

Türkiye’de Yaygın Olarak Görülen Bakteriyel Arı Hastalıklarının PCR Yöntemi İle İdentifikasyonu

Özet

Ülkemizde yaygın olarak görülen ve koloni kayıplarına sebep olan, aynı zamanda arıcılık sektörünü büyük oranda etkileyen bakteriyel hastalık etkenlerinin izolasyonu için primer dizayn edilmesi ve moleküler yöntemlerden PCR kullanılarak 16S ribozomal RNA gen bölgesinden hastalığın var/yok analizinin yapılarak asemptomatik bireylerde de kısa süre içerisinde identifikasyonun sağlanması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel Arı Hastalıkları, PCR, Paenibacillus larvae

Giriş

Türkiye 6 milyonun üzerindeki koloni varlığı ile Dünya’da üçüncü sırada yer alırken, bal üretiminde ise Çin’den sonra 2. sırada yer almaktadır. Ülkemiz koloni varlığında her yıl artış sağlanmasına rağmen koloni başına ortalama bal verimi düşüktür (FAO., 2012). Bunun en önemli nedenlerinden birisi de arı hastalık ve zararlıları hakkında yeterli bilgiye sahip olunmaması, gerekli mücadelenin zamanında ve doğru bir şekilde yapılmamasıdır. Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak bulunan bakteriyel arı hastalık ve zararlılarıyla mücadelede kullanılacak moleküler yöntemlerin teşhisi ve önemi hakkında bilgi verilecektir. Ülkemizde yaygın olarak bulunan bakteriyel arı hastalıkları Amerikan Yavru Çürüklüğü ve Avrupa Yavru Çürüklüğüdür.

Amerikan Yavru Çürüklüğü: Bu hastalık bal arısı larvalarında görülen ve larvaların ölüp kokuşmasına yol açan çok tehlikeli ve salgın bir yavru hastalığıdır. Hastalığın etmeni Paenibacillus larvae larvae adlı sporlu bir bakteridir (Uygur ve Girişgin., 2008). Paenibacillus larvae larvae gram pozitif bir bakteri olup, sporları yavrular için patojendir. Besinlerle beraber larvalara bulaştırılan bakteri sporları larvalarda hastalığa neden

olur (Zeybek, 1991). Hastalık etmeni olan sporlar kuru olarak 100°C’de 8 saat, sıvı içinde ise 90°C’de 120 dakika ve 100°C’de 11-14 dakika dayanabilmektedir. 100°C ısıtılmış balda 30 dakika yaşadığı saptanmış, 116°C sıcaklıkta ise 20 dakikada öldüğü bilinmektedir (Öncüer ve Benlioğlu, 1998). Bu sporlar kovanda 33 yıl, toprakta 60 yıl ve temel petekte 45 yıl canlı kalabilmektedirler. Ülkemizde ihbarı zorunlu olan bu hastalıkla en kesin ve etkili mücadele yöntemi, hastalıklı kolonilerin tümüyle yakılarak yok edilmesidir (Gülpınar, 2005; Uygur ve Girişgin., 2008).

Avrupa Yavru Çürüklüğü, bal arılarının larva döneminde görülen bakteriyel bir hastalıktır. Etkeni Melissococcus pluton isimli bir bakteridir. Larvalar hastalık etmenini ağız yolu ile alırlar. Sindirim sistemine yerleşen bakteriler barsakta gelişir ve dışkı ile petek gözünün tabanına atılırlar. Petek gözünü temizleyen arılar bakterileri diğer arı ve yavrulara bulaştırırlar. Bakteriler larvanın pupa dönemine zayıf olarak girmesine veya ölmesine yol açar. Genellikle, ilkbahar ve sonbahar mevsiminde ve açık gözlerde bu hastalık görülür. Soğuk hava yetersiz beslenme hastalığın şiddetini artırır (Özkök 1995; Şahinler ve Gül., 2005).

Bakteriyel Arı Hastalıklarına Yönelik PCR Uygulaması

Nükleik asitlerin çoğaltılması ve tanımlanmasına imkan sağlayan, 1983 yılında Kary Mullis tarafından Thermus aquaticus’dan izole edilen Taq DNA polimerazı moleküler biyolojide özellikle “in vitro” şartlarda termostabil “polymerase chain reaction” (PCR) tekniğinde başarı ile uygulaması araştırmacılara bu alanda yeni bir kapı açmıştır (Günel, T., 2008).

Şükrü ÖNALAN¹
Dilek KABAKCI²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi,
Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar
Anabilim dalı, Van.

²Aricılık Araştırma İstasyonu
Müdürlüğü, Ordu.



PCR için Kullanılacak Primerlerin Dizaynı

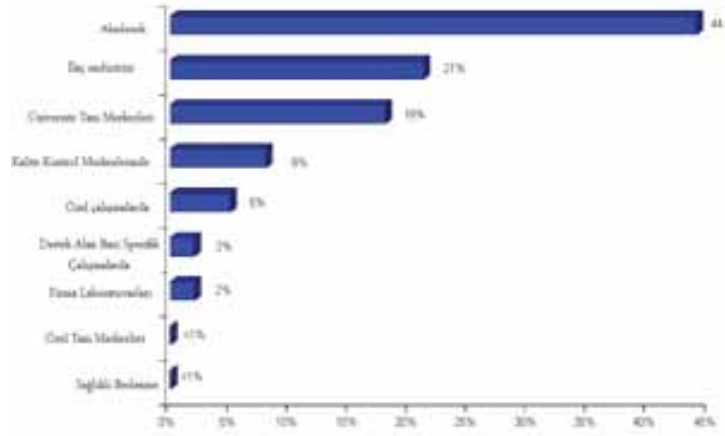
- 15-20 baz uzunluğunda boyları birbirine yakın olmalı,
- Genomda hedeflenen bölgelere uyumunun kontrolü yapılmalı,
- Tm ("melting temperature"=Çift iplikli DNA molekülünün % 50'sinin birbirinden ayrılması için gerekli olan ısı) 58-60 oC olmalı,
- Reaksiyon içerisinde konsantrasyonu 50-200 nmol arasında olacak şekilde düzenlenmeli,
- Primer tasarımında hazır bilgisayar programları olduğu gibi bir çok firma tarafından kit olarak üretimi yapılmaktadır (Küfrevioğlu, Ö. İ., 2008).

Primer dizaynı var/yok analizi için yapılabildiği gibi, genin tamamının çoğaltılması amacıyla da yapılabilmektedir. Primer dizaynı yaparken öncelikle bakteriyel arı hastalığını meydana getiren patojenin NCBI (National Center for Biotechnology Information) sitesinden etkene özgü dizilime erişiyoruz. Bu amaçla DNA üzerindeki mutasyona en az uğrayan ve en çok korunan bölge olan 16S ribozomal RNA gen bölgesini tercih ediyoruz.

DNA İzolasyonu

Bakteriyel arı hastalıklarına sebep olan patojenlere ait primer dizaynı yapıldıktan sonra DNA izolasyonu basamağına geçilerek PCR uygulaması için kalıp DNA elde edilmiş olur.

10 g her bir bal örneği 10 ml steril distile su içerisinde süspanse edilir ve 95 oC'de 6 dakika inkübe edilir. Sonradan, bu solüsyonun 10 ml'si 4.000 g'de 30 dakika santrifüj edilir. Elde edilen pelletler DNA ekstraksiyonu için kullanılır. Balmumu örneklerine de benzer metot uygulanır fakat örnekler 1g olarak alınır. Klinik semptomlar gösteren larvalar 500µl PBS içerisinde



Resim 1. PCR uygulama alanları (Günel, T., 2008).

Resim 2. Bakteriyel arı hastalığını meydana getiren patojenin DNA'sına ait NCBI sitesinde 16S ribozomal RNA gen bölgesinin seçimi.

Resim 3. Bakteriyel arı hastalığını meydana getiren patojene ait NCBI sitesinde 16S ribozomal RNA gen bölgesinin özellikleri

Sonuçlar

Bakteriyel arı hastalıklarını meydana getiren iki patojen etken ülkemizde hem ekonomik yönden hem de arı yetiştiriciliği yönünden büyük öneme sahiptir. Hastalık semptomu göstermeyen yani asemptomatik seyretme durumunda teşhis yönünden moleküler yöntemlerin kullanılması hem doğruluk oranının yüksek oluşu hem de sonuçların somut bir şekilde göz önüne serilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Bakteriyel arı hastalıklarını meydana getiren patojenlerin izolasyonu hakkında dünyada, Chagas, S. S., ve arkadaşları brezilyadan izole edilen *Paenibacillus larvae* izolatlarının karakterizasyonu, Hornitzky MAZ ve Clark S *Bacillus larvae*'nin kültürü ve özellikleri, Dernakhshifar I Amerikan yavru çürüklüğünün erken tanısı için diagnostik yöntemler, Peters M, Kilwinski J, Beringhoff A, ve arkadaşları Avrupa yavru çürüklüğü etkeninin genotiplendirmesi, Türkiye'de ise Aydın N, ve ark. *Paenibacillus larvae*'nin izolasyonu ve Kılıç A. ve arkadaşları Amerikan yavru çürüklüğü hastalığının kültür ve PCR ile ortaya konması amacı ile çalışmalar yapmışlardır. Arı hastalıkları konusunda yapılan bu çalışmalar ileride yapılacak çalışmalar yönünden büyük önem arz etmektedir.

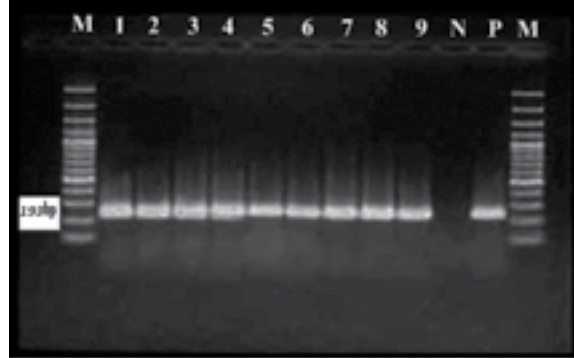
Sonuç olarak, arı hastalıklarında kullanılan moleküler yöntemler, hastalıkların teşhis ve epidemiyolojisinde, tür içi ya da türler arası yapılacak taksonomik çalışmalarda, gen kaynaklarının tespiti ve korunması gibi daha birçok konuda yapılacak araştırmalar için rutin bir araç haline gelmişlerdir.

```
KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
      start  len  tm  gc%  any  3' seq
1 LEFT PRIMER  967  20  60.02  45.00  4.00  2.00  aagcaacgagcaagaacacotta
  RIGHT PRIMER 1159  20  60.01  60.00  6.00  2.00  cttagatgagcgcacccctctgc
  PRODUCT SIZE: 193, FAIR ANY COMPL: 4.00, FAIR 3' COMPL: 1.00
2 LEFT PRIMER  774  20  60.07  50.00  2.00  0.00  tggggagcaaacacaggattag
  RIGHT PRIMER  986  20  60.02  45.00  4.00  0.00  taaggtctcttcgctgtgctt
  PRODUCT SIZE: 213, FAIR ANY COMPL: 5.00, FAIR 3' COMPL: 1.00
3 LEFT PRIMER  773  20  59.93  50.00  2.00  2.00  gtggggagcaaacacaggatta
  RIGHT PRIMER  986  20  60.02  45.00  4.00  0.00  taaggtctcttcgctgtgctt
  PRODUCT SIZE: 214, FAIR ANY COMPL: 5.00, FAIR 3' COMPL: 2.00
4 LEFT PRIMER  895  20  59.91  50.00  3.00  1.00  acggttcgcaaacagctgaacct
  RIGHT PRIMER 1140  20  60.01  50.00  4.00  2.00  cgtctgagcaaacctaaagctca
  PRODUCT SIZE: 246, FAIR ANY COMPL: 4.00, FAIR 3' COMPL: 2.00

Statistics
con  too  in  in  no  tm  tm  high  high
sid  many  tar  excl  bad  GC  too  too  any  3'  poly  high
ered  Na  get  reg  GC%  clamp  low  high  compl  compl  X  stab  ok
Left  3540  147  0  0  1105  0  809  755  0  7  0  147  570
Right 3568  134  0  0  1107  0  835  767  0  1  0  136  588
Fair State:
considered 660, unacceptable product size 652, ok 8
primer3 release 1.1.4
```

Resim 6. Bakteriyel arı hastalığını meydana getiren patojene ait Primer3 sitesinden 16S ribozomal RNA gen bölgesine ait seçilen primerlerin özellikleri



Resim 7. Agaroz Jel Elektroforez Uygulama Sonrası Bantların görünümü (Kılıç, A., Şimşek, H., Kalender, H., 2010).

Kaynaklar

- Anonim.,(2012).<http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>, <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>
- Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, Nowotny N (2003) Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: Comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1504-1510.
- Chagas, S. S., Vaucher R. A., Brandelli A., (2012). Characterization of *Paenibacillus larvae* isolates from Brazil. *Journal of Cell and Molecular Biology* 10(2):79-83, 2012
- Günel, T., (2008). Real-Time PCR ve Uygulama Alanları. İ.Ü.Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İ. Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIYOGEM). Real-Time PCR Çalıştayı Uygulamalı Eğitim Programı.
- Gülpınar, V. 2005. Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Teknik Arıcılık*. 87: 2- 7.
- Kılıç, A., Şimşek, H., Kalender, H., (2010). Detection of american foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*) by the PCR and culture. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 16(5): 841-845, 2010.

- Küfrevioğlu, Ö. İ., (2008). Primer Dizaynı. *Uygulamalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Yaz Okulu*, Erzurum.
- Öncüer, C., Benlioğlu, K. 1998. Bal arısı Zararlıları, Hastalıkları ve Zehirlenmeleri. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları. Yayın no: 3. Aydın.
- Özkök, D. 1995.Toros Dağ Köylerinde Arıcılığı Geliştirme Olanakları.Yüksek Lisans Tezi.Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.
- Şahinler N. Gül A.,(2005). Hatay Yöresinde Bulunan Arıcılık İşletmelerinde Arı Hastalıklarının Araştırılması., *Uludağ Bee Journal February* 2005-5
- Türe, M., Eroğlu, O., Aksakal, E., (2012). Balık Hastalıklarında Moleküler Genetik Belirteçler ve Kullanımları. *Yunus Araştırma Bülteni* 2012 (3):8-17.
- Uygun, S.Ö., Girişgin, O.A. (2008). Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları, U. Arı Drg. Kasım 2008 / U. Bee J. November 2008, 8(4):130-142
- Zeybek, H., (1991) Arı Hastalık ve Zararlıları, Etik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, 96, Ankara