



MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ
“MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.”
<http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index>



Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görünen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Determination of the Genetic Characterization of Varroa destructor (Family: Varroidae) Collected from Honey Bees Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae) in the Province of Van in Turkey

Adnan Ayan¹, Kerem Ural², Osman Selçuk Aldemir³, Hidayet Tutun⁴

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı VAN, TÜRKİYE

²Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı AYDIN, TÜRKİYE

³Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı AYDIN, TÜRKİYE

⁴Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı BURDUR, TÜRKİYE

Abstract: The mite *Varroa destructor* is an ectoparasite that is considered a major pest of the Turkey honeybee for beekeeping. The aim of the present study was to identify the haplotypes of the *V. destructor* mite which infest honeybees in the province of Van in Turkey. In this study, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Part Length Polymorphism (RFLP) modified method were used to analyze mitochondrial Cox1 gene region of the mites. Also, bidirectional sequence analysis of 10% (28) of the samples (286) was performed. Afterwards, 570 bp in size amplified DNA was obtained. Thereafter, for the RFLP the *XhoI* and *SacI* restriction enzymes were applied to the amplified products. Although the *SacI* restriction enzyme did not cut the DNA, the *XhoI* restriction enzyme cut the amplified DNA into two fragments (bands), 270 and 300 bp in size. The banding pattern of the RFLP reaction and sequence analysis of the mitochondrial DNA revealed that all mite samples were of *V. destructor* Korean haplotype.

Key words: *Apis mellifera*, Haplotype, Van, *Varroa destructor*

Yazışma Adresi: Adnan AYAN Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner

Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Tuşba/VAN

E-posta: adnan_ayan43@hotmail.com

Telefon: 0432 225 1128

Öz: Türkiye’de arı yetiştiriciliğinin en önemli arı zararlısı olarak görülen *Varroa destructor*, bir ektoparazitir. Çalışmanın amacı, Türkiye’nin Van bölgesindeki bal arılarını (*Apis mellifera*) istila eden *V. destructor* akarının haplotiplerini belirlemektir. Araştırmada, akarın mitokondriyal Cox1 gen bölgesini analiz etmek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) modifiye yöntemi kullanıldı. Ayrıca, 286 örneğin % 10’u (28) çift yönlü dizi analizi yapıldı. PCR sonucunda, 570 bp büyüklüğünde amplifiye DNA elde edildi. RFLP için amplifiye ürüne *XhoI* ve *SacI* restriksiyon enzimleri uygulandı. *SacI* restriksiyon enzimi DNA’yı kesmemesine rağmen *XhoI* restriksiyon enzimi amplifiye DNA’yı 270 ve 300 bp olarak iki parçaya (bant) kestiği görülmüştür. RFLP reaksiyonunun bantları ve mitokondriyal DNA’nın dizi analizi, tüm akar örneklerinin *V. destructor* Kore haplotipi olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Bal arısı, Haplotype, Van, *Varroa destructor*

Geliş Tarihi: 02.11.2017

Kabul Tarihi: 16.11.2017

Kaynak göstermek için: Ayan A, Ural K, Aldemir OS, Tutun H. 2017. Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görünen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonu Belirlenmesi. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 5(2): 78-84.

Giriş

Bal arısı hastalıkları arasında, parazit akar *V. destructor* arı yetiştiriciliğinde zararlı etkileri nedeniyle muhtemelen bal arıları için dünyanın en ciddi tehdididir (Anderson ve Trueman, 2000). *Varroa* akarları, hem bal arıların yaşam süresini kısaltarak hem de larva ve pupaların hemolenfinden beslenmek suretiyle ağırlık kaybına neden olarak arı kolonilerine zarar verir (Rosenkranz ve ark. 2010). *Apis cerana* türü bal arısı *V. destructor*'e karşı savunma mekanizması geliştirmiştir. Ancak, *A. mellifera* türü balarılarının Asya'ya getirildiğinde, bu parazite karşı savunma mekanizmasının olmadığı anlaşılmıştır (Delaplane, 2001; Webster ve Delaplane, 2001) Asya'da 1960'lı yıllarda Japonya ve Sovyetler Birliğinde gözlemlenen akar, ilerleyen yıllarda önce Doğu Avrupa'ya ve oradan da 1970'lerin sonuna doğru Batı Avrupa'ya doğru yayıldığı rapor edilmiştir (Thompson ve ark. 2002).

Ülkemizde farklı bölgelerden 17 ilde *Varroa* akar örneği Anderson ve Truman, (2000) tarafından tanımlanan morfometrik ölçümlere göre incelenmiş ve *V. destructor* olarak tanımlanmıştır (Aydın ve ark. 2007).

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde *V. destructor*'un genetik karakterizasyonu ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da Van bölgesinde *V. destructor*'un genetik karakterizasyonu ile ilgili hiçbir bildirim bulunmamaktadır. Van bölgesinde arıcılığın yoğun olarak yapılması Varroosis ile ilgili sorunların yaşanmasına ve bu nedenle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle ilgili çalışmada Van bölgesinde moleküler teknikler kullanılarak bölgede mevcut olan *V. destructor*'un genetik karakterizasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada; Van bölgesi arıcılık işletmelerindeki kovanlardan 286 adet yetişkin dişi *V. destructor* Mayıs 2016 ile Mayıs 2017 tarihleri arasında toplandı. Bunun için özellikle arıcılık yönünden zengin olan Erciş, Muradiye, Merkez, Edremit, Gevaş, Çatak, Gürpınar ve Başkale ilçeleri tercih edildi. Toplanan örnekler laboratuvara getirilerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Laboratuvara getirilen *V. destructor* örneklerinden ticari kit (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kiti, 69504) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Toplam 50 µL'lik reaksiyonda; 35,75 µL DNase/RNase Free Distilled Water (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), 5 µL 10X PCR Buffer (Geneaid, New Taipei City, Taiwan), 3 mM MgCl₂ (Geneaid, New Taipei City, Taiwan), 1 mM dNTP (Geneaid, New Taipei City, Taiwan), 1,5 µL Forward primer (İontek, İstanbul, Turkey), 1,5 µL Reverse primer (İontek, İstanbul, Turkey), 1,25 ünite Taq DNA polimeraz (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) ve 16 ng DNA örneği kullanıldı.

PCR çalışması, Strapazon ve ark. (2009)'nın kullandıkları COXF [5'GG(A/G)GG(A/T)GA(C/T)CC(A/T)ATT(C/T)T(A/T)TATCAAC3'] Forward ve COXRa [5'GG(A/T)GACCTGT(A/TA(A/T)AATAGCAAATAC3'] Reverse primerleri kullanılarak yapıldı. Reaksiyonun aşamaları; ön denatürasyon 94 °C'de 4 dk, siklusların her birindeki denatürasyon 94 °C'de 1 dk, bağlanma 50 °C'de 1,5 dk, uzama 72 °C'de 1,5 dk olup 35 siklustan oluşup son uzama aşaması 72 °C'de 10 dk'da yapıldı. Daha sonra % 1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jeldeki PCR ürünleri 90 volt doğrusal akımda 1,5 saat elektroforeze tabi tutuldu. Bu işlemden sonra jel görüntüleme cihazında (UV transluminatör, UVP EC3 ChemiHR 410 Imaging System) görüntüleri elde edildi. Oluşan bantlar DNA marker ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *V. destructor* Japon ve Kore haplotiplerinin tanımlanması için Anderson ve Fuchs (1998)'un bildirdiği; tanıma yeri 5'...GAGCTC...3' 3'...CTCGAG...5' olan *SacI* restriksiyon enzimi (R0156S-0501212 New England Biolabs) ve 5'...GTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5' olan *XhoI* restriksiyon enzimi (R0146S-0581507 New England Biolabs) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri kesildikten sonra % 2'lik agaroz jel görüntüleri elde edildi. Örneklerin % 10'u (28) çift yönlü dizi analizi için özel bir firmaya gönderildi. Daha sonra sekanslanan örneklerle blastlama yapılarak dünyada GenBank'a kaydı girilmiş diğer dizi analizlerine ve Anderson ve Fuchs (1998), tarafından tanımlanan referans sekanslara hizalama analizleri yapılarak karşılaştırıldı.

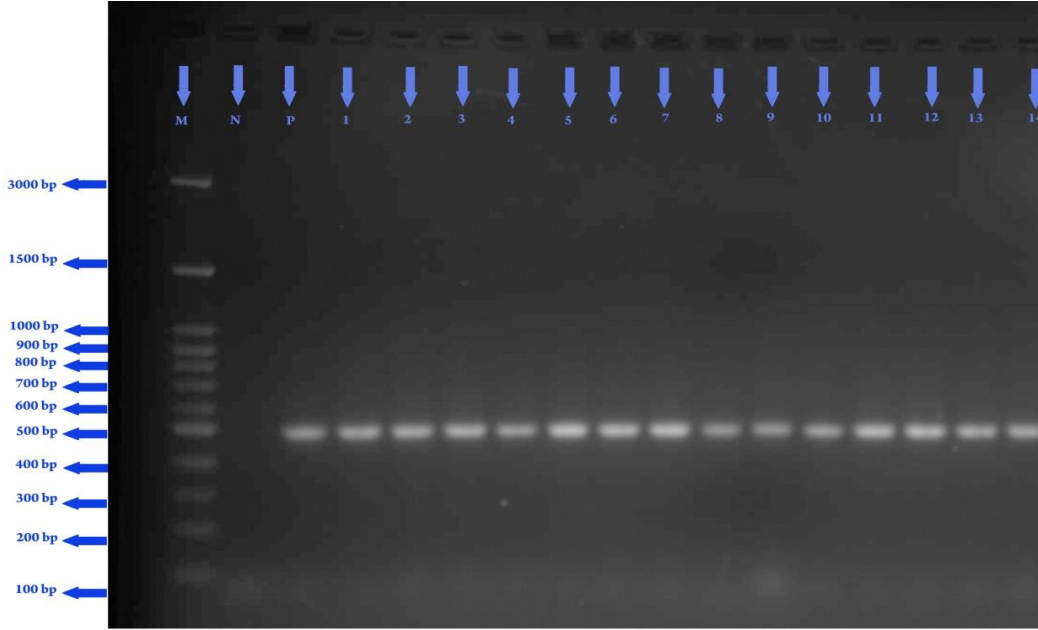
Bulgular

İncelenen 286 örnekte *V. destructor CoxI* gen bulguları için yaklaşık 570 bp büyüklüğünde bantlar amplifiye edildi (Resim 1). Resim 2'de *SacI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanıldı. Amplifiye genomik DNA'yı sadece *XhoI* restriksiyon enzimi kesti. *XhoI* restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen genomik DNA amplifikasyonunda 270 ve 300 bp büyüklüğünde iki bant elde edildi. Elde edilen bantlar *V. destructor* kore haplotipi için

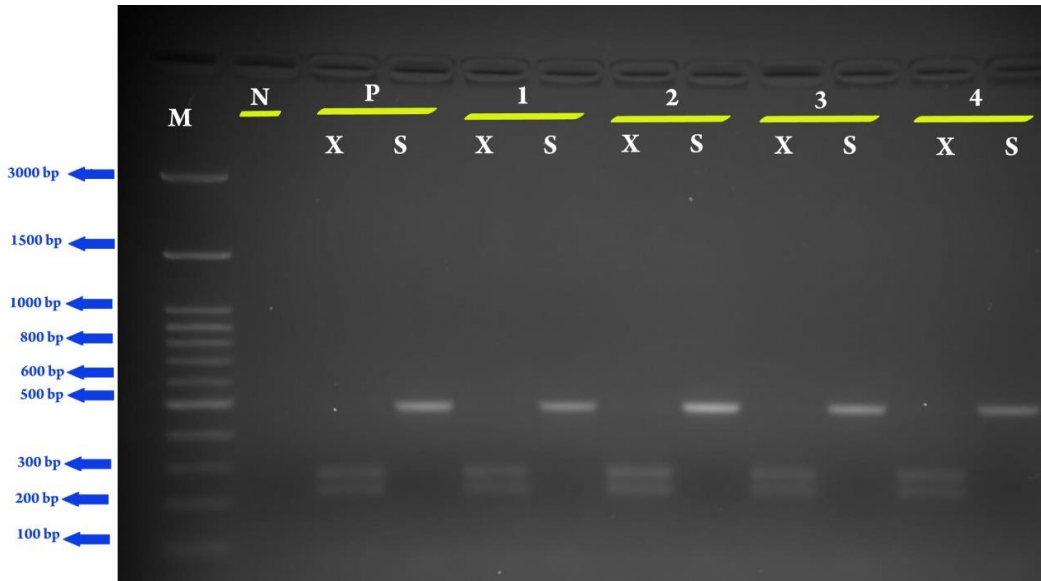
Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görülen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Determination of the Genetic Characterization of *Varroa destructor* (Family: Varroidae) Collected from Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the Province of Van in Turkey

sepesifik bulundu. Sekanslanan 28 örneğe blastlama yapılarak dünyada GenBank'a kaydı girilmiş diğer dizi analizlerine ve Anderson ve Fuchs (1998), tarafından tanımlanan referans sekanslara hizalama analizleri yapılarak karşılaştırıldığında 28 örneğin tamamının Kore haplotipi olduğu tespit edildi.



Resim 1. *Cox1* gen bölgesi agaroz jel görüntüsü, M (Marker), P (Pozitif kontrol), N (Negatif Kontrol), bp (Baz Çifti).



Resim 2. Amplifiye PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü, M (Marker), P (Pozitif kontrol), N (Negatif Kontrol), X (*XhoI* restriksiyon enzimi), S (*SacI* restriksiyon enzimi), bp (Baz Çifti).

Bu sonuçlara göre *V. destructor*'un genetik karakterizasyonuna yönelik yapılan çalışmada elde edilen bantların sayıları ve büyüklükleri dikkate alındığında; incelenen 286 örneğin tamamının *V. destructor* Kore haplotipi olduğu ve örneklerin hiçbirinde Japon haplotipinin bulunmadığı saptandı.

Tartışma ve Sonuç

A. mellifera bal arılarında *V. destructor*'un Kore, Japon, Serbia 1 ve Peshter 1 haplotiplerine (Anderson ve Trueman, 2000; Gajic ve ark. 2013) ve *A. cerana* bal arılarında *V. destructor*'un Kore, Japon, Vietnam, Çin ve Laos haplotiplerine sahip olduğu bildirilmiştir (Navajas ve ark, 2010; Beaufrepaire ve ark. 2015).

Japon haplotipi, ilk olarak geçen yüzyılda Japonya'da *A. cerana*'dan *A. mellifera*'ya geçtiği tespit edilmiştir (Sakai ve Okada, 1973). 1970'li yıllarda bu haplotip *A. mellifera* üzerinde önce Tayland ve Brezilya'ya (De Jong and Gonçaves, 1981; Anderson ve Trueman, 2000) ardından da Kuzey Amerika'ya dağılım göstermiştir (De Guzman ve ark. 1999). Avrupa'ya ise 1960'lı yıllarda *A. mellifera*' üzerinden gelmiştir (Crane, 1978).

Akinwande ve ark. (2012) Nijerya'nın güneybatısındaki Osun, Ogun ve Lagos şehirlerinde 14 kovan *Apis mellifera* üzerinde yaptıkları bir çalışmada toplam 42 koloni incelemiş ve çalışma sonucunda *V. destructor*'un Kore haplotipi olduğunu tespit etmişlerdir. Bir diğer *A. mellifera* üzerinde yapılan çalışmada, Filipinlerin Los Banos şehri, Kore'nin Lipa, Dien Bien ve Son La şehirlerinde *A. mellifera* kolonilerinden 263 *A. cerana* kolonilerinden 109 olmak üzere toplam 372 örnek incelemişlerdir. Lipa, Dien Bien ve Son La şehirlerindeki *A. mellifera*'lardan elde edilen *V. destructor*'ların Kore haplotipi, Los Banos şehrinden *Apis cerana*'lardan elde edilen *V. destructor*'ların Japon haplotipi, Dien Bien ve Son La şehirlerinde Vietnam haplotipi, Cat Ba şehrinde ise Çin haplotipi olduğu tespit edilmiştir (Beaufrepaire ve ark. 2015).

Chemurot ve ark. (2016) Uganda'da 365 bal arısı kolonisinde yaptıkları çalışmada, incelenen 9 örneğin tamamının Kore haplotipi olduğunu saptamışlardır. Gajic ve ark. (2013) *A. mellifera*'da Sırbistan'ın Palic, Belgrad, Vrbica, Bor, Zajecar, Boljevac, Zlatibor, Suvi Do ve Saprance gibi 9 farklı coğrafik bölgesinden toplam 45 adet *V. destructor* toplayıp incelemişlerdir. Çalışma sonucuna göre; Palic bölgesindeki 6 örnekten; Belgrad ve Suvi Do bölgelerindeki 4'er örnekten; Boljevac ve Saprance bölgelerindeki 3'er örnekten; Vrbica ve Zlatibor bölgelerindeki 2'şer örnekten; Bor ve Zajecar bölgelerindeki 1'er örnekten Kore

Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görülen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Determination of the Genetic Characterization of *Varroa destructor* (Family: Varroidae) Collected from Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the Province of Van in Turkey

Boljevac 3, Zlatibor 2, Suvi Do 4 ve Saprance'dan 3 Kore haplotipi bulmuşlardır. Ayrıca, Belgrad bölgesindeki 6 örnekten; Zlatibor bölgesindeki 4 örnekten; Boljevac ve Saprance bölgelerindeki 3'er örnekten; ve Vrbica bölgesindeki 1 örnekten Serbia 1 haplotipi ile Suvi Do bölgesindeki 2 örnekten de Peshter 1 haplotipi bulmuşlardır.

Maggi ve ark. (2012) Arjantin'in Entre Rios, Buenos Aires, Corrientes, Rio Negro, Santa Cruz, Neuquen bölgelerindeki *A. mellifera* kolonilerinde incelenen örneklerde %98 Kore haplotipine benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir. Munoz ve ark. (2008) *A. mellifera* iberiensis kolonilerinden toplam 575 *V. destructor* incelemiştir. Sonuçlara göre, İspanya'nın Guadalajara şehrinde toplanan 10 örnekten dokuzunun Kore haplotipi birinin Japon haplotipi olduğu, Portekiz, Balearik ve Kanarya adalarından toplanan 565 örneğin tamamının ise Kore haplotipi olduğunu bildirilmiştir.

Warrit ve ark. (2004)'nın yaptığı bir çalışmada, Türkiye'nin 8 bölgesinde bulunan 10 koloniden toplam 46 *V. destructor* örneği incelemiştir. Zonguldak-Karadeniz Ereğli'den 4, Kastamonu-İnebolu'dan 7, Sinop-Erfelek'ten 3, Samsun-Bafra'dan 10, Ordu-Yokusdibi 2, Gümüşhane-Kurtun'dan birinci koloniden 2, ikinci koloniden 2, Bayburt 6, Rize-Anzer birinci koloniden 6, ikinci koloniden 4 örnek toplanmış ve sekanslanan 18 örnek gen bankası ile (Genbank accession number: AF106899) karşılaştırılmıştır. İncelenen tüm örneklerin Kore haplotipi olduğu bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada ise; (PCR + RFLP) ve sekans analizi sonucu Türkiye'nin Van bölgesinde *V. destructor*'un Kore haplotipine rastlanılmıştır. Bulaşmanın, Kore haplotipi taşıyan *A. mellifera* bal arılarının bölgeye taşınmasıyla gerçekleşmiş olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, Türkiye'nin diğer bölgelerindeki haplotipleri belirlemek için de benzer çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Kaynaklar

1. Akinwande KL, Badejo MA, Ogbogu SS. 2012. Incidence of the Korean haplotype of *Varroa destructor* in southwest Nigeria. *J Apic Res.* 51(4): 369-370.
2. Anderson D, Trueman JWH. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 165-189.
3. Anderson DL, Fuchs S. 1998. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 37(2): 69-78.
4. Aydın L, Güleğen E, Çakmak İ, Girişgin AO. 2007. The Occurrence of *Varroa destructor* Anderson and Trueman, 2000 on honey bees

Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görülen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Determination of the Genetic Characterization of *Varroa destructor* (Family: Varroidae) Collected from Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the Province of Van in Turkey

- (*Apis mellifera*) in Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31: 189-191.
5. Beaurepaire AL, Truong TA, Fajardo AC, ve ark. 2015. Host Specificity in the Honeybee Parasitic Mite, *Varroa* spp. in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. PLoS ONE. 10(8): 1-12.
 6. Chemurot M, Akol AM, Masembe C, ve ark. 2016. Factors influencing the prevalence and infestation levels of *Varroa destructor* in honeybee colonies in two highland agro-ecological zones of Uganda. Exp. Appl. Acarol. 68(4): 497-508.
 7. Crane E. 1978. The Varroa mite. Bee World. 59: 164-167.
 8. De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA. 1999. Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. In North America. Apidologie. 30: 31-36.
 9. De Jong D, Gonçalves LS. 1981. The Varroa problem in Brazil. Am. Bee. J. 121: 186-189.
 10. Delaplane KS. *Varroa destructor*: revolution in the making. Bee World 2001; 82(4): 157-159.
 11. Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, ve ark. 2013. Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. Exp. Appl. Acarol. 61: 97-105.
 12. Maggi M, Medici S, Quintana S, ve ark. 2012. Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. Exp. Appl. Acarol. 56: 309-318.
 13. Muñoz I, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, ve ark. 2008. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. J. Apic. Res. 47: 310-313.
 14. Navajas M, Anderson DL, De Guzman LI, ve ark. 2010. New Asian types of *Varroa destructor*. a potential new threat for World apiculture Apidologie. 41: 181-193.
 15. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103: 96-119.
 16. Sakai T, Okada I. 1973. The present beekeeping in Japan. Glean Bee Cult. 101: 356-357.
 17. Strapazzon R, Carneiro FE, Guerra Jr JCV, ve ark. 2009. Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. Genet. Mol. Res. 8(3): 990-997.
 18. Thompson HM, Brown MA, Ball RF, ve ark. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. Apidologie. 33: 357-366.
 19. Warrit N, Hagen TAR, Smith DR, ve ark. 2004. Survey of *Varroa destructor* strains on *Apis mellifera* in Turkey. J. Apic. Res. 43(4): 190-191.
 20. Webster TC, Delaplane KS. 2001. Mites of Honey Bee, Illinois,; Dadant ve Sons Yayıncılık, s. 280.