

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ÜLKEMİZDE GÜNEY MARMARA BÖLGESİ'NDEKİ BAL ARILARINDA *NOSEMA CERANAE*'NİN MİKROSKOBİK VE MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

Microscopic and Molecular Determination of *Nosema ceranae* in Honeybees in South Marmara Region of Turkey

(Extended abstract can be found at the end of the article)

Ayça ÖZKAN KOCA¹, Peiman AZARİ ZANJANI², İbrahim ÇAKMAK³,
Selvinar SEVEN ÇAKMAK², İrfan KANDEMİR²

¹Faculty of Fine Arts, Maltepe University, 34857 Maltepe-Istanbul, Turkey

²Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, 06100 Tandoğan-Ankara, Turkey

³Beekeeping Development-Application and Research Center (AGAM), Bursa, Turkey

Geliş Tarihi: 04.09.2016

Kabul Tarihi: 04.10.2016

ÖZ

Bu çalışmada Bursa ve Balıkesir çevresindeki kolonilerde mikroskopik olarak *Nosema* türlerinin varlığını belirlemek ve multipleks PCR yöntemi ile kolonilerin hangi *Nosema* türü (*N. ceranae* ve *N. apis*) ile enfekte olduğunu tespit etmek amaçlanmıştır. Mikroskopik inceleme sonucunda, 14 koloniden 11 tanesindeki (%78,6) bireylerde *Nosema* sporları bulunmuş ve taranan bireylerin *Nosema* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bu kolonilerden alınan örneklerde multipleks PCR metodu kullanılarak moleküler tanımlama ile *N. ceranae*'nin 16S rRNA gen bölgesini karakterize eden bantlar bulunmuştur. Çalışmada kolonilerin büyük çoğunluğunun *N. ceranae* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Apis mellifera*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, tanımlama, Bursa ve Balıkesir

ABSTRACT

This study was aimed to determine microscopically the presence of *Nosema* spp. in colonies collected from Bursa and Balıkesir provinces and to detect *N. ceranae* and *N. apis* using multiplex PCR method. In a result of microscopic examination, *Nosema* spp. spores were found in 11 out of 14 (78.6 %) colonies and screening individuals have been identified to be infected with *Nosema*. By molecular identification, the bands, characterized 16S rRNA gene region of *N. ceranae*, were found in samples taken from these colonies. The vast majority of the colonies in the study were determined to be infected with *N. ceranae*.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, identification, Bursa and Balıkesir

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

GİRİŞ

Nosemosis, Dünya çapında önemli arı kayıplarına neden olan en yaygın ergin bal arısı, *Apis mellifera* L., hastalıklarından birisidir (Higes vd., 2006; Paxton, 2010). Bu hastalığın ilk defa bir mikrosporidia olan *Nosema apis*, Zander tarafından ortaya çıkarıldığı bilinmektedir. 1994 yılında Doğu bal arılarında (*Apis cerana*, Fabricus) *N. apis*'e benzer bir mikrosporidia olan *Nosema ceranae*'yi Fries tanımlanmıştır (Fries vd., 1996). Bal arısı kolonilerinde *Nosema*'nın bulaştırılması, dışkı-ağız yolu ile olmaktadır. Konakçısı dışında sadece metabolitik olarak inaktif spor şeklinde bulunan her iki *Nosema* türü konakçısının hücreleri içerisinde gelişmektedir (Chen vd., 2010). *N. apis* enfeksiyonu ergin arıların ortabağırsak epiteli ile sınırlı iken *N. ceranae*'nin malpigi tüplerini, hipofaringeal bezleri ve tükürük bezlerini enfekte ettiği görülmektedir (Gisder vd., 2011). Hastalık sindirim sistemi bozukluklarına, arıların ömürlerinin kılmasına, uçuş bozukluklarına, koloninin sayıca azalmasına, dolaylı olarak bal ve polen toplamada düşüşe ve kış döneminde büyük koloni kayıplarına neden olmaktadır (Fries, 1997; Higes vd., 2006, 2007, 2008). *N. ceranae*, son yıllarda birçok etken ile birlikte "Koloni Çökme Sendromu" veya "Colony Collapse Disorder" (CCD) olarak adlandırılan koloni kayıplarının nedenlerinden biri olarak görülmektedir.

Yapılan çalışmalar ile *A. mellifera*'daparazitlenen *N. ceranae*'nin günümüzde *A. mellifera*'da hastalık etmeni olduğu bilinmektedir (Higes vd., 2006; Paxton, 2010; Vejsnaes et al., 2010). Yaygın olarak Afrika, Avrupa, Avustralya Kuzey Amerika ve Asya'da bulunmaktadır (Chauzat vd., 2007; Chen vd., 2009; Gierschet vd., 2009; Higes vd., 2009; Klee vd., 2007; Hernández vd., 2007; Paxton vd., 2007; Williams vd., 2008; Whitaker vd., 2011). *N. ceranae*'nin *N. apis*'den farklı olarak sadece ilkbahar ve sonbaharda değil sıcak yaz aylarında da etkili olabildiği görülmektedir. Bu durumda *N. ceranae*'nin hem sıcak ve hem de soğuk bölgelerde yaşayabilmesi ve *N. apis* ile rekabette daha baskın çıkması ve dolayısı ile arıları daha fazla olumsuz etkilediği rapor edilmektedir. Bu durumda koloni kayıplarının en önemli 3 patolojik nedenlerinden biri olarak *N. ceranae* kayıtlara geçmektedir (Paxton vd., 2007, Williams vd., 2014).

Türkiye'de *N. apis*'in varlığı ile ilgili tanımlama Aydın vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. 2010 ve 2011 yıllarında, *N. apis* ve *N.*

ceranae'nin Türkiye'deki bal arılarında bulunup bulunmadığı ile ilgili moleküler metotlar kullanılarak tanımlanması için çalışmalar yapılmıştır (Muz vd., 2010; Utuk vd., 2010, 2016; Whitaker vd., 2011). Whitaker vd. (2011), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı örnekler ile yaptığı çalışmada, farklı bölgelerdeki kolonilerde moleküler tanımlama ile her iki *Nosema* türünün bulunduğunu belirtmiştir. Utuk vd., (2016) moleküler tanımlama yoluyla Türkiye'de her iki türün varlığını ve *Nosema ceranae*'nin yaygın tür olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmanın amacı, Bursa ve Balıkesir çevresinden toplanan 14 koloniye ait örneklerde, mikroskopik tanımlama ile *Nosema* türlerinin varlığını belirlemek ve moleküler olarak multipleks PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile iki *Nosema* türü için 16S rRNA gen bölgelerinin spesifik primerler ile çoğaltılarak hangi türlerin bulunduğunu araştırmaktır.

MATERYAL METOT

Bu çalışma Bursa ve Balıkesir illerinden proje çalışması için 14 kolonide etkili bir varroa mücadelesi yapılmış olmasına, besleme ve koloni yönetimlerinin itina ile yapılmasına rağmen kolonilerin normal gelişim göstermediği için yapılmıştır. Bu yüzden bu çalışmada kolonilerde sorunun yeni nosema türü olabileceği düşünülerek bu çalışmanın yapılmasına karar verilmiştir. Çalışmada Bursa ve Balıkesir illerindeki 14 kovanda, ergin bal arısı örneklerinde *Nosema* sporları hemositometre kullanılarak mikroskopik olarak teşhis edilmiştir. *Nosema* sporları için pozitif çıkan örneklerde PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yapılarak *Nosema* türleri ayırt edilmiştir.

Örneklerin toplanması ve mikroskopik tanımlama:

Bal arısı örnekleri 2011 yılında (Ekim ayında) Bursa-Uludağ Üniversitesi ana kampüs alanındaki 14 kovandan alınmıştır. Araştırma öncesinde arı örnekleri %70'lik etil alkol içerisinde oda sıcaklığında saklanmıştır. Mikroskopik olarak inceleme işleminde, her bir arının abdomeni ilk olarak 500 µl su ile yumuşatılarak ezilmiş bu süspansiyonun üzerine 500 µl daha su eklenerek tekrar ezme işlemi yapılmıştır. Bu karışımdan alınan 10 µl sıvı ışık mikroskopunda 40X büyütmede incelenmiştir. Bu preparasyondaki

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sporların konsantrasyonu hemositometre üzerinde sayım ile hesaplanmıştır(Cantwell, 1970).

DNA izolasyonu ve moleküler tanımlama:

Mikroskobik inceleme sonrasında pozitif sonuç veren kovanlardan birer örneğe ait süspansiyondan 500 µl alınarak toplamda 10 örnekte PCR ile tür tayini yapılmıştır. DNA izolasyonu, mikroskopik incelemede pozitif sonuç veren süspansiyonlardan Doyle and Doyle (1991)'in CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) yöntemi

modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'ların saflıkları ve miktarları spektrometrik olarak Nanodrop (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ile belirlenmiştir. İzolasyon sonrası DNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Mikroskobik olarak görülen *Nosema* sporlarının hangi türe ait olduğunun moleküler tespiti amacıyla Hernández et al. (2007) tarafından belirtilen 16S rRNA gen bölgesi için spesifik primerler kullanılarak Multipleks PCR yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Multipleks PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer	Primerin DNA Dizisi (5'-3')	Tür	Ürün büyüklük-bç
218mitoc-For	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA	<i>N. ceranae</i>	218
218mitoc-Rev	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG		
321Apis-For	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA	<i>N. apis</i>	321
321-Apis-Rev	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACATG		

Multipleks PCR'da her örnek için 1 µl DNA, 1,25 µl 10X (NH₄)₂SO₄ içeren tampon (Fermentas), 0,75 µl MgCl₂ (25mM), 2 µl dNTP (100µM, 10µl her nükleotid), 0,5 µl primer ve 0,3 µl *Taq* DNA Polimeraz (5u/µl, 500U Fermentas) kullanılmıştır. Döngü koşulları belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir; 95° 2 dakika (ön denatürasyon), 95°C 1 dakika (denatürasyon), 50°C 1 dakika (bağlanma), 72°C 1 dakika (uzama), 35 siklus ve 72°C 5 dakika (son uzama). Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüş ve ürünler UV altında görüntülenmiştir. DNA bandları için büyüklük belirleyici olarak 100 bç'lik marker (Fermantas) kullanılmıştır. Jel üzerinde DNA band profillerine bakılarak hangi türe ait olduğu belirlenmiştir.

BULGULAR

Bursa ve Balıkesir illerinden alınan kolonilerden toplanan bal arısı örneklerinde yapılan mikroskobik

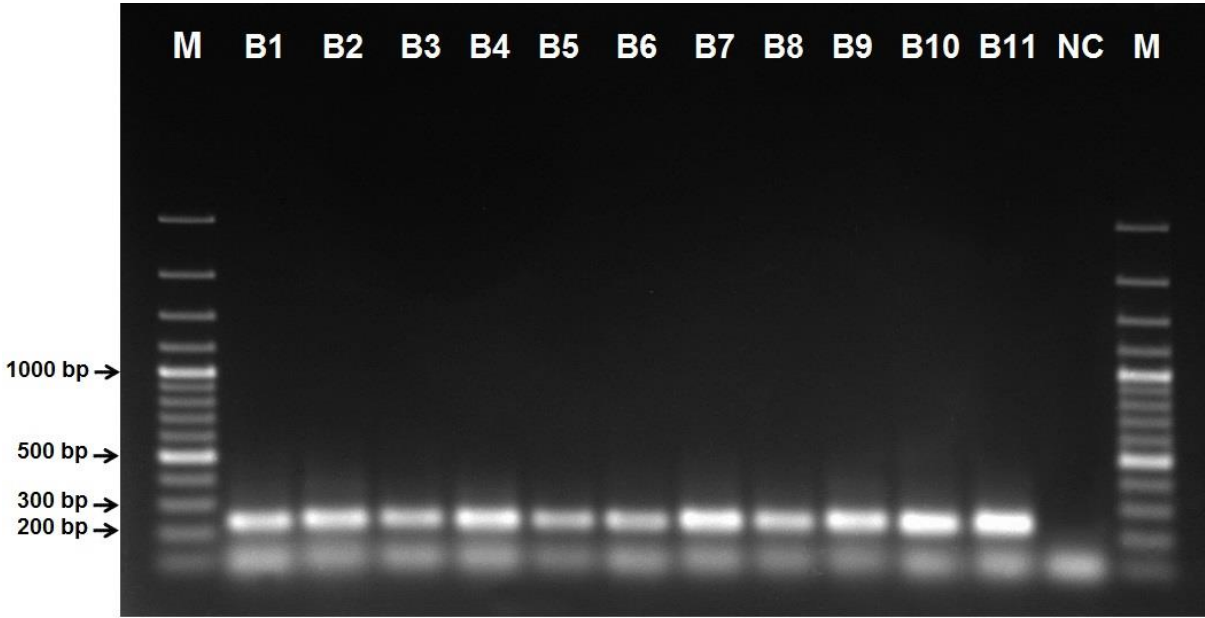
tanımlama ile örneklerin *Nosema* tarafından enfekte olup olmadıkları incelemiş ve moleküler tanımlama ile hangi *Nosema* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Mikroskobik inceleme sonucunda, toplamda taranan 14 kovandan 11 tanesindeki bireylerde *Nosema* sporları bulunmuş ve *Nosema* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Her bir kovandan incelenen 10 bireyden 1 ile 6 bireyde *Nosema* sporuna rastlanmıştır. Bunu yüzde olarak değerlendirildiğimizde 10 bireyde %10-60 arasında *Nosemosis* görülmüştür. On dört kovanda enfekte olan bireylerdeki ortalama spor sayısı 4.10^8 - $1,5 \times 10^7$ arasında değişmektedir (Tablo 2).

Mikroskobik inceleme sonucunda, *Nosema* sporları görülen bireylerde moleküler teşhis için multipleks PCR yapılarak agaroz jel üzerindeki band profillerine bakıldığında, tüm örneklerde *N. ceranae*'yi karakterize eden 218 bç'lik DNA bandı görülmüştür (Şekil 1). Moleküler tanımlama ile taranan kovanların hiçbirinde *N. apis*'i karakterize eden banda rastlanmamıştır.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 2. Her bir kovandaki 10 birey arasındaki Nosemosis'in yaygınlığı ve enfekte bireylerdeki toplam spor sayısı.

Kovan no	Enfekte birey sayısı	Enfeksiyon yüzdesi	Her bir enfekte bireylerdeki ortalama toplam spor sayısı
B1-49	2/10	20	$2,5 \times 10^8$
B2-ada	4/10	40	4×10^8
B3-72h	1/10	10	$1,5 \times 10^7$
B4-55	1/10	10	$1,5 \times 10^8$
B5-27a	2/10	20	$3,5 \times 10^8$
B6-27	6/10	60	4×10^8
B7-6	2/10	20	1×10^8
B8-73	1/10	10	3×10^7
B9-57	2/10	20	2×10^8
B10-73m	2/10	20	4×10^8
B11-6m	2/10	20	$4,5 \times 10^7$
B12-40	-/10	-	-
B13-64	-/10	-	-
B14-72	-/10	-	-



Şekil 1. Örneklerde *N. ceranae*'nin varlığını işaret eden 218 bç'lik DNA bandının jeldeki görüntüsü (M: Marker, 100bç DNA ladder, Fermentas, NC: Negatif kontrol).

TARTIŞMA

Türkiye'de Nosemosis üzerine yapılan mikroskopik çalışmalar Türkiye'de Nosemosis'in yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmadaki kovanlarda Nosemosis'in yaygınlığı %24,0–26,4 olarak bulunmuştur (Cakmak vd., 2003). Yaptığımız bu çalışma Bursa ve Balıkesir illerinden alınan

kolonilerde moleküler tanımlama ile *N. ceranae*'nin varlığını göstermiştir. Çalışmada kolonilerin büyük çoğunluğunun (%78,6) *N. ceranae* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın yanı sıra Muz vd. (2010)'un moleküler tanımlama yoluyla yaptığı araştırma Güneydoğu Marmara Bölgesi'ndeki kolonilerde %84 *N. ceranae*, %16 *N.apis* enfeksiyonun olduğunu göstermiştir. Aynı

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

yöntemi kullanarak Whitaker vd. (2011). Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki koloniler üzerine yaptıkları çalışmalarda moleküler tanımlama ile her iki *Nosema* türünün bulunduğunu belirtmiş, Bursa ilinden topladıkları kolonilerdeki örneklerde *Nosema*'ya rastlamamıştır. Utuk vd., (2016), moleküler tanımlama yoluyla Türkiye'de *N.ceranae*'nin yaygın tür olduğunu ve Bursa kolonilerinde *N.ceranae*'nin bulunduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak 2010-2011 yılları arasında Bursa ilindeki kolonilerin *N. ceranae* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Aydın vd. (2005), Türkiye'nin farklı bölgelerindeki kolonilerde *N.apis*'in varlığı ile ilgili yaptıkları çalışmada Marmara Bölgesi'nde *N. apis* ile enfekte olmuş koloniler olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada Bursa çevresindeki kolonilerden alınan örneklerde moleküler teşhis ile *N. apis*'e rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla bir uyum göstermektedir. Bursa-Balıkesir çevresindeki kolonilerde *N. ceranae*'nin bulunduğu tespit edilmiş ve bu *Nosema* türünün ülkemizde yaygın tür olduğunu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. İki farklı *Nosema* türünün semptomları birbirinden farklılık göstermekte olup mikroskopik olarak iki türün ayrımı zor olsa da moleküler yolla multiplaks PCR yöntemiyle iki tür kolaylıkla ayırt edilmektedir.

Nosemosis hem Türkiye'de hem de dünya'da önemli yaygın arı hastalıklarından birisi olup arıcılık üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar ve deneysel çalışmalar *N. ceranae*'nin dünya çapında arıcılık için ciddi bir tehdit olduğunu göstermektedir (Higes vd., 2006; 2007). Bunun en önemli nedeni, Nosemosis'e neden olan *N. ceranae*'nin Avrupa balarısı ile birlikte evrim sürecinin *N. apis*'e göre daha kısa bir sürece dayanması belirtilmektedir (Utuk vd., 2016). Bu kısa süreç, konak-parazit ilişkisi içinde fizyolojik adaptasyon mekanizmasının minimum etki göstermesine neden olabilmektedir. Sonuçta, kolonilerde koloni çöküşüne kadar uzanan olumsuz birçok etki görülmektedir (Paxton vd., 2010). *N. ceranae*'nin Türkiye bal arılarındaki patojenitesi hakkında bilinenler çok azdır. *N.ceranae*'nin bugüne kadar ülkemizdeki toplu arı ölümlerine neden olan birçok faktörden bir tanesi olması olasıdır.

N.apis ve özellikle daha büyük bir tehdit unsuru olan *N.ceranae* ile ilgili Türkiye'deki tüm bölgelerde, bu iki türü ayırt edici moleküler çalışmalar yapılarak her iki tür tarafından ortaya çıkan hastalığın

günümüzdeki durumu belirlenmelidir. Ancak bu çapta yapılacak kapsamlı bir çalışma ile *N. ceranae*'nin ülkemiz için ne derecede bir tehdit unsuru oluşturduğu anlaşılacaktır.

KAYNAKLAR

- Aydın, L., Cakmak, I., Gulegen, E., Wells, H. 2005. Honey bee *Nosema* disease in the Republic of Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 44: 196–197.
- Bailey, L. 1981. *Honey bee pathology*. Academic press, London, UK, 124 pp.
- Chauzat, M.-P., Higes, M., Martin-Hernandez, R., Meana, A., Cougoule, N., Faucon, J.P. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Apidologie*, 46(2): 127–128.
- Cakmak, I., Aydın, L., Gulegen, A.E. 2003. Güney Marmara Bölgesinde balarısı zararlıları ve hastalıkları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 1: 33–35.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 204-209.
- Chen, Y.P., Huang, Z.Y. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*, 41: 364-374.
- Cantwell, G.E. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*, 110: 222–223.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13-15.
- Fries, I.M., Feng, F., da Silva, A.J., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp.(Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32: 356–365.
- Fries, I. 1997. Protozoa. In: Morse, R.A., Flottum, K. (eds), *Honey bee pests, predators, diseases*. A I Root Company, USA. pp. 59–76.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M. 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40(2): 117–123.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology*, 13: 404-413.
- Hernández, R.M., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Bailon, E.G., Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6331-6338.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 93-95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94: 211-217
- Higes, M., Hernández, R.M., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659-2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., Meana, A. 2009. First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African Honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*, 48: 217-219.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R.J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 1-10.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E., Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6331-6338.
- Muz, M.N., Giriskin, A.O., Muz, D., Aydın, L. 2010. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection in Turkish apiaries with collapsed colonies. *Journal of Apicultural Research*, 49(4): 342.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38: 558-565.
- Paxton, R.J. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 49: 80-84.
- Utuk, A.E., Piskin, F.C., Girisgin, A.O., Selcuk O., Aydin, L. 2016. Microscopic and molecular detection of *Nosema* spp. in honeybees of Turkey. *Apidologie*, 47(2): 267-271.
- Utuk, A.E., Pişkin, F.Ç., Kurt, M. 2010. Türkiye'de *Nosema ceranae*'nin ilk moleküler tanısı. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 57: 275-278.
- Vejsnaes, F., Neilson, S.L., Kryger, P. 2010. Factors involved in the recent increase in colony loss in Denmark. *Journal of Apicultural Research*, 49: 109-110.
- Whitaker, J., Szalanski, A.L., Kence, M. 2011. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkey honey bees. *Apidologie*, 42(2): 174-180.
- Williams, G.R., Shafer, A.B.A., Rogers, R.E.L., Shutler, D., Stewart, D.T. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 189-192.
- Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-MacLellan, K.L., Rogers, R.E.L. 2014. *Infra-population and -community dynamics of the parasites Nosema apis and Nosema ceranae, and consequences for honey bee (Apis mellifera) hosts.* *PLoS One* 9, e99465.

EXTENDED ABSTRACT

Nosemosis is one of the most prevalent diseases of adult honeybees and constitutes significant economic losses to beekeepers worldwide. This disease is caused by two different *Nosema* spp. (*Nosema apis*, Zander and *Nosema ceranae*, Fries). In recent years, *N. ceranae*, especially is seen as one of the causes of colony losses along with many other factors or in combination.

In this study we aimed to determine microscopically the presence of *Nosema* spp. in colonies collected from Bursa and Balıkesir provinces and to detect *N. ceranae* and *N. apis* using multiplex PCR method. For this aim, adult honeybee samples were

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

collected from 14 colonies within Uludag University main campus area. Honeybee samples were stored in 70% (v/v) ethanol at room temperature prior to examination. In microscopically examination, the abdomens of each adult honeybee sample were macerated in 500 µl of distilled water. 500 µl of distilled water was added on this suspension and re-crushing operation was carried out. 10 ml of this mixture was placed on a slide under a cover slip and examined by light microscopy at ×40 magnification. The concentration of spores in this mixture were calculated by counting on a haemocytometer. In case of positivity for microscopic test, DNA isolation was performed by the CTAB method from suspension. Using a total of 10 honeybee samples from each hive, *Nosema* spp. were determined by multiplex PCR. In order to molecular identification, multiplex PCR was performed using primer pairs specific for 16S rRNA region. In a result of microscopic examination,

Nosema spores were found in 11 out of 14 (78.6%) colonies and screening individuals have been identified to be infected with *Nosema*. By molecular identification, the bands, characterized only *N. ceranae*, were found in samples taken from these colonies. The vast majority of the colonies in the study were determined to be infected with *N. ceranae*. The results obtained in this study indicate agreement with the earlier studies. This and previous studies have demonstrated that *N. ceranae* is common species in our country.

Nosemosis caused by two *Nosema* spp. is one of the most important and common bee diseases in Turkey as well as all over the world and has a negative impact on beekeeping. Especially, *N. ceranae* that causes the disease constitutes a serious threat to beekeeping. Therefore, molecular studies should be performed to distinguish two *Nosema* spp. in all regions in Turkey and current status of the disease must be determined.