

## BAL ARISI ZEHRİNİN KARAKTERİZASYONUNDA SDS-PAGE ELEKTROFOREZ KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

The Investigation of Usage of SDS-Page Electrophoresis in Identification of Honey Bee Venom

(Extended Abstract Can be Found at the end of the Article)

Yakup ŞİRİN<sup>1</sup>, Hilal Ebru ÇAKIR<sup>1</sup>, Zehra CAN<sup>2</sup>, Oktay YILDIZ<sup>3</sup>, Sevgi KOLAYLI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi, Şebinkarahisar Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Giresun

<sup>3</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi, Maçka M.Y.O., Trabzon

Geliş tarihi: 12.12.2016

Kabul Tarihi: 09.01.2017

### ÖZ

Arı zehri (bee venom, apizehir) açık renkte, kokusuz, sıvı bir madde olup, keskin, acı bir tada sahip bir peptit ve protein karışımıdır. Biyolojik aktif değeri yüksek çok sayıda peptit ve proteinden oluşan arı zehri apiterapi uygulamaları için çok değerlidir. Kozmetikten apiterapi uygulamalarına kadar çok sayıda kullanım alanı bulan arı zehrinin kullanılmadan önce kalitesinin test edilmesi gerekir. Arı zehri analizi HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF gibi ileri analiz yöntemleri ve laboratuvar donanımı gerektirmektedir. Yapılan bu çalışmada, arı zehrinin pratik ve ucuz yolla teşhis edilmesine imkân sağlayan metot geliştirildi. Taze toplanan arı zehrinin ham protein miktarı ile sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez kromatografisi yapıldı. Toplam protein miktarı %66 olarak bulunan arı zehrinin SDS-PAGE ile üç önemli protein bandı elde edildi. Molekül ağırlıkları yaklaşık 30 ve 40 kDa iki küçük ve molekül ağırlığı yaklaşık 4 kDa olan büyük bir protein bandı elde edildi. Arı zehrinin yaklaşık %60'ını oluşturan melittin küçük molekül kütlelerinden dolayı en uzağa yürüyen bant olup (4 kDa.dan küçük) molekül ağırlığı 30-40 kDa arasında olan iki küçük bantın hyaluronidaz, fosfolipaz A2 enzimlerine ait oluşu tespit edildi. Sonuç olarak, SDS-PAGE elektroforez tekniği arı zehrinin pratik olarak teşhis edilmesine uygun bir yöntem olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Arı zehri, SDS-PAGE elektroforez, melittin

### ABSTRACT

Apitoxin called or bee venom is light color, odor-free, liquid, its taste is bitter and apitoxin is a protein mixture. Peptides and protein of the bee venom have many biological activities and its very important for apitherapeutic applications. Bee venom is used in many areas like apitherapeutic applications and cosmetics, and should be analyzed before uses. Bee venom analyzed need sophisticated analyzed techniques, such as HPLC, LC-MS/MS, MALDI-TOF and developed equipment. In this study, an identification method of bee venoms was developed, and this method provides us to identify bee venoms in a cheap and simple way. Crude protein amount and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the fresh collected bee venom was analysed. Total protein content of the sample was 66% and three important protein bands was obtained. Two small bands of nearly 30 and 40 kDa and a big band of nearly 4 kDa was obtained of the SDS-PAGE. The smallest band (4 kDa) represents melittin, which forms approximately %60 of dried bee venom, because of the small molecular mass of melittin. Also, the other bands (30 and 40

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

kDa) represent hyaluronidase and phospholipase A2, which are characteristic proteins of bee venom. In conclusion, SDS-PAGE gel electrophoresis is very suitable for determination identification bee venom that was a practical way.

**Key word:** Bee venom, SDS-PAGE electrophoresis, melittin

### GİRİŞ

Bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri gibi arı ürünlerinin insan sağlığı için her türlü kullanımı apiterapi olarak adlandırmakla birlikte bu yöntem geleneksel ve tamamlayıcı tıbbin önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Stangaciu, 2006; Zumla ve Lulat, 1989). Apiterapinin kökeni insanlık tarihi kadar eski olup ilk kayıtlı metinler 6000 yıl öncesindeki antik Mısır'a kadar dayanmaktadır. Apiterapi uygulamalarında arı zehrinin yeri oldukça farklı olup daha çok canlı arının kullanıldığı arı sokması olarak bilinen tedavi yöntemleri günümüzde Çin, Kore, Rusya, Romanya, Ukrayna, Doğu Avrupa ve Güney Amerika gibi dünyanın pek çok yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1997; Molan, 2006; Moolenaar ve ark., 2006; Lee ve ark., 2005).

Arılar, Hymenoptera takımının Aculeata grubunda Apoidea üst familyasının bir bölümü olan Apiformes'i oluşturan böceklerdir. Yeryüzünde şimdiki kadar tanımlaması yapılmış 18.000'e yakın arı türü bulunmaktadır (Michener, 2007). Hymenoptera takımı üyeleri insanlar için zehirli olan en önemli böcek gruplarından biridir. İşçi arılarda bulunan ovipozitörün (yumurtlama organı) yapısal değişikliğe uğrayarak, savunma amaçlı kullanılan kompleks bir yapıya olan arı iğnesine dönüşür. Zehir miktarı işçi arılar 2-3 haftalık olduğunda maksimum seviyeye ulaşır, daha sonra giderek zehir miktarı azalır (King ve Guralnick, 2004; White, 2000). İğneyle birlikte işçi arı zehir kesesini, kaslarını ve sinir merkezini kaybeder. Vücudunun önemli bir bölümünü kaybeden arı 2-4 saat içinde ölür (White, 2000).

Arı zehri, arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca melittin, apamin, MCD-peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz A2 bulunan, keskin kokulu, acı tatta, sarımsak renkte, sıvı, hava ile temas edince çabuk kuruyup kristalize olan bir karışımdır (Anonim, 1989). Arı zehri eski çağlardan günümüze kadar daha çok ağrı azaltıcı ve iltihaplı romatizmal hastalıklara karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Billingham ve ark., 1973). Son yıllarda arı zehri tedavisi özellikle romatoid

artrit, multiple sclerosis (MS), kanser ve zona tedavileri için destekleyici tedaviler sunmaktadır (Park ve ark., 2004; Son ve ark., 2007; Putz ve ark., 2006; Gajski ve ark., 2014; Kim ve ark., 2015).

Arı zehri toplanmasında birkaç farklı yöntem kullanılmakla birlikte elektroşok yöntemi en yaygın kullanılan yöntem olup en yüksek verimin alındığı tekniktir (Özbek, 1990, Golden ve ark., 1997). Bu teknikte 12 voltluk akım ile toplanan zehir, cam levhadan bir süre sonra opak bir toz olarak kazanır. Zehir, rutubet ve ışıktan korunursa uzun yıllar muhafaza edilebilir. Aksi takdirde oksidasyona bağlı olarak, rengi beyazdan kahverengi ve sarıya dönüşür ve oksidasyon ile terapötik etkisi azalır (Atayoğlu, 2012). Arı alerjisi olan hastaların %50'den fazlasında IgE antikorlarının oluşturduğu arı zehri protein ve enzimlerine karşı oluşan majör alerjenlerden ileri gelmektedir. Balarısı zehrinde bulunan majör alerjenler fosfolipaz A2 (Api m1), hyaluronidaz (Api m2), düşük moleküler ağırlıklı bir protein olan Api m6, asit fosfataz, allerjen C ve yüksek molekül ağırlıklı bazı proteinlerdir (Gökmen, 2008; Kelle, 2007).

Arı zehri bileşiminin yaklaşık %88'i su olup geri kalan kısmı peptitler, polipeptitler, enzimler, aminler, lipitler, şekerler ve amino asitler oluşturmaktadır (Chen ve Lariviere, 2010; Danneels ve ark., 2015; Son ve ark., 2007). Melittin majör arı proteini olup 26 aminoasitten oluşan molekül ağırlığı yaklaşık 3 kDa olan ve arı zehri kuru ağırlığının %50-60'ını oluşturur. Fosfolipaz A2 (%10-13), hyaluronidaz (%2) enzimleri ile apamin (%2-3), MCD peptid (%2-3), sekapin (%0,5-2), pamin (%1-3) peptitlerini oluşturur (Moreno ve Giralt, 2015; Bogdanov, 2016).

Bugüne kadar arı zehri karakterizasyonu için çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmiş olup bunlar arasında ince tabaka kromatografisi, kapiller elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ultra performans sıvı kromatografisi (UP-LC), MALDI-TOF teknikleri bulunmaktadır (Pacakova ve ark., 1995; Kokot ve Matysiak, 2009; Rybak-Chmielewska ve Szczêsna, 2004). Ancak, bu analiz teknikleri çok az sayıda laboratuvarında

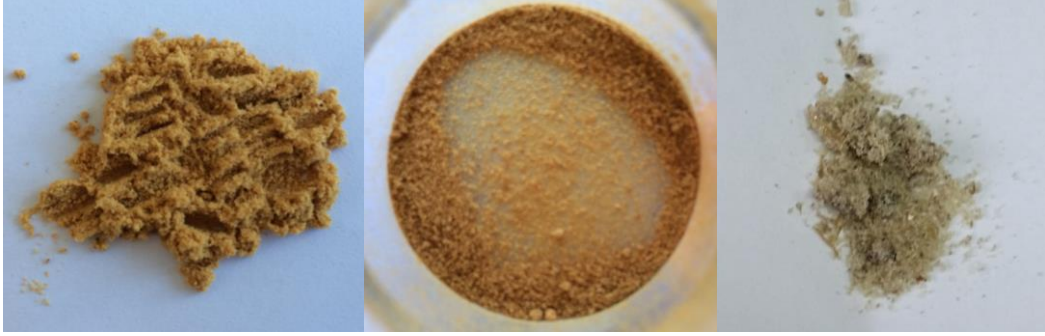
## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

yapılabilen çok sofistike yöntemler olup maliyet gerektirirler. Apiterapik uygulamalarda ve özellikle arı zehri taşımasının önlenmesi amacıyla pratik bir yöntem bulunması faydalı olacaktır. Bu amaçla, sunulan çalışmada hemen her biyokimya laboratuvarında bulunabilen ve pratik ve ucuz bir yöntem olan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforez ile arı zehri analizi yapıldı.

### MATERYAL VE METOT

#### Arı Zehrinin Temini

Çalışmada kullanılan arı zehirleri farklı zamanlarda Zonguldak bölgesi arıcılar birliği (ZAYBİR), Artvin ve Ankara bölgesi arıcılarından araştırma amaçlı temin edildi. Temiz ve kuru koyu renkli cam bir şişede -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 1. Kullanılan arı zehri örnekleri

#### Cihaz ve Kimyasallar

Kullanılan cihazlar SDS-PAGE için Bio-Rad Mini (Sigma, England), protein tayini için UV-VIS Spektrofotometre (Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS Spectrophotometer, USA), pH metre (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), çalkalayıcı (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany), etüv (Nüve, EN 400, Türkiye), hassas terazi (Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland) kullanıldı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS), bovine serum albümin (BSA), fosfomolibtik asit, amonyum persülfat, gliserol, glisin ve marker protein karışımı Sigma-Aldrich Chemie, Germany firmasından satın alındı. N,N,N',N''-Tetrametiletildiamin TEMED, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktif, bromofenol mavisi, β-merkaptotanol, Coomassie Brilliant Blue R 250 ve metanol Merck, Germany firmasından satın alındı.

#### Protein Tayini

BSA standardı kullanılarak Bradford yöntemine göre spektrofotometrik olarak toplam protein miktarı tayin edildi (Bradford, 1976). Bu teknikte negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G 250 reaktif

proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm'de absorbans verir. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılarak konsantrasyona karşı absorbans grafiğinin eğrisi hazırlanarak tayin yapıldı. Arı zehri %0.9 NaCl de çözündürüldü.

#### Protein Elektroforezi

Klasik SDS-PAGE protein elektroforez tekniğine göre tayin yapıldı. Çalışmada %5'lik yığma jeli ve %8, %10, %12 ve %15 ayırma jelleri kullanılarak en iyi ayırımın yapıldığı jeller tespit edildi.

#### Jellerin hazırlanması

Elektroforez camları etil alkol ile temizlendikten sonra cam levhalar elektroforez sistemine yerleştirildi. Tablo. 1'de oranları verilen dört farklı ayırma jeline %5, 10-12-15'lik TEMED ilave edilerek polimerleşme başlatıldı. Polimerleşmenin başlatılmasıyla birlikte hazırlanan jel cam levhalar arasına döküldü hava ile teması kesildi. Polimerleşmenin tamamlanması için 1 saat kadar beklendikten sonra jelin üzerine %5'lik yığma jeli hazırlandı ve döküldü. Cam levhaya dökülen yığma jelinin üzerine kuyucuklar oluşturmak için taraklar kondu ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

Elektroforez hazırlanmasında yapılan pipetlemeler Tablo 1’de özetlendi.

### Elektroforezde kullanılan çözeltiler

*Ayırma Jeli Tamponu* (1,5 M Tris-HCl): 9,085 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH’sı 8,80’e ayarlandı, hacmi 50 mL’ye tamamlandı ve 4°C’de saklandı.

*Yığılma Jeli Tamponu* (1 M Tris-HCl): 6,057 g Tris 45 mL saf suda çözüldü, pH’sı 6,80’e ayarlandı, hacmi 50 mL’ye tamamlandı ve 4°C’de saklandı.

*SDS Çözeltisi* (%10): 5 g SDS saf suda çözüldü hacmi 50 mL’ye tamamlandı.

*Amonyum Persülfat* (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözüldü hacmi 10 mL’ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20°C’de saklandı.

*N,N,N,N’-Tetrametiletilediamin* (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

*Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi* (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N’-metilen bisakrilamid saf suda çözüldü hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

*Gliserol Çözeltisi* (%80): 80 mL gliserolün hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.

*Bromofenol Mavisi* (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL’ye tamamlandı.

*SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi*: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1

bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptotanol’ün karıştırılması ile hazırlandı, kısımlara ayrılarak -20°C’de saklandı.

*SDS-PAGE Yürütme Tamponu*: 7,2 g glisin ve 1,5 g Tris yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,30’a ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL’ye tamamlandı.

*Jel Boyama Çözeltisi*: 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250’nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.

*Arı zehrinin elektroforez için hazırlanması*: 1 mg/mL konsantrasyonda %0,9 NaCl’de çözelti hazırlandı. Elektroforez kuyucuklarına 50 µL enjekte edildi.

Jele uygulanacak olan örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeler yapılarak etüvde 95°C’de 5 dakika bekletildi. Jel üzerindeki tarak çıkartılarak, jel tamamen tampon içerisinde kalacak şekilde elektroforez kuvetine yerleştirildi ve kuyucuklara örnekler yüklendi. Güç kaynağı ile jele 100 V ve 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi. Cam plakalar arasından çıkartılan jelin boyanması için Coomassie Brilliant mavisi kullanıldı. Jel, boya ile 10 dakika ve çalkalayıcıda 70 rpm’de çalkalandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 70 rpm’de bantlar görünür hale gelene kadar yıkandı.

**Tablo 1.** Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları

Bileşenler	%5’lik Yığılma Jeli (mL)	%12’lik Ayırma Jeli (mL)
Saf Su	2,7	3,3
%30’luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	4,0
1,5 M Tris Tamponu (pH 8,8)	--	2,5
1,5 M Tris Tamponu (pH 6,8)	0,5	--
%10’luk Amonyum persülfat	0,04	0,1
SDS (%10 w/v)	0,04	0,1
TEMED	0,005	0,004

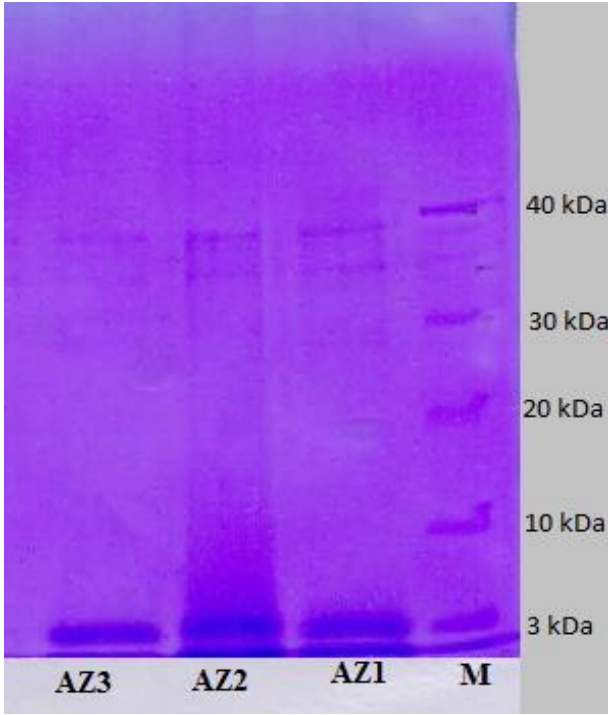
### BULGULAR

Çalışmamızda öncelikle Bradford (1976) yöntemiyle arı zehrindeki toplam protein miktarı tayin edildi ve kuru ağırlık başına %66 ham protein olduğu tespit

edildi. Elektroforez için %10’luk SDS kullanıldı ve yürütme hem %10’luk hem de %12’lik SDS-PAGE jelinde yapıldı. 100 V ve 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi. Cam plakalar arasından çıkartılan jel Coomassie

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Brillant mavisi ile 10 dakika ve 70 rpm'de çalkalanarak muamele edildi. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 70 rpm'de bantlar görünür hale gelene kadar yıkandı ve fotoğraflandı. SDS-PAGE elektroforez sonucunda jel üzerinde üç bant görüntülendi. Molekül ağırlığı 30 ile 40 kDa arasında iki küçük protein bandı ve molekül ağırlığı 4 kDa'dan daha küçük, yoğun bir protein bandı olduğu görüldü. Elde edilen üç önemli bandın molekül ağırlığı 30-40 kDa arasındaki bantlar sırasıyla hyaluronidaz, fosfolipaz A2 enzimleri molekül ağırlıkları büyük olduğu için fazla yürümemiş, en büyük bant olan melittin ise molekül ağırlığı küçük olduğu için en uzağa yürümüştür. Şekil 2'de elektroforez sonucu elde edilen SDS-PAGE elektroforez kromatogramı gösterilmektedir. Arı zehri toplam proteinlerinin %60'tan fazlasını melittinin oluşturduğu görülmektedir.



**Şekil 2.** Arı zehri içeriğindeki proteinlerin SDS-PAGE incelenmesi

## TARTIŞMA

Literatürde melittin tayini için yüksek performans sıvı kromatografisi (Szokan ve ark., 1994) ve kapiler elektroforezine (Pacakova ve ark., 1995) dayanan analitik metotlar bulunmaktadır. Arı zehri bileşiminin aydınlatılmasına yönelik yapılan bir çalışmada HPLC ile bileşenleri olan apamin, fosfolipaz A2, melittin ayrıldığı bildirilmiştir. (Rybak-Chmielewska ve Szczêsna, 2004). Bu çalışmada apamin, fosfolipaz A2 ve melittin ayrılmasında, en az 180 Å gözenek çapına sahip C18 kromatografik kolonun en uygun olduğu gözlemlenmiştir, balarısının zehir bileşiklerinin ortalama %65 melittin, %13 fosfolipaz A2 ve %3 apamin olduğu rapor edilmektedir. Farklı mevsimlerde elde edilmiş arı zehri örneklerinin melittin için istatistiksel açıdan önemli farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada arı zehrinin kapiller elektroforez ile analizi gerçekleştirilmiş olup bu analiz sonuçlarının HPLC de farklı olduğunu ve ayırımlar arasında farklılıkların bulunduğu ifade edilmiştir (Zenon ve ark. 2011).

Elektroforez tekniği, proteinleri molekül ağırlığı ve yüklerine göre ayırmaya yarayan bir kromatografik analiz yöntemi olup, karışımlardaki proteinlerin ayrılmasında, saflaştırılmalarında ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadır. Elektroforez ayrıca klinik biyokimyanın önemli araçlarından biri olup, kan serum ve plazma protein ve lipoproteinlerin analizlerinde de aktif olarak kullanılmaktadır (Longsworth ve MacInnes, 1940). Doğal-PAGE ve SDS-PAGE olarak iki farklı biçimde kullanılan elektroforez bilimsel çalışmalarda saflık kontrolü, molekül ağırlığı tayini ve proteinlerin alt birimlerinin tespiti gibi pek çok amaçla kullanılmaktadır. Bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) negatif yüklerle zengin olup proteinlerin toplam yüklerinin negatif olmasına yol açarak onları molekül ağırlığı esasına göre ayrılmalarını sağlar. Bu nedenle, proteinlerin alt birimlerinin ayrılmasında ve toplam yüklerinin negatif yüklerle yüklenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bir çözeltide bulunan proteinlerin %10'luk SDS ile muamele edilmesiyle alt birimlerine ayrılarak her bir alt birim negatif yüklerle yüklenerek polipeptitlerin molekül ağırlığına göre ayrılması sağlanır. Ancak bu çalışmada en ideal ayırımın %12'lik SDS-PAGE sonucunda olduğu ve ancak üç proteinin bandının elde edilebildiği bulundu. Protein bantlarının molekül ağırlıklarının standart protein karışımı kullanılarak tayin edildiğinde yaklaşık 3 kDa büyük bant ile 30 kDa ve 40 kDa.luk

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

iki küçük bandın olduğu tespit edildi. Melittin 26 amino asitten oluşan bir peptit olup elektroforezde en uzağa göç eden ve toplam arı zehri proteinlerinin %60'tan fazlasını oluşturduğu, diğer iki belirgin bandı ise proteinin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturan 30 kDa fosfalipaz A2 ve 40 kDa'luk hyaluronidaz enzimlerine ait olduğu düşünülmektedir.

Arı zehrinde 15-20'den fazla sayıda peptit ve protein bulunduğu bildirilmektedir. Anca SDS-PAGE elektroforezi ile bu bantları tam olarak ayırmak ve görmek mümkün değildir (Bogdanov, 2016). Çünkü bu SDS karışımındaki proteinleri alt birimlerine ayırarak toplam yüklerini eşitlediği için molekül ağırlığı birbirine yakın bantların üst üste çakıştığı düşünülmektedir. Tam bir ayırım sağlanması için mutlaka LC-Tandem Mass, kapiller elektroforez, Maldi-TOF gibi ileri ayırma tekniklerinin kullanılması gerekir. Ancak, bu çalışma ile her üç arı zehri örneğinin benzer kromatogramlar oluşturması pratik olarak arı zehri teşhisinde önemli bir ipucu veya parmak izi olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak bu üç protein varlığından yola çıkarak SDS-PAGE protein elektroforezi ile bir karışımın arı zehri olup olmadığını tespit etmek mümkün olabilir. Bu bakımdan SDS-PAGE elektroforez tekniği pratik ve ucuz bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak daha ileri ayırım ve tetkikler için ileri ayırma teknikleri ile fosfalipaz ve hyaluronidaz enzim aktiviteleri de kullanılması uygun olabilir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan arı zehirleri 114Z370 nolu TÜBİTAK projesindeki apiterapik araştırmalar için toplandı. Bu çalışmada kullanılan arı zehirlerinin temin edilmesinde emeği geçen arıcılara teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Anonim, 1989. Arı Zehri Tasarısı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Atayoğlu, T. 2012. Apiterapi Açısından Arı Ürünlerinin Kalite Kriterleri Ve Standardizasyonu, Amerikan Hastanesi, Türk Standartları Enstitüsü.
- Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, R. A., Vernon, C. A. 1973. An anti-

inflammatory peptide from bee venom. *Nature Publishing Group*.

- Bogdanov, S., 2016. Bee Venom: production, composition and quality. In: The bee venom Book, Chapter 1, Muehlethurnen, Switzerland. www.bee-hexagon.net.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72,1-2, 248-254.
- Chen J. ve Lariviere W.R. 2010. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92,151-183.
- Danneels, E. L., Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., de Graaf, D. C. (2015). Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins*, 7(11), 4468-4483.
- Gajski, G., Čimbora-Zovko, T., Rak, S., Rožman, M., Osmak, M., Garaj-Vrhovac, V. 2014. Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. *Journal of Applied Toxicology*, 34,12: 1332-1341.
- Golden, D.B., Marsh, D.G., Freidhoff, L.R. 1997. Natural history of Hymenoptera Venom Sensitivity in Adults. *Journal Allergy Clin Immunology*, 100:760-6.
- Gökmen, E.N. 2008. Venom Biyokimyası, Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics, 1(1) :22-25.
- Kelle, İ. 2007. Apiterapi. *Dicle Tıp Dergisi*, 34: 311-315.
- Kim, C. S., Yates, D. M., & Heaney, P. J. 1997. The layered sodium silicate magadiite: an analog to smectite for benzene sorption from water. *Clays and clay minerals*, 45(6), 881-885.
- Kim, J. Y., Lee, W. R., Kim, K. H., An, H. J., Chang, Y. C., Han, S. M., & Park, K. K. 2015. Effects of bee venom against *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in human keratinocytes and monocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1651-1656.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- King, T.P., Guralnick, M. 2004. Hymenoptera allergens. *Clin Allergy Immunology*, 18: 339-53.
- Kokot, Z. J., Matysiak, J. (2009). Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. *Chromatographia*, 69 (11-12), 1401-1405.
- Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. 2005. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. *Evid Based Complement Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2: 79-84.
- Longworth, L. G., MacInnes, D. A. (1940). An electrophoretic study of nephrotic sera and urine. *The Journal of experimental medicine*, 71(1): 77-82.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*, 2<sup>nd</sup> ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Molan, P. C. 2006. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int. J. Low Ekstrem Wounds*, 5 40-54 10.1177/1534734605286014.
- Moolenaar, M, Poorter, RL, van der Toorn, PP, Lenderink, AW, Poortmans, P, Gerardus Egberts, AC. 2006. The effect of honey compared to conventional treatment on healing of radiotherapy-induced skin toxicity in breast cancer patients. *Acta Oncol*, 45: 623-4.
- Moreno, M., Giralt, E., 2015. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7: 1126e1150.
- Özbek, H. 1990. Bal Arısı (*Apis Mellifera* L.) Zehri, Yüksek lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum 18s.
- Pacakova, V., Štulík, K., Hau, P. T., Jelinek, I., Vinš, I., Sýkora, D. (1995). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, 700(1), 187-193.
- Park, H.J. Lee, S.H., Son, D.J., Oh, K.W., Kim, K.H., Song, H.S., Kim, G.J., G.T. Oh, Yoon, D.Y., Hong, J.T. 2004. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappa B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis & Rheumatology* 50: 3504-3515.
- Putz, T., Ramoner, R., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., Thurnher, M. 2006. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 55: 1374-1383.
- Rybak-Chmielewska, H., Szczêsna, T. 2004. HPLC Study of Chemical Composition of Honeybee (*Apis Mellifera* L.) Venom. *Journal of Apicultural Science*. 48 (2): 187-193.
- Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology Therapeutics Journal*. 115: 246-270.
- Stangaciu, S. 2006. What is apitherapy? [www.apitherapy.com](http://www.apitherapy.com) (Accessed 27.10.06).
- Szokan G., Horvath J., Almas M., Saftics G., Palocz A. (1994). Liquid Chromatographic Analysis and Separation of Polipeptide Components from Honey Bee Venoms. *J. Liquid. Chrom.*, 17 (16):3333-3349.
- White, J. 2000. Bites and Stings From Venomous Animals a Global Overview. *Ther Drug Monitoring*. 22: 65-68.
- Zenon J. K., Matysiak, J., Urbaniak, B., Dereziński, P. 2011. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399:7, 2487-2494.
- Zumla ve Lulat, 1989. Honey-a remedy rediscovered. *Journal of the royal society of medicine*. 82 (7): 384-385.

### EXTENDED ABSTRACT

Bee venoms are important natural protein mixtures in traditional medicine. The amount of venom in the body of a bee depends on season and the kind of bee, and the amount is generally between 0.05 mL/bee and 0.30 mL/bee. Bee venoms have pharmacological importance, and bee venoms

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

consist of lots of peptides and proteins. In recent years, bee venoms have used in cosmetics and pharmaceutical industry. Therefore, bee venoms are launched to the market as different productions. However, the productions of bee venoms must be tested in point of their qualification before they reaches the costumers. Actually, there is not a certain way to recognize whether a production is made of bee venom or not, and advanced analysis techniques like HPLC, LC-MALDI-TOF and capillary electrophoresis are mostly used in order to identify these productions. Also, the characterization of bee venoms can be done by using the characterization techniques of some enzymes like phospholipase, hyaluronidase and glucosidase. However, these techniques are very expensive and also require lots of experiences in this field. As a result of these requirements, in this field, there is a need for a simple technique in order

to identify bee venoms. In this study, a new identification method of bee venoms was developed, and this method allows us to identify bee venoms in a cheap and simple way. Firstly, the total amount of protein in bee venom was determined as 66%. Subsequently, qualitative analyses of the bee venom were fulfilled by using Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). With 12% of separation gel and 10% of SDS gel, two protein bands whose molecular weights are between 30 and 40 kDa. were obtained, and also a dense protein band being under 4kDa. was obtained. Because of the small molecule mass of melittin, which involves approximately 60% of mixture of bee venom, the outmost band under 4 kDa. and the bands between 40 and 30 kDa. represent hyaluronidase and phospholipase A2 which are characteristic proteins of bee venom.



## BAL ARILARINDA YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ VE KİREÇ HASTALIĞINA BAĞLI KOLONİ KAYIPLARI

### Colony Losses Linked to Foulbrood and Chalkbrood Diseases

(Extended Abstract Can be Found at the end of the Article)

Ebru BORUM<sup>1</sup>, İbrahim ÇAKMAK<sup>2</sup>, Selvinar SEVEN ÇAKMAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, ebruborum@balikesir.edu.tr

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi, Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi (AGAM), Görükle Kampüsü, Bursa

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan, Ankara

Geliş tarihi: 09.02.2017

Kabul Tarihi: 02.03.2017

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Bursa bölgesinde 2011-2013 yıllarında yavru çürüklüğü ve kireç hastalığının koloni kayıpları üzerine etkisini araştırarak değerlendirilmesidir. Bu çalışma, Anadolu arısı (*Apis mellifera anatoliaca*) ile Uludağ Üniversitesi Arıcılık Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Görükle kampüsü Bursa'da ilkbahar, yaz ve sonbahar dönemlerinde 200 koloni ile yapılmıştır. Tüm koloniler 2009 yılı Eylül ayında Bursa ve ilçelerindeki sabit arıcılardan satın alınmıştır. Alınan örnekler yavru çürüklükleri ve mantar hastalıkları yönünden incelenmiş ve koloni kayıpları açısından özellikle kış ve ilkbahar dönemlerinde değerlendirilmiştir. Klinik ve laboratuvar bulguları ile yavru çürüklükleri ve mantar hastalıkları incelenmiştir. 2011-2012 kış sezonunda toplam sönen kolonilerin %12.90'ında yavru çürüklüğü, 2012-2013 kış sezonunda sönen kolonilerin ise %14'ünde yavru çürüklüğü hastalığı belirlenmiştir. Aynı dönemde kireç hastalığı bulunan kovanların ise %16.60'ı sönmüştür. Yavru çürüklüğü tespit edilip 2011-2012 yılı kış sezonunda sönen kolonilerin oranı %80.9, yaşayanların oranı ise %19.10 olarak saptanmıştır. Yavru çürüklüğü belirlenen kolonilerden elde edilen suni oğul veya bölmelerden toplam 13 koloniden 10'u kış sonrası sönmüştür. Yavru çürüğü saptanan kolonilerin ancak %20'sinin ertesi yıla kadar yaşayabildiği görülmüştür. Bu durum yavru çürüklüğünün bölünen kolonilerde devam ettiğini, bu kolonilerin daha sonra öldüğünü ve koloni kayıpları açısından ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Yavru çürüklüğü görülen analardan elde edilen ya da bölünen yeni kovanlarda da hastalık bulguları görülmüş ve bazı kovanlar sönmüştür. Sonuç olarak bu çalışma ile özellikle yavru çürüklüğünün tek başına ya da birlikte koloni kayıplarına sebep olduğu ve ana arının genetik yapısının da hastalık görülmesinde etkili olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bal arısı, *Apis mellifera anatoliaca*, yavru çürüklüğü, kireç hastalığı, koloni kayıpları

#### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate colony losses due to the foulbrood and chalkbrood diseases in Bursa province of Turkey in the years of 2011-2013. The totals of 200 Anatolian honey bee (*Apis mellifera anatoliaca*) colonies were used for the study in Gorukle campus of Uludag University Beekeeping Development Application and Research Center, Bursa. All these colonies were bought from stationary beekeepers in Bursa province and surrounding area in September of the year of

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

2009.The samples were taken and cultured for identification of foulbrood and chalkbrood. The colonies were monitored for colony losses in winter and spring particularly. The samples for foulbrood and chalkbrood taken were examined by clinical and laboratory methods. Of colonies died in the years of 2011-2012 winter those diagnosed foulbrood about%12.90, and those of % 14 in the years of 2012-13 winter. Of those died colonies in the same years %16,60 died due to chalkbrood diseases. Of those diagnosed foulbrood diseases in the years of 2011-2012 winter season % 80,9 died and % 19.10 survived. The thirteen split colonies that were from foulbrood colonies ten of them died in winter. That is only 20 % of those colonies diagnosed foulbrood survived next year and 80 % died after winter in the spring. This means that foulbrood in the artificial swarms or splits from foulbrood colonies continued to show symptoms of foulbrood and then died. The artificial swarms or splits from foulbrood colonies originated from foulbrood queens continued to show symptoms of foulbrood and then died. As result foulbrood diseases alone or with other factors cause colony losses. Since bee colonies that have heritaged from foulbrood colonies continue to have foulbrood diseases. The result suggests here that foulbrood may have some genetic link.

**Key words:** Honey bee, *Apis mellifera anatoliaca*, foulbrood, chalkbrood, colony losses

### GİRİŞ

Bal arılarının sadece bal ve arı ürünleri üretiminde değil tozlaşmada da önemli katkıları olduğundan hastalıklara bağlı koloni kayıpları oldukça önem taşımaktadır. Çünkü koloni kayıpları aynı zamanda bitkisel ve dolaylı olarak hayvansal üretimde de ciddi üretim ve kalite kayıplarına yol açmaktadır. Son yıllarda koloni kayıpları ve buna bağlı ekonomik kayıplar söz konusu olmasına karşın, Avrupa'da tozlaşmanın ekonomik önemi konusunda yapılan güncel bir çalışmada ki kazancın 22 milyar avro olduğu rapor edilmiştir (Kandemir 2007; Gallai ve ark., 2009; Çakmak ve Seven Çakmak, 2016). Bu yüzden ABD ve AB' de son yıllarda büyük bütçeli arıcılık projeleri yapılmaktadır. Ülkemizde ise dünyadaki gelişmelerden farklı olarak Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının son yıllardaki teşvikleri ile koloni kayıpları, suni oğul ve doğal oğul ile telafi edilmekte ve hatta her yıl yaklaşık 500,00 civarında koloni kaybı yaşanmaktadır. Fakat bu durum hâlihazırda mevcut koloni kayıplarının seviyesinin görülememesine neden olmakla birlikte koloni kayıplarının da arttığı gerçeğini değiştirmemektedir. Yine de koloni başına üretimin düşmesi bir fikir vermekte olup koloni başına üretim miktarı yaklaşık 18 kg dan 14 kg a düşmüştür (Anonim, 2016).

Ülkemizde koloni kayıpları bu teşvikler ile fazla fark edilmese de giderek artmaktadır. Başta arı hastalık ve parazitleri olmak üzere zararlılar, ana arı kullanımı, besleme, koloni yönetimi, yeni nesil tarım ilaçları gibi birçok faktör koloni kayıplarının nedeni

sayılabilir. Koloni kayıplarına bakteri, parazit, virüs, zirai ilaçların bilinçsiz kullanımı dışında su, hava ve çevre kirliliği ile olumsuz iklim değişimleri de sebep olmaktadır (Bailey ve Ball, 1991; Giray ve ark., 2007; Sammataro ve Yoder, 2012; Blacquièrè ve ark., 2012; Bryden ve ark.,2013; Karahan ve ark., 2015; Çakmak ve Seven Çakmak 2016). Koloni kayıpları çoğunlukla klinik olarak ciddi semptomlar görünmeden seyretmekte, kayıplar 24 saat içerisinde ya da birçok faktörlerin varlığına bağlı olarak değişik sürelerde de gelişebilmektedir (Chen ve ark., 2006; Muz, 2008).

Bakteriler tarafından meydana getirilen arı hastalıkları, özellikle de genç larvaları etkileyenler, önemli yer tutar. Bakteriyel hastalıklar içinde özellikle Amerikan Yavru Çürüklüğü (AYÇ) ve Avrupa Yavru Çürüklüğü (AVYÇ) etkenleri arıcılıkta önemli kayıplara yol açmakta, arıcılığa ve ekonomiye büyük zarar vermektedir (Bailey ve Ball 1991; Kaftanoğlu ve ark., 1995; Tutkun ve Boşgelmez, 2003; Ellis ve Munn, 2005). Hastalıklar sonucu arı kayıpları genellikle kış ve ilkbahar aylarında görülür. İlkbahar aylarında özellikle yavru yetiştirme faaliyetinin büyük hız kazanmış olması ve beklenmeyen soğuk ve yağışlı havalarda bu kayıpların artma sebebidir. Çünkü bu dönemde zayıf olan arı kolonileri yavrulu alanda gerekli olan 35-36°C olan sabit sıcaklığı yeterli olmayan arı popülasyonu ile sağlayamamaktadır (Winston, 1987; Muz 2008).

En yaygın hastalıklardan birisi olan yavru çürüklüğü hastalığı farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Arıların yeterli sıcaklığı sağlayamaması durumunda

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

çoğu zaman adi yavru çürüklüğü olarak bilinen ve çevrede mevcut bakterilerin bu bakterilere karşı hassas olan kolonilerde oluşturduğu hastalık ortaya çıkmaktadır. En yaygın olarak görülen adi yavru çürüklüğü olsa da AvYÇ ve AYÇ'nin son yıllarda önemli bir koloni kaybı etkeni olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında, son yıllarda nedeni bilinmeyen ve genetik kaynaklı olduğu düşünülen yavru çürüklüğü hastalığı rapor edilmektedir (VanEngelsdorp ve ark., 2013).

Dünyanın her yerinde görülen AYÇ oldukça bulaşıcı bir hastalık olup, diğer yavru arı hastalıkları içinde en tehlikeli olanıdır. Hastalığa yakalanmış koloni her geçen gün zayıflayarak söner (Morse ve Nowogrodzki, 1990; Bailey ve Ball 1991; Kaftanoğlu ve ark.,1995; Shimanuki ve Knox 2000; Tutkun ve Boşgelmez, 2003). Bu hastalık yüksek derecede bulaşıcı bir hastalıktır ve tedavi edilmezse ciddi koloni kayıplarına neden olabilir. Hastalık sadece bireysel olarak larvalar için değil aynı zamanda tüm koloni için oldukça öldürücü ve tehlikelidir (Genersch, 2010). Yumurtanın mevcut olduğu her dönemde karşılaşılabılır. Ancak yumurtlamanın yoğun olduğu dönemde daha fazla görülür. Hastalık uzun yıllar kolonilerde kalabilir, petek ve bal ile yıllarca yeni kolonilere bulaştırılabilir (Bailey ve Ball 1991; Tutkun ve Boşgelmez, 2003)

Amerikan Yavru Çürüklüğü hastalığının etkeni *Paenibacillus larvae* ssp. *Larvae* olarak bilinmektedir. Spor formu oldukça dayanıklıdır. Toprakta 60 yıl, kovanda 33 yıl, 100°C'de ısıtılmış balda 30 dakika, normal balda 1-10 yıl, temel petekte 45 yıl, eritilmiş balmumunda 5 gün (72°C), 116°C'de ısıtılmış balmumunda 20 dakika yaşayabilir. Sporlar ısıtma, soğutma ve kimyasallara oldukça dirençlidir, hem bal hem de poleni kontamine ederler (Alippi,1999; Shimanuki ve Knox 2000; Genersch, 2010).

Avrupa Yavru Çürüklüğünün etkeni *Melissococcus plutonius*'dur. Hastalıkta sekonder bakterilerde görülür. Fakat *M. plutonius*, hastalıklarla ilgili diğer bakterilerin görülmesinden önce, hastalığın erken devresinde görülür. Sekonder bakteriler hastalığa neden olmazlar fakat ölü larvanın kıvamı ve kokusu üzerinde etkili olurlar. Sekonder bakteriyel etkenler, *Paenibacillus alvei* (indikatör mikroorganizma), *Achromobacter euridice*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis* ve *Paenibacillus apiarius*'dur. AvYÇ zamanında teşhis edilip mücadele edilmezse

hastalık ilerler ve koloni kayıpları oluşur (Russenova ve Parvanov, 2005; Forsgren, 2010).

Bal arılarındaki kireç hastalığının en yaygın etkeni *Ascospaera apis*'tir. İnfeksiyon nedeniyle arı popülasyonu azalır, bunun sonucu olarak bal üretimi düşer, larvaların %80'ininden fazlası etkilenebilir ve sonuçta infekte kovan söner. Zayıflamış koloni etkili bir tozlaşma sağlayamaz, arıliklar arasında arı ürünleri, arılar ve ana arı, kullanılmış kovan ve arıcılık ekipmanlarının hareketlerini kontrol altına alma zorunluluğu ortaya çıkar (Çakmak ve ark., 2003; Calderon ve ark., 2004).

Ancak bu hastalıkların dışında oldukça yaygın olan ve arıcılar tarafından özellikle AYÇ ve AvYÇ ile karıştırılan Adi Yavru Çürüklüğü vardır. Bu hastalık AYÇ ve AvYÇ ile aynı klinik bulguları göstermekte ve arıcılar arasında korku oluşturmaktadır. Bu hastalığın etkenleri çok çeşitlidir. Etkenler; insan, hayvan ve çevre orjinlidir. *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. en sık rastlanılan etkenlerdendir (Hutton, 2013).

Bu çalışmada koloni kayıplarına sebep olan yavru çürüklüğü, kireç hastalığı ve koloni kayıpları ilişkisi incelenmiştir.

### MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Arıcılık Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde 2011-2013 yıllarında Görükle kampüsünde toplam 200 Anadolu arı (*Apis mellifera anatoliaca*) kolonileri ile yapılmıştır. Bu koloniler 2009 yılı eylül ayında Bursa ve civarındaki ilçelerdeki sabit arıcılardan satın alınarak araştırma amacı ile kullanılmıştır.

Koloni kayıp sebeplerinin incelenmesi için mantar ve yavru çürüklüğü şüpheli kovanlardan swap, petek ve larva numuneleri alınmıştır (Borum ve ark., 2015).

Mantar şüpheli koloniler ise incelenmiş ve mantar izolasyonu için patates dekstroza agar kullanılmıştır. Alınan örnekler besiyerine inoküle edilerek 25°C'de 1-5 gün inkübe edilmiştir. Süre sonunda mantar teşhisi, spor ölçümleri, koloni özellikleri incelenerek yapılmıştır. Bakteriyolojik inceleme ile *P.larvae* (AYÇ etkeni) ve *M. plutonius* (AvYÇ etkeni) ve diğer

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

bakteriyel etkenlerin izolasyonu için MYPGP agar, PLA agar ve Columbia Sheep Blood agar kullanılmıştır. Şüpheli larva örnekleri 5 ml. distile su ile süspansiyon edilmiştir. Her numune için iki adet süspansiyon hazırlanmıştır. Birinci süspansiyon örneği vejetatif bakterileri öldürmek için 80°C'de 10 dakika ısıtılmıştır. İkinci örnek ise ısıtılmamıştır. Her bir süspansiyondan 200 µl ilgili besiyerlerine inoküle edilmiştir. Bütün kültürler 37°C'de aerobik ve mikroaerofilik koşullarda 24-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerindeki üremeler koloni morfolojisi, gram boyama ve biyokimyasal testler ile incelenmiştir (Alippi, 1999; Genersch, 2010). Hastalıkların kolonilerdeki dağılımı, hastalık tespit edilen kolonilerden yaşayan ve sönenlerin değerlendirilmesinde aritmetik ortalama ve yüzde gibi temel istatistiksel işlemlerden yararlanılmış, sonuçlar çizelge ve sütun grafikleri halinde verilmiştir (Soysal, 1992).

### BULGULAR

2011 yılında incelenen 199 kovanın kireç hastalığı şüpheli 10 kovanından *Ascosphaera apis* izole ve teşhis edilmiştir. Yavru çürüklüğü görülen kovanlardan 8 numune swablar ile alınmıştır. Bütün örneklerden 12 tür bakteri izole ve teşhis edilmiştir. Bazı kovanlardan birden fazla bakteri türü izole ve teşhis edilmiş olup *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* gibi insan çevre ve hayvan orjinli etkenlerdir. Hiçbir numunede *Paenibacillus larvae* ve *Melissococcus plutonius* üremesi gerçekleşmemiştir.

AvYÇ'nin sekonder etkeni *Paenibacillus alvei* kültürel yöntemle iki örnekte izole edilmiştir. Bu çalışmada, Bursa ve çevresinden alınan kolonilerde *P.larvae* ve *M.plutonius* varlığı saptanmamıştır. Çalışmada yavru çürüklüğü şüpheli kovanlardan

insan, çevre ve hayvan orjinli etkenlerin izole edilmesi, hijyenik koşullara uyularak çalışmanın önemli olabileceği fikrini vermektedir.

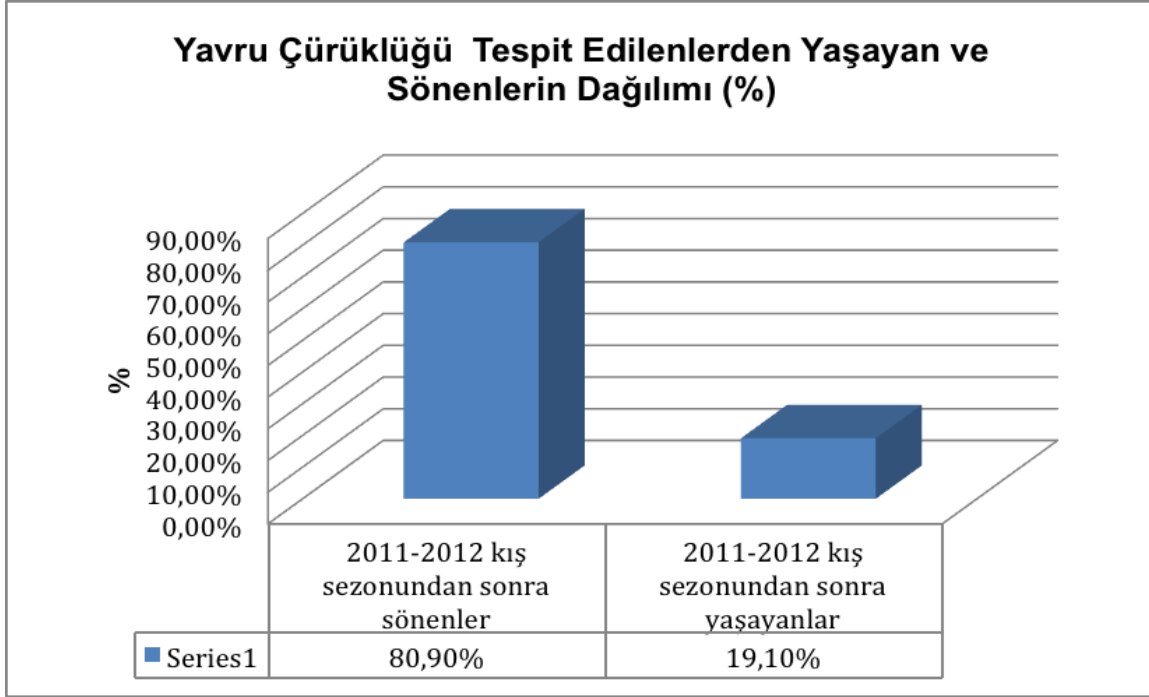
Özellikle izole edilen etkenler adi yavru çürüklüğü etkenleri olup ciddi koloni kayıplarına sebep olmuştur. Bu etkenlerin izole edildiği koloniler ilerleyen zamanlarda kayıplara uğrayarak sönmüştür. İzole ve identifiye edilen etkenler Çizelge1'de verilmiştir.

Çizelge1. İzole ve identifiye edilen bakteriler

Bakteri Türleri	İzole edilme oranı
<i>Bacillus subtilis</i>	%62.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus cereus</i>	%50
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium jeikum</i> <i>Paenibacillus alvei</i>	%37.5
<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Corynebacterium renale</i> <i>Corynebacterium aquaticum</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	%12.5

Yavru çürüklüğü tespit edilip yaşayan ve sönen kovanlarda yavrulu çerçevelere baktığımızda genel olarak bir ayırım görülmemiştir. Yaşayan 4 kovanın 2'sinin 2 yavrulu çerçeveye, 2'sinin ise 3 yavrulu çerçeveye sahip olduğu belirlenmiştir. Yavrulu çerçeve ortalamaları sönenler de 1.9 yaşayanlar da ise 2.5 olarak belirlenmiştir. Bu ortalamalar 2011 ağustos kayıtlarına göre hesaplanmıştır. Yavru çürüklüğü tespit edilip 2011-2012 yılı kış sezonundan sonra sönen kovanların oranı %80.9, yaşayanların oranı ise %19.10 olarak saptanmıştır (Şekil 1).

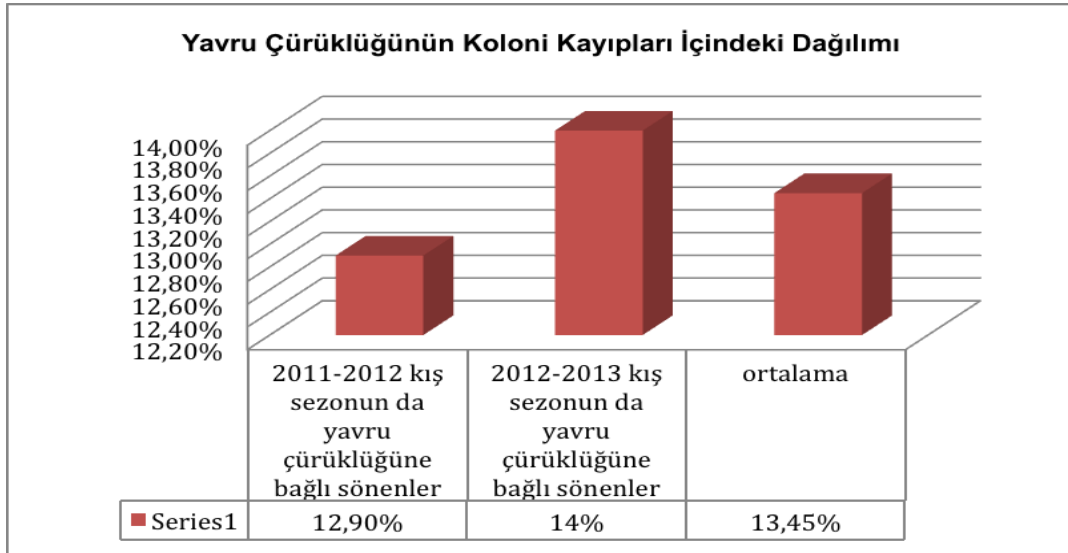
## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 1: Yavru çürüklüğü tespit edilenlerden yaşayan ve sönenlerin oranları

2011-2012 kış sezonunda 176 kovandan 132'si (%75) sönmüştür. 2011-2012 kış sezonunda sönmeyen 44 (%12.90) kovan ise 2012-2013 kış sezonunda sönmüştür. Bu kovanların 6'sında

(%33.30) yavru çürüklüğü, 3'ünde (%16.60) ise kireç hastalığı bulguları görülmüştür. Yavru çürüklüğüne bağlı koloni kayıpları Şekil 2'de verilmiştir.

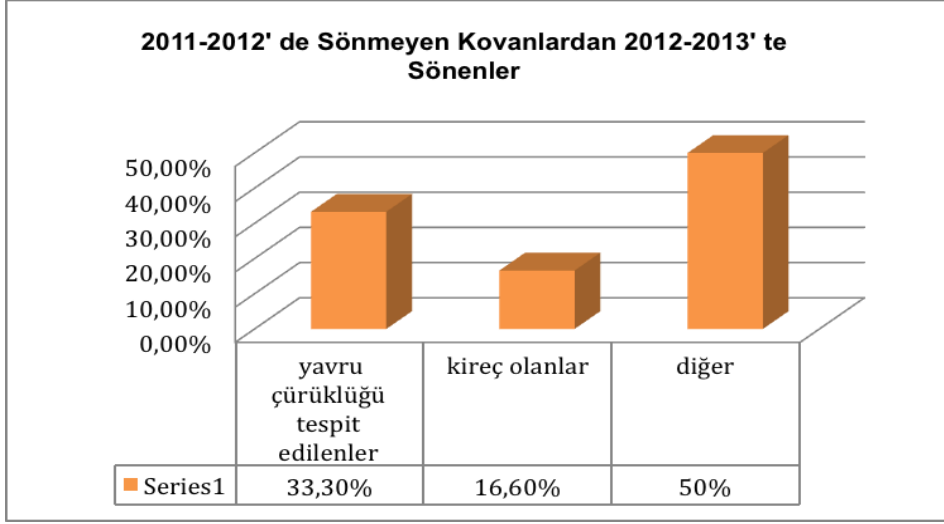


Şekil-2: Yavru çürüklüğünün koloni kayıpları içindeki dağılımı

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

Yavru çürüklüğü görülen 13 kovandan bölünen 10 kovan (%76.90) 2011 kış sezonunda sönmüştür. 2012-2013 kış döneminde ise 94 kovan sönmüş, bunlardan 13'ünde (%14) yavru çürüklüğü bulguları görülmüştür. 2011-2012 kış sezonunda sönen kovanların %18.90'ında kireç hastalığı,

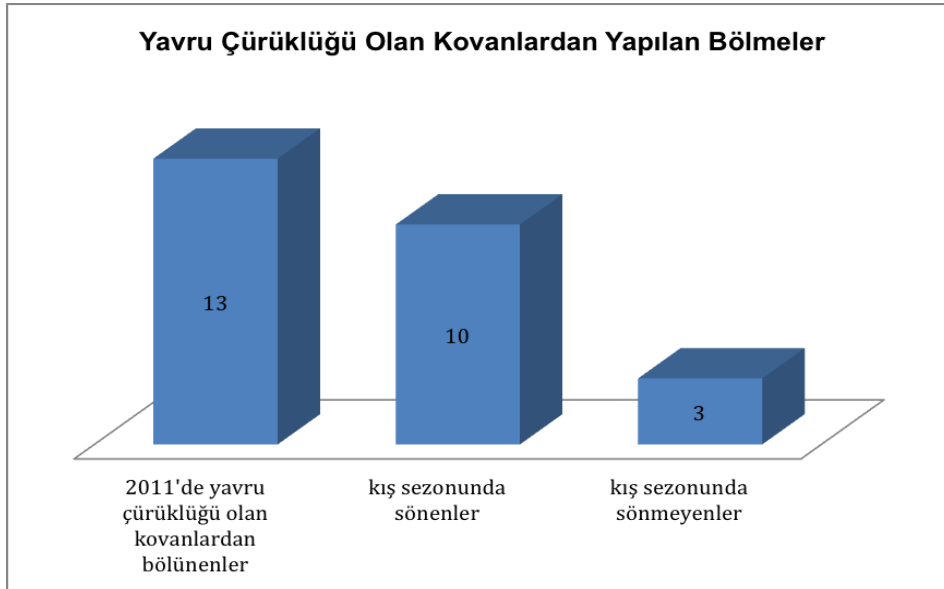
%12.90'ında yavru çürüklüğü görülmüştür. 2011-2012 kışında sönmeyen 44 kovanın 18 tanesinden 6 tanesi (%33.3) yavru çürüklüğü, 3 tanesi (%16.6) kireç hastalığı, 9 tanesi (%50) ise diğer nedenlerle 2012-2013 kış sezonunda sönmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. 2012-2013 sezonunda sönen kovanlar

2011'de yavru çürüklüğü görülen analardan elde edilen ya da bölünen 13 yeni kovanda da hastalık

bulguları görülmüş ve bu kolonilerin 10'u sönmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Yavru çürüklüğü görülen kovalardan yapılan bölmelerden sönen kovan sayısı

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

### TARTIŞMA

Türkiye’de koloni kayıplarına neden olan mantar ve bakteriyel hastalıklar arasındaki ilişki arasında yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Aynı zamanda hastalık verileri çoğunlukla klinik bulgular ile sınırlı kalmıştır. Asıl doğru olan etkenin izolasyon ve teşhisi ile yapılmasıdır. Bu çalışmamızda koloni kayıpları görülen koloniler ile bu kolonilerden bölünen koloniler 2011-2013 yılları arasında takip edilmiş, şüpheli kovanlardaki etkenlerin izolasyon ve teşhisleri yapılmıştır.

Yapılan çalışmada koloni kayıplarından %14.00-%33.30 oranında yavru çürüklüğünün, %16.60-%18.90 kireç hastalığının sorumlu olduğu belirlenmiştir. İzole edilen yavru çürüklüğü etkenleri adi yavru çürüklüğü etkenleri olmasına rağmen ciddi koloni kayıplarına neden olmuştur.

Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada kireç hastalığı oranı %26.4, yavru çürüklüğü ise %5.4 olarak belirlenmiştir (Sıralı, 1993). Karadeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada, kolonilerin %18.33’ünün yavru çürüklüğü hastalığı ve %7.80’inin kireç hastalığı ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Yaşar ve ark. 2002). Kış salkımının erken bozulduğu Hatay ve yöresindeki bir çalışmada 900 arı kolonisinin 72’sinde (%8) Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni saptanmıştır. Sönen 180 koloninin 36’sında (%20) AYÇ etkeni saptanırken, sönmeyen 36 (%5) kolonide de etken PCR ve kültürel metodlar ile belirlenmiştir (Muz ve ark., 2012). Bingöl yöresinde %8.43 (Gül ve Kutlu; 2009), Hatay ve yöresinde yapılan çalışmada ise AYÇ şüpheli kolonilerde etkene %30 oranında rastlandığı bildirilmiştir (Yalçınkaya, 2008).

Elazığ bölgesinde yapılan çalışmada rastgele alınan 250 örneğin 8’inden (%3.2) *P.alvei* izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır (Şimşek ve Özcan, 2001). Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada ise 394 arı işletmesinin 5 tanesinde (%1.27) AYÇ etkeni tespit etmiştir (Beyazıt ve ark., 2012).

Güney Marmara bölgesinde daha önce yapılan anket ve laboratuvar çalışmalarında AYÇ’ne rastlanmadığı bildirilmiştir (Aydın ve ark., 2003; Özakın ve ark., 2003). Aydın ve ark., (2003) tarafından yapılan anket çalışmasında ise Güney Marmara bölgesinde %14 yavru çürüklüğü, %11 ise kireç hastalığına rastlandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizimle sonuçlarımız ile uyumlu görülmektedir. Diğer bölgelerden elde edilen bazı sonuçlar anket niteliğinde olabilmektedir. Bu

nedenle laboratuvar da etken izolasyon ve teşhis yapmadan elde edilen sonuçlar sağlıklı değildir.

Yapılan bu çalışmada yavru çürüklüğü saptanan kovanlardan yapılan bölmelerle elde edilen kolonilerde de koloni kayıpları olmuştur. Bu da ana arının hastalıklara direnç ve genetik aktarımda önemli olduğunun belirtisidir. Bu konuda bazı yeni araştırma sonuçları rapor edilmektedir (Van Engelsdorp ve ark., 2013).

Son yıllarda yavru çürüklüğü hastalığının Marmara bölgesinde oldukça arttığı ve koloni kayıplarında önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Borum ve ark., 2015). Bu çalışmada her ne kadar AvYÇ ve AYÇ etkeni belirlenmemiş olsa bile AvYÇ ve AYÇ etkenlerinin yoğun gezginci arılık nedeni ile bölgede yaygın olabileceği kuvvetli bir ihtimal olarak görülmektedir. Bu nedenle bu kritik dönemde arıların özellikle yavru hastalıklarına karşı korunması için gerekli özen gösterilmelidir.

Bakanlığın bir an önce bu konuda yeni tedbirler alarak bu hastalığın tedavisinin sağlanması konusunda adımlar atmasının arıcılık için önemli olacağını belirtmekte yarar görülmektedir. Aksi takdirde “tedavisinin olmadığı ve kolonilerin yakılması gerektiği” şeklindeki uygulamanın devam etmesi durumunda bu hastalığın giderek daha yaygın hale geleceği açıktır. Bu yüzden son yıllardaki yeni yöntem ve uygulamalar ile koloniler yakılmadan bu kolonilerin izole bir bölgeye taşınıp öncelikle antibiyotik ile tedavisi, tüm infekte kovanların dezenfekte edilmesi, petekli çerçevelerin arılar çıktıktan sonra yüksek sıcaklıkta (120°C) eritilmesi ve ana arıların çürüklük olmayan kovanlardan yetiştirilip değiştirilmesi hastalığın yayılmasını önlemede ve azaltmada oldukça etkili olacağını belirtmekte yarar görülmektedir (Alippi, 1999; Genersch, 2010)

Ülkemizde yavru çürüklüğü hastalığının giderek arttığı, arıcılardan gelen şikâyetler ve az da olsa yapılan araştırmalardan ortaya çıkmaktadır. Uzun mesafeli ve sınırsız gezginci arıcılık faaliyetlerinin ülkemizde oldukça yaygın olması, ham peteklerin yeterince denetim ve analizlerinin yapılamaması ve yurtdışından son yıllarda balmumu ithal edilmesi gibi konuların yavru çürüklüğü hastalığı açısından oldukça önemli olduğunu ve gerekli önlemlerin alınmasını tavsiye ediyoruz.

Sonuç olarak ülkemizde bal arısı koloni kayıpları ile koloni kayıplarına sebep olan etkenlerin incelenmesi konusunda yapılan çalışmalar oldukça

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

sınırlıdır. Ayrıca yavru çürüklüğü çıkan kovanlardan elde edilen yeni kovanların takibi ve hastalık inceleme çalışmaları da oldukça sınırlıdır. Son yıllarda giderek artan yavru çürüklüğü hastalığı özellikle Güney Marmara bölgesinde her geçen gün artan koloni kayıplarının en önemli nedenlerinden biri olabileceği için bu konudaki çalışmalara ağırlık verilmesi ve Bakanlığın bir an önce yeni tedbirler almasını tavsiye ediyoruz.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya mali destek sağlayan Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı adına TAGEM' e (Proje no. 2009/10), kısmi desteğinden dolayı Civan Arıcılığa ve çalışmada katkılarından dolayı Semih Selova ve Sami Mengilic'e teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Alippi, A.M., 1999. Bacterial diseases CIHEAM Options Mediterraneennes, Zaragoza.
- Anonim, 2016. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı veritabanı. <http://www.tarim.gov.tr/HAYGEM>. Erişim tarihi. 15.11.2016
- Aydın, L., Çakmak, İ., Güleğen, E., Korkut, M., (2003). Güney Marmara Bölgesi'nde arı hastalık ve zararlıları anket sonuçları. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 3(1):38-41.
- Bailey L., Ball B.V., 1991. *Honey Bee Pathology*. 2nd edition, Academic Press, London.
- Beyazıt, A., Akkoca, N., Eskiizmirli, S., Albayrak, H., Özcan, E., Özden, M., Selver, M.M., Tunalıgil S, 2012. Ege Bölgesi İlerinde Önemli Arı Hastalıklarının Yaygınlığının Araştırılması Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Antalya.
- Blacquièrè T., Smagghe G., Vangestel C.A.M., Mommaerts V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 973-992. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- Borum, A.E., Özkan, C., Güneş, E., Aydın, L., Ülgen, M., Çakmak, İ., 2015. The investigation by PCR and culture methods of Foulbrood diseases in honey bees in South Marmara region. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 21(1): 95-99.
- Bryden, J., Gill, R.J., Mitton R.A.A., Raine N.E., Jansen V.A.A., 2013. Chronic sublethal stress

causes bee colony failure. *Ecology Letters* 16:1463-1469.

- Chen Y., Evans J., Feldlaufer M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 92:152-159.
- Calderon, R.A., Rivera, G., Sanchez, L.A., Zamora, L.G., 2004. Chalkbrood (*A. apis*) and some other fungi associated with Africanized honey bees (*apis mellifera*) in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 43: 187-188.
- Çakmak, İ., Aydın, L., Güleğen, E., 2003. Güney Marmara bölgesinde bal arısı zararlıları ve hastalıkları. *U. Arı Drg./U. Bee J.*, 3: 33-35.
- Çakmak, İ., Seven-Çakmak, S., 2016. Beekeeping and recent colony losses in Turkey. *U. Arı Drg./U. Bee J.* 16(1): 31-48.
- Ellis, J.D., d Munn, P., 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86: 88-101.
- Forsgren E., 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 5-9.
- Gallai, D., Salles, J M., Settele, J., Vaissere, B E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.* 68 (3): 810-821, Doi:10.1016/j.ecolecon.2008.06.014
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 10-19.
- Giray, T., Çakmak, İ., Aydın, L., Kandemir, İ., İnci, A., Oskay, D., Döke, M.A., Kence, M., Kence, A 2007. Preliminary Survey Results On 2006-2007 "Colony Losses in Turkey". *U. Arı Derg./U. Bee J.* 7, 101-107.
- Gül, A., Kutlu M.A., 2009. Bingöl ili ve ilçelerinde görülen bal arısı hastalık ve zararlılarının belirlenmesi üzerine bir çalışma. 3. Bingöl Sempozyumu Kitapçığı, Bingöl.
- Hutton, S., 2013. Foulbrood diseases of honeybees and other common brood disorders. The Food and Environment Research Agent (online), <http://secure.fera.defra.gov.uk> > ... > Bee Pests, Diseases & Maps > Foulbrood, Accessed: 03.03.2014.
- Kaftanoğlu, O., Yeninar, H., Kumova, U., Ozkok, D., 1995. Epidemiology and control of honeybee (*Apis mellifera* L.), diseases in Turkey. *TUBİTAK Project No VHAG-925*,



## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TUBİTAK Publication No: 92-0054, Final Report. 93 pp. Ankara.,

- Kandemir İ., 2007. Amerika Birleşik Devletleri'nde toplu arı ölümleri ve koloni çökme bozukluğu üzerine bir derleme. *U. Arı Drg./ U. Bee J*, 7: 63-69.
- Karahan, A., Çakmak, İ., Hranitz, J., Karaca, İ., Wells, H., 2015. Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. *Ecotoxicology*. 24: 2017-2025, DOI 10.1007/s10646-015-1537-2.
- Morse, R.A., Nowogrodzki R., 1990. Honey Bee Pests, Predators and Diseases, Cornell University Press, Ithaca and London.
- Muz, MN. 2008. Bal arılarında koloni sönmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 32 (3): 271-275.
- Muz, M.N., Solmaz, H., Yaman, M., Karakavuk, M., 2012. Kış Salkımı Erken Bozulan Arı Kolonilerinde Paraziter ve Bakteriyel Patojenler. *YYU Veteriner Dergisi*. 23 (3): 147-150.
- Özakın C., Aydın L., Çakmak İ., Güleğen E., 2003. Hazır ve eski peteklerin bakteriyolojik mikolojik yönden incelenmesi. *U. Arı Drg./ U. Bee J*, 3 (1): 27-30.
- Russenova, N., Parvanov P., 2005. European Foulbrood Disease—Aetiology, Diagnostics and Control. *Trakia Journal of Sciences*, 3(2):10-16.
- Sammaturo D., Yoder J.A., 2012. Honeybee colony health. CRC Press, USA.
- Sıralı, R., 1993. Trakya Bölgesi Arıcılığı, Sorunları ve Çözüm Yolları Üzerine Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi) Trakya Üniv. Fen Bilimleri Enst. 65 sayfa. Tekirdağ.
- Soysal, M. İ., 1992. Biyometrinin prensipleri. Trakya Üniv. Tekirdağ Ziraat Fak. Yay. No: 95. 257 sayfa. Tekirdağ.
- Şimsek, H., Özcan, C., 2001. Elazığ Yöresinde Bulunan Arı İşletmelerinde Avrupa Yavru Çürüklüğü Hastalığının Araştırılması. *Türk J Vet Anim Sci*, 25 929-932.
- Shimanuki H., Knox D.A., 2000. Diagnosis of Honey Bee Diseases, Agriculture Handbook, Department of Agriculture.
- Tutkun, E., Boşgelmez, A., 2003. Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teşhis ve Tedavi Yöntemleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara.

- vanEngelsdorp, D., Tarpy, D.R., Lengerich, E.J., Pettis, J., 2013. Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*. 108: 225-233.
- Winston, M., 1987. The Biology of the Honey bee. Harvard University Press, Cambridge.
- Yalçınkaya, A., 2008. Hatay ve Adana yöresindeki bal arılarının (*Apis mellifera* L.) mikrobiyal ve paraziter hastalıklar yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniv. Fen Bil Ens, Ankara.
- Yaşar, N., Güler, A., Yeşiltaş, H.B., Bulut, G., Gökçe, M., 2002. Arıcılığın genel yapısının belirlenmesi. *Mellifera*, 2-3: 47-56.

### EXTENDED ABSTRACT

#### Introduction

The aim of this study was to investigate colony losses due to the foulbrood and chalkbrood diseases in Bursa province of Turkey in the years of 2011-2013.

#### Materials and Methods

The total of 200 Anatolian bee (*Apis mellifera anatoliaca*) colonies were used for the study in Gorukle campus of Uludag University Beekeeping Development Application and Research Center, Bursa. All these colonies were bought from stationary beekeepers in Bursa province and surrounding area in September of the year of 2009. The samples were taken and cultured for identification of foulbrood and chalkbrood. The colonies were monitored for colony losses in winter and spring particularly. The samples for foulbrood and chalkbrood taken were examined by clinical and laboratory methods.

#### Results and Conclusion

Of colonies died in the years of 2011-2012 winter those diagnosed foulbrood about 12.90%, and those of % 16,60 in the years of 2012-13 winter. Of those died colonies in the same years 16,60% died due to chalkbrood diseases. Of those diagnosed foulbrood diseases in the years of 2011-2012 winter season 80,90% died and 19.10% survived. The thirteen split colonies that were from foulbrood colonies ten of them died in winter. That is only 20% of those colonies diagnosed foulbrood

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

survived next year and 80 % died after winter in the spring. This means that foulbrood in the artificial swarms or splits from foulbrood colonies continued to show symptoms of foulbrood and then died. The artificial swarms or splits from foulbrood colonies originated from foulbrood queens continued to show symptoms of foulbrood and then died. As

results honey bee diseases alone or with other factors cause colony losses. Since bee colonies that have heritaged from foulbrood colonies continue to have foulbrood diseases. The result suggests here that foulbrood may have some genetic link.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

# THE SOUTH-EASTERN DISTRIBUTION LIMIT OF *Apis mellifera*, A MORPHOMETRIC STUDY OF THE HONEY BEES (*Apis mellifera* L.) OF SISTAN-BELUTSCHISTAN

*Apis mellifera*'nın Güney-Doğu Yayılış Sınırları, Sistan-Belutschistan Balarılarında (*Apis mellifera* L.) Morfometrik Çalışma

(Genişletilmiş Türkçe Özet Makalenin Sonunda Verilmiştir)

**Mohammad Reza POURELMI, Stefan FUCHS**

Department of Animal Science, Islamic Azad University (IAU), Chalous Branch, IRAN

Institut für Bienenkunde, Faculty of Life Sciences, Goethe-University Frankfurt am Main, GERMANY

Geliş Tarihi: 25.02.2017

Kabul Tarih: 15.04.2017

### ABSTRACT

The western honeybee, *Apis mellifera*, covers an immense range of natural distribution. In contrast to the limits in the North, West and South defined by the sea, the continental limits in the East are far less clear. Here we present detailed morphometric data on the Bees of Sistan-Belutschistan in the far South-Eastern End of the *A. mellifera* distribution. These are of particular interest because they inhabit a comparatively narrow desert climate land strip separating the distribution range from the Eastern honey bee, *Apis cerana*. Samples from the area differed quite substantially from the next-neighbouring Iran bee population, particularly by small body size, short hair, coloration patterns, and comparatively broad wings, but were clearly allocated to *A. m. meda* rather than to other representative *A. mellifera* subspecies. The study expands the South-Eastern range of *A. m. meda* by a particularly heat-adapted subpopulation, considerably narrowing the geographic gap to *A. cerana* in Pakistan.

**Keywords:** *Apis mellifera meda*, distribution range, morphometry

### ÖZ

Batı bal arısı *Apis mellifera* çok geniş doğal bir yayılışa sahiptir. Batı ve Güney'deki sınır denizle tanımlanırken Doğu'daki kıtasal sınır Kuzey sınırına göre çok daha belirsizdir. Burada *Apis mellifera*'nın Güneydoğu sınırının son kısmında Sistan-Belutschistan arıları hakkında detaylı morfometrik verileri sunuyoruz. Bu bölge özel ilgi alanıdır çünkü bu arılar oldukça dar bir çöl iklim bölgesinde Doğu arısı *Apis cerana* yayılış bölgesini ayıran bir çizgide bulunmaktadır. Bölgeden alınan numuneler hemen aynıdaki İran arı popülasyonundan oldukça farklı olup özellikle küçük vücut büyüklüğü, kısa kıllar, renk durumları, karşılaştırmalı geniş kanatları ile başka bir *Apis mellifera* alt türünden çok net bir şekilde *A. m. meda*'ya dahil olmaktadır. Bu çalışma *A. m. meda*'nın güneydoğu bölgesine uzanan sıcaklığa adapte olmuş alt popülasyonu olup *A. cerana* ile aradaki coğrafik boşluğu ciddi şekilde daraltmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Apis mellifera meda*, yayılış alanı, morfometri

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

### INTRODUCTION

In this study we reinvestigate the south-eastern distribution of *Apis mellifera*, in an area of specific interest. The South-Eastmost region of Iran, Sistan-Belutschistan, forms a land strip of about 1100 km, which stretches from Zabol bordering Afghanistan in the North, along the border of Pakistan to Chabahar in the South, at the Gulf of Oman (Fig. 1). It covers an area of about 181578 km<sup>2</sup> inhabited by about 2.4 m people. Little is known about honey bees and beekeeping in this region dividing the

distribution ranges of *A. mellifera* and *A. cerana* without any apparent overlap. According to Ruttner et al (1985), the most eastern *A. mellifera* were found close to Dalfarh (28°58N 57°38E) in the district of Kerman, located west of Sistan-Belutschistan. They reported that there were no *A. mellifera* bees in Sistan-Belutschistan due to its extremely dry desert climate, but reported the presence of the dwarf honey bee, *A. florea*. More to the East, from Pakistan and Afghanistan onwards, the Eastern honey bee, *Apis cerana*, is found.

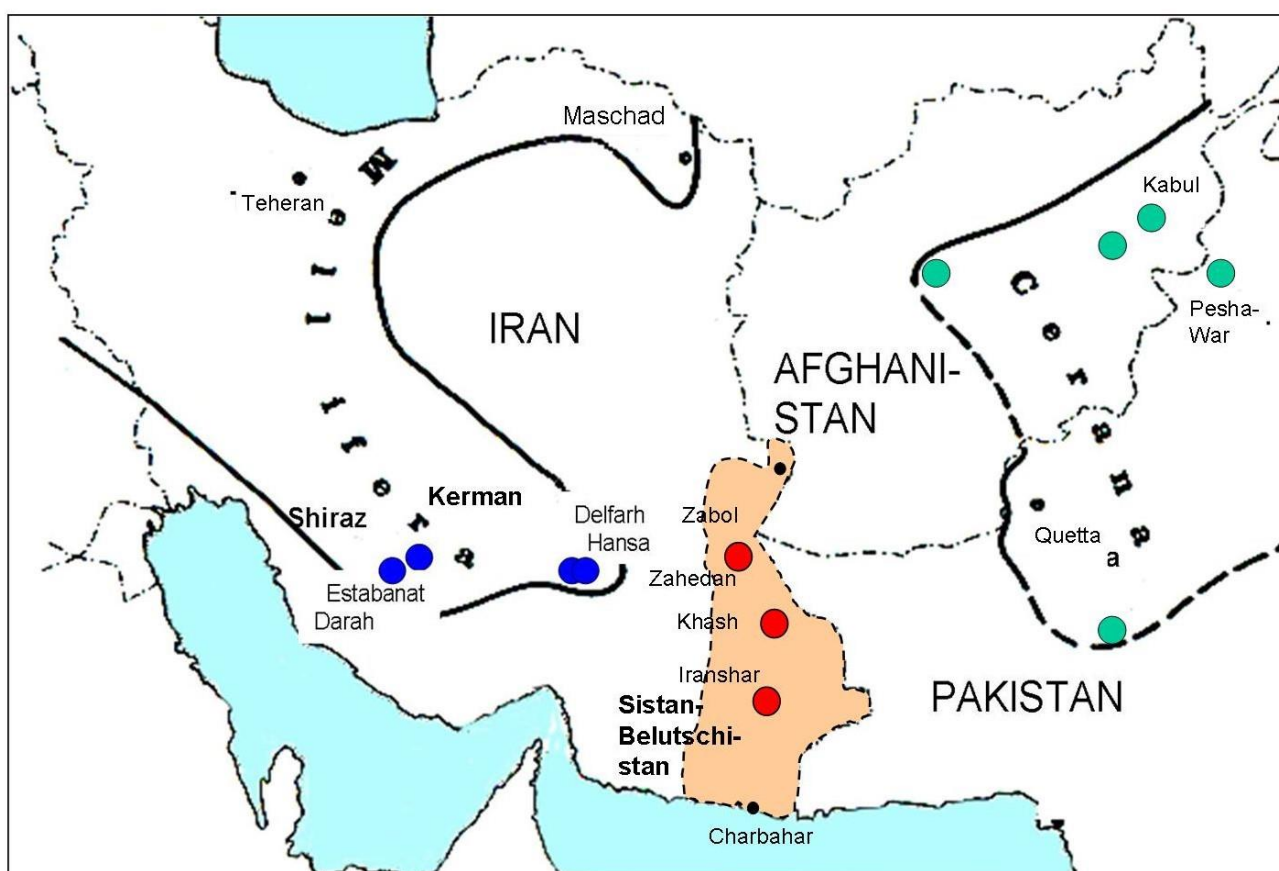


Fig. 1 The south-eastern boundaries of the *A. mellifera* distribution area, as well as the west-eastern boundaries of *A. cerana*, modified from Ruttner et al. (1985). The blue symbols give the hitherto eastmost sampling locations of *A. mellifera*, green symbols the westmost of *A. cerana*. Red symbols show the sampling locations in this study. No *A. mellifera* bees were found at Charbahar.

In this study, a reinvestigation of that Eastern limit of *A. mellifera* distribution range was undertaken. In a sampling excursion in 2005, we found that quite some beekeeping takes place in the area.

According to local estimates this comprised of 1299 beekeepers in the year 1998, which had decreased to about 200 in 2005 due to long-lasting periods of extreme dearth (>22mm rainfall/year). Traditional

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

beekeeping had been performed using common clay pot hives, but at that time the about 3.000 colonies were kept modern Langstroth hives. A wide variety of plants are visited by the bees for honey and pollen. Bees are prone to swarming, and are fairly defensive. Common natural enemies of the bees were Beewolves (*Philantus spec.*), bee eaters, and ants. In 2015, Rahini undertook a mtDNA study on *A. meda* including 3 sample locations of bees in Sistan-Belutschistan. In the current study we present a detailed morphometric study of these bees, and explore their morphological relation to other bee subspecies.

### MATERIALS AND METHOD

One of us (Pour Elmi) collected *Apis mellifera* honey bees from 7 colonies in the region. In 2005, four locations were visited. From South to North: no *A. mellifera* bees were found at Chabahar (Bandar Beheshti, (25° 17'N 60°36'E, altitude 0 to 100 m), 3 samples were taken from Iranshahr (27°10'N, 60°38'E, altitude 660 m). 1 from Khash (28°13'N, 61°11'E, altitude 14900 m, and another 3 from Zahedan (29°30'N, 60°50'E, altitude 1384 m). Mean annual temperatures were high in all locations (20-28°C) with average July temperatures between 27-34°C). Average rainfall is generally low (<110 mm/year), humidity is high at the coast (85%, Chabahar), but low within the inland (25 to 50%). *A.florea* was noted in all locations except Zahedan. Sampling beeyards were selected where beekeepers were not engaged in breeding, and did not move their colonies. Each sampled colony was at least 30 km distant from any other to avoid close relatedness. At least ten worker bees were taken from each sampled colony, and were stored in 95% Ethanol for later analysis.

10 worker bees per colony were analyzed according to the methods described in Ruttner (1988), using 37 morphometric characters (16 sizes, 7 colors, 3 pilosity, and 11 wing angles). Measurements of size and wing venation were performed using a stereo microscope and a computer-aided measuring system based on a video system and measuring program (Meixner 1994). For measurements of pilosity and color scaling a stereo microscope was used. To determine the morphometric position within the species, data from 67 samples of *A. m. meda* and 128 samples of other adjacent subspecies were obtained from the Oberursel data bank. Results

were analysed by discriminant analysis and UPGMA Cluster Analysis using SPSS 23 (2015).

### RESULTS

A selection of morphometric data are listed in Table 1, together with Oberursel data bank data for the most relevant subspecies and *A. m. meda* subgroups. Due to low numbers of colonies sampled in Sistan-Belutschistan, sampling locations were not differentiated. The honey bees of Sistan-Belutschistan were small in relation to most of the other bee groups, and differed highly significantly in almost all length measurements from the data bank measurement of *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* and *A. m. anatoliaca* (univariate comparisons with LSD post-hoc comparisons), but were similar in size to *A. m. syriaca*. However, they were markedly bigger than *A. m. jemenitica*, where all size measurements were significantly smaller. They were also slightly smaller in relation to other *meda* groups (Iran central, Iran North-East (NE), Iran South-East (SE) Iran Mazandaran, and Irak, but only about half of the measurements were statistically different. In particular, they were very similar to the other *meda* groups in the waxmirror dimensions and the metatarsal length and width. An outstanding character was wing dimensions. While wing length ranged similar as other length measurements, wing width measures were significantly higher in comparison to all other groups except *A. m. carnica* and Iran NE. Consequently, forewing index (length/width) was significantly higher in all comparisons. Sistan-Belutschistan bees did not show an exceptional position in relation to the other groups in slenderness (length/width of sternum 6) nor in the relation of body size to leg length.

Hairlength was significantly shorter than in all the other bee groups, with the exception of *A. m. jemenitica* where it was significantly shorter. Tomentum width differed significantly only from the higher value of *A. m. caucasica*, while the dark stripe differed significantly only from the higher values in *A. m. mellifera* and *A. m. Iran NE*.

Sistan-Belutschistan bees were fairly light colored. In particular, pigmentation of tergite 4 was significantly lighter than in any of the other groups. Tergite 2 and 3 pigmentations were considerably and significantly lighter in comparison to *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* and *A. m.*

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

*anatoliaca*. While tergite 2 pigmentation did not differ throughout the other groups, tergite 3 pigmentation was significantly darker in comparison to *A. m. syriaca*, *A. m. jemenitica* and the *A. m. meda* groups from Central Iran and Irak. Pigmentation of the scutellum was generally lighter than in all other groups, the differences were significant except for scutellum 1 in comparison to *A. m. jemenitica*, Iran SE and Irak, and for scutellum 2 in comparison to *A. m. caucasica*, *A. m. syriaca* and *A. m. jemenitica*. In contrast,

pigmentation of labrum 1 was significantly darker than all other groups (except *A. m. jemenitica*, Iran SE and Irak where the difference was not significant). Pigmentation of labrum 2 was darker than in the *A. m. meda* groups and *A. m. jemenitica*, which difference was significant for Iran SE and Irak, but was lighter in comparison to the other groups which was significant only for *A.m.caucasica*.

Table 1. Morphometric characteristics of Sistan-Belutschistan honey bees (*A. mellifera*), and data on other subspecies or *A. meda* subgroups obtained from the Oberursel Data Bank. Significance of difference to Sistan-Belutschistan: \*  $P>0.05$ , \*\*  $P<0.005$  \*\*\*  $P<0.0005$

					<i>A. m. meda</i>			
	<i>A. m. caucasica</i>	<i>A. m. anatoliaca</i>	<i>A. m. syriaca</i>	<i>A. m. jemenitica</i>	Iran central	Iran SE	Irak	Sistan-Belutschistan
Body size (LT3+LT4). (mm)	4.54 0.075 ***	4.48 0.059 ***	4.19 0.132 *	3.88 0.115 ***	4.35 0.089 ns	4.48 0.111 ***	4.29 0.113ns	4.28 0.057
Complete leg fem+tib+mtar. (mm)	8.27 0.144 ***	8.14 0.104 ***	7.87 0.144 *	7.02 0.201 ns	7.81 0.163 ns	7.92 0.153 *	7.76 0.127 ns	7.75 0.138
Forewing index wfw/lfw	0.34 0.003 ***	0.34 0.004 ***	0.33 0.003 ***	0.34 0.004 ***	0.34 0.004 ***	0.34 0.005 ***	0.34 0.005 ***	0.35 0.005
Hair length. (mm)	0.34 0.034 ***	0.29 0.025 **	0.22 0.037 *	0.18 0.019 ***	0.28 0.033 **	0.28 0.016**	0.28 0.018 *	0.25 0.029
Pigment tergite 4	1.53 0.86 ***	2.81 0.70 ***	3.83 0.25 ***	4.38 0.80 ***	4.33 0.68 **	4.66 0.89 ***	5.82 0.27 ***	6.41 0.49
Pigment tergite 2	3.60 0.86 ***	4.77 0.89 ***	8.56 0.43 ns	8.06 0.85 ns	8.56 0.43 ns	8.34 0.55 ns	8.92 0.25 ns	8.07 0.59
Pigment scutellum 1	1.57 0.82 ***	3.91 1.42 ***	5.91 0.95 *	6.30 0.69 ns	5.93 0.99 *	6.11 0.44	6.69 0.53 *	6.78 0.56
Angle A4 (degree)	34.6 1.54 ***	33.0 1.12 ***	32.6 1.29 ***	34.3 1.21 ***	30.6 1.37 ***	29.9 0.85 *	30.20 0.98	28.4 *1.07
Angle K19 (degree)	75.0 2.32 ***	77.8 2.00 ***	79.9 2.16**	81.1 1.53 ns	78.7 1.58 ***	80.0 1.46 ns	80.5 1.65 ns	82.4 1.89

In the 11 wing venation angles, Sistan-Belutschistan bees differed significantly from the other groups in 72 of 121 possible comparisons. They differed in most angles (9 out of 11) from *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. anatoliaca* and *A. m. anatoliaca*, in somewhat more than half from *A. m. syriaca* and *A. m. jemenitica*, and in somewhat less than half from the *A. m. meda* groups (about 5 out of 11). Some angles took extreme positions. Angle A4 and Angle O26 were significantly smaller than in all other groups (except A4 in comparison to *A. m. carnica* and Iran NE, and O26 in comparison

to Iran NE Iran Mazandaran, and Irak, where differences were not significant. Angle b4, G18 and K19 were significantly larger than in all other groups (except b4 in comparison to *A. m. carnica* and G18 as well as K19 in comparison to *A. m. jemenitica* where differences were not significant). Cubital vein 1 was significantly longer than in *A. m. jemenitica*, but shorter than in *A. m. carnica*, IranNE and IranSE, vein 2 was also significantly larger than in *A. m. jemenitica* but smaller than *A. m. mellifera*, *A. m. caucasica* and *A. m. anatoliaca*. Cubital index was significantly lower in comparison to *A. m.*

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

*carnica* and IranSE, but higher in comparison to *A. m. mellifera*, *A. m. caucasica*, *A. m. anatoliaca* and *A. m. jemenitica*. Differences were not significant in the other comparisons.

In discriminant analysis, when entered as an own group the bees from Belutschistan were positioned adjacent to the *A. m. meda* groups (Fig. 2 a), with some affinity to *A. m. syriaca* or *A. m. anatoliaca*. They were distinct enough from all other groups that each sample was reallocated to their own group with very high probability ( $P > 0.9995$ ). When entered as unclassified samples, all were assigned with very high post-hoc probability to *A. m. meda*

( $P > 0.9995$  in all but the sample from Khash, where  $P$  was 0.996).

A separate discriminant analysis of the Sistan-Belutschistan samples together with the *A. m. meda* groups alone again emphasized the comparatively high distance of these bees from the other groups, predominantly because of their smaller size reflected on discriminant function 1 (Fig 1b). As ungrouped samples, all Sistan-Belutschistan samples were allocated to the Iran SE group with very high probability ( $P > 0.9995$ ), except one sample from Iranshar which was allocated to the Irak meda group with lower probability of  $P = 0.965$ ).

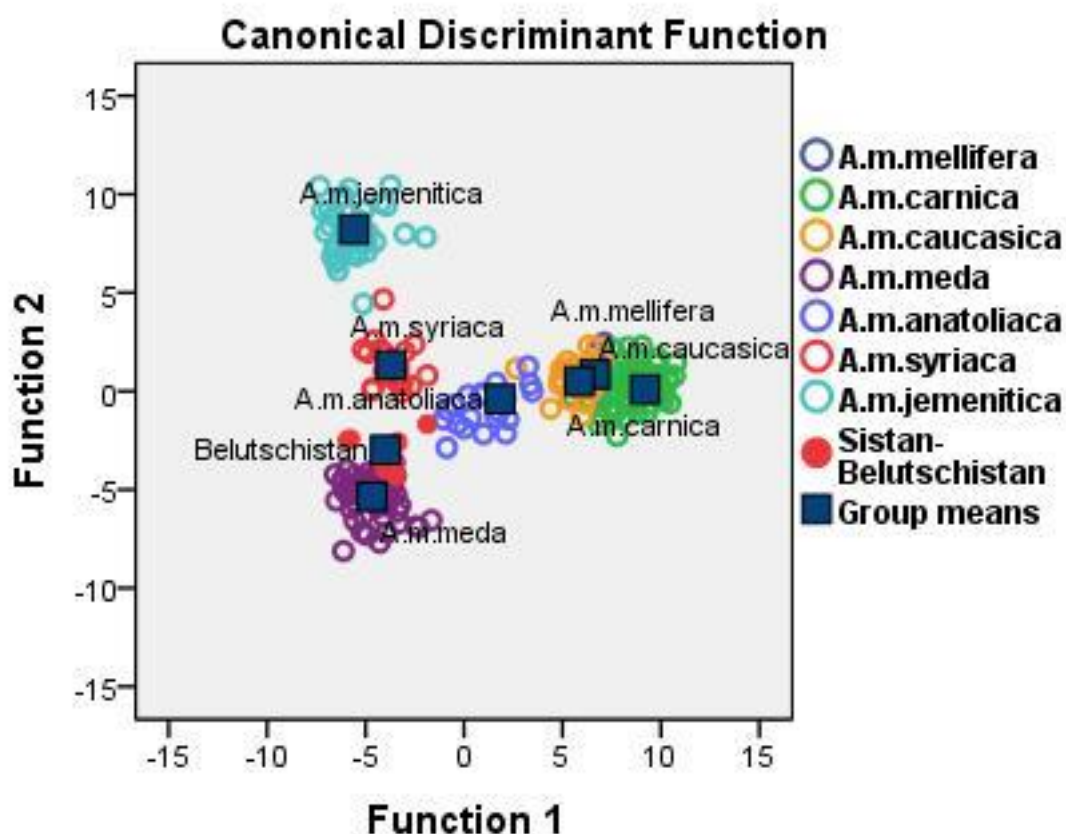


Fig.2a Discriminant analysis function plots. a for the grouped Sistan-Belutschistan samples together with all other subspecies, b for the ungrouped Sistan-Belutschistan samples together with the *A. m. meda* subgroups.

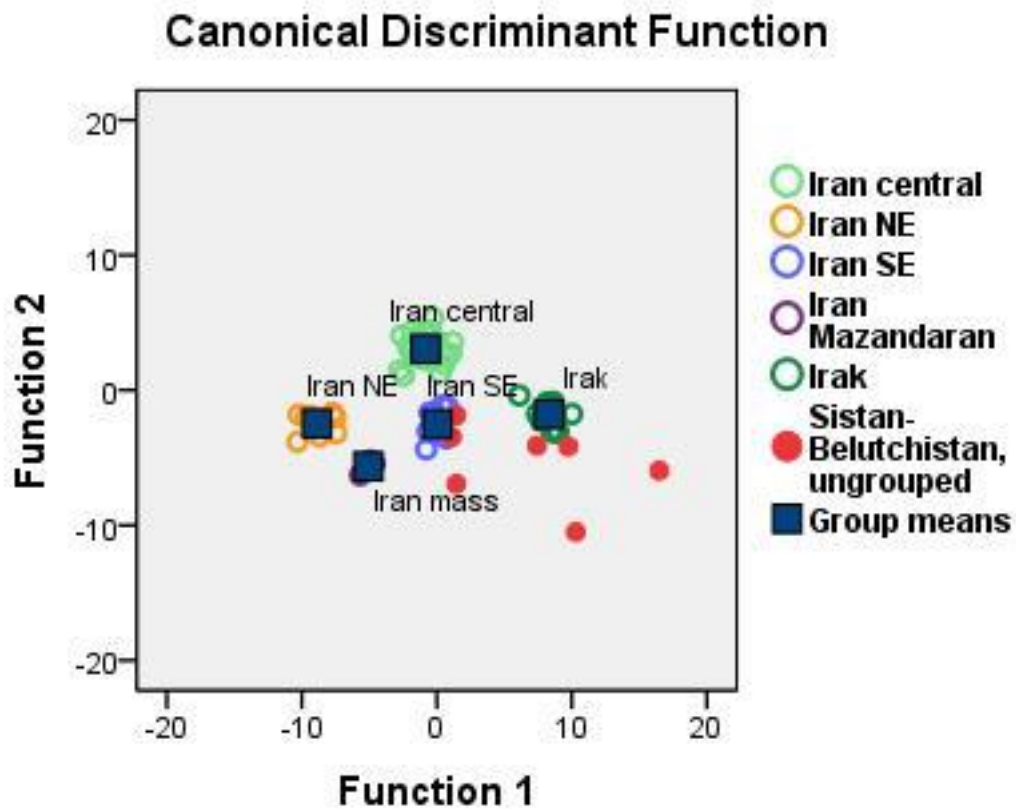


Fig. 2 b. Discriminant analysis function plots. a for the grouped Sistan-Belutschistan samples together with all other subspecies, b for the ungrouped Sistan-Belutschistan samples together with the *A. m. meda* subgroups.

A cluster analysis based on of group means of z-normalized character data also showed the Sistan-Belutschistan bees to be closely linked to the *A. m. meda* cluster (Fig. 3). Again they had closer affinity to the Iran SE group, and from the other subspecies they were next linked to *A. m. syriaca*, then to the *A. m. anatoliaca* / *A. m. caucasica* cluster, and then to *A. m. carnica*, to *A. m. mellifera* followed at some

distance by *A. m. jemenitica*. Table 2 gives an excerpt from the distance matrix reflecting the Euclidian distances from Belutschistan bees, similarly showing the relative closeness to *A. m. meda* groups, to *A. m. syriaca*, followed by the other subspecies with *A. m. jemenitica* placed furthest away.



## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

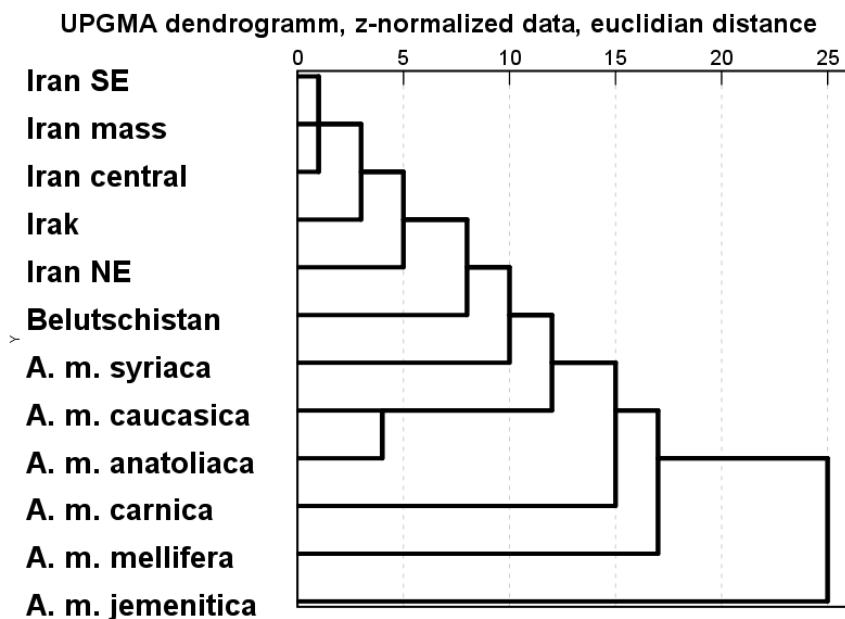


Fig. 3 Dendrogram showing the position of the Belutschistan bees in relation to other subspecies, and to subgroups of *A. m. meda*, based on z-normalized morphometric data

Table 2. Euclidian distance from the Belutschistan group based on z-normalized character data.

Euclidian distance	
Group	Belutschistan
<i>A. m. mellifera</i>	10,487
<i>A. m. carnica</i>	9,465
<i>A. m. caucasica</i>	9,721
<i>A. m. anatoliaca</i>	7,628
<i>A. m. syriaca</i>	6,741
<i>A. m. jemenitica</i>	11,378
Iran central	5,436
Iran NE	6,550
Iran SE	5,558
Iran mass	6,091
Irak	5,516
Belutschistan	0,000

### DISCUSSION

In this study we investigate the honey bees (*A. mellifera*) at the south-eastern distribution boundary of *Apis mellifera*, in an area of specific interest due to its vicinity to the distribution area of the Eastern honey bee *A. cerana*. These sampling positions

were approximately 300 km east of the currently most eastward sample of *A. mellifera*, at Delfarh (28°58N 57°38E) in the district of Kerman, which had been morphometrically analyzed by Ruttner *et al.* (1985). No bees had been suspected by these authors because of the extremely hot and dry desert climate generally adverse to beekeeping. This hot desert strip constitutes the separation line to the beginning of *A. cerana* territory in Pakistan, the width of which has thus been reduced by about one third until the next record of *A. cerana* at Thari (Pakistan, 34°30' N 64°51' E), but possibly the distance of separation might be even less. It might be not impossible but unlikely that there is any overlap between the species as the separating region is extremely uninhabitable. The geographic situation is sketched out in Fig 1, based on Ruttner *et al.* (1985).

At the same time, the bees of Sistan-Belutschistan enrich the spectrum of *A. m. meda* by a subpopulation of clearly deviating properties. *Apis mellifera meda*, distributed throughout Iran, was first described by Skorikov in 1929 (Ruttner 1988), for a small location in its northern range. The first more detailed investigation by Ruttner *et al.* (1985) still remains the main reference in which, based on

## ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

63 samples from Iran, they roughly outlined the approximate distribution limits. They further identified 5 discernible subpopulations in Iran (West and central Iran, Mazandaran, Northeast Iran and South-east Iran) but also extensions into Iraq and Southeast Anatolia. This work was later supplemented by Ftayeh *et al.* (1994), who clarified the distribution limit into northern Syria, and by Ruttner *et al.* (2000) showing altitude-related clinal variation pattern along the 36°N latitude up and down the Elbrus Mountains to the Caspian sea. Later, Adl *et al.* (2007) confirmed the clear separation between west Iranian *A. m. meda*, east Anatolian *A. m. anatoliaca* and *A. m. caucasica*. Dolati *et al.* (2013) further differentiated Iranian *A. m. meda* into 9 subpopulation by geometric wing analysis. All these investigations were based on morphometry, but were recently supplemented by a few molecular studies, mostly restricted to partial areas (Kandemir *et al.* 2004, Rahini 2015). However, the complete amount of variation within *A. m. meda* and its geographical the pattern still needs to be sorted out, which is beyond the scope of this paper.

Discriminant analysis, as well as cluster analysis, clearly confirmed that Sistan-Belutschistan bees belong to *A. m. meda*, in spite of quite some deviations which in part may be interpreted as adaptations to the extremely dry-hot climate. Some particular features set them apart, which are small size (but bigger than *A. m. jemenitica*), light coloration particularly of tergite 4 which was lighter-colored than in any of the other groups, and extremely short hairs. A distinctive trait is the relatively broad wings, and some extreme wing angles (A4, O26, b4, G18 and K19 which might be resulting from general wing shape. While distinctly different from all other *A. m. meda* populations, Sistan-Belutschistan bees were closest related to the most adjacent South-Eastern *A. m. meda* population. Next to the *A. meda* population Sistan-Belutschistan bees were most similar to *A. m. syriaca* with resemblances in size and pigmentation. An mtDNA analysis including bees from Sistan-Beluschistan (Rahini, 2015) had shown their membership to the evolutionary C line, thus supporting their status within the *A. m. meda* subspecies.

### Acknowledgement

We thank Prof. N. Koeniger for discussions and for providing workspace, B. Springer for helping with the morphometric measurements. We thank the Islamic Azar University of Nowshahr and Chalus for financial support.

### REFERENCES

- Adl, M. B. F., Gencer, H. V. Firatli, C., Bahreini, R. 2007. Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Centraj Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 46: 225-231.
- Dolati, L., Rafie, J. N., Khalesro, H. 2013. Landmark based morphometric study in the fore and hind wings of an Iranian race of European Honeybee (*Apis mellifera meda*). *Journal of Apicultural Science*. 57: 187-197.
- Rahini, A. 2015. Study of genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations using the mtDNA COI-COII intergenic region. *Biologija* 61: 54-59.
- Ftayeh, A., Meixner, M., Fuchs, S. 1994. Morphometrical investigation in Syrian honeybees. *Apidologie* 25: 396-401.
- Kandemir, I., Kence, M., Kence, A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31: 343-356.
- Meixner, M. D. 1994. Analyse polymorpher Subspezies von *Apis mellifera* L.: Morphometrische und molekulare Untersuchungen an den europäischen Rassen *Apis mellifera carnica* und *ligustica* und den afrikanischen Rassen *Apis mellifera monticola* und *scutellata*. Ph.D. thesis, Johann-Wolfgang-GoetheUniversity, Frankfurt.
- Ruttner, F. (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer, Berlin
- Ruttner, F., Pourasghar, D., Kauhausen, D. 1985. Die Honigbienen des Iran. *Apidologie* 16, 241-264
- Ruttner, F., Pour Elmi, M., Fuchs, S. 2000. Eoclines in the Near East along the 26° N latitude in *Apis mellifera* L. *Apidologie* 31: 157-165.
- SPSS, 2015. SPSS for Windows, Release 23.0.0.0, standard version. IBM corporation, USA.

# ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

### Giriş

Bu çalışmada özel bir ilgi alanına sahip olan coğrafyada *Apis mellifera*'nın güney-doğu dağılım sınırları yeniden araştırılmıştır. Daha öncesinde Sistan-Belutchistan bölgesinin çok fazla kuru çöl iklimine sahip olmasından dolayı balarısı *Apis mellifera*'nın bu bölgede olmadığı ancak *A. florea*'nın varlığı rapor edilmiştir. 2005 yılında yapılan bir arazi çalışmasında bu bölgede hem modern hem de geleneksel yöntemlerle bayağı bir arıcılık faaliyetleri yapıldığı bulunmuştur. Bu çalışmada bu bölge balarılarının detaylı morfometrik çalışması yapılmış ve diğer balarılar ile morfolojik ilişkileri araştırılmıştır.

### Materyal ve Metot

Yazarlar biri olan Pour Elmi 2005 yılında bölgeyi güneyden kuzeye doğru ziyaret ziyaret etmiş ve 7 balarısı kolonisinden alkol içerisine örnekler toplamıştır. Bu örneklerden 3 tanesi Iranshahr (27°10'N, 60°38'E, rakım 660 m). 1 tanesi Khash (28°13'N, 61°11'E, rakım 14900m, ve diğer 3 tanesi ise Zahedan (29°30'N, 60°50'E, rakım 1384 m) şehrinden toplanmıştır (Şekil 1). Kovanlardan toplanan örneklerden her kovandan 10 birey olacak şekilde Ruttner (1988)'de tanımlanan metoda göre 37 morfometrik karakter (16 vücut büyüklüğü, 7 renk, ve 11 kanat açısı) ölçülmüştür. Bu bölge arılarının morfometrik pozisyonunu belirlemek amacıyla 67 *A. m. meda* ve 128 diğer yakın balarısı alttürlerinin Oberursel veri tabanında bulunan kovan verileri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler SPSS 23 kullanılarak diskriminat fonksiyon analizi ve UPGMA kümeleme analizleri ile çok değişkenli istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur.

### Sonuç ve Tartışma

Morfometrik karakterlerden bazılarının karşılaştırmalı sonuçları ve farklılıkları Tablo 1'de verilmiştir. Sistan-Beluchistan'dan elde edilen arıların diğer örnekler göre az sayıda olması nedeniyle bu bölge arılarının farklı lokasyonları gruplanamamıştır. Ancak tüm morfometrik ölçümlerde bu bölge arıları veri tabanında bulunan *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* ve *A. m. anatoliaca*'dan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulunmuştur. *A. m. syriaca*'ya benzer büyüklükte fakat *A. m. jemenitica*'dan çok daha büyük bulunmuştur. Aynı zamanda diğer İran ve Irak bölgesindeki arılardan da çok az küçüktür. Kullanılan 37 karaktere göre diğer balarısı grupları ile benzerlik ve farklılıklara sahiptir. Bu karakterlerin tamamı kullanılarak yapılan çok değişkenli istatistiksel analizlerde Beluchistan bölgesinden toplanan arıların *A. m. meda* grubuna daha yakın çıktığı fakat *A. m. syriaca* ve *A. m. anatoliaca*'ya da benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 2). Morfometrik karakter ortalamalarının UPGMA kümeleme analizinde de *A. m. meda* kümesi ile bağlanmıştır. Diğer alttürlerden ise *A. m. syriaca*'ya ve daha sonra *A. m. anatoliaca* / *A. m. caucasica* grubuna daha sonra ise *A. m. carnica*, *A. m. mellifera* ve sonrasında ise uzaktan *A. m. jemenitica*'ya bağlanmaktadır (Şekil 3). Tablo 2'de Beluchistan balarılarının diğer balarısı alttürlerine olan öklid uzaklıkları gösterilmektedir. Bu uzaklıklar incelendiğinde UPGMA kümeleme analizindeki benzer ilişkiler görülmektedir. Bu bölge balarılarının yapılan detaylı çalışması ile *Apis mellifera* dağılımı diğer balarısı türü olan *A. cerana*'ya kadar yakınlaşmıştır. Hem diskriminant hem de Kümeleme analizi Beluchistan arılarının biraz farklılıklarla birlikte *A. m. meda*'ya bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan mtDNA analizi (Rahini, 2015) ile bu bölge arılarının C evrimsel koluna ait olduğu ve *A. m. meda* alttürünün de pozisyonunu belirlenmektedir.

## BAL ARISI (*Apis mellifera* L.) SPERMASININ TAZE VE DONDURULARAK MUHAFAZA EDİLMESİ

### Preserving Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Semen as Fresh and Frozen

(Extended Abstract Can be Found at the end of the Article)

Aziz GÜL<sup>1</sup>, Durmuş Ali CEYLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Antakya/Hatay

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi Çumra Meslek Yüksekokulu Çumra/Konya

Geliş Tarihi: 04.02.2017

Kabul Tarihi: 02.03.2017

#### ÖZ

Arıcılık dünya üzerinde çok eski dönemlerden beri yapılmakta olup çeşitli tarım kolları ile birlikte uyumlu bir şekilde toprağa bağlı kalınmaksızın yapılabilen bir yetiştiricilik koludur. Bilim ve teknolojinin gelişmesi ile yakın geçmişten günümüze balarılarının yaşamları aydınlatılmıştır. Balarılarında üremenin izahı 1845 yılında yapılmış olup, 1926 yılında balarılarında suni tohumlamanın keşfi ile birlikte arıcılık sektörü hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Suni tohumlama ile birlikte balarısı spermasının depolanılabilirliği üzerinde çalışmalar da 1960'lı yıllarda başlamıştır. Günümüzde, balarısı sperması taze olarak 16°C'de 2 hafta gibi bir süre canlı olarak muhafaza edilebilmektedir. Dondurma işleminde ise tam bir başarı elde edilmiş değildir. Günümüzde depolanmış sperma ile döllenmiş anaarlarda %50'nin üzerinde işçi arı oranı elde edilmesine rağmen, spermanın saklanması konusunda metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Balarısı, sperma, taze depolama, dondurma, sıvı azot

#### ABSTRACT

Beekeeping has been practiced throughout the world since ancient times and it can be done in a harmony with various agricultural branches without adhering to the soil. With the development of science and technology, the daily lives of honey bees have recently been explained. The explanation of honey bees' breeding was made in 1845 and the beekeeping sector progressed rapidly with the discovery of artificial insemination in 1926. Scientists also began working on the storage of honey bees' sperm in the 1960s after the discovery of artificial insemination. Today, honey bees' sperm can be kept alive for two weeks at 16°C, however, it hasn't been a complete success in the freezing process. Although there was a 50% success rate producing worker bees after the frozen-thawed process, the freezing methods need to be improved.

**Key words:** Honey bee, sperm, fresh storage, freezing, liquid nitrogen

#### GİRİŞ

Balarıları bal, balmumu, propolis, arı zehri ve arısütü gibi ekonomik öneme sahip birçok ürünün üreticileri olması yanında sayısız tarımsal ürün ve yabani bitkinin de ana dölleyicileridirler. İnsan tüketimine sunulan meyve ve sebzelerin 1/3'ü

balalarılarının da içerisinde bulunduğu tozlayıcı böcekler tarafından tozlanmakta olup balarıları bu bitkilerin %80'inin polinasyonunda rol oynamaktadır (FAO, 2016). Ayrıca, tropikal bitkilerin yaklaşık yarısının tozlaşmasını sağlamaktadır (Abdelkader ve ark., 2014). Balarıları tozlaşmadaki etkilerinden dolayı modern tarımın sürdürülmesinde önemli role

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

sahiptirler. Bitkisel üretimde tozlanmaya sağladığı tozlayıcı katkısından dolayı bazı ülkelerde tozlaşmada kullanılmakta ve arıcılar için ek bir gelir kaynağı oluşturmaktadır. Örneğin Kaliforniya eyaletinde (ABD) bulunan badem ve takiben narenciye bahçeleri için yıllık 1.7 milyon bal arısı kolonisi kiralanmaktadır (Rucker ve ark., 2012).

Balarılar sosyal yaşantıları sebebi ile diğer canlılardan farklılıklar göstermektedir; doğaya faydalarının yanında sosyal yaşantıları da araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bazı böceklerin dişileri özel organlarında spermayı birkaç yıla kadar saklayabilmektedirler. Depolama organları yapısal olarak koruyucu, besleyici, kimyasal olarak stabil bir çevre ve sperm canlılığını koruyacak bir yapıdadır (Choe ve Crespi, 1997; Neubaum ve Wolfner, 1999). Balarılarında çiftleşme, diğer böceklerden farklı olarak anaarının yüksükten çıkmasını takiben bir hafta içerisinde olmaktadır. Ancak hava koşullarına bağlı olarak yeterli sperm depo edilememesi durumunda, ikinci bir çiftleşme olabilmektedir. Doğal eşleşme sonrası dişi genital kanala bırakılan sperma yumurta kanalından geçerek 24 saat içerisinde spermatekaya ulaşmakta ve burada anaarının tüm yaşamı boyunca canlılığını korumaktadır (Genç ve Dodoloğlu, 2011). Sosyal böceklerin yaşantıları ve vücutlarındaki bu özel yapılar incelenerek diğer hayvanlarda olduğu gibi böceklerin de spermlerinin depolanabilirliği yıllardır birçok bilim adamı tarafından araştırılmıştır (Taber ve Blum, 1960; Harbo, 1976, 1979, 1983; Melnichenko ve Vavilov, 1976; Verma, 1983; Kaftanoğlu ve Peng, 1984, Hopkins ve Herr, 2010; Wegener ve ark., 2014).

Yeryüzünde sayısız balarısı değerli alttür ve nadir ekotipleri, tarımda pestisitlerin kullanımı ve arazi işlemedeki değişiklikler gibi insanoğlunun sürdürdüğü aktiviteler sonucu tehdit altındadır (James ve Pham Deleque, 2002). Bu gibi tehditlerden dolayı, tehditlerin en aza indirilmesinin yanında, balarılarının spermasının dondurularak sıvı azot içerisinde uzun süre depolanması da önem kazanmıştır. Günümüzde ıslah amacıyla farklı hayvan türlerine ait, sperma veya döllü-dölsüz yumurta gibi materyaller dondurularak kullanılmaktadır. Balarılarında da tür ve ırkların korunması kaliteli gen kaynaklarının saklanması ve yaygınlaştırılması için spermanın dondurularak korunması doğa, tarım, arı ve anaarı üreticileri için son derece önemlidir (Hopkins ve ark. 2012).

Balarısı spermasının dondurulmasına ait ilk çalışmalar 1970 ve 1980'li yıllarda yapılmıştır (Harbo, 1979, 1983; Kaftanoğlu ve Peng, 1984). Ancak bu ilk çabalarda depolanmış sperma ile suni tohumlanan anaarılardan kısmen başarı elde edilmiştir. İlk olarak Taber ve Blum (1960) çalışmalarında, balarısı spermasının oda sıcaklığında 68 gün boyunca depolandıktan sonra anaarılardan suni olarak tohumlanabildiğini bildirmişlerdir. Ancak sonuçların başarılı sayılabilmesi için anaarılardan %50'sinin döllenmiş yumurta bırakması gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmada depolanmış sperma ile döllenmiş 105 anaarılardan 31 tanesinin ancak döllü yumurta bıraktığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Jaycox (1960) yaptığı çalışma ile balarısı spermasını cam kapiller tüpler içerisinde 35°C'de depolamıştır. Araştırmacı hiçbir şekilde bir ek solüsyon kullanmadan 22 gün boyunca spermlerin canlı kaldığını tespit etmiştir.

Kaftanoğlu ve Peng (1984) yaptıkları bir çalışmada, balarısı spermasının sıvı azot içerisinde bir yıl veya daha uzun süre ile depolanabileceğini tespit etmişlerdir. Ancak depolanmış sperma ile döllenmiş anaarılardan yeterli işçi arı yumurtası bırakmadığı ve koloninin anaarısı olması için verimli olmadığını, depolama için daha etkili depolama solüsyonlarının geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Almeida ve Soares (2002) yaptıkları çalışmalarında, balarısı spermasını hindistancevizi suyunda 120 güne kadar depolamışlardır. Ancak çalışma sonucunda spermlerin 80. güne kadar canlı kalabildikleri ve yalnızca 15 gün depo edilen spermanın suni tohumlamada kullanılabildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda bu yöntemin *in vitro* olarak balarısı spermasının kısa süreli depolanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Hopkins ve Herr, 2010 yılında sperma depolama konusunda çok kapsamlı bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar Koruyucu çözeltilerin toksitesini, sıcaklık hassasiyetlerini, donma oranını ve soğuk şokun etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda en fazla sperma canlılığının (%93) programlanabilir donma oranını 2°C/dak olduğu ve %10 DMSO kullanılan grupta olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca spermanın 4°C üzerindeki sıcaklıklara toleranslı olduğunu bildirmişlerdir.

Wegener ark., (2014), balarısı spermasının dondurulmasında kullanılan DMSO gibi koruyucu maddelerin hipertonic etkilerine karşı diyaliz

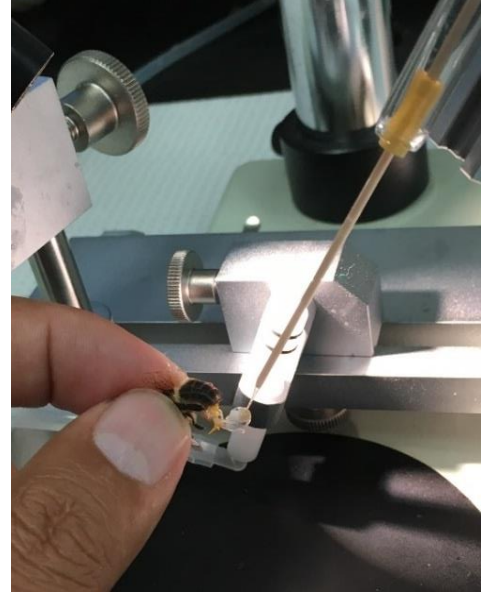
## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrıca spermanın dondurularak çözülmesi sonucunda sperma örneklerinin içerisindeki koruyucu kimyasalların olumsuz etkilerini azaltmak için çözülen spermayı santrifüj ederek dondurma esnasında kullanılan koruyucu kimyasalları ayırmışlardır. Bu işlemler sonucunda koruyucu çözeltilerin direkt katılması, spermanın koruyucular içerisinde diyaliz edilmesi ve diyaliz ile birlikte santrifüj işlemi sonucunda elde edilen işçi arı oranlarını sırasıyla %45.7 (29.2–77.8), %47.5 (25.6–72.5) ve %27.0 (0.5–65.3) olarak belirlemişlerdir.

### ERKEK ARILARDAN SPERMA TOPLAMA

Balarısı spermasının taze veya dondurularak saklanması ilk aşaması spermanın sağlıklı bir şekilde erkek arılardan toplanmasıdır (Resim 1). Sperma toplamak için erkek yetiştirme kolonileri belirlenmeli ve bu koloniler takviye besinlerle beslenerek kolonin işçi arı mevcudu yüksek tutulmalıdır. Ayrıca erkek yetiştirme kolonilerinin varroa mücadelesi de etkili bir şekilde yapılmalıdır. Varroa parazitinin erkek arı petek gözlerini tercih ettiği ve varroa ile bulaşık kolonilerdeki erkek arı semen kalitesinin düşük olduğu unutulmamalıdır (Goodvin ve Eaton, 2001). Suni tohumlama şırıngasında spermanın toplanması esnasında

kullanılan serum fizyolojik solüsyonuna alternatif olarak Kiev solüsyonu (100 ml saf su içerisinde: Trisodyum citrate-2 hydrate, 2.43 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0.01 g; KCl, 0.30 g; glikoz, 0.30 g), ringer solüsyonu (100 ml saf su içerisinde: NaCl, 0.85 g; KCl, 0.025 g; CaCl<sub>2</sub>, 0.030 g; glikoz, 0.50 g ve saf su, 100 ml ) vb. birçok kimyasal bileşim kullanılabilir (Harbo, 1985; Cobey ve Schley, 2002; Güler, 2006). Ancak 2012 yılında Hopkins ve ark. (2012) tarafından geliştirilen sulandırıcı (100 ml saf su içerisinde: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.014196 g; sodium citrate 0.03 g; KCl 0.6113 g; NaCl 0.49 g; NaHCO<sub>3</sub> 0.042 g; TES buffer 0.6878 g; Tris base 0.3634 g; EDTA 0.00037 g; bovine serum albumin 2 mg; proline 0.04950 g; catalase 0.5 mg; arginine 0.01 g; glycine 0.00075 g; 10 µl Gentamycine; 25 µl Streptomycin; 20 µl penicillin) hem sperma dondurma solüsyonu olarak, hem de sperma toplama ve anaarların tohumlanması esnasında iyi sonuçlar vermektedir. Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µl.lik filtreden geçirilerek kullanılmalıdır. Arıcılıkta suni tohumlama işleminde veya spermanın dondurulması esnasında dikkat edilecek diğer önemli bir konu da ortamın sterilizasyonudur. Çalışma alanının hijyenik olması çalışmanın başarısı üzerine doğrudan etkilidir. Çalışma odasının önceden temizlenmesi kullanılacak alet ve ekipmanların %70'lik etil alkol ile sterilize edilmesi olası mikrobik bulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir.



Resim 1. Kovan giriş deliği önünden erkek arıların alınması ve sperma toplaması.



## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

### BALARISI SPERMASININ TAZE OLARAK SAKLANMASI

Balarısı sperması kapiller tüpler içerisinde veya toplandığı suni tohumlama iğneleri içerisinde 16°C'de 2 hafta kadar taze olarak muhafaza edilebilmektedir (Almeida ve Soares, 2002; Cobey, 2007). Ancak, spermanın erkek arılardan toplanması esnasında kullanılan serum fizyolojik veya diğer sulandırıcıların içerisine olası mikrobik bulaşmayı ve yayılmasını engellemek amacı ile gentamycine, streptomycin, tylosin ve penicillin benzeri antibiyotikler katılır. Sperma toplama işlemi bittikten sonra kapiller tüplerin veya iğnelerin her iki

tarafı spermaya bulaşmayacak şekilde vazelin benzeri mumsu bir madde ile hava almayacak şekilde kapatılır (Resim 2). Ülkelerarası veya bir ülkede iller arasında uzun mesafeler taşınacak olan sperma örnekleri de aynı şekilde muhafaza edilerek düşük sıcaklıkta taşınabilir. Ancak 1-2 gün gibi kısa süre muhafaza edilecek olan spermalar için kapiller tüplerin veya iğnelerin her iki tarafına bir miktar sulandırıcı çekilmesi yeterlidir. Ayrıca, spermanın 2 hafta gibi uzun süreli muhafazalarında kapiller tüpler olası ısı farklılığı ve ışığın olumsuz etkilerinden korunması amacıyla alüminyum folyo vb. bir madde ile kaplanır.

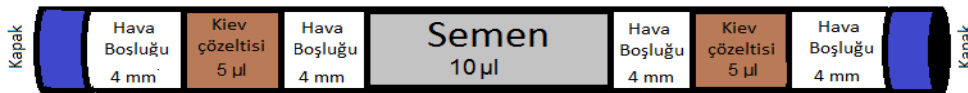


Resim 2. Cam kapiller tüpler ve suni tohumlama şırınga iğnesi içerisinde depolanan sperma.

### BALARISI SPERMASININ DONDURULARAK SAKLANMASI

Balarısı spermasının dondurularak saklanması genelde diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi 0.25 ml'lik payetler içerisinde yapılmaktadır. Sperma örnekleri payetlere doldurulmadan önce koruyucu solüsyonlarla sulandırıldıktan sonra payetlere çekilir. Balarısı sperması ilk olarak bir miktar sulandırıcı (5 birim sperma: 1 birim sulandırıcı) ile sulandırılır. Daha sonra karışımın pH ve ozmotik basınç dengesini korumak amacı ile buffer solüsyonları, dondurulma esnasında hücre içi buzlanmayı engellemek amacı ile hücre içi suyu

uzaklaştırmak için Dimethyl sulfoxide (DMSO) ve tercihe göre yumurta sarısı katılır. Tüm karışım hazırlandıktan sonra spermanın her iki tarafında 4-5 mm boşluk olacak şekilde sırasıyla sulandırıcı-sperma- sulandırıcı payete çekilir ve payetin pamuk olmayan tarafı herhangi bir sıcak baskı veya kapama tozu ile kapatılır (Resim 3, Resim 4). Dondurmanın başarısı üzerinde hücre içi kristalizasyonu engellemek amacı ile sulandırıcıya katılan koruyucu maddelerin konsantrasyonu ve çeşidi, soğutma hızı ve soğuk şoku, genel sıcaklık duyarlılıkları önemli bir etkiye sahiptir (Hopkins ve Herr, 2010).



Resim 3. Payetlere spermanın doldurulma şekli.

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE



Resim 4. Plastik payetlere (0.25 ml) çekilmiş ve doldurulmaya hazır bal arısı sperması.

Hazırlanan payetler ilk aşamada katılan DMSO'nun hücre içi sıvı ile yer değiştirmesi ve ısının stabilizasyonu amacıyla  $+5^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat kadar ekilibrasyonda bekletilir. Bu süre sonunda payetler alınarak kademeli dondurma cihazı haznesine yerleştirilir (Resim 5). Cihazın programlaması  $3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$  soğuyacak şekilde  $-40^{\circ}\text{C}$ 'ye soğuyacak

şekilde programlanır (Hopkins ve ark., 2012; Wegener ve ark., 2014). Sıcaklık  $-40^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaştığında sperma örnekleri seri bir şekilde alınarak sıvı azot tankları içerisine yerleştirilerek kullanılıncaya kadar burada muhafaza edilir (Resim 6).



Resim 5. Kademeli dondurma cihazında dondurma işlemi.

Spermanın dondurulması amacıyla kullanılan sulandırıcıların eritme sonrası canlılık üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, dimethylacetamide (DMA) ve glycerol balarılarında kullanılan başlıca kriyoprotektanlar olup bunlar içerisinde en etkili olanı ve en fazla kullanılan koruyucu DMSO'dur (Taylor ve ark., 2009). Kriyoprotektanlar genelde

hücre içi buzlanmayı engelleyici etkiye sahiptirler (Watson ve Fuller, 2001). Ancak yumurta sarısı sperma depolama çalışmalarında kullanılmış (Hopkins ve ark., 2012) ve iyi sonuçlar alınmış olsa bile spermanın çözülerek anaarılara tohumlama yapıldıktan sonra anaarının ovariol kanallarını tıkadığı ve olumsuz etkileri olduğu yönde şüpheler de bulunmaktadır (Wegener ve ark., 2014).



## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

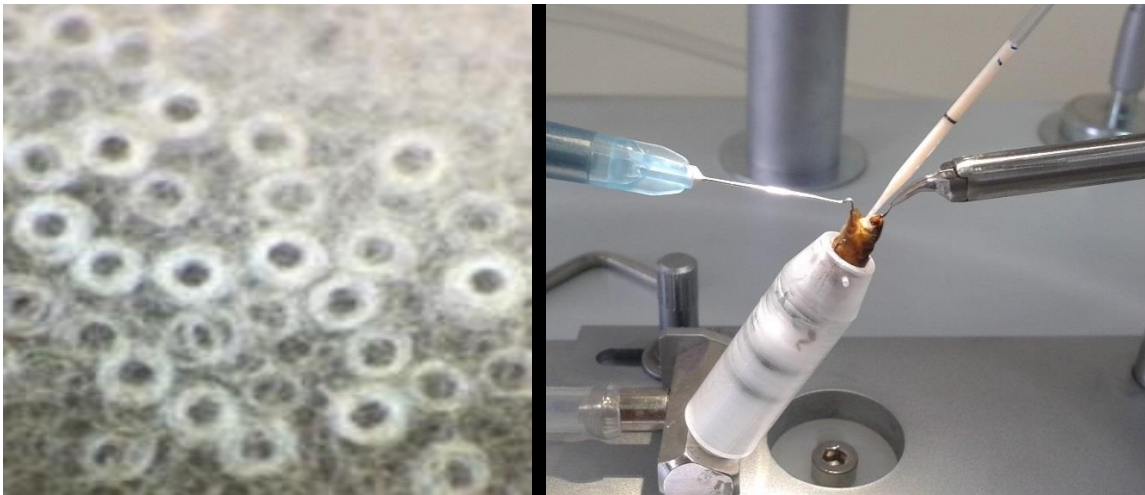


Resim 6. Azot tankı içerisinde spermanın dondurulmuş halde muhafazası.

Başka bir dondurma yöntemi olan ve diğer çiftlik hayvanları spermasının dondurulmasında uygulanabilen vitrifikasyon yöntemi, balarısı sperması için uygun bir dondurma yöntemi değildir. Hızlı dondurma yöntemlerinde balarısı spermlerinin yaşadığı ani soğuk şokları dondurma esnasında ölü sperm sayısının artmasına sebep olmaktadır (Hopkins ve ark., 2012; Wegener ve ark., 2014). Bu sebeple balarısı sperması için kademeli dondurma yöntemi idealdir.

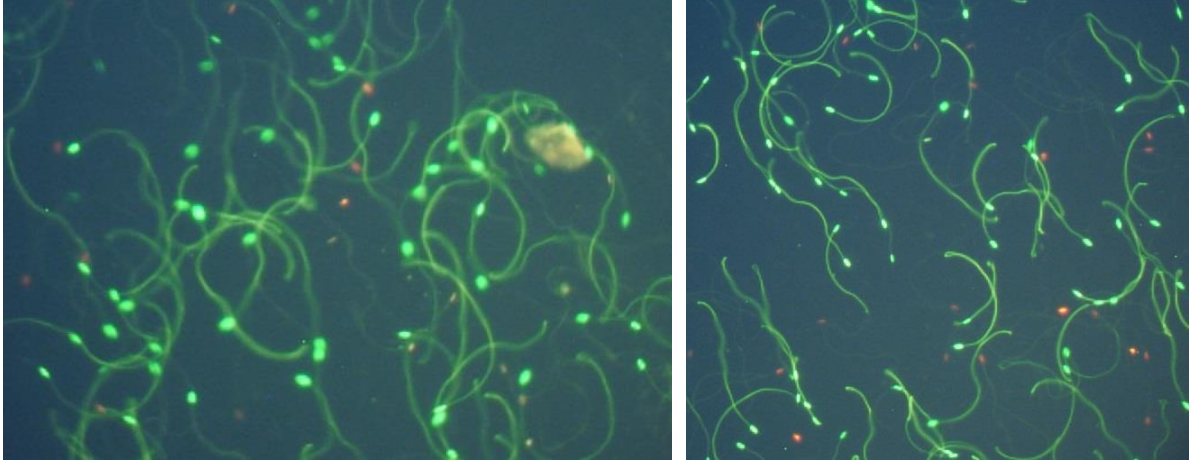
### **DONDURULMUŞ SPERMANIN ÇÖZÜLMESİ VE SUNİ TOHURLAMA**

Dondurulmuş sperma kullanılacağı zaman seri bir şekilde sıvı azot içerisinde alınır ve 35-40°C sıcaklıktaki su içerisine daldırılır. Su içerisinde hafif sallanarak 20 saniye kadar tutulur (Hopkins ve ark., 2012). Daha sonra steril bir ortama alınarak sterilize edilmiş bir makas ile payetin her iki tarafı kesilir ve suni tohumlama şırıngasına aktarılarak tohumlama yapılır. Tohumlamadan önce bir lam üzerine 1 µl kadar çözülmüş sperma örneği alınır ve mikroskop altında motilitesi belirlenir (Resim 7). Ayrıca ölü/canlı sperm oranı (Resim 8) vital boyama yöntemi ile belirlenir. Canlı sperm hücre sayısı ve motilite skorları yüksek (4-5) sperm örnekleri anaarların tohumlamasında kullanılır.



Resim 7. Dondurma işlemi sonrasında motil spermanın görünüşü ve anaarının tohumlanması.

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE



Resim 8. Dondurma işlemi sonrasında vital boyama ile ölü (kırmızı) ve canlı (yeşil) sperma testi

### SONUÇ

Diğer çiftlik hayvanlarında sahada rahatlıkla kullanılacak şekilde geliştirilmiş olan sperma dondurma işleminin balarılarında da aynı düzeye ulaşması arıcılık sektörüne de benzer kolaylıklar sağlayacaktır. Günümüzde sığırlarda 37 yıldır depolanmış olan sperma örneklerinin çözüldüklerinde normal bir motiliteye sahip oldukları görülmüş ve başarılı bir şekilde *in vitro* döllemede kullanılmıştır (Leibo ve ark., 1994). Genetik materyallerin dondurulmasının geçmişi çok eski olmamasına rağmen, şu ana kadar elde edilmiş verilere göre sıvı azot içerisinde sperma veya embriyoların muhafazası uzun süre yapılabilecektir. Ancak sperma dondurma işlemi balarısı sperması için ayrı bir zorluk teşkil etmektedir. Diğer çiftlik hayvanlarında milyonlarca sperma içeren her bir payet bir dişi için kullanılmakta ve payetteki tüm sperma bir yumurtayı döllemek için rekabet etmektedir. Dolayısı ile dondurma başarısı çok düşük olsa bile yumurtanın döllemesi kuvvetle muhtemeldir. Ancak balarılarında durum çok farklıdır. Anaarının yumurtladığı her yumurtanın döllemesi için sperm kesesinde depolanan spermadan 5-30 arasında sperm kullanılmaktadır. Dolayısı ile dondurulan balarısı spermalarında canlılık ve motilitenin çok yüksek olması gerekmektedir. Ayrıca dondurma ve çözme işleminden sonra canlı ve ölü spermleri ayırma metodlarının geliştirilmesi de önem arz etmektedir. Mevcut çalışmalar ile dondurma sonrası elde edilen işçi arı oranları genetik materyallerin korunması için yeterli olsa da özel sektörde uygulanacak düzeyde değildir. Dondurma yöntemlerinin geliştirilmesi ve

ölü/canlı sperm ayırımı ile yüksek oranda işçi arı elde edilmesi metodun ticari arıcılıkta da kullanılmasına imkan sağlayacaktır.

### KAYNAKLAR

- Abdelkader F.B., Kairo G., Tchamitchian S., Cousin M., Senechal J., Crauser D., Vermandere J.P., Alaux C., Conte Y.L., Belzunces L.P., Barbouche N., Brunet, J.L. 2014. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45 (2), 215–223.
- Almeida, R., Soares, A. E. E. 2002. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; *Hymenoptera*: *Apoidea*). *Interciencia*, 27, 317–321.
- Cobey, S., Schley, P. 2002. Innovation in instrumental insemination. The compact, versatile right and left handed Schley model II instrument. Ohio State University 1735 Neil Ave. Columbus, Ohio USA.
- Cobey S. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38, 390-410
- Choe, J C., Crespi, B J. 1997. The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids, Cambridge University Press. Cambridge. Pp: 385.

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization, Pollinators. Retrieved from <http://www.fao.org/biodiversity/components/pollinators/en/>
- Genç, F., Dodoloğlu A. 2011. Arıcılığın Temel Esasları. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Güler, A. 2006. Bal arıları (*Apis mellifera* L.)'nda yapay tohumlama ve Türkiye için önemi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 2006, 21(3): 370-378
- Goodvin, M., Eaton V. C. 2001. Control of Varroa. A Guide for New Zealand Beekeepers.
- Harbo, J.R. 1976. "Survival of honey bee spermatozoa in Liquid Nitrogen". *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70, 257–258.
- Harbo, J.R. 1979. "Storage of honey bee spermatozoa at -196°C". *J. Apic. Res.* 18, 57-63.
- Harbo, J.R. 1983. "Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196 °C)". *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76, 890-891.
- Harbo, J.R. 1985. Instrumental insemination of queen bee. Stock Center Laboratory. ARS, USDA, Route 3, Ben Hur Road, Baston Rouge, LA 70820.
- Hopkins, B.K., Herr, C. 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41(5), 548–556.
- Hopkins, B.K., Herr, C., Sheppard, W.S. 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*. 24 (8), 1079–83.
- James, D., Pham-Delegue, M.H. 2002. Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Book. Retrieved from <http://www.amazon.co.uk/Honey-Bees-Estimating-Environmental-Chemicals/dp/0415275180>
- Jaycox, E.R. 1960. The effect of drying and various diluents on spermatozoa of honey bee. *J. Econ. Entomol.* 53 (2), 266-269.
- Kaftanoglu, O., Peng, Y.S. 1984. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *Journal of Apicultural Research*. 23 (3), 157–163.
- Leibo, S.P., Semple M.E., Kroetsch T.G. 1994. "In vitro fertilization of oocytes by 37 year-old cryopreserved bovine spermatozoa". *Theriogenology*, 42,1257-1262.
- Melnichenko, A.N., Vavilov Y.L. 1976. "Long term storage of drone semen by freezing in liquid nitrogen SP S Kennan". *Soviet Agric. Sci.* 1, 34–36.
- Neubaum, D.M, Wolfner M.F. 1999. Wise, winsome, or weird Mechanisms of sperm storage in female animals. *Curr Topics Dev Biol.* 41, 67–97.
- Rucker, R. R., Thurman, W. N., Burgett, M. 2012. Honey bee pollination markets and the internalization of reciprocal benefits. *American Journal of Agricultural Economics*, 94 (4), 956–977.
- Taber, S., Blum M.S. 1960. "Preservation of honey bee semen". *Science*, 131 (3415), 1734-1735.
- Taylor, M.A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M.M. 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*. 72 (2), 149–159.
- Verma, L.R. 1983. "Effect of deep freezing on the survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa". *Am. Bee J.* 123, 851–852.
- Watson P F., Fuller B J. 2001. Principles of Cryopreservation of Gametes and Embryos, in: Watson P.F., Holt W.V. (Eds.), Cryobanking The Genetic Resource: Wild life Conservation for the Future?, CRC Press, London,. pp. 21–46.
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K. 2014. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69 (2), 236–42.

### EXTENDED ABSTRACT

Honey bees are social insects that produce honey, pollen, propolis, wax and bee venom, which humans have utilized for thousands of years. In the effort to collect and produce these hive products, honey bees perform arguably their most ecologically important role, pollination, making them a critical component of modern agriculture. Honey bees pollinate more than 100 crop varieties, with an estimated one-third of the human diet being derived from these insect-pollinated plants. Honey bees are

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

responsible for about 80 percent of this pollination around the world.

With the development of science and technology, the daily lives of honey bees have recently been explained. The explanation of honey bees' breeding was made in 1845 and the beekeeping sector progressed rapidly with the discovery of artificial insemination in 1926. Scientists also began working on the storage of honey bees' sperm in the 1960s after the discovery of artificial insemination. Today, honey bees' sperm can be kept alive for two weeks at 16 °C, however, the current freezing process has not been a complete success. Although there was a 50% success rate producing worker bees after the frozen-thawed process, the freezing methods need to be improved.

While fresh semen can be safely stored a couple weeks, conservation and breeding requires long-term preservation. Liquid nitrogen storage of gametes provides a means for long-term storage of genetic material. Cryopreservation of semen has been used to maintain valuable breeding material for a number of animal species of agricultural importance. Protecting the genetic resources of

honey bees by freezing spermatozoa is of great importance as a conservation safety net and breeding tool.

The most critical aspect of collection and above-freezing storage of semen is the introduction of antibiotics into the sample. Honey bees' sperm is stored which is the same process that is applied in other livestock species in 0.25 ml straws. Before being loaded to straws, semen mixes with extender (5 sperm: 1 extender). Buffer is added to balance the pH and osmotic pressure, Dimethyl sulfoxide (DMSO) and egg yolk to prevent intracellular freezing during the cooling process. Cryoprotectants have an important role during freezing of germplasms. The working mechanism of cryoprotectant is the same in all cells or ovariol of animals, including honey bees. Although dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, dimethylacetamide (DMA) and glycerol are common cryoprotectants used in cryo-studies in bee semen, dimethyl sulfoxide (DMSO) is the most effective cryoprotectant in the process of freezing process any type of live cells, including honey bee sperm.

## KUM ARILARI (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae)

### Sand Bees (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae)

(Extended Abstract Can be Found at the end of the Article)

Canan HAZIR

Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çevre Sağlığı Programı, Efeler, Aydın, cananhazir@gmail.com

Geliş Tarihi:23.02.2017

Kabul Tarihi: 29.03.2017

#### ÖZ

Yaban arıları, çok sayıda yabancı ve kültür bitkisinin tozlaşmasını sağlaması dolayısıyla ekolojik ve ekonomik öneme sahiptir. Bu nedenle bu canlılar için “temel taşı” türler terimi kullanılır. *Andrena* Fabricius, 1775 cinsi yabancı arıları genel olarak kum arıları olarak bilinir. Hem tür sayısı hem de birey sayısı en fazla olan arı cinslerinden biridir. Tanımlanmış 1500 türüyle arı cinsleri arasında en geniş grubu oluşturur. Tüm türleri yuvasını toprağa yapar. Çoğu türü polilektiktir, çok sayıda farklı yabancı ve kültür bitkisinin tozlaşmasını sağlayarak onların üremedeki başarısına yardım eder. Tarımda ve yabancı hayatta önemli olan kum arısı faunasının saptanması ve muhafazası ülkemiz açısından değerlidir.

Anahtar kelimeler: *Andrena*, kum arıları, arılar

#### ABSTRACT

Wild bees have ecological and economic importance as pollinators of several wild plants and crops; hence they are often termed keystone species. *Andrena* Fabricius, 1775 species are commonly known as sand bees. This is one of our most abundant genera of bees, both in species and individuals. *Andrena* is the largest genus of bees, comprises more than 1500 valid species. All species of sand bees burrow their nests into the ground. Many species are polylectic, They pollinate many of the wild and cultivated plants belonging to different families and help the success in producing. In agriculture and wild life, sand bees are so important in the identification and conservation of the fauna are of value for our country.

Key words: *Andrena*, sand bees, bees

#### GİRİŞ

Arılar, Hymenoptera takımında Apoidea üstfamilyasının Apiformes grubunu oluşturan böceklerdir. Şüphesiz, arı denince akla balarısı gelse de sadece *Apis* L. cinsine giren türler bal arılarını oluşturmaktadır (Michener, 2007). Halbuki yeryüzünde 20.000 civarında arı türü mevcuttur (Danforth et al., 2013). Balarısı (*Apis* L.) dışında kalan arı türleri yabancı arılarını oluşturur.

Apoidea üst familyasının Spheciformes (sphecoid wasplar) gurubunu oluşturan hymenopterler, halk

arasında “eşekarıları” olarak da bilinirler. Bunlar, ilk bakışta arılara çok benzerlerse de Apiformes grubu, yani arılar, Spheciformes gurubundan iki özellik bakımından ayrılırlar: Birincisi, neredeyse tüm arıların larvaları polenle beslenirken (Bir istisna olarak *Trigona* Jurine cinsi arıların larvaları polen yerine leşle beslenir), Spheciformes larvaları karnivordur. İkincisi, arılarda kıllar genellikle plumos ve dallı, arka bacağa ait tarsusun ilk segmenti (basitarsus), takip eden diğer segmentlerden daha geniş olup üzerindeki uzun kıllar yardımıyla polen sepeti konumunu almıştır. Ayrıca hortum

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

(proboscis) Spheciformes gurubu üyelerininkinden daha uzundur (Michener, 2007). Bu nedenle eşek arısı olarak nitelendirdiğimiz böcekler aslında arı değil wasptir.

Arılar genel olarak ağız parçalarının uzunluğuna göre kısa dilliler ve uzun dilliler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Stenotritidae, Colletidae, Andrenidae, Halictidae ve Melittidae familyaları kısa dilli arılar grubunda yer alırken; Megachilidae ve Apidae familyaları uzun dilli arıları ihtiva eder (Michener, 2000).

Andrenidae en büyük arı familyalarından birisidir. Dünya genelinde 4.000'den fazla türü bulunmaktadır (McGavin, 2001). Bu familya üyeleri Avustralya ve Antarktika hariç tüm kıtalarda görülür. Ancak tropik Asya'da neredeyse hiç bulunmaz. Ayrıca, Afrika'da Sahra çölünün güneyinde yalnızca birkaç cins ve türle temsil edilir (Osyshnjuk ve ark., 2005).

Andrenidae familyası Andreninae, Alocandreninae, Oxaeinae ve Panurginae olmak üzere dört alt familyadan oluşmaktadır (Michener, 2007). Küçük alt familya Panurginae dışında Palearktik Bölge'de yaşayan Andrenidae familyasına ait türlerin çoğu Andreninae altfamilyasına aittir (Osyshnjuk ve ark., 2005). Bu alt familyada en kalabalık cinsi *Andrena* Fabricius oluşturmaktadır (Michener, 2007).

### KUM ARILARI

*Andrena* cinsi üyeleri genel olarak kum arıları ya da soliter kazıcı arılar olarak bilinir. 1500 tanımlanmış türü, alttürleri ve sinonimleri de içeren yaklaşık 3000 taksonla arı cinsleri arasında en geniş grubu oluşturur. Gerçek tür sayısı 1500'ün üzerindedir. Morfolojik açıdan uniform bir gruptur; ancak şimdiye kadar 101 altcins ayrılmıştır (Dubitzky ve ark., 2010). Maalesef bu altcinsler arasındaki ilişki çok az anlaşılabilmiştir. Moleküler yöntemlerin taksonomik açıdan sorunlu olan *Andrena* gibi grupların filogenetik ilişkilerinin anlaşılmasını sağlayabileceği düşünülmektedir (Neff ve Larkin, 2002; Larkin, 2004).

*Andrena* Holarktik'te geniş bir yayılım gösterir. Alaska'nın güneyinden Panama'ya, batı Avrupa'dan, Kuzey Afrika, Anadolu ve Orta Asya'yı da içine alarak Kore'ye, Japonya'ya ve Kuzey Doğu Rusya'ya kadar yayılmıştır. Panama'nın tropikal düzlüklerinde bulunan bir tür hariç *Andrena*'nın tropikal bölgelerde varlığı kısıtlıdır. Dağlık tropikal

bölgelerdeki *Andrena* tür zenginliği birçok Holarktik bölgeye nazaran çok azdır. Güney Amerika'da, Orta Afrika'nın büyük bir kısmında, Güneydoğu Asya'da ve Avustralya'da ise bu cins üyelerine rastlanmaz (Dubitzky, 2006). Neredeyse tamamı Akdeniz ve Orta Asya'nın stepleri gibi kuru ve ılık iklim koşullarını tercih eder. Bu bölgelerde en fazla çeşitliliğe sahiptir. Tanımlanan altcinslerin, 51 tanesi yalnızca Palearktik'te ve 32 tanesi ise Nearktik Bölge'de bulunur. Sadece üç tür: *A. barbilabris* (Kirby), *A. wilkella* (Kirby) ve *A. clarkella* (Kirby) hem Palearktik'te hem de Holarktik'te yayılım gösterir (Dubitzky, 2005).

Dubitzky (2005)'e göre *Andrena*, Andreninae'nin en modern grubunu temsil eder. Bu cins *Cubiandrena*'nın atasından ya da *Cubiandrena*+*Ancylandrena* ortak atasından türemiştir. Tahminen Akdeniz bölgesi ile Orta Asya arasındaki bir yerde Eski Dünya'da evrimleşmiştir. Bu nedenle *Andrena*'nın en temel altcinsleri Palaearktik'te yer alır. En eski *Andrena* fosili Baltık amberde bulunmuştur ve Oligosen dönemine aittir. Bu nedenle *Andrena* cinsi muhtemelen geç Kretase ile erken Tersiyer (Eosen) arasında ortaya çıkmıştır. Bu dönemlerde Kuzey Amerika ile Avrupa henüz birbiriyle bağlantılıydı. Palaearktik kökenli bir *Andrena* hızlı biçimde tüm Holoarktik bölgeye yayılmış olabilir.

### Yuva Yapımı

Tüm *Andrena* türleri yuvalarını toprakta yapar. Genellikle güneşe maruz kalan çıplak ya da zayıf vejetasyona sahip kumlu alanları tercih ederler. Bu nedenle kum arıları olarak adlandırılırlar (Dubitzky, 2005). Yuvalar genellikle orman kenarlarında, açıklıklarda, yol kenarlarında, patikalarda, kıyılarda, dik yamaçlarda, bazen de yonca (*Medicago sativa* L.) tarlalarında bitki köklerinin aralarında bulunur (Radchenko ve Pesenko, 1994).

Kum arıları soliter (bireysel) yaşam sürdürür her dişi kendi yuvasını yapar (Dubitzky, 2005). Radchenko ve Pesenko (1994)'nin bildirdiğine göre yuvalar tek ya da küçük veya büyük kümeler şeklindedir. Örneğin, *Andrena chrysopus* Perez dişileri birbirine olan uzaklıkları 2-50 m. olacak şekilde yuvalar meydana getirir. Bununla birlikte Osyshnjuk ve arkadaşları (2005), *A. vaga* Panzer ve *A. fulva* (Müller)'nin sıklıkla büyük kümeler oluşturduğunu ileri sürmektedirler. Kumlu bir toprakta 1 m<sup>2</sup> alanda *A. vaga*'nın yaklaşık 100 yuvası bulunmuştur. Bunun aksine benzer koşullardaki (toprak, güneş ışığı) çevrede bu türe ait hiçbir yuva bulunmamıştır.

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

*A.fulva*'nın 1 m<sup>2</sup>lik alanda kümeleri 30'dan fazla yuvadan meydana gelir. Michener (1974), *A.labialis* (Kirby)'in yaklaşık 40 m<sup>2</sup>lik bir alanda 600 yuvadan oluşan bir kümesini gözlemiştir. Küme oluşturan türlerde birnevi sosyal davranış gözlenmiştir. Britanya'da yapılan incelemeler *A.bucephala* (Perkins) ve *A.ferox* (Yarrow and Guichard)'un müşterek koloniler halinde yaşadıklarını göstermektedir. Çok sayıda dişi toprakta tek girişi olan yuvaya girip çıkmaktadır. Osytshnjuk ve arkadaşları (2005) benzer şekilde *A.labialis*'in 2-3 dişisi tek bir yuvada çalıştığını bildirmektedir.

Kum arılarında yuva girişi genellikle tünelin kazılmasıyla açığa çıkan toprağın oluşturduğu tümseklerle ya da bazen bacayla çevrelenir. Tümseğin şekli (geniş, dar, yüksek, alçak gibi) esas olarak toprağın tipine bağlıdır. Genellikle ana tünel, yuvanın içine doğru uzanır, az ya da çok toprak yüzeyine diktir. Fakat bazen doğal engellerin üstünden geçer. Çapı arının serbest hareketine olanak sağlayacak ölçüdedir. Tünelin uzunluğu esas olarak dışının büyüklüğüne ve toprağın sertliğine bağlıdır. *Micrandrena* alt cinsine ait en küçük arılar birkaç santimetre uzunluğunda kanallar kazarken; *Andrena morio* Brulle gibi büyük türler yaklaşık 100 cm derinlikte yuvalar yaparlar. Bazı türler gevşek topraklara nazaran sert ve yoğun topraklarda daha az derinliğe sahip yuvalar yapar. Değişen derinliklerde olmak üzere ana tünel yan tünellere dallanır, bu tüneller de oval kuluçka hücrelerine uzanır. Bazen kuluçka hücreleri direkt olarak ana tünelde açılır. Yan tünellerin uzunluğu çok değişkenlik gösterir. Bazı türlerde (*Andrena cineraria* (Linnaeus), *A.florae* Fabricius, *A.vaga* Panzer gibi) yan tüneller ana tünelden daha uzun olabilir. *Andrena* cinsinde yuva tasarımı primitif olarak kabul edilir. Daha gelişmiş yuvalarda hücreler direkt ana tünelle bağlantılıdır (Osytshnjuk ve ark., 2005).

Tipik olarak her dişi 2-3 yuva yapar; ilk yuva 3-10 hücreye sahiptir fakat diğer yuvalarda daha az hücre bulunur. Bir dişi tarafından yapılan toplam kuluçka hücre sayısı 4'den 14'e kadar değişir. Hücreler dikey, eğik (*A.vaga*, *A.florae*, *A.bimaculata* (Kirby)) ya da yatay (*A.cineraria*) olabilir. Hücre büyüklüğü ergin arının büyüklüğüne uygunluk gösterir. Kuluçka hücresi kazıldıktan sonra su geçirmez bir tabakayla kaplanır. (Osytshnjuk ve ark., 2005). Bu kaplama işinde Dufour bezi salgısı kullanılır (Schiestl ve Ayasse, 2000). Sonra hücre besinle doldurulur.

Besin, nektar ve polen karışımından oluşmaktadır, büyüklüğü ve şekli türe bağlıdır. Toplar, hafif yassılaştırmış toplar veya küpler şeklinde biçimlendirilebilir. *A.vaga*'da olduğu gibi bazen bir polen topağı nektar üzerinde yüzebilir. Yiyecek tedarigi, larval gelişimin sağlanabilmesi için yeterli olmalıdır. Dişi arı, polen üzerine yumurta bırakır ve hücreyi bir kapakla kapatır. Diğer tüm arılarda olduğu gibi andrenid yumurtaları da kavisli, uzun ve oval, beyazımsı ve yarısaydamdır. Yumurta gelişimi 6-7 günden (*A.cineraria*) 18-21 güne kadar (*A.vaga*) sürer (Özbek, 1975; Osytshnjuk ve ark., 2005).

Larvalar, bacaksız, maggot tipindedir. Başlangıçta süt beyazı olan rengi, sindirim sisteminin kütikuladan görünmesi nedeniyle beslendikçe koyulaşır. Beslenme periyodu 11-14 gün sürer. Dört gün süren dışkılama sonucu larva büyüklüğü azalır. Bu duruma prepupal evre denir. Sonrasında kütikula sertleşir. Andrenid larvaları kokon örmez. Çoğu arı türü prepupa olarak, bazıları ise ergin olarak kışlar (Osytshnjuk ve ark., 2005).

Çoğu tür yılda sadece bir nesil verir. Her iki cinsiyete ait ergin arılar hücrede kışlar ve ertesi yıl yaklaşık benzer zamanlarda dışarı çıkar. Sonbahar türleri prepupa olarak kışlayabilir. Sadece birkaç türün yılda iki nesil verdiği bilinmektedir (Michener, 2007).

### Fenoloji

Uçuş sezonunun uzun ya da kısa olması bölgeye göre değişir. *Andrena* türleri konukçu bitkilerin çiçeklenmeye başlamasıyla, erken ilkbaharda görülmeye başlanır. Son türler ise ilk sonbahar kışından sonra ortadan kaybolur (Osytshnjuk ve ark., 2005). Çoğu tür erken ilkbahardan erken yazı kadar uçar. Sadece birkaç tür yaz aylarında ve hatta sonbaharda görülür. Bu istisnalardan biri olan Doğu Akdeniz türlerinden *A.grosella* yalnızca ekimden kasıma kadar aktiftir (Dubitzky, 2005). Her ne kadar bazı türler yılda iki döl verse de kum arılarının büyük bir kısmı yılda bir döl verir (univoltine). Özellikle erken ilkbahar türleri hücrelerinde ergin olarak kışlar ve takip eden yıl içinde dişi ve erkekler hemen hemen aynı zamanda çıkar (Michener, 2000). Buna rağmen *Andrena* türlerinin çoğu değişik mevsimlerde yaklaşık 2 ay gibi kısa bir uçuş dönemine sahiptir. Sonuç olarak, erken ilkbahar, ilkbahar-yaz, yaz ve geç yaz türleri ayırt edilebilir. Uçuş döneminin başlangıcı ve uzunluğu oldukça değişiklik gösterse de *Andrena* cinsi esas olarak ilkbahar türlerini içerir (Osytshnjuk ve ark., 2005).



## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

Aktif oldukları zaman ani olarak bulutların ortaya çıkışı güneş ışınlarının önünü kapatırsa bu arılar aktivitelerini durdurur ve çiçekler üzerinde dinlenirler. Rüzgarlı ve serin günlerde de bu arıların aktivitelerinin çok azaldığı bildirilmiştir (Özbek, 1975).

### Besin Tercihi

Diğer tüm arılar gibi kum arıları da evrimsel süreçte polen ve nektarla beslenmeye adapte olmuştur. Dişiler, sahip olduğu özel polen sepetleriyle (skopa) polenleri toplar ve taşır. Topladıklarını larva için besin rezervi haline getirir. Dişi, bir larva için kuluçka hücrelerine nektarla karıştırılmış 5-8 parça polen bırakır. Bunun için dişinin çok sayıda çiçeği ziyaret etmesi gerekir (Osytshnjuk ve ark., 2005).

Arılar, polen ve nektar toplarken çok sayıda yabancı ve kültür bitki türünde tozlaşmayı gerçekleştirerek döllenmeyi sağlar. Bu yolla yabancı döllenmeye gereksinim duyan bitki türlerinin soylarını devam ettirmelerini olanaklı kılar. Diğer taraftan, çok sayıda ekonomik açıdan önemli türün meyve ve tohum verimliliğini artırır. Bunlar arasında yem bitkileri, yağ bitkileri, sebzeler, meyve ağaçları ve çalılar bulunmaktadır (Osytshnjuk ve ark., 2005; Özbek, 2011).

Çoğu *Andrena* türü polilektiktir, farklı familyalara ait bitkileri ziyaret eder (Dubitzky, 2005). Kuzey Amerika'da *Andrena* türlerinin Asteraceae, Brassicaceae, Cornaceae, Cucurbitaceae, Ericaceae, Fabaceae, Hydrophyllaceae, Malvaceae, Onagraceae, Portulacaceae, Salicaceae ve Solanaceae familyasına ait bitkileri ziyaret ettiği bildirilmektedir (Larkin ve ark., 2008). Ülkemizde, *A.flavipes* Panzer, *A.labialis* (Kirby), *A.morio* Brullé ve *A.ovatula* (Kirby) gibi türlerin yonca, korunga, değişik meyve türleri ve ayçiçeğini ziyaret ettikleri belirtilmektedir (Özbek, 1976a, 1978, 1979a, 2008a, 2008b, 2011).

Oligolektik arılar tek bir bitki familyası veya cinsiyle ilişkilidir. Bu özelleşme genellikle ağız parçalarının uzaması ya da özelleşmiş polen toplama kıllarının gelişmesi gibi morfolojik adaptasyonlarla ilişkilidir (Dubitzky, 2005). *Andrena ovatula* (Kirby) (= *A.albofasciata*) Fabaceae çiçekleriyle ilişkilidir ve yonca bitkisinin önemli polinatörüdür (Özbek, 1976a; 2008a). *Andrena potentillae* Panzer, Rosaceae familyasıyla zorunlu ilişkilidir. Campanulaceae çiçeklerinin tozlaşmasını sağlayanlar arasında *A.curvungula* Thomson, *A.paucisquama* Noskiewicz, *A.pandellei*, *A.limata*

gibi türlerin bulunduğu belirtilmektedir (Osytshnjuk et al., 2005). Farklı araştırmacılar tarafından *A.asiatica* Friese'nin ülkemizde *Campanula* cinsi bitkilerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Özbek, 1976b; Schuberth et al., 2001) (Şekil 1).



Şekil 1. *Campanula* çiçeği üzerinde *Andrena asiatica* dişi (Aydın, Türkiye)

*Andrena* cinsi içinde çok az tür sınırlı oligolektiktir. Bunlar arasında yer alan *A.florea* Fabricius, *A.nasuta* Giraud, *A.stepposa* Osytshnjuk, *A.marginata* Fabricius, *A.hattorfiana* (Fabricius), *A.aberrans* Eversmann, *A.fuscipes* (Kirby) kendilerine özgü bitki cins ve türleriyle ilişkilidir (Osytshnjuk ve ark., 2005).

### Türkiye'deki Biyoçeşitliliği

Türkiye'de kum arılarıyla ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Buna rağmen yaklaşık 300 tür tanımlanmıştır (Warncke 1966, 1969, 1974, 1975; Özbek, 1976; Gusenleitner, 1998; Patiny, 1998; Gusenleitner ve Schwarz, 2000; Gusenleitner ve Schwarz, 2002; Grünwaldt ve ark., 2005; Dubitzky, 2006; Scheuchl and Hazir, 2008; Scheuchl and Gusenleitner, 2009; Hazir ve ark., 2012; Scheuchl ve Hazir, 2012). Türkiye'ye ait *Andrena* türlerinin birçoğu Klaus Warncke tarafından 1960 ve 1970'lerde tanımlanmıştır (Warncke 1966, 1969, 1974, 1975). Warncke, Türkiye'de şu an bilinen türlerin ve alt türlerin yaklaşık %50'sini tanımlamıştır. Bu nedenle Türkiye'ye ait kum arılarının büyük kısmının tip türleri Almanya Münih Zooloji müzesi ve Avusturya Linz Biyoloji müzesinde bulunmaktadır. Warncke, 1975 yılına ait makalesinde Türkiye'den 294 tür bildirmiştir. Fakat sıklıkla birbirine yakın grupları tek bir türün alttürleri olarak ele almıştır.



## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

Özbek (1975, 1976b) Doğu Anadolu bölgesinde yürüttüğü araştırmalarda *Andrena* cinsine ait 135 tür ve 31 alt tür saptamıştır. Hazır (2010) Türkiye genelinde yürüttüğü doktora tez çalışmasında *Andrena* cinsine ait 134 farklı tür ve 4 alt tür bildirmiştir. En fazla tür çeşitliliğini sırasıyla İç Anadolu, Ege ve Akdeniz bölgelerinde belirlemiştir.

Türkiye'deki en yaygın türler *A.truncatilabris*, *A.humilis*, *A.labialis*, *A.flavipes*, *A.lamiana*, *A.panurgimorpha* ve *A.fulvitaris* olarak bildirilmiştir. Kum arılarının genellikle ilkbaharda aktif olduğu, uçuş zamanının nisan-haziran ayları olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *A.bicolor* ve *A.thoracica* şubat-ağustos ayları aralığında rastlanan, en uzun uçuş süresine sahip türler olmuştur (Hazır ve ark., 2014).

Yazar ve arkadaşları tarafından 2010 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen proje kapsamında Üniversitenin Fen Edebiyat Fakültesinde Türkiye Yaban Arıları Müzesi (TUYAM) oluşturulmuş ve çok sayıda türün muhafazası ve envanteri sağlanmıştır (Şekil 2-10).



Şekil 2a. Türkiye Yaban Arıları Müzesinin genel görüntüsü



Şekil 2b. Müzedeki kum arısı örnekleri



Şekil 3. *Andrena albopunctata* (Rossi, 1792) (dişi)



Şekil 4. *Andrena crecca* Warncke, 1965 (dişi)



Şekil 5. *Andrena cypria* Pittioni, 1950 (dişi)

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE



Şekil 6. *Andrena danuvia* Stöckert, 1950 (dişi)



Şekil 9a. *Andrena hesperia* Smith, 1853 (dişi)



Şekil 7a. *Andrena flavipes* Panzer, 1799 (dişi)



Şekil 10a, b. *Andrena labialis* (Kirby, 1802) (erkek)



Şekil 8a. *Andrena fulvitorsis* Brullè, 1832 (erkek)



DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE



Şekil 11a, b. *Andrena laticeps* Morawitz, 1876 (erkek)



Şekil 12a, b. *Andrena limata* Smith, 1853 (dişi)



Şekil 13a, b. *Andrena morio* Brullè, 1832 (dişi)



a



b

Şekil 14a, b. *Andrena nobilis* Morawitz, 1874 (dişi)

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE



Şekil 15a, b. *Andrena orientana* Warncke, 1965 (dişi)



Şekil 17a, b. *Andrena scita* Eversmann, 1852 (dişi)



a



a



b

Şekil 16a, b. *Andrena schencki* Morawitz, 1866 (dişi)



b

Şekil 18a, b. *Andrena transitoria* Morawitz, 1871 (dişi)



## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE



Şekil 19. *Andrena truncatilabris* Morawitz, 1877 (dişi)



a



b

Şekil 20a, b. *Andrena wilhelmi* Schuberth, 1995 (dişi)

### SONUÇ

Arılar eklem bacaklılar arasında, insan kültürü ve mitolojisi ile tarım, ekonomi ve ekoloji içerisinde özel bir yere sahiptir (Engel, 2001). İnsanlık açısından arıların sağladığı en büyük yarar çiçekli bitkilerin tozlaşmasında rol oynamalarıdır (Michener, 2000). Kültürel bitkiler de dahil olmak üzere bitkilerin çeşitliliği eşeyli üremeye bağlı olduğundan polinatörler biyoçeşitlilik ve türlerin korunumu için vazgeçilmezdir. Dünyada kültür yapılan bitkilerin yaklaşık %73'ünün tozlaşması arılar aracılığıyla gerçekleşmektedir (FAO, 2004).

Çoğu zaman bal arılarının gölgesinde kalan, vasplarla karıştırılan yaban arıları ülkemizde fazlasıyla ihmal edilmiştir. Buna karşın çeşitli ülkelerde yaban arısı faunasının tespiti için geniş çapta çalışmalar yapılmış, birçok yaban arı türünün biyolojisi incelenmiş ve bu arılardan kültür bitkilerinin tozlaşmasında azami derecede yararlanma olanakları araştırılmıştır (Özbek, 1979b, 1979c, 1995a, 1995b, 2008a, 2008b). A.B.D. ve Avrupa'da değişik yaban arı türlerinin yetiştirilip, doğaya salıverme veya tarlaların yakınına yerleştirilerek tozlaşmanın sağlanması gibi çalışmalar sürdürülmektedir (Winfree, 2010).

Yakın zamanda yapılan çalışmalara göre Avrupa'da arı sayısı gittikçe azalmaktadır. Buna neden olan en önemli unsurlar olarak habitat kaybı, yoğun ve hatalı tarım uygulamaları (pestisit, gübre kullanımı gibi), kentleşme, artan yangınlar ve iklim değişiklikleri gösterilmektedir. Uluslararası Doğa Koruma Birliği (IUCN) tarafından Avrupa'da 1942 arı türünün durumu üzerine yapılan araştırmada 77 arı türünün tehdit altında olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında 9 *Andrena* türü bulunmaktadır. Bu türlerden 3'ü çok tehlikede, 4'ü tehlikede ve 2'si hassas tür kategorisinde listelenmiştir (Nieto ve ark., 2014).

Ülkemiz açısından da tarımda ve yabani hayatta bu denli önemli olan yaban arı faunasının saptanması, biyolojilerinin incelenmesi ve bunlardan daha fazla yararlanma olanaklarının araştırılması gerekmektedir (Özbek, 2002).

### KAYNAKLAR

Danforth, B.N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E.A.B., Michez, D. (2013). The impact of molecular data on our understanding of bee

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

- phylogeny and evolution. *Annu. Rev. Entomol.* 58:57-78.
- Dubitzky, A. (2005). Studies in Phylogeny and Biosystematics of Bees: The Bee Genus *Andrena* (Andrenidae) and the Tribe Anthophorini (Apidae) (Insecta: Hymenoptera: Apoidea). Ph.D. Thesis, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany.
- Dubitzky, A. (2006). New palearctic species of the bee genus *Andrena* (Insecta: Hymenoptera: Andrenidae). *Zootaxa* 1284: 1-27.
- Dubitzky, A., Plant, J., Schönitzer, K. (2010). Phylogeny of the bee genus *Andrena* Fabricius based on morphology (Hymenoptera: Andrenidae). *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 100: 137–202.
- Engel, M. S. (2001). A Monograph of The Baltic Amber Bees and Evolution of The Apoidea (Hymenoptera), *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 259, 1-192.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004, Conservation and Management of Pollinators for Sustainable Agriculture - The International Response. Solitary Bees Conservation, Rearing and Management for Pollination. Freitas, B.M. and Pereira, J.O.P.(eds.), A contribution to the International Workshop on Solitary Bees and Their Role in Pollination, Beberibe, Cear, Brazil, pp. 19-25.
- Grünwaldt, W., Osytshnjuk, A.Z., Scheuchl, E. (2005). Neue *Andrena*-Arten aus der Paläarktıs (Hymenoptera: Apidae: Andreninae). *Entomofauna* 26 (19): 349-368.
- Gusenleitner, F. (1998). Neue westpaläarktische *Andrena*-Arten (Hymenoptera: Apidae: Andreninae). *Entomofauna* 19 (6): 109–144.
- Gusenleitner, F., Schwarz, M. (2000). Nomenklatorische Aktualisierungen in der Bienengattung *Andrena* sowie Beschreibung einer neuen Art (Hymenoptera: Apidae: Andreninae). *Entomofauna* 21 (10): 105–116.
- Gusenleitner, F., Schwarz, M. (2002). Weltweite Checkliste der Bienengattung *Andrena* mit Bemerkungen und Ergänzungen zu paläarktischen Arten (Hymenoptera, Apidae, Andreninae, *Andrena*). *Entomofauna Supplement* 12, 1280pp.
- Hazır, C. (2010). *Andrena* Fabricius, 1775 (Hymenoptera: Andrenidae) Cinsi Arıların Türkiye'deki Biyolojik Çeşitliliğinin ve Yayılışının Belirlenmesi (Doktora Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Türkiye.
- Hazır, C., Keskin, N., Scheuchl, E. (2012). First record of four species of *Andrena* sandbees in Turkey (Hymenoptera: Apoidea: Andrenidae). *Zoology in the Middle East* 56:142-143.
- Hazır, C., Keskin, N., Scheuchl, E. (2014). Faunistic, Geographical and Biological Contributions to The Bee Genus *Andrena* (Hymenoptera, Andrenidae, Andreninae) from Turkey. *Journal of Hymenoptera Research* 38: 59-133.
- Larkin, L. L. (2004). Four New Species of Fall *Andrena* From The Southwestern United States, *Journal of the Kansas Entomological Society* 77 (3): 254-268.
- Larkin, L. L., Neff, J. L., Simpson, B. B. (2008). The Evolution of A Polen Diet: Host Choice and Diet Breadth Of *Andrena* bees (Hymenoptera: Andrenidae), *Apidologie* 39, 133-145.
- McGavin, G.C. (2001). Essential Entomology. An Order-by-Order Introduction. Oxford University Press, 310 p, New York, USA.
- Michener, C.D. (1974). The Social Behavior of The Bees, Harvard University Press, 404 p.
- Michener, C.D. (2000). The Bees of The World, Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, 913 p.
- Michener, C.D. (2007). The Bees of The World. 2nd edition. Johns Hopkins University Press, 953 p, Baltimore & London, UK.
- Neff, J.L., Larkin, L.L. (2002). *Andrena chaparralensis* New Species, A New Vernal Bee Associated with Asteraceae on the South Texas Plains (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae), *Journal of the Kansas Entomological Society* 75(4): 268-273.
- Nieto A., Roberts S. P. M., Kemp J., Rasmont P., Kuhlmann M., García Criado M., ve ark. (2014). European red list of bees. Publication Office of the European Union, Luxembourg.
- Osytsnjuk, A.Z., Romasenko, L., Banaszak, J., Cierzniak, T. (2005). Andreninae of the Central and Eastern Palaeartic Part 1.

## DERLEME MAKALESİ /REVIEW ARTICLE

- Polish Entomological Monographs, Vol. 2, Polish Entomological Society, 235 p, Ponzan, Bydgoszcz.
- Özbek, H. (1975). Erzurum çevresindeki *Andrena Fabricius* arıları üzerinde sistematik çalışmalar.76 pp. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, Türkiye.
- Özbek, H. (1976a). Pollinator bees on alfalfa in the Erzurum region of Turkey. *Journal Apicultural Research* 15 (34): 145-148.
- Özbek, H. (1976b). Doğu Anadolu bölgesi Andrenidae (Hymenoptera: Apoidea) familyası arıları kısım I. *Bitki Koruma Bülteni* 16 (3): 123-145.
- Özbek, H. (1978). Doğu Anadolunun bazı yörelerinde elma ağaçlarında tozlaşma yapan arılar (Hymenoptera: Apoidea ) *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 9 (4): 73.
- Özbek, H. (1979a). Erzurum civarında yonca (*Medicago sativa* L.) ve korunga (*Onobrychis sativa* L.)'daki polinatör arılar (Apoidea:Hym.) bunların faaliyetleri, meyve ve tohum bağlamaya etkileri. Atatürk Üniv. Yay. No. 516, Zir. Fak. Yay. No. 235, Araş. Serisi No. 152, Erzurum.
- Özbek, H. (1979b). *Chalicodoma parietina nestorea* Brulle (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae)'nin Tanımı ve Yuvası, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Dergisi* 10: 9-13.
- Özbek, H. (1979c). Doğu Anadolu Bölgesinin Bazı Yörelerinde Bulunan *Osmia*, *Lithurga* ve *Coelioxys* (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae) Türleri, *Türkiye Bitki Koruma Dergisi* 3: 47-58.
- Özbek, H. (1995a). Türkiye'de tehdit altında bulunan yabancı (Hymenoptera: Apoidea) türleri ve alınacak önlemler. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi 11-13 Eylül 1995, Ankara.
- Özbek, H. (1995b). Ziraat mücadelesinde ilaçlarının arılara etkileri. II.Ulusal Ziraat Mücadele İlaçları Sempozyumu, 18-20 Kasım 1996, Ankara, 140-148.
- Özbek, H. (2002). Arılar ve Doğa. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2002 (3): 22-25.
- Özbek, H. (2008a). Türkiye'de yonca bitkisini ziyaret eden arı türleri ve *Megachile rotundata* F. (Hymenoptera: Megachilidae), *Uludağ Arıcılık Dergisi* 8 (1):17-29.
- Özbek, H. (2008b). Türkiye'de ılıman iklim meyve türlerini ziyaret eden böcek türleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 8 (3): 94-105.
- Özbek, H. (2011). Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.): önemli bir arı bitkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 11(2):51-62.
- Patiny S. (1998). Description d'une nouvelle espèce turque de *Simandrena* Pérez, 1890 (Hymenoptera, Andrenidae, Andreninae). *Bembix* 10: 34-36.
- Radchenko, V.G., Pesenko, Y.U.A. (1994). Biology of Bees (Hymenoptera, Apoidea). Russian Academy of Sciences, Zoological Institute, St. Petisrsburg, 350 p.
- Scheuchl, E., Gusenleitner, F. (2009). *Andrena (Margandrena) elsei* nov.sp., eine neue türkische Sandbienenart (Hymenoptera, Apidae, Andreninae). *Linzer biol. Beitr.* 41 (1): 947-962.
- Scheuchl E., Hazir C. (2008). Description of a new *Andrena* species from Turkey, *Andrena (Notandrena) selcuki* n.sp. (Hymenoptera: Apoidea, Andrenidae). *Zootaxa* 1763: 63-66.
- Scheuchl E., Hazir C. (2012). Description of three new *Andrena* species (Hymenoptera: Apoidea, Andrenidae) from Turkey. *Florida Entomologist* 95 (4): 831-838.
- Schiestl, F.P., Ayasse, M., 2000, Post-mating Odor in Females of The Solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), Inhibits Male Mating Behavior, *Behaviour Ecology Sociobiology* 48: 303-307.
- Schuberth, J., Grünwaldt, W., Schönitzer, K. (2001). Klärung und Neubeschreibung der Sandbiene *Andrena asiatica* Friese, 1921 (Hymenoptera: Apidae, Andreninae). *Beitr. Ent.* 51: 65-71.
- Warncke, K. (1966). Beitrag zur Kenntnis der Bienengattung *Andrena* F. in der Türkei (Hymenoptera, Apoidea). *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*. 55: 244-273.
- Warncke, K. (1969). Bienen der Gattung *Andrena* F. aus der Türkei und dem Balkan (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae). *Bulletin des Recherches agronomiques de Gembloux*. 4 (2): 302-305.
- Warncke, K. (1974). Die Sandbienen der Türkei (Hymenoptera, Apoidea, *Andrena*), Teil A.

## DERLEME MAKALESI /REVIEW ARTICLE

*Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 64: 81-116.

Warncke, K. (1975). Die Sandbienen der Türkei (Hymenoptera, Apoidea, *Andrena*), Teil B. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*. 65: 29-102.

Winfree, R. (2010). The conservation and restoration of wild bees. In R Ostfeld and W Schlesinger, eds, *The Year in Ecology and Conservation Biology*. The New York Academy of Sciences: New York. Pp 169-197.

### EXTENDED ABSTRACT

Pollinators play an important functional role in most terrestrial ecosystems and provide a key ecosystem service. Being the main pollinators of angiosperm plants, the bees are an important component of the overwhelming majority of land ecosystems. They also play a significant role in agriculture by providing yield of entomophilous crops.

The bees of the genus *Andrena* Fab. commonly called sand bees, represent the largest genus of bees. Although sand bees are similar morphologically; 101 subgenera are currently recognized. To date it contains about 1500 valid species but estimated at about 2000 species. This is one of our most abundant genera of bees, both in species and individuals. The genus *Andrena* exhibits a widespread holarctic distribution ranging from North America south to Panama, as well as from Western Europe including northern Africa via Asia minor, Central Asia eastward to Korea, Japan and the Kamtschatka region.

All species burrow their nests into the ground, often preferring sunny exposed areas with sparse or bare vegetation and sandy ground. Sand bees are typically solitary, that is, each female constructs its

own nest. Some species show communal nesting behaviour often occurring in large aggregations. Most species produce only one generation per year; they mature and hibernate as adults in the brood cells, the two sexes emerging at more or less the same time the following year. Autumnal species may overwinter as prepupa. A few species produce two generations per year.

Many species of *Andrena* are polylectic and use pollen from more than a single plant family for the provision of their larvae. A typical nest-provisioning strategy of many solitary bees is to construct the nest, provision brood cells therein with a pollen loaf, and then add nectar to moisten the mass before depositing the egg. Sand bees fly from early spring until early summer and a few species occur in the summer or fall.

Faunistic studies of the sand bees of Turkey are limited. Nevertheless there have been nearly 300 species reported from Turkey. *Andrena truncatilabris*, *A. humilis*, *A. labialis*, *A. flavipes*, *A. lamiana*, *A. panurgimorpha* and *A. fulvitaris* are the most wide spread species in Turkey.

In recent years, research has demonstrated substantial declines in many species of bees. The main threat to bees is habitat loss as a result of agriculture intensification (using of pesticides, fertilisers), urban development, increased frequency of fires and climate change. Nine of the *Andrena* species are considered threatened at the European countries. According to IUCN European red list, 3 of the *Andrena* species are critically endangered; 4 are endangered and 2 are vulnerable in Europe.

Conserving wild bee populations is essential for sustaining agricultural production and wild life. So, more research is greatly needed of bee conservation, including population biology and taxonomy.