

Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

Türkiye’de *Nosema ceranae*’nın ilk moleküler tanısı

Armağan Erdem ÜTÜK¹, F.Çiğdem PiŞKİN¹, Mitat KURT²

¹Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Parazitoloji ve Arı Hastalıkları Laboratuvarı, Ankara, Türkiye; ²Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Arı Hastalıkları Laboratuvarı, Samsun, Türkiye.

Özet: *Nosema ceranae* Avrupa bal arılarının (*Apis mellifera*) önemli mikrosporidian parazitlerinden biridir. Bugüne kadar Türkiye’de *N. ceranae*’nın varlığı hakkında bilgi mevcut değildir. 2007 ve 2008 yıllarında laboratuvarımıza gönderilen iki arı kolonisine ait örneklerde mikroskopik olarak *Nosema* sp. teşhis edilmiştir. Pozitif örnekler, *Nosema* türlerinin tespiti amacıyla daha önce geliştirilen spesifik PZR primerleri ile test edilmiştir. Çalışmamız sonucunda Türkiye’de ilk defa moleküler olarak *N. ceranae* belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, PZR, Türkiye.

First molecular detection of *Nosema ceranae* in Turkey

Summary: *Nosema ceranae* is an important microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*). To date there is no information about the presence of *N. ceranae* in Turkey. *Nosema* sp. was microscopically diagnosed in two bee colonies that were sent to our laboratory in the years 2007 and 2008. Positive samples were tested to detect the *Nosema* species using previously developed specific PCR primers. As a result of our study we molecularly detected *N. ceranae* in Turkey for the first time.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, PCR, Turkey.

Nosematosis ergin bal arılarında görülen en yaygın hastalıklardan birisidir. Hastalığın etkeni *Nosema apis* ve *N. ceranae* adlı mikrosporidialardır (13). Hastalık bal arısı kolonilerinde fekal-oral yolla yayılmaktadır. Erişkin arılar hastalığa sporlarla kontamine su ve gıdayla ya da kovan temizliği sırasında kontamine dışkıyı uzaklaştırılırken yakalanırlar. Sporlar alındıktan sonra orta bağırsakta çimlenerek çoğalır. Enfeksiyondan birkaç hafta sonra milyonlarca spor oluşur ve bu sporlar dışkı ile dışarı atılır (5, 13). Enfekte kolonilerde; sindirim sistemi bozuklukları başta olmak üzere, yaşam sürelerinde kısalma, uçamama, bağırsakların kirli beyaz ve mat renk alması, kovan girişinde ölü arıların toplanması, koloni popülasyonunda ve bal üretiminde azalma, hatta, kolonilerde sönme şekillenebilmektedir (1, 5, 9, 13).

Nosema apis ilk tanımlanan mikrosporidian parazitlerden biridir. Geçmişte Avrupa bal arılarında (*Apis mellifera*) nosematosis etkeninin sadece *N. apis* olduğu, *N. ceranae*’nın ise sadece Asya bal arısında (*Apis cerana*) parazitlendiği düşünülmekteydi. Ancak yeni tanımlanan bir tür olan *N. ceranae*, günümüzde, Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika olmak üzere dört kıtada görülmekte, Avrupa bal arıları arasında hızla yayılmakta, dünya genelinde ise *N. apis*’in yerini almaktadır (3, 8, 10, 16). Yapılan çalışmalar *N.*

ceranae’nın *N. apis*’ten daha patojen olabildiğini ve enfekte kolonilerin tedavi edilmedikleri takdirde yok olduğunu ortaya koymaktadır (12, 13).

Hastalığın teşhisi geleneksel mikroskopik yöntemler ve bazı moleküler tekniklerle yapılmaktadır (2, 7, 10, 13).

Ülkemizde nosematosis ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Elazığ yöresinde yapılan bir çalışmada nosematosisin yaygınlığı % 8.77 olarak belirlenmiştir (14). Yine Elazığ’da yapılan bir çalışmada nosematosisin yaygınlığı Merkez’de % 4, Baskil’de % 4 ve Sivrice’de % 10 olarak tespit edilmiştir (15). Güney Marmara bölgesinde 217 kovanda yapılan bir çalışmada ise hastalığın yaygınlığı % 24 olarak belirlenmiştir (4).

Bu çalışmada; geleneksel mikroskopik tanı yöntemlerinde oluşabilecek hataları ortadan kaldırmak, her iki nosema etkenini aynı anda ve doğru bir şekilde teşhise yardımcı olabilecek multipleks PZR tekniğini rutin laboratuvar kullanımına sokmak hedeflenmiş ve çalışma sonunda da Türkiye’de ilk kez *N. ceranae* moleküler olarak tespit edilmiştir.

Çalışmanın materyalini 2007 ve 2008 yılında Samsun ve Giresun illerinden gönderilen iki koloniye ait arılar oluşturdu. Nosematosisin teşhisi amacıyla 20 arının abdomeni ayrılarak 3 ml serum fizyolojik içerisinde

Tablo 1: Multipleks PZR’da kullanılan primerler ve özellikleri (7).
Table 1: Primers used in multiplex PCR and their speciality (7).

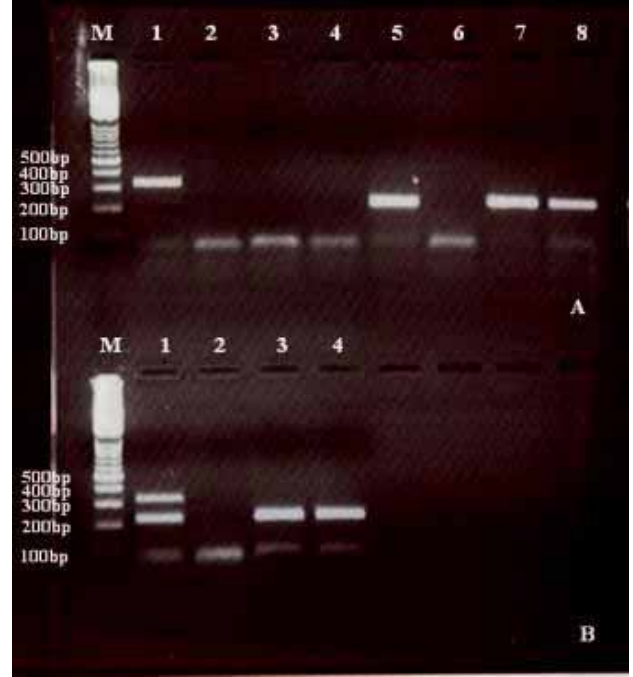
Primer	Primerin DNA dizilimi (5'-3')	Hedef gen bölgesi	Spesifite	Ürün büyüklüğü (bp)
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTTAA CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG	16S rRNA	<i>N. ceranae</i>	218-219
321APIS-FOR 321APIS-REV	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACCTATG	16S rRNA	<i>N. apis</i>	321

ezildi. Oluşan süspansiyondan 3 damla kadar alınarak bir lam üzerine konuldu ve üzerine bir lamel kapatılarak ışık mikroskopunda sporlar yönünden incelendi. *Nosema* sp. yönünden pozitif bulunan örnekler kullanılmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Hedef DNA elde edilmesinde, Hernández ve ark. (7)’lerinin kullandığı metot modifiye edilerek uygulandı. Pozitif örneklerin bulunduğu süspansiyondan 1 ml alınarak 1.5 ml’lik tüp içerisine konuldu. 800 x g’de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra dipte kalan tortudan QIAamp® doku kiti (Qiagen GmbH, Germany) ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraktlar PZR’de kullanılmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonunda Hernández ve ark. (7) tarafından Multipleks PZR için dizayn edilen, *N. ceranae* ve *N. apis*’in 16S rRNA genine spesifik primer çiftleri (Alpha DNA, Montreal, Canada) kullanılmış ve primerlerin özellikleri Tablo 1’de belirtilmiştir. Toplam 50 µl’lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR tamponu, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksiniükleotidlerin her birinden 200 µM, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase enzimi (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), primer çiftlerinin her birinden 50 pmol ve 2,5 µl template DNA ilave edildi. PZR amplifikasyonunda 95 °C’de 2 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu, 95 °C’de 1 dk denatürasyon, 50 °C’de 1 dk bağlanma, 72 °C’de 1 dk uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72 °C’de 5 dk son uzama işlemi yapıldı. Oluşan ürünler %1,5’lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlendi.

Tek primer çifti kullanılarak yapılan PZR’de *N. ceranae*’nın pozitif kontrolleri için 218-219 bp ve *N. apis*’in pozitif kontrolleri için 321 bp’lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 1A). Aynı pozitif kontrollerin *Nosema ceranae* ve *N. apis*’e spesifik primer çiftleri birlikte kullanılarak yapılan multipleks PZR’inde *N. ceranae* ve *N. apis*’e ait spesifik bantlar aynı anda elde edilmiştir. Böylece multipleks PZR ile gerek tek ve gerekse miks enfeksiyonların belirlenebileceği anlaşılmıştır (Şekil 1B). 2007 ve 2008 yılına ait saha izolatlarından elde edilen templateler hem PZR, hem de multipleks PZR’de kullanılmıştır. Elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi ve ethidium bromide ile boyanmasından sonra *N. ceranae* için spesifik bantları verdiği görülmüştür (Şekil 1 A, B).



Şekil 1: A. M: Marker (100bp DNA ladder, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: *N. apis* pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol (distile su), 3: 2007 yılı izolatu, 4: 2008 yılı izolatu, 5: *N. ceranae* pozitif kontrol, 6: Negatif kontrol, 7: 2007 yılı izolatu, 8: 2008 yılı izolatu. Şekil 1: B. M: Marker, 1: *N. apis* ve *N. ceranae*’ya ait pozitif kontroller (2.5 µl *N. apis* DNA’sı + 2.5 µl *N. ceranae* DNA’sı karışımı), 2: Negatif kontrol, 3: 2007 yılı izolatu, 4: 2008 yılı izolatu.

Figure 1: A. M: Marker (100bp DNA ladder, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: *N. apis* positive control, 2: Negative control (distilled water), 3: 2007 isolate, 4: 2008 isolate, 5: *N. ceranae* positive control, 6: Negative control, 7: 2007 isolate, 8: 2008 isolate. Figure 1: B. M: Marker, 1: Positive controls of *N. apis* and *N. ceranae* (mixture of 2.5 µl *N. apis* DNA + 2.5 µl *N. ceranae* DNA) 2: Negative control, 3: 2007 isolate, 4: 2008 isolate.

Nosematosis *N. apis* ve *N. ceranae*’nin neden olduğu son derece önemli ve yaygın bir bal arısı hastalığıdır (13). Hastalığın teşhisi mikroskopta *Nosema* sp. sporlarını görmek sureti ile yapılmaktadır. Ancak her iki türün sporları da morfolojik olarak birbirine çok benzediklerinden geleneksel mikroskobik yöntemlerle tür ayrımı yapmak oldukça zordur (6, 13). Bu nedenle günümüzde iki patojenin neden olduğu enfeksiyonların ya da miks enfeksiyonların tanısında PZR, Multipleks PZR, DNA dizileme ve PZR-RFLP (PZR-Restriction Fragment Length Polimorphism) gibi moleküler biyolojik teknikler kullanılmaktadır (2, 3, 7, 8, 16).

Chen ve ark. (3), nosematozis PZR ile teşhisi ve tür ayrımı amacıyla rRNA genini hedef alan farklı primer çiftlerini kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Avrupa bal arısı kolonilerinde *N. ceranae*'yı ilk kez tespit etmişlerdir. Klee ve ark. (10), *Nosema* türlerinin teşhis ve ayrımında PZR-RFLP tekniğini kullanmışlardır. Bu amaçla 16S rRNA'nın 400 bp'lik bölgesini çoğaltan primerleri dizayn etmişlerdir. Bu gen bölgesinin kesiminde ise *PacI*, *NdeI* ve *MspI* adlı restriksiyon enzimlerini kullanmışlardır. *PacI* in sadece *N. ceranae*'nin, *NdeI* 'in sadece *N. apis*'in, *MspI*'in ise *N. ceranae*, *N. apis* ve *N. bombi*'nin, PZR ile çoğaltılan 16S rRNA genini kestiğini, PZR-RFLP tekniğinin hastalığın teşhisinde ve hastalığa neden olan türlerin ayrımında, oldukça hızlı ve güvenilir olduğunu ifade etmişlerdir. Higes ve ark. (8), 16S rRNA genini PZR ile çoğalttıktan sonra dizileyerek Avrupa'da ilk kez Avrupa bal arısı kolonilerinde *N. ceranae*'yı tespit etmişlerdir. Aynı tekniği kullanan farklı araştırmacılar Kanada, Orta Amerika (16) ve Fransa'daki (2) Avrupa bal arısı kolonilerinde ilk kez *N. ceranae*'yı tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Hernández ve ark. (7), nosematozis teşhisi amacıyla 16S rRNA genini hedef alan primerler dizayn etmişlerdir. *N. apis* ve *N. ceranae*'ya spesifik olan bu primerlerin multipleks PZR'de miks enfeksiyonların teşhisi amacıyla kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Hernández ve ark. (7) tarafından dizayn edilen, bu çalışmada kullanılan primer çifti ve multipleks PZR tekniği, günümüzde nosematozis teşhisinde OIE (Office International des Epizooties) tarafından önerilmektedir (11).

Ülkemizde hastalığın mikroskobik tanısına yönelik çalışmalar yapılmış ve hastalığın yaygınlığı hakkında bilgi verilmiş (4, 14, 15) ancak moleküler düzeyde tür tayinine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa *N. ceranae* moleküler olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan Multipleks PZR tekniği, laboratuvarımızda hastalığın rutin teşhisi amacıyla; her iki patojeni aynı anda tespit edebilmesi ile PZR'den, tek aşamalı ekonomik ve kolay olması yönü ile de PZR-RFLP ve DNA dizileme tekniklerinden daha uygun bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda ülkemizde daha fazla koloninin incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Konuyla ilgili çalışan araştırmacıların elinde stok halinde geçmiş yıllara ait *Nosema* sporları bulunuyorsa, bunların moleküler olarak tür tayinlerinin yapılması da bu hastalığın ülkemize kaç yılında girdiğinin tespit edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca nosematozis mikroskobik olarak teşhisinde tür ismi verilmesinden kaçınılması ve *Nosema* sp. yazılmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Nosema apis ve *N. ceranae*'nin pozitif kontrollerinin temininde yardımcı olan Dr. Raquel

Martin-Hernández'e (Centro Apicola Reginal, Spain) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Bailey L, Ball BV (1991): *Honey Bee Pathology*. 2nd ed. Academic Press, London.
2. Chauzat MP, Higes M, Hernández RM, Meana A, Cougoule N, Faucon JP (2007): *Presence of Nosema ceranae in french honey bee colonies*. J Apic Res, **46**, 127-128.
3. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS (2008): *Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (Apis mellifera) in the United States*. J Invertebr Pathol, **97**, 186-188.
4. Çakmak İ, Aydın L, Güleğen AE (2003): *Güney Marmara Bölgesinde balarısı zararlıları ve hastalıkları*. Uludağ Arıcılık Derg, **1**, 33-35.
5. Fries I (1997): *Protozoa*. 59-76. In: Morse RA, Flottum K (Ed), *Honey Bee Pests, Predators, Diseases*. A I Root Company, USA.
6. Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ (1996): *Nosema ceranae (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee Apis cerana (Hymenoptera, Apidae)*. European J Parasitol, **32**, 356-365.
7. Hernández RM, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Bailon EG, Higes M (2007): *Outcome of colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae*. Appl Env Microbiol, **73**, 6331-6338.
8. Higes M, Hernández RM, Meana A (2006): *Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe*. J Invertebr Pathol, **92**, 93-95.
9. Higes M, Hernández RM, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal M J, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A (2008). *How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse*. Env Microbiol, **10**, 2659-2669.
10. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ (2007): *Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, Apis mellifera*. J Invertebr Pathol, **96**, 1-10.
11. OIE (2008): *Nosematosis of honey bees*. http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf Erişim tarihi: 29.05.2009
12. Paxton RJ, Julia K, Seppo K, Ingemar F (2007): *Nosema ceranae has infected Apis mellifera in Europe since at least 1998 and may be more virulent than Nosema apis*. Apidologie, **38**, 558-565.
13. Somerville D, Hornitzky M (2007): *Nosema disease*. http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0003/177519/nosema-disease.pdf Erişim tarihi: 27.03.2009
14. Şimşek H (2005): *Elazığ yöresi bal arılarında bazı parazit ve mantar hastalıklarının araştırılması*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **52**, 123-126.
15. Şimşek H, Dilgin N, Gültekin İ (2001): *Elazığ yöresinde bulunan arı işletmelerinde nosematozis yaygınlığı*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, **12**, 49-51.

- 16. Williams GR, Shafer ABA, Rogers REL, Shutler D, Stewart DT (2008):** *First detection of Nosema ceranae, a microsporidian parasite of European honey bees (Apis mellifera), in Canada and Central USA.* J Invertebr Pathol, **97**, 189-192.

Geliş tarihi: 02.04.2009 / Kabul tarihi: 12.10.2009

Yazışma Adresi:

*Dr. Armağan Erdem Ütük
Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
06020 Etlik/Ankara
e-mail: erdemutuk@hotmail.com*