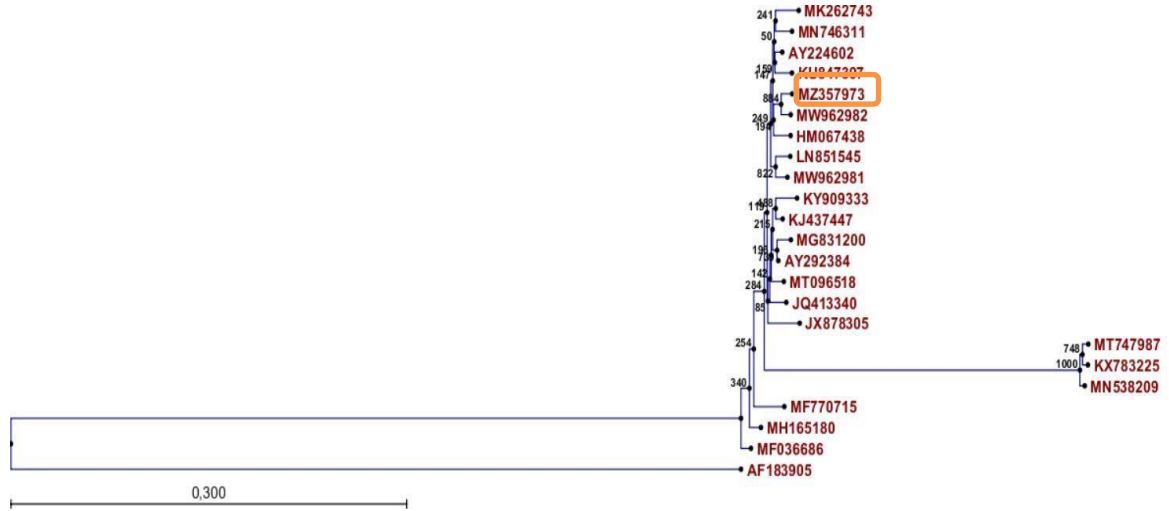
Baz Sıralaması	Nükleik Asit Baz Dizisi
1	atcagcgcttagtgaggaaatgaaggcatttaaggagcgctacactatgggtcagatttacatcgcgtaggtgcggaattagt
89	gcgtcagttaagaaagctttaccaaccatttcataaccgaaaaactaccacattggactgttcaatgtggtattgctaaacctg
181	agatggatcatgcttatgaggttatgagttcgtatgcagctggaatgaatgcagagattgaagcgcatgaacaagtcggcggtt
272	tatcagtggaaatgtcaatatgcagagcctcaagcctcaagaaatcctgatgacgaagggccaaccatagatgaagaacttat
359	gggcgacactgaatttacatcacaggctctagaacgtcttggtgatgaaggttatataactggaaaacagaagaaatatag
449	ctacgtgggttagtaagcgctgcgaacatactgctgacttcgatcttggtggactgataatttgcgtgttaagtgcgtatgc
542	gcatgaacgatcatctcaactcggctttctacggatgatgtcaggttatataaaacaattagcatgttacatcaaaagtatgata
702	ccacagagtgtgctaagtgtcaacattggtatgctccgttgactgatatctatgttgacgataagaaattgttctggtgtcagaaa gagaaaaagacacttattgatgtccgaaaattgtcga

Sekans analizi sonucunda klonlanmış olan DNA'nın dizisinin 702 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. DNA dizisi elde edilen DWV izolatı MZ357973 erişim numarası ile NCBI Gen Bankası veri tabanına kaydedilmiştir. Filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla NCBI veri tabanından dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilen 21 farklı DWV izolatı seçilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4. 3. Gen bankası veri tabanında bulunan DWV virüsüne ait farklı izolatların erişim numarası, Ülke, Virüs, Konukçu, Gen, Nükleotit Benzerliği

Erişim No.	Ülke	Virüs	Konukçu	Gen	Nükleotid Benzerliği
MW962982	Türkiye	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 98,45
AY224602	Fransa	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	%97,75
KU847397	Avusturalya	DWV	<i>European honeybee</i>	Structural protein	%97,33
AY292384	ABD	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 97,33
MW962981	Türkiye	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 97,33
HM067438	İngiltere	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 97,33
MN746311	İsveç	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 97,05
LN851545	Suriye	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 97,05
KJ437447	İngiltere	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 96,91
MT096518	İspanya	DWV	<i>insekta</i>	Polyprotein	% 96,91
JQ413340	Şili	DWV	<i>Honey bee</i>	Polyprotein	% 96,77
MK262743	İspanya	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Complate genom	% 96,62
MG831200	ABD	DWV	<i>Honey bee</i>	Polyprotein	% 96,20
KY909333	İtalya	DWV	<i>Vespa crabro</i>	Polyprotein	% 95,92
MH165180	Çin	DWV	<i>Apis cerana</i>	Polyprotein	% 95,78
JX878305	Güney Kore	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 95,64
MF036686	Çin	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 95,36
MF770715	Çin	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 95,36
MN538209	Hollanda	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 77,50
KX783225	Belçika	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 77,25
MT747987	İtalya	DWV	<i>Apis mellifera</i>	Polyprotein	% 77,22

Filogenetik analiz sonucunda DWV Bingöl izolatlarının dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile %98,45-77,22 arasında değişen oranlarda nükleotit benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir. DWV izolatı, en düşük (%77,22) oranda İtalya izolatı (MT747987) ile ve en yüksek (%98,45) Türkiye izolatı (MW962982) ile nükleotit benzerliği göstermiştir (Tablo 4.3). Ayrıca filogenetik ağaçta DWV Bingöl izolatının aynı kümede olduğunu ve genetik yakınlık içerisinde olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.5. DWV Bingöl MZ357973 izolatu ile dünyadaki DWV izolatlarının CP geninin nükleik asit dizisi 1000 tekrerrülü olarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan ışınsal filogenetik ağacı

4.2. Kronik Arı Felci Virüsü (CBPV) İle İlgili Bulgular

Mevcut literatür taramaları, yoğun şekilde ticari arı ve kovan malzemeleri alışverişinin en olası sonucu olarak CBPV'nin dünya çapındaki bal arılarında yaygın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte viral etmenin varlığının -değişken olsa da- genellikle diğer yaygın viral patojenlere oranla daha nadir ya da düşük frekansta olduğu rapor edilmiştir (Allen et al., 1996). Bu, muhtemelen viral enfeksiyonun kısa sürede kovan dışında arı ölümlerine neden olmasından ya da surveyler esnasında canlı bireylerden numune alınmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada, 128 arılığın hiçbirinde CBPV etmeninin kılıf protein genine karşılık gelen beklenen 455 bp uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilememiştir.

Dünya çapında yürütülen çalışmalarda, virüs spesifik primerler kullanılarak farklı büyüklükte genom fragmentleri elde edilerek enfeksiyon oranları ortaya çıkarılmıştır. Fransa'da CBPV'nin yaygınlığı %28'dir (Tentcheva et al., 2004), diğer bazı Avrupa ülkelerinde ise kış veya yaz arılarındaki yaygınlığı çok daha düşüktür (örneğin, Avusturya'da %9, Danimarka'da %4, Macaristan'da %0 ve %15, Slovenya'da %18,3) (Berényi et al., 2004; Toplak vd., 2012). 2011-2012 yıllarında Çin ve Arjantin'nin farklı bölgelerinde altı bal arısı virüslerinin yaygınlığı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Çin'de hem *A. cerana*'da hem de *A. mellifera*'da altı virüs (DWV, BQCV, SBV, CBPV, ABPV ve IAPV) tespit edilirken, Arjantin'de dört virüsün

(DWV, BQCV, CBPV ve ABPV) mevcut olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda bölgelere dağılım olarak DWV'nin CBPV'ye oranla daha yaygın olduğu belirlenmiştir (Ding et al., 2016).

Yukarıda değinildiği gibi, bal arıları ile ilişkili yurt çapında yürütülen incelemelerde de CBPV patojeni farklı enfeksiyon oranlarıyla belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan aynı primer setlerinin kullanıldığı çalışmada, Karadeniz Bölgesi'ndeki altı ilde (Sinop, Samsun, Amasya, Giresun, Trabzon, Rize) toplam 280 bal arısı üç bal arısı virüsü (ABPV, CBPV, BQCV) varlığını araştırmak için RT-PCR metodu kullanılarak test edilmiştir. Sonuç olarak arıların %25'inde CBPV ve BQCV tespit edilirken, ancak hiçbir arılıkta ABPV enfeksiyonu tespit edilememiştir. Bu çalışma, Türkiye'deki CBPV ve BQCV etmenlerinin ilk raporu olarak kayıtlara geçmiştir (Gümüsova vd., 2010) tarafından yürütülen çalışmada Moleküler testlerin dışında viral etmenin varlığı farklı yöntemlerle de tespit edilebilir.

Kalaycı ve ark., (2020), Bursa, Kütahya, Manisa, İzmir, Aydın, Muğla ve Adana illerinde yaptıkları çalışma ile totalde 76 arılıktan toplanılan örnekler test edilerek %18,4'ü oranında CBPV virüsü rapor edilmiştir. 2015 yılında Hakkari ilinde toplam 90 arı kolonisinde bal arılarında semptom gösteren arı virüslerinin varlığını tespit etmek için çalışma yapıldı. CBPV ve DWV enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlıkları RT-PCR yöntemi ile araştırmışlardır. CBPV ve DWV enfeksiyonlarının varlığı ilk kez RT-PCR ile belirlendi. Asimptomatik arı örneklerinin %23 oranında DWV ve %9 oranında CBPV enfeksiyon oranı ile pozitif sonuçlar tespit edilmiştir (Rüstemoğlu ve Sipahioğlu 2019).

Ribière et al., (2000), Fransa'nın güneydoğusundaki birkaç kolonide Western blot ve agar jel immünodifüzyon testi kullanarak virüsün CBPV patojeninin varlığını doğruladı. Dittes et al. (2020) felç, ataksi (vücut koordinasyon bozukluğu), uçuş yetersizliği ve kısa karımlı siyah tüysüz bireylerin varlığı görüldüğü CBPV infekteli bal arısı (*Apis mellifera carnica*) kolonilerine enfeksiyonun baskılanması amacıyla iki farklı terapi yöntemi kullandı. Çalışmada, Varroa kontrolü ve kraliçe arı değiştirilmesine yönelik uygulamaların bal arılarının sağlıklı bir şekilde kışlatılmasına katkıda bulunduğu belirlendi. Amiri et al. (2014) CBPV belirtisi gösteren arıların, troflaksi yoluyla (besin ya da diğer sıvı maddelerin ağız ağıza verilmesi) kraliçeye yeterli miktarda aktif CBPV partikülü ileterek açık bir enfeksiyona neden olduğunu rapor etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada yapılan tüm tarımsal faaliyetlerde olduğu gibi arıcılıkta da fungus, bakteri ve virüs gibi etmenler hastalıklara neden olabilmektedir. Bu etmenler içinde virüslerle mücadelenin zor olması ve verdiği zarar göz önüne alındığında ayrı bir öneme sahip olduğunu söyleyebiliriz. Dolayısıyla Bingöl ilinde arıcılık faaliyetinin yoğun olarak yapılması ve bal arılarını infekteliyen virüslerle ilgili bugüne kadar herhangi bir çalışma yapılmamış olması bizleri bu çalışmaya sevk etmiştir. Dünya genelinde bal arılarında en yaygın ve en etkili olan ekonomik olarak zarara uğratan virüslerin arasında bulunan DWV ve CBPV virüslerinin Bingöl ilindeki varlıklarını ve infeksiyon oranlarının tespit edilmesi arıcılık faaliyetleri açısından önem arz etmektedir.

Bingöl ili bal arısı kolonilerindeki viral infeksiyonlar arasında Deforme kanat virüsü (DWV) ve Kronik arı felç virüsü (CBPV) varlıklarını ve yaygınlığını tespit etmek amacıyla 2020 yılı ilkbahar ve yaz aylarında survey çalışması yapılmıştır. Bu çalışma ile viral etmenlerin tespiti için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan spesifik primerler daha önce yürütülen çalışmalardan benimsenerek moleküler test çalışmaları yürütülmüştür. Toplamda 128 koloniden alınan örnekler test edilmiş ve %21,87 oranında DWV virüsü tespit edilmiştir. Çalışılan örneklerin hiçbirinde CBPV infeksiyonuna rastlanılmamıştır.

Bingöl ilinde tespiti yapılan DWV virüsünün rastgele seçilen izolatının moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. DWV Bingöl izolatı dünyadaki diğer izolatlarla karşılaştırıldığında %98,45-77,22 arasında nükleotit benzerliği gösterdiğini ortaya konulmuştur. Ayrıca oluşturulan filogenetik ağaca göre Bingöl DWV izolatı en yakın Türkiye izolatı ile kümelendiği tespit edilmiştir.

RT-PCR sonucu tespit edilen ve moleküler karakterizasyonu yapılan DWV virüsü literatür araştırmamıza göre Bingöl ili için ilk rapordur.

Bu çalışma neticesinde elde edilen verilerle bal arılarında ekonomik kayıplara neden olan viral etmenler arasında gerek Dünyada gerekse Türkiye’de arı kolonilerinde en yaygın

bulunan DWV virüsünün Bingöl ilindeki varlığının tespit edilmesi bu ildeki arıcılık açısından önem arz etmektedir.

Bingöl ilinin bitki çeşitliliği bakımından zengin bir floraya sahip olması göçer arıcılığın tercih ettiği bölge olmasından dolayı giriş yapacak olan arı kolonilerinin Tarım Orman İl Müdürlüğü veya Üniversite aracılığıyla teste tabi tutulması viral etmenlerin yayılmasını önemli oranda kontrol altına alınabileceği kanaatindeyiz.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ve bulgular değerlendirildiğinde Bingöl ilinde arıcılık yapan üreticilere aşağıdaki önerileri yapabiliriz.

- Yapılan bu çalışma ile tespit edilen arı virüslerine karşı yapılacak en etkili mücadele virüsün birincil vektörü olan varroa vb. vektörlere karşı yapılan kapsamlı bir mücadeledir. Bal arısı virüslerini kontrol etmek için doğrudan yöntemlerin bulunmadığını gözönünde bulundurarak vektörlerle mücadele aynı zamanda virüsle dolaylı bir mücadele olduğunu unutulmamalıdır. Ayrıca varroa akarının kontrolü açısından kullanılan uygulamalar bu virüsü baskı altına tutacaktır.
- Arılıklar için virüse dirençli arı kolonileri seçilip yetiştirilmesi viral etmenlerin kontrolünde önemli rol oynar.
- Arılıklarda hijyene gereken önem verilmeli; yerlere petek, petek kırıntıları, propolis parçaları atılmamalıdır. Hastalıklı arı kolonilerinden alınan bal, petek, çerçeve vb. malzemeler sağlam arı kolonilerinde kesinlikle kullanılmamalı imha edilmelidir.
- Oğula verilecek temel petek ve ballı peteklerin temiz, hastalıksız olmasına özen gösterilmelidir.
- Hastalık etmeni taşımayan ana arı ile çalışılmalı, hasta koloniler satın alınmamalıdır.
- Hastalık etmenlerinin bulunmadığı çevrelerde arıcılık yapılmalı ve tedbirli olunmalıdır. Hastalığın ilk görüldüğü kovanlar ve arılar hastalık yayılmadan derhal imha edilmeli ve diğer arıcılara bildirilmelidir.

KAYNAKÇA

Akyol E, Camcı Ö (1999) Arıcılığın bitkisel üretimdeki yeri ve önemi. GAP 1. Tarım Kongresi. Şanlıurfa, 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 M, Ball B (1996) The incidence and world distrubition of honey bee viruses. Bee world 77: 141-162

Allen MF, Ball BV (1996) The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World. 77: 141–162

Amiri E, Meixner M, Büchler R, Kryger P (2014) Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybee Queens: Evaluating Susceptibility and Infection Routes, Viruses 6: 1188-1201

Anonim (2021a) Food and Agriculture Organization of The United Nation, “FAO Statistical Databases /Agriculture”.<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>. (Erişim tarihi: 20.02.2021)

Anonim (2021b) [https://www.ordutb.org.tr/wp-content/uploads/2020/10/Arıcılık Raporu.pdf](https://www.ordutb.org.tr/wp-content/uploads/2020/10/Arıcılık_Raporu.pdf). (Erişim tarihi; 10.06.2021)

Anonim (2021c) International Committee on Taxonomy of Viruses. http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20130611, Edinburg. (Erişim tarihi: 12.04.2021)

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, 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

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

Avalos J, Rosero H, Maldonado G, Reynaldi FJ (2019) Honey bee louse (*Braula schmitzi*) as a honey bee virus vector? *Journal of Apicultural Research* 1: 3

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, Ball BV (1991) Honey bee pathology. 2nd edition. Academic Press, London
Bailey L, Ball BV, Perry JN (1981) The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology* 97: 109-118

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* Linnaeus). *Virology* 21: 390-395

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

Ball L (1999a) Efficient Rules for Monetary Policy. *International Finance* 2,no 1: 63-83

Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N (2006) Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2414-2420

Blanchard P, Ribiere M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V, Iscache AL, Faucon JP (2007) Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J Virol Methods* 141:7-13

Blanchard P, Schurr F, Olivier V, Celle O, Antunez K, Bakonyi T, Berthoud H, Haubruge E, Higes M, Kasprzak S, Koeglberger H, Kryger P, Thiery R, Ribiere M (2009) Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) isolated from various geographic regions. *Virus Research* 144(2): 334-338

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

Cagırgan A, Yazıcı Z (2021) The prevalence of seven crucial honeybee viruses using multiplex RT-PCR and their phylogenetic analysis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 45: 44-55

- Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon J-P, Ribière M (2008) Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res.* 133: 280–284
- Chen G, Wu Y, Deng J, Wen Z, Wang S, Chen Y, 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 Y (2011) Viruses and Viral Diseases of the Honey Bee, *Apis*. *Recent Advances in Entomological Research: From Molecular Biology to Pest Management*, p. 105
- Chen YP, Evans J, Feldlaufer MF (2006a) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal Invertebrate Pathology* 92: 152-9
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF (2006b) Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied Environmental Microbiology* 72: 606-611
- Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF (2004a) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 441-448
- Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* 70: 33-80
- Chen YP, Smith IB, Collins AM, Pettis JS, Feldlaufer MF (2004b) Detection of *Deformed wing virus* infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. *American Bee Journal* 144: 557-559
- Choi YS, Lee MY, Hong IP, Kim NS, Byeon, KH, Yoon, H (2010) Detection of Honeybee Virus from Bumblebee (*Bombus terrestris* L. and *Bombus ignitus*). *Korean Journal of Apiculture* 25(4): 259- 266
- Cirkovic D, Stevanovic J, Glavinic U, Aleksic N, Djuric S, Aleksic J, Stanimirovic Z (2018) Honey bee viruses in Serbian colonies of different strength. *PeerJ* 6: e5887
- De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge G, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier 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): 51-55
- Di Pasquale, G Salignon, ML Conte, Y Belzunces, LP Decourtye, A Kretzschmar, A Suchail, S Brunet, JL Alaux (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?, *PLoS ONE* 8(8): e72016
- Ding G, Fondevila N, Palacio MA, Merke J, Martinez A, Camacho B, Aignasse A, Figini E, Rodriguez G, Lv LP, Liu ZG, Shi W (2016) Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. *Rev Sci Tech.* 35(3): 825-833

Dittes J, Schäfer MO, Aupperle-Lellbach H, Mülling CKW, Emmerich IU (2020) Overt Infection with Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) in Two Honey Bee Colonies. *Veterinary Sciences* 7(3): 142

Dolezal AG, Hendrix SD, Scavo NA, Carrillo-Tripp J, Harris MA, Wheelock MJ, Toth A.L (2016) Honey Bee Viruses in Wild Bees: Viral Prevalence, Loads, and Experimental Inoculation. *PLOS ONE* 11(11): e0166190

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

Eyer M, Chen YP, Schäfer MO, Pettis J, Neumann P (2009) Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 40: 419–428.

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

Genersch E, Yue C, Fries I, Miranda J (2005) Detection of *Deformed wing virus*, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 61–63

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

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

Güller A, Usta M, Çakar G, Kurt Z (2021) Molecular characterization of *Deformed wing virüs* identified in honeybees (*Apis mellifera* L.) colonies in Erzincan province of Turkey. *European Journal of Science and Technology* 27: 186-192

Gülmez Y, Bursalı A, Tekin Ş (2009) First molecular detection and characterization of *Deformed wing virüs* (DWV) in honeybees (*Apis mellifera* L.) and mite (*Varroa destructor*) in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 8(16): 3698-3702

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

Haddad N, Al-Gharaibeh M, Nasher A, Anaswah E, Alammari Y, Horth L (2017) Scientific note: molecular detection of pathogens in unhealthy colonies of *Apis mellifera jemenitica*, *Apidologie* 49(1): 84–88

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

Highfield A, Kevill J, Mordecai G, Hunt J, Henderson S, Sauvard D, Feltwell J, Martin SJ, Sumner S, Schroeder DC (2020) Detection and Replication of Moku virus in Honey Bees and Social Wasps. *Viruses* 12(6): 607

Kalaycı G, Cagırgan AA, Kaplan M, Pekmez K, Beyazıt A, Ozkan B, Yesiloğlu 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

Karapınar Z, Oğuz B, Dinçer E, Öztürk C (2018) Phylogenetic analysis of black queen cell virüs and *deformed wing virüs* in honeybee colonies infected by mites in Van, Eastern Turkey. *Medicine Weterinary* 74 (7): 460-465

Kutlu MA, Ekmen F (2003) Presence of Nosema disease and infection rate in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Bingöl region. *Technical Beekeeping* 79: 24-26

Kutlu MA, Gül A (2020) The Colony Losses in Bingol Province (Bee Deaths), Causes and Suggestions. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 7(4):867–873

Lanzi G, De Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camazine SM, Rossi C (2006) Molecular and biological characterization of *deformed wing virus* of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology* 80: 4998–5009

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

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

Martin SJ, & Brettell LE (2019) Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. *Annual Review of Virology*, 6:1

Muz D, Muz NM (2009) Survey of the occurrence of *Deformed wing virus* and multiple parasites of queens (*Apis mellifera* L.) in apiaries with collapsed colonies in Hatay, Turkey. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 48(3): 204-208

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

Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O, Dubois E, Tordo N, Thierry R, Houlgatte R, Ribière M (2008a.) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Chronic bee paralysis virus*, a honeybee virus. *Virus Res* 132: 59-68

Powell JE, Eiri D, Moran NA, Rangel J (2018) Modulation of the honey bee queen microbiota: Effects of early social contact. *PLoS ONE* 13(7): e0200527

- Ribière M, Faucon JP, P pin M (2000) Detection of honey bee (*Apis mellifera* L.) *chronic paralysis virus* infection: application to a field survey. *Apidologie* 31: 567–577
- Ribière M, Lallemand P, Iscache AL, Schurr F, Celle O, Blanchard P, Olivier V, Faucon JP (2007) Spread of infectious *chronic bee paralysis virus* by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7711-7716
- Ribière M, Olivier V, Blanchard P (2010) *Chronic bee paralysis*: a disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 120-31
- Ribiere M, Triboulot C, Mathieu L, Autieres C, Faucon JP, P pin M (2002) Molecular diagnosis of *chronic bee paralysis virus* infection. *Apidologie* 33: 339- 351
- Roberts MK, Anderson DL, Durr PA (2017) Absence of *deformed wing virus* and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Scientific Reports* 7: 6925
- Rodríguez M, Vargas M, Ant nez K, Gerding M, Ovidio CF, Zapata N (2014) Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biob o region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chil. J. Agricul. Res.* 74: 170–77
- R stemo lu M (2019) Uluslararası Arıcılık Araştırmaları ve S rd r lebilir K rsal Kalkınma Stratejileri Kongresi. 11-13 Ekim 2019. Bingöl, Türkiye
- R stemo lu M (2020) Isolation and Characterization of Two Important Honeybee-Killing Virus Species, *Deformed Wing Virus*(DWV) and *Black Queen Cell Virus*(Bqcv) From Messor Concolorants (Hymenoptera: Formicidae). *Applied Ecology and Environmental Research* 18: 7407-7415
- R stemo lu M, Sipahio lu HM (2019) Occurrence and prevalence of six honey bee viruses in Hakkâri (Turkey) and their genomic divergence. *Munis Entomology & Zoology* 14(2): 574-583
- Sanpa S, Chantawannakul P (2009) Survey of six bee viruses using RT-PCR in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 116–119
- 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: 2281-2289
- Simeunovi  P, Stevanovi  J, Vidanovi  D, Niřavi  J, Radovi  D, Staniři  L, & Stanimirovi  Z (2014) A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from serbia using real-time RT-PCR. *Acta Veterinaria*, 64(1): 81–92
- 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

Todd JH, Miranda JR, Ball BV (2007) Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* 38: 354-367

Toplak I, Jamnikar Ciglencečki U, Aronstein K, Gregorc A (2013) Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses*. 5: 2282–2297

Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencečki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič-Maganja D (2012) Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies in Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov. Vet. Res.* 49: 83–91

Traiyasut P, Mookhploy W, Kimura K, Yoshiyama M, Khongphinitbunjong K, Chantawannakul P (2016) First Detection of Honey Bee Viruses in Wax Moth. *Chiang Mai Journal of Science* 43: 695-698

TÜİK (2019) Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). www.tuik.gov.tr (Erişim: 27.03.2021)
 Usta A, Yıldırım Y (2020) Bal Arılarının Viral Hastalıkları. *Çukurova J. Agric. Food Sci.* 35(1): 57-66

Usta A, Yıldırım Y (2021) Investigation of deformed wing virus, black queen cell virus and acute bee paralysis virus infections by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique in honey bees. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 68(3): 2

Weinstein-Teixeira E, Chen YP, Message D, Pettis J, Evans JD (2008) Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 117- 119

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

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

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

