

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Apis mellifera anatoliaca Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Juvenil
Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve
Varroa destructor Üzerine Etkisinin Araştırılması

Berkant İsmail YILDIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Apis mellifera anatoliaca Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Juvenil
Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve
Varroa destructor Üzerine Etkisinin Araştırılması

Berkant İsmail YILDIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Apis mellifera anatoliaca* Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Jüvenil
Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve
Varroa destructor Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Berkant İsmail YILDIZ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez, T.C. Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2022-6006
nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Apis mellifera anatoliaca* Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Juvenil
Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve
Varroa destructor Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Berkant İsmail YILDIZ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 13/07/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ
Prof. Dr. Fehmi GÜREL
Prof. Dr. Fulya ÖZDİL
Prof. Dr. Nuray ŞAHİNLER
Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

ÖZET

***Apis mellifera anatoliaca* Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Jüvenil Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve *Varroa destructor* Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Berkant İsmail YILDIZ

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Temmuz 2023; 83 sayfa

Yakın zamanda farklı ülkelerde gözlemlenen bal arısı koloni kayıpları gelecekte dünyanın ekolojik dengesini etkileyebilecek bir sorun olarak görülmektedir. Yüksek oranda koloni kaybına sebep olan *Varroa destructor*'a karşı birçok mücadele yöntemi uygulansa da bu akar hala bal arısı için en tehlikeli tehdittir. Bu nedenlerden dolayı bilim insanları ve arıcılar tarafından Varroa ile mücadelede alternatif ve kesin sonuç verecek çözüm yöntemi arayışı sürmektedir.

Varroa yüksek konukçu özgülüğü gösteren bir ektoparazitir. Bu akar erkek arı larvalarını işçi larvalarından, tarlacı arıları bakıcı arılardan ayırt edebilmektedir. Larva tercihinde feromonlar ve düşük yoğunluktaki diğer uçucu bileşiklerin rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, Varroa'nın konukçu tercihi altında yatan moleküler ilişki henüz çözülmemiş değildir.

Jüvenil hormon asit O-metiltransferaz (JHAMT), böceklerde Jüvenil hormon (JH) biyosentez yolağının son aşamasında JH asitlerini veya JH'lerin aktif olmayan öncüllerini aktif JH'lere dönüştüren bir enzimdir. Aynı zamanda feromon olarak davranabilen metil farnesoat üretiminden de sorumlu olması JHAMT geninin ifadesi ile Varroa'nın konukçu tercihi arasında bir ilişki olabileceği fikrini doğurmuştur. Bu fikre dayanarak bu tez porjesinde Varroa ile mücadelede sürdürülebilir yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için Muğla Arı Yetiştiricileri Birliği bünyesinde bulunan Anadolu bal arısı (*Apis mellifera anatoliaca*)'nın Muğla ekotipinde pedigri aile setleri oluşturularak CRISPR-Cas9 yöntemiyle iki generasyon JHAMT geni susturulmuş (knockout) mutant kraliçeler ve işçi arılar yetiştirilmiştir. Varroa'nın konukçu tercihi bakımından JHAMT geni susturulmuş mutant larvalar ile yabani tip kontrol larvaları *in vitro* ve *in vivo* şartlarda karşılaştırılmıştır. Hem *in vitro* ($p=0,002$) hem de *in vivo* ($p=0,037$) denemelerde Varroa'nın yüksek oranda mutant larvaları tercih etmemesi JHAMT geninin konukçu tercihi üzerindeki etkisini ortaya çıkartmıştır.

Başarıyla tamamlanan bu tez çalışmasında gen manipölasyonlarının hedeflenen sonuçları vermesi CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak Varroa akarına karşı yeni, etkili ve sürdürülebilir bir çözüm önerisi geliştirilmesini sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Bal arısı, CRISPR-Cas9, Jüvenil hormon asit O-metiltransferaz (JHAMT), Konukçu tercihi, *Varroa destructor*

JÜRİ: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Fehmi GÜREL

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Prof. Dr. Nuray ŞAHİNLER

Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR



ABSTRACT

Production of Juvenile Hormone Acid O-methyltransferase (JHAMT) Knockout Mutants Using CRISPR-Cas9 in *Apis mellifera anatoliaca* Honey Bee and Investigation of Its Effect on *Varroa destructor*

Berkant İsmail YILDIZ

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

July 2023; 83 pages

Honeybee colony losses, which have been observed in different countries recently, are seen as a problem that may affect the ecological balance of the world in the future. Although many methods of struggle are applied against *Varroa destructor*, which causes high colony loss, this mite is still the most dangerous threat to the honey bee. For these reasons, scientists and beekeepers continue to search for alternative and definitive solutions in the fight against *Varroa*.

Varroa is an ectoparasite with high host specificity. This mite can distinguish drone larvae from worker larvae, and forager bees from nurse bees. It is known that pheromones and other low-density volatile compounds play a role in larval preference. However, the molecular relationship underlying *Varroa*'s host preference is not yet resolved.

Juvenile hormone acid O-methyltransferase (JHAMT) is an enzyme that converts JH acids or inactive precursors of JHs to active JHs in the final step of the Juvenile hormone (JH) biosynthesis pathway in insects. The fact that it is also responsible to produce methyl farnesoate, which can act as a pheromone, has led to the idea that there may be a relationship between the expression of the JHAMT gene and the host preference of *Varroa*. Based on this idea, it is aimed to develop a new sustainable method in the fight against *Varroa* in this thesis project. In order to achieve this aim, pedigree family sets were created in Muğla ecotype of Anatolian honey bee (*Apis mellifera anatoliaca*) within the Muğla Beekeepers' Association, and two generations of knockout mutant queens and worker bees were raised by CRISPR-Cas9 method. In terms of host preference of *Varroa*, mutant larvae with JHAMT gene silenced and wild-type control larvae were compared *in vitro* and *in vivo*. The fact that *Varroa* did not prefer highly mutant larvae in both *in vitro* ($p=0.002$) and *in vivo* ($p=0.037$) trials revealed the effect of JHAMT gene on host preference.

The results obtained with gene manipulations in the study enabled the development of a new, effective and sustainable solution against the *Varroa* mite using CRISPR-Cas9 technology.

KEYWORDS: CRISPR-Cas9, Honey bee, Host preference, Juvenile hormone acid O-methyltransferase (JHAMT), *Varroa destructor*

COMMITTEE: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Fehmi GÜREL

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Prof. Dr. Nuray ŞAHİNLER

Assoc. Prof. Dr. Demir ÖZDEMİR



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, güncel moleküler tekniklerden biri olan CRISPR-Cas9 aracılığıyla *Apis mellifera anatoliaca* bal arısında juvenil hormon asit O-metiltransferaz (JHAMT) geni susturularak mutant işçi arılar elde edilerek *in vitro* ve *in vivo* koşullarda *Varroa destructor*'ın konukçu tercihi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

JHAMT geni susturulmuş mutant bireylerin *Varroa* tarafından konukçu olarak tercih edilmediği, dolayısıyla JHAMT geninin *Varroa* için atraktant etki gösterdiği *in vitro* ve *in vivo* testler sonucunda tespit edilmiştir. Böylece bal arılarının en büyük zararlısı olan *Varroa* akarına karşı yeni ve sürdürülebilir bir çözüm önerisi geliştirilmiştir.

Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Doktora Programı'ndaki eğitim sürem boyunca beni her zaman cesaretlendiren, bilgi ve tecrübesiyle tez fikrinin oluşturulmasından başarıyla sonuçlandırılmasına kadar desteğini esirgemeyen, yeri geldiğinde bir abi, bir baba veya bir arkadaş olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kemal KARABAĞ'a; tezimin arazi çalışmalarına destek veren ve tüm imkanlarından faydalanma olanağı sağlayan Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği'ne (MAYBİR); arazi ve suni tohumlama çalışmalarında çok büyük emeği geçen Hasan GÜREŞÇİ'ye; çalışmalarımda emeği geçen başta Emel TÜTEN SEVİM olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma; eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve her zaman yol gösterici olan Doç. Dr. Mehmet TORUN'a; manevi desteklerinden dolayı Elif Hale ASLAN'a; beni bugünlere getiren, hiçbir karşılık beklemeden maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez projemin gerçekleşmesi sürecini destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Bal Arısının Sınıflandırılması	3
2.2. Bal Arısı Biyolojisi ve Koloni Yapısı	4
2.3. Anadolu Arısı (<i>Apis mellifera anatoliaca</i>).....	5
2.4. <i>Varroa destructor</i>	6
2.4.1. Varroa'nın konukçu tercihi.....	8
2.5. Varroa ile Mücadele Yöntemleri.....	9
2.5.1. Kimyasal mücadele.....	10
2.5.2. Mekanik mücadele.....	10
2.5.3. Biyoteknolojik mücadele	10
2.5.4. Varroa'ya karşı davranışsal mücadele	11
2.6. Juvenil Hormon Asit O-Metiltransferaz (JHAMT).....	13
2.7. Programlanabilir Gen Düzenleme Teknikleri	15
2.7.1. ZFN (Çinko Parmak Nükleaz).....	16
2.7.2. TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz)	18
2.7.3. CRISPR (Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri)...20	
2.8. Lipozom Temelli RNP Transfeksiyonu	24
2.9. Programlanabilir Gen Düzenleme Teknikleri ve Etik.....	25
2.10. Bal Arılarında Yapılan Programlanabilir Gen Düzenleme Çalışmaları.....	26
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. sgRNA ve Cas9 Proteininin Hazırlanması	28
3.1.1. sgRNA'nın PCR ile <i>in vitro</i> transkripsiyonu.....	29
3.1.2. Transkribe edilen sgRNA'ların saflaştırılması	31
3.2. Tez Materyali Arıların Yetiştirilmesi	32

3.2.1. Spermilerin eldesi ve CRISPR-Cas9 sistemi ile transfeksiyonu	33
3.2.2. Ana arıların suni tohumlanması.....	34
3.2.3. CRISPR bireylerin yetiştirilmesi	35
3.3. Total DNA Ekstraksiyonu	37
3.4. Genotipleme Analizi.....	39
3.5. Varroa'nın Konukçu Tercih Testi	40
3.6. İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1. Genotipleme Analizi Bulguları	43
4.2. Varroa'nın Konukçu Tercih Testi Bulguları	56
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	63
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Apis mellifera anatoliaca* Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Jüvenil Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve *Varroa destructor* Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

13/07/2023

Berkant İsmail YILDIZ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
g	: Göreceli santrifüj kuvveti
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

Kısaltmalar

bç	: Baz Çifti
Cas9	: CRISPR İlişkili Protein 9
CRISPR	: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSB	: Çift Zincir Kırılması
dsDNA	: Çift zincirli DNA
GFP	: Yeşil Floresan Protein
gRNA	: Rehber RNA
HDR	: Homoloji Yönlendirmeli Onarım
HR	: Homolog Rekombinasyon
IVT	: <i>In vitro</i> Transkripsiyon

JH	: Jüvenil Hormon
JHA	: Jüvenil Hormon Asit
JHAMT	: Jüvenil Hormon Asit O-metiltransferaz
kb	: Kilobaz
KO	: Knockout
MF	: Metil Farnesoat
mRNA	: Haberci RNA
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
PAM	: Protospacer Bitişik Motif
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
RNP	: Ribonükleoprotein
SGMT	: Sperm Aracılı Gen Transferi
sgRNA	: Tek Zincirli Rehber RNA
STAGE	: Sperm Transfeksiyon Destekli Gen Düzenleme
TALEN	: Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleaz
Tm	: Erime Sıcaklığı
UTR	: Transle Edilmeyen Bölge
vd	: Ve Diğerleri
ZFN	: Çinko Parmak Nükleaz

Tezde ondalık ayırıcı olarak virgül (,) kullanılmıştır (Örn. “11,04”).

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir bal arısı kolonisini oluşturan bireyler (Anonim 2022a).....	4
Şekil 2.2. Anadolu arısının görünümü (Anonim 2022b)	6
Şekil 2.3. <i>Varroa destructor</i> ‘ın anatomik yapısı (Anonim 2022c).....	7
Şekil 2.4. Ektoparazit <i>Varroa</i> akarları (Anonim 2023).....	7
Şekil 2.5. Jüvenil hormon asit metiltransferaz biyosentez yolağı (Picard vd. 2021).....	14
Şekil 2.6. Çinko parmak nükleaz yapısı (Rahman vd. 2011).....	17
Şekil 2.7. Sol ve sağ TALEN kolları, DNA bağlanma alanını içeren tekrar değişken di-kalıntı (RVD) tarafından spesifik bir genomik DNA dizisine yönlendirilmektedir (Campbell vd. 2013)	19
Şekil 2.8. CRISPR sisteminin çalışma mekanizması (Razzaq ve Masood 2018).....	21
Şekil 2.9. lipozomlar aracılığıyla genetik materyalin hücreye iletilmesi (Carter ve Shieh 2015)	24
Şekil 3.1. Tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan çalışmaların grafiksel özeti	28
Şekil 3.2. NCBI kayıtlarından yararlanılarak JHAMT geni ekzon 5 bölgesi üzerinde bulunan 20 nükleotidlik hedef sekans (sarı renkli alan PAM sekansını belirtmektedir) ve kodladığı amino asitler	28
Şekil 3.3. Guide-it sgRNA <i>in vitro</i> Transcription Kit (Takarabio, Japonya) ile sgRNA’ların üretilmesi için gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarından görüntüler ...	29
Şekil 3.4. sgRNA ileri primeri kullanılarak elde edilen sgRNA şablonunun jel görüntüsü.....	30
Şekil 3.5. Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) İncirköy arılığı	33
Şekil 3.6. Erkek arılardan spermilerin toplanması ve CRISPR kompleksi ile muamele edilmesi	34
Şekil 3.7. Ana arının, suni tohumlama cihazında transfekte spermillerle tohumlanması .	35
Şekil 3.8. Tohumlanan numaralandırılmış ana arının ruşet kovanlara aktarımı	35
Şekil 3.9. Ana arı yüksüklerinde G1 ana arıların yetiştirilmesi.....	36
Şekil 3.10. CRISPR-Cas9 yöntemiyle JHAMT geni susturulmuş işçi arıların yetiştirilmesi.....	37
Şekil 3.11. Larvaların steril plastik çubuklar yardımıyla homojenizasyonu	38

Şekil 3.12. Erkek arı gözlerinden pens yardımıyla Varroa'ların toplanması.....	40
Şekil 3.13. Petri kutularında <i>in vitro</i> konukçu tercih testlerinin gerçekleştirilmesi.....	41
Şekil 3.14. a) Kontrol grubu petek gözlerinde Varroa sayımı b) Knockout mutant petek gözlerinde Varroa sayımı	41
Şekil 4.1. Proje materyalini oluşturan kraliçe arılar ve CRISPR-Cas9 uygulamalarının sonucu üretilen generasyonlar	43
Şekil 4.2. G1 generasyonu larvalardan izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü....	44
Şekil 4.3. G1 generasyonu larvaların JHAMT gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 4.4. G1 generasyonu kontrol grubu larvaların JHAMT geni DNA dizisi	45
Şekil 4.5. G1 generasyonu CRISPR-Cas9 uygulanmış ve gen düzenleme gerçekleşmemiş larvaların JHAMT geni DNA dizisi	45
Şekil 4.6. 751 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	46
Şekil 4.7. 811 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	47
Şekil 4.8. 827 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	47
Şekil 4.9. 874 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	48
Şekil 4.10. 939 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	49
Şekil 4.11. 1044 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi	49
Şekil 4.12. G2 generasyonu larvalardan izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü..	50
Şekil 4.13. G2 generasyonu larvaların JHAMT gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 4.14. G2 generasyonu kontrol grubu larvaların JHAMT geni DNA dizisi	51
Şekil 4.15. G2 generasyonu CRISPR-Cas9 uygulanmış ve gen düzenleme gerçekleşmemiş larvaların JHAMT geni DNA dizisi	51
Şekil 4.16. 827.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi ...	52
Şekil 4.17. 939.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi ...	53
Şekil 4.18. 1044.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi .	53
Şekil 4.19. Gen düzenleme çalışmaları sonucunda elde edilen kolonilerdeki gelişimin fenotipik sonuçları.....	55

Şekil 4.20. Varroa'nın <i>in vitro</i> konukçu tercihinin histogram grafiği	56
Şekil 4.21. Varroa'nın <i>in vivo</i> şartlardaki konukçu tercihinin boxplot grafiği	57



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>A. mellifera</i> 'nın sınıflandırılması Linnaeus (1758)	3
Çizelge 3.1. sgRNA template üretimi için kullanılan Takarabio'nun (Japonya) yönergelerine göre dizayn edilen ileri primer	29
Çizelge 3.2. sgRNA amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri	30
Çizelge 3.3. sgRNA şablonu amplifikasyonu için gereken PCR programı	30
Çizelge 3.4. sgRNA IVT için kullanılan PCR reaksiyonu bileşenleri	31
Çizelge 3.5. sgRNA IVT için gereken PCR programı	31
Çizelge 3.6. sgRNA inkübasyonu için gereken PCR programı	31
Çizelge 3.7. PCR için JHAMT genine özgü tasarlanan primerlerin tanımlayıcı bilgileri (https://chopchop.rc.fas.harvard.edu)	39
Çizelge 3.8. JHAMT geninin amplifikasyonu için gereken PCR reaksiyonu bileşenleri	39
Çizelge 3.9. JHAMT geninin amplifikasyonu için gereken PCR programı	39
Çizelge 4.1. Varroa konukçu tercih testi skorları	56
Çizelge 4.2. Varroa'nın petek gözü tercihi	57

1. GİRİŞ

Bal arısı (*Apis mellifera*), tozlayıcı olarak ekosistemin sağlıklı ve dengeli bir şekilde işleyişindeki rolüyle; bal, balmumu, polen, arı sütü ve propolis gibi değerli arı ürünlerini üretmesiyle en faydalı böcek türüdür. Ayrıca, haplodiploid üreme sistemi, sosyal bir böcek olarak popülasyon içerisinde iş bölümü göstermeleri, öğrenme ve hafıza çalışmaları bakımından bilimsel açıdan da önemli bir model organizmadır. Araştırmalara göre, 2005 yılı için Avrupa’da bal üretiminin ekonomik değeri 140 milyon euro iken, bal arılarının tozlaşma yoluyla bitkisel üretime katkısı bunun yaklaşık 100 katı (14,2 milyar euro) olarak tahmin edilmektedir. Dünya’da ise bal arısı tozlaşmasının ekonomik değeri 153 milyar euro olarak hesaplanmıştır (Moritz vd. 2010). Eldeki veriler doğrultusunda bal arılarının tozlaşma yoluyla ülkemizin tarımsal üretimine katkısının milyonlarca euro olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında, arıcılık faaliyetleriyle dünyada her yıl 1 milyon tonun üzerinde bal üretimi yapılmaktadır. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü verilerine göre Türkiye 7 milyonun üzerinde arılı kovan sayısı ile dünyada ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizin, sahip olduğu önemli bal arısı ırkları, zengin iklimsel çevresi ve bitki florası bakımından arıcılığa oldukça uygun olmasına rağmen verimlilik açısından alt sıralarda yer aldığı görülmektedir. Bu durum, arıcılıkta doğru koloni yönetiminin, hastalık ve zararlılarla mücadelenin yeterince yapılamadığını düşündürmektedir (Uygur ve Girişgin 2008; Muz vd. 2012). Bal arısı koloni kayıpları modern arıcılığın başlangıcından beri önemli bir sorun olmuştur (Underwood ve vanEngelsdorp 2007). Zayıf beslenme, ekto ve endoparazitlerin baskısı, bakteriyel ve viral hastalıklar ve sinerjistik pestisit etkileşimleri dahil olmak üzere koloni kayıplarına sebep olan birçok etken bulunmaktadır.

Parazitler ve patojenler arıcılık endüstrisini ve bir bütün olarak tarımı tehdit eden koloni kayıplarının altında yatan temel faktörlerdir. Bu parazitlerden en fazla koloni yıkıcı etkisi olan *Varroa destructor*’dur. *Varroa*, larvaların ve ergin bal arılarının yağ dokusundan ve hemolenfinden beslenen obligat bir ektoparazittir (Ramsey vd. 2019; Oldroyd 1999). *Varroa* akarları, arı larvalarını petek gözleri mühürlenmeden önce istila etmekte ve gelişmekte olan arı larvalarından beslenerek orada çoğalmaktadır. Peteklerden yetişkin arı çıkarken ona tutunan dişi akarlar da birlikte çıkmakta ve başka bir arıya ya da başka bir arı larvasına transfer olabilmektedir (Rosenkranz vd. 2010; Shimanuki vd. 1994). Uygun mücadele yöntemi kullanılmadığı takdirde *Varroa* ile enfekte olmuş koloni 2-3 yıl içerisinde çökmektedir (Boecking ve Genersch 2008; Rosenkranz vd. 2010).

Varroa’ya karşı mücadele mekanik araçlar, organik ve kimyasal ilaçlarla birlikte davranışsal birçok yöntem uygulanmaktadır. Diğer taraftan, arı ürünlerinde kalıntı bırakması nedeniyle insan sağlığını da tehdit etmesine rağmen *Varroa* akarına karşı organofosfat kaumafos, tau-fluvalinat, formamidin amitraz gibi kimyasalların kullanımı yaygındır ve *Varroa* bunlara karşı direnç geliştirebilmektedir (Pettis 2004; Maggi vd. 2010). Kimyasal ilaçların olumsuz yan etkilerinden dolayı *Varroa*’ya karşı dirençli genotiplerin geliştirilmesi gibi alternatif ve sürdürülebilir çözüm yollarının arayışı da sürmektedir (Rosenkranz vd. 2010). Ancak, arıcılığın en büyük sorunu haline gelen *Varroa*’ya karşı henüz istenilen çözüm sağlanamamıştır.

Varroa destructor, yüksek konukçu özgülüğü gösteren bir ektoparazittir (Xie vd. 2016). *Varroa*, erkek arı larvalarını işçi larvalarından, bakıcı arılardan tarlacı arıları ayırt edebilmektedir. *Varroa* akarları, kendilerine tarlacı ve bakıcı arı arasında seçenek sunulduğunda açıkça bakıcı arıları tercih etmektedir (Kraus 1993; Kuenen ve Calderone

1997; Del Piccolo vd. 2010). Varroa ile mücadelede, farklı bir bakış açısı olarak Varroa'nın konukçu tercih sebepleri ve mekanizmasının aydınlatılması sayesinde arzu edilen etkin ve sürdürülebilir yöntemlerin geliştirilebileceği düşünülmektedir. Bu konuda mevcut sadece birkaç çalışma bulunmakla birlikte elde edilen biyokimyasal ipuçları çözüm noktasında önemli bir potansiyel olduğunu göstermektedir. Konukçu tercihi, hem kütikular hidrokarbonlar gibi düşük uçuculuktaki bileşiklere hem de bal arıları tarafından yayılan uçucu bileşikler olan feromonlara dayanmaktadır (Eliash vd. 2014). İletişimlerinin en büyük kısmını feromonlarla sağlayan bu sosyal böcekler, kovandaki hiyerarşik ilişkileri de yine bu kimyasallarla belirlemektedir (Bortolotti ve Costa 2014).

Bu bilgiler, bal arılarında feromon olarak davranabilen uçucu bileşik metil farnesoat (MF) üretiminde görevli ve juvenil hormon yolağının son aşamasında bulunan juvenil hormon (JH) asit O-metiltransferaz'ın (JHAMT) Varroa'nın konukçu tercihinde etkili bir dinamik olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bal arısı juvenil hormon yolağının Varroa'nın üreme döngüsünü başlatmada önemli bir rol oynadığı fikri (Aurori vd. 2021), konukçu seçimi için etkili olabilecek diğer bir unsur niteliği taşımaktadır. JHAMT, böceklerde JH biyosentez yolağının son aşamasında JH asitlerini veya JH'lerin aktif olmayan öncüllerini aktif JH'lere dönüştüren bir enzimdir (Shinoda ve Itoyama 2003). JHAMT, metil farnesoat epoksidaz (MFE) tarafından JH'ye dönüştürülen metil farnesoat (MF) üretmek için S-adenozil-L-metiyoninden farnesoik asitlerin karboksil grubuna bir metil grubu aktarmaktadır (Niwa vd. 2008; Bomtorin vd. 2014). Ayrıca, daha yüksek JHAMT ifadesinin ise Varroa'yı gözlemlere çekebileceği de bildirilmiştir (Aurori vd. 2021).

Moleküler yöntemlerin Varroa ile mücadeleye uyarlanması ve genom mühendisliği potansiyelinin bu alanda kullanılması büyük önem taşımaktadır. Son zamanlarda bal arılarında kullanılan en güncel moleküler yöntem CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated nuclease 9: düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri-CRISPR ilişkili nükleaz 9) aracılığıyla genom düzenleme teknolojisidir. CRISPR-Cas9 sistemi, Cas9 nükleaz ve özelleştirilebilir tek rehberli RNA'dan (sgRNA) oluşan RNA aracılı bir DNA endonükleaz sistemidir. sgRNA, bir protospacer bitişik motifinden (PAM: Protospacer Adjacent Motif) hemen önce bir hedef diziye tamamlayıcı bir 18-20 nükleotid dizisini içerecek şekilde programlanabilmektedir (Tian vd. 2017). sgRNA tarafından yönlendirilen Cas9-sgRNA kompleksi, genom boyunca hedefi arayıp ve PAM bölgesinin yaklaşık 3 bç yukarısında küt uçlu çift iplikli kırılma yaratmaktadır (Jinek vd. 2012). Takip eden DNA onarımı, homolog olmayan uç birleştirme veya homolog rekombinasyona dayalı onarım (Symington ve Gautier 2011), hedef genin susturulması (knockout) veya istenen mutasyonun eklenmesi ile sonuçlanmaktadır.

Yukarıda özetlenen bilgiler ışığında şekillenen ve tamamlanan bu tez çalışmasında, CRISPR-Cas9 teknolojisi aracılığıyla Muğla ekotipi işçi arılarında işçilerinde JHAMT geni susturularak (knockout) Varroa ile bal arısı arasındaki moleküler ilişki aydınlatılmaya çalışılmış ve böylece, Varroa'ya karşı mücadelede CRISPR-Cas9 aracılığıyla yeni bir çözüm önerisi geliştirilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Bal Arısının Sınıflandırılması

Kehribar içerisinde bulunmuş, bilinen en eski Apini fosili örnekleri 40 milyon yıl önceye dayanmaktadır. Modern bal arıları (Apidae: Apini), beş tür içeren *Apis* cinsinde sınıflandırılmaktadır. Bu türler; *Apis mellifera* (Avrupa bal arısı), *Apis dorsata* ve *Apis Laboriosa* (dev bal arısı), *Apis cerana* (Hint bal arısı) ve *Apis florea*'dır (cüce bal arısı) (Winston 1991).

Üretkenliğinin yüksek, koloni yönetiminin kolay olması nedeniyle dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan ve bal ihtiyacının büyük çoğunluğunu karşılayan tür *A. mellifera*'dır (Crane 1999). *A. mellifera*, taksonomik sınıflandırmaya göre; hayvanlar (animalia) aleminin eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesi'nin zarkanatlılar (hymenoptera) takımında ve arılar (apidea) familyası içerisinde yer almaktadır (Çizelge 2.1).

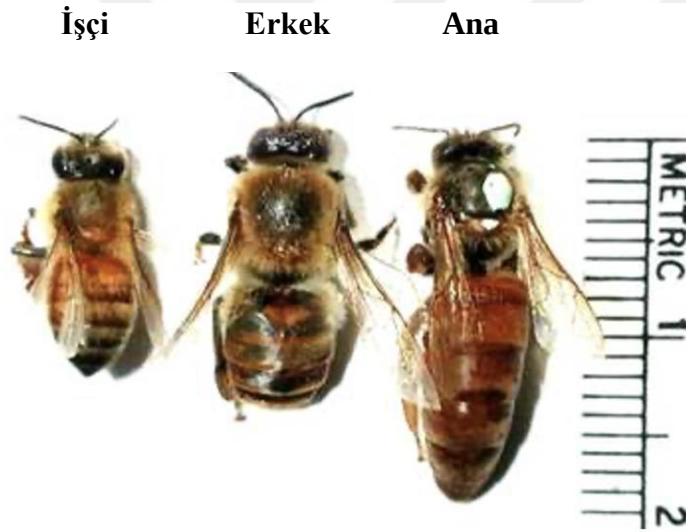
Çizelge 2.1. *A. mellifera*'nın sınıflandırılması Linnaeus (1758)

Alem:	Animalia
Şube:	Arthropoda
Alt Şube:	Hexapoda
Sınıf:	Insecta
Alt Sınıf:	Pterygota
Üst Takım:	Holometabola
Takım:	Hymenoptera
Alt Takım:	Apocrita
Üst Familya:	Apoidea
Familya:	Apidae
Alt Familya:	Apinae
Oymak/Tribü:	Apini
Cins:	<i>Apis</i> Linnaeus, 1758
Tür:	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758

A. mellifera'nın kökeni hakkında yapılan ilk çalışmalar (Whitfield vd. 2006) Afrika kökenli olduğunu bildirmiş fakat Kotthoff vd. (2013) hem fosilleri hem de günümüzdeki tür dağılımı kullanılarak Avrupa kökenli olduğu ve sonradan Afrika'ya göç ettiği sonucuna varmışlardır. Bugün ise arıcılık faaliyetleri nedeniyle bal arısı kutuplar hariç tüm dünyaya yayılmıştır. *Apis mellifera*'nın farklı coğrafyalar boyunca dağılması ve farklılaşmasıyla çok sayıda coğrafi ırk meydana gelmiştir. *A. mellifera* bilinen 30'dan fazla alt türe sahiptir (Bouga vd. 2011; Engel 1999; Raina vd. 2011). Bunlara 2016 yılında bir yenisi eklenmiştir (Chen vd. 2016). Ülkemiz; zengin bitki örtüsü, iklim ve topografik yapı çeşitliliği gibi koşullar nedeniyle arı ve arıcılık için son derece önemli bir potansiyel taşımaktadır. Ülkemizin sahip olduğu bu ekolojik çeşitlilik sayesinde, *A. mellifera*'nın farklı ırklarına ve bu ırkların da farklı genetik yapıdaki ekotiplerine rastlamak mümkündür. Türkiye'de en yaygın bal arısı ırkı ise *Apis mellifera anatoliaca*'dır.

2.2. Bal Arısı Biyolojisi ve Koloni Yapısı

Bir bal arısı kolonisini benzersiz görevleri bulunan; ana arı (kraliçe), işçi arılar ve erkek arılar (dron) oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Kolonide mevsimine göre değişmekle birlikte bir adet ana arı, 20-60 bin adet işçi arı ve birkaç yüz adet erkek arı bulunmaktadır (Bailey ve Ball 1991).



Şekil 2.1. Bir bal arısı kolonisini oluşturan bireyler (Anonim 2022a)

Neredeyse tüm böceklerde olduğu gibi arılarda da yaşam döngüsü yumurta ile başlamakta, larva, pre-pupa, pupa ve ergin olarak devam etmektedir. Ana arının yumurtadan ergin döneme kadar ki olan gelişme süresi 16 gündür (Page Jr ve Peng 2001). Dişi larvanın ana arı mı yoksa işçi arı mı olacağı, besin miktarı ve kalitesi ile belirlenmektedir. İlk 3 gün ana arı ve işçi arı larvaları aynı şekilde beslenirken ana arı larvaları ömürlerinin sonuna kadar arı sütü ile beslenmektedir. Kovan içerisinde kastaşmayı belirleyen diğer bir etken de petek gözünün büyüklüğüdür. Bir ana arı gözü, işçi gözlerinden çok daha büyüktür (Winston 1991). Ergin ana arı yaklaşık 178-292 mg ağırlığındadır. Ana arı çevresinde sürekli olarak bulunan genç bakıcı işçi arılar kraliçenin beslenmesi, temizlenmesi ve yumurtlama performansını takibinden sorumludur (Winston

1991). Koloninin devamlılığı için hayati bir görev yerine getiren ana arı bal arısı türünde yumurtlamadan sorumlu ve aktif üreyen tek dişi arıdır. Genç kraliçe arılar normal şartlar altında petek gözünden çıktıktan bir hafta sonra yaklaşık olarak 7-17 erkek arı ile havada çiftleşmekte ve yumurtalarını dölemek için sperm kesesine (spermateka) doldurduğu erkek arıların spermlerini kullanmaktadır. Oogenez, çiftleşmeden 3-7 gün sonra gerçekleşmektedir (Page Jr ve Peng 2001). Yumurtlama sırasında sperm ile döllenmiş yumurtalardan işçi arılar oluşurken, döllenmemiş yumurtalardan ise erkek arılar meydana gelmektedir (Robinson 1992). Bir günde yaklaşık olarak 2000 yumurta üreten sağlıklı bir ana arı güçlü feromonları sayesinde kovan düzenini sağlayarak işçi arıların görevlerini yerine getirmesinde etkin rol oynamaktadır. Bu sebeple ana arı kovan içerisinde bal arısı yaşamını bir arada tutan adeta sosyal bir birleştirici rol oynamaktadır (Winston 1991). Ana arı genellikle 2-5 yıl yaşarken, işçi arılar yazın 20-40 gün, kışın ise 6-8 aya kadar yaşamaktadır (Amdam 2011; Maurizio ve Hodges 1950; Rueppell vd. 2007; Visscher ve Dukas 1997).

İşçi arılar, dölsüz yumurtlama yeteneğine sahip olmalarına rağmen üremeyen koloni üyeleridir (Ratnieks 1995; Oldroyd ve Ratnieks 2000; Halling vd. 2001). Bir işçi arının yumurtadan ergine dönüşmesi 21 gün sürmektedir ve ergin bir işçi yaklaşık 81-151 mg ağırlığındadır (Page Jr ve Peng 2001). İşçi arıların kolonideki görevleri yaşlarıyla ilgilidir. Pupa döneminden sonraki ilk üç haftada işçiler zamanlarını temizlik, bakıcılık, arı sütü salgılama, petek örme, balın olgunlaştırılması ve kovan bekçiliği gibi görevleriyle kovanı geçirmektedir (Lindauer 1961). Aynı zamanda bu dönemde ana arının beslenmesi veya tımarlanması da sorumludur. Yaşamının son evrelerinde (3-6 hafta) bir işçi arı tarlacılık olarak adlandırılan dışarıda besin toplama (polen, propolis, nektar, salgı ve su) görevlerini yerine getirmektedir (Seeley 1991). Aynı zamanda kovan içi sıcaklığının da belirli aralıklarda kalmasını sağlarlar.

Erkek arılar yumurtadan ergine dönüşmek için 24 güne ihtiyaç duymaktadır (Page Jr ve Peng 2001). Dölsüz yumurtadan gelişen erkek arılar, ergin dönemde yaklaşık olarak 196-225 mg ağırlığında ve ana arılarla aynı boyutta, işçilerden ise iki kat daha büyüktür. Erkek arılarda iğne ve zehir bezi bulunmamaktadır. İşçi arılar tarafından bakılmakta ve beslenmekte olan (Winston 1991) erkek arıların asıl görevi çiftleşme uçuşuna çıkan genç kraliçeleri dölemek olsa da ihtiyaç halinde tarlacılık yapmakta ve kovana su taşımaktadırlar. Erkek arıların ömürleri 20-40 gün arasında olmakla birlikte çiftleştikten sonra endophallusu kırılarak ölmekte ya da kış mevsiminden önce koloniden işçi arılar tarafından uzaklaştırılmaktadır (Page Jr ve Peng 2001).

2.3. Anadolu Arısı (*Apis mellifera anatoliaca*)

Avrupa ve Asya kıtası arasında doğal bir köprü görevi gören ve birçok önemli bal arısı alt türüne ev sahipliği yapmak durumunda olan Anadolu'da en yaygın arı ırkı *A.m. anatoliaca* 'dır. Anadolu arısı, İç Anadolu, Ege ve Akdeniz ile Karadeniz Bölgesi'nin büyük bir bölümünde yayılım gösteren ülkemize özgü bir arı ırkıdır (Koca ve Kandemir 2013). Anadolu arısı Maa (1953) tarafından *A.m. Anatoliaca* adıyla sınıflandırılmıştır. Kirli-sarı renkte bir arı ırkı olan Anadolu arısı (Şekil 2.2) skutellum ve karın tergiti siyah, tomentum geniş, tibia ve metatarsus geniş, ön kanat uzunluğu 10 mm kadardır. Morfolojik olarak İtalyan arısına benzetilse de İtalyan arısından daha büyüktür; abdomeni ve metatarsusu daha geniş, ön kanatlar daha ince, kanatlar ve bacaklar vücuduna göre daha kısadır. Skutellum donuk, koyu turuncudur, kanat damarlarında ve damar

açıklıklarında İtalyan arısına göre farklılıklar olmasıyla birlikte kübital indeks değeri daha düşüktür (Adam 1983; Genç 1996).



Şekil 2.2. Anadolu arısının görünümü (Anonim 2022b)

Anadolu arısı, olumsuz iklim şartlarına dayanıklılık, yön bulma, yiyecek toplama ve yüksek kışlama yeteneği, düşük yağmacılık eğilimi, ana arı ve işçi arılarda uzun yaşam süresi gibi ayrı ayrı ırklarda görülebilecek özellikleri bir arada bulunduran ve ıslah programlarında çeşitli özelliklerin elde edilmesinde rol oynayacak oldukça değerli bir ırktır (Adam 1987).

Anadolu’da en yaygın bal arısı grubu olan *A.m. anatoliaca*, farklı morfolojik ve davranışsal özelliklere sahip bir dizi ekotip de içermektedir. Anadolu arısı ekotiplerinin içerisinde üreme yeteneği ve bal üretimi en fazla olan ekotip, İzmir’den Antalya’ya uzanan sahil kesiminde bulunan Muğla bal arısıdır (Gençer ve Karacaoğlu 2003).

2.4. *Varroa destructor*

Apis mellifera’daki en önemli zararlı olan *Varroa destructor*, 2000 yılına kadar *Varroa jacobsoni* olarak bilinmekteydi ancak bu tarihten sonra yapılan moleküler genetik çalışmalarla *Varroa destructor* adıyla, Arthropoda filumu, Parasitiformes takımı, Varroidae ailesi, *Varroa* cinsi içinde farklı bir tür olarak sınıflandırılmıştır (Anderson ve Trueman 2000). Erkek bireyler beyaz, dişiler ise kırmızımsı kahverengi renklidir. *Varroa* morfolojik olarak disk şeklinde 1-1,1 mm uzunluğunda, 1,5-2 mm genişliğinde ve sekiz bacaklıdır. Büyük bir kalkan şeklinde sırt kabuğuna, ağzı içeren gnathosoma adı verilen bir ön bölgeye sahiptir ve vücutları neredeyse tamamen mekanoreseptif işlevlere sahip kıllarla kaplıdır (Jack ve Ellis 2021) (Şekil 2.3-2.4). *Varroa*, ön iki bacağını, böceklerin antenlerini kullandığı gibi kullanmaktadır (Rickli vd. 1992). Bu bacaklar hareket için nadiren kullanılmaktadır ve genellikle yukarı doğru konumlanmış durumdadır. *Varroa*’nın en önemli duyuşal modlarının, koku alma ve tatma olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle *Varroa* konukçu tercihi ile ilgili yapılan araştırmaların büyük bir kısmı bu konulara odaklanmaktadır (Dillier vd. 2006). Benzaldehit, salisilaldehit ve metilsalisilat gibi sentetik uçucular, koku alma reseptör hücrelerinin ateşleme hızında bir artışa neden olmaktadır (Endris ve Baker 1993; Blumer-Meyre vd. 1998; Dillier vd. 2001). Benzaldehit, arı sütünde ve yetişkin erkek arılarda bulunan bir uçucu olarak bilinmektedir (Dillier vd. 2002a), ayrıca benzaldehit ile metilsalisilat polen, çiçek ve balın bileşenleri

arasında da bulunmaktadır (Maga 1983).



Şekil 2.3. *Varroa destructor* 'ın anatomik yapısı (Anonim 2022c)



Şekil 2.4. Ektoparazit Varroa akarları (Anonim 2023)

Son 70 yılda, Varroa akarı tüm dünya çapında yayılarak çok sayıda bal arısı kolonisinin çökmesine neden olmuştur (Rosenkranz vd. 2010). *V. destructor* bal arısı larva ve erginlerinde varroosise neden olmaktadır (Boecking ve Genersch 2008). Larva ve ergin bal arısının yağ dokusu ve hemolenfi ile beslenerek, bağışıklık sistemini zayıflatmakta, morfolojik deformasyonlara neden olmakta ve işçilerde ömrü kısaltmaktadır (Ramsey 2019). Aynı zamanda önemli arı virüslerine de vektörlük etmektedir (Gisder vd. 2009; Rosenkranz vd. 2010).

Varroa akarları, kapalı petek gözlerinde gelişmekte olan larvalarda beslenirken burada çoğalmaktadır. Petek gözü, işçi arılar tarafından sırlanmadan önce, gözler içerisinde bulunan arı larvaları tarafından salınan feromonlar ile göz içerisine çekilmektedir (Le Conte vd. 1989). Erkek arı gözleri, işçi gözlerinden daha uzun süre kapalı kalmasından dolayı dişi akarlar erkek arı gözlerini tercih etmektedir (Palmer 2019). Anne akarlar ya da "kurucular", erkek arı gözlerine girdikten sonra arılar erginliğe ulaşp gözden çıkmadan, 30 saatlik aralıklarla bir erkek ve birkaç dişi yumurta bırakmaktadır (Ratti vd. 2013). Yumurtadan ilk önce erkek akar çıkmaktadır ve erkek akar yetişkin kız kardeşleri ile çiftleşerek tek görevi olan üremeyi yerine getirmektedir (Shimanuki vd. 1992). Üreme, erkeğin keliserinin bir parçası olan spermatodaktil denen kanül benzeri bir

yapı aracılığıyla gerçekleşmektedir (Evans 1992). Erkek akarların ağız yapıları beslenmek için uygun olmadığından çiftleşmenin ardından ölmektedir. Anne akar ve çiftleşen kızları ise ergin arı gözden çıktığında gözü terk etmektedir (Fries vd. 1994). Çiftleşen Varroa'lar yaklaşık 2 hafta sonra yeni gözlerle yumurtlamaya başlamaktadır.

2.4.1. Varroa'nın konukçu tercihi

Bal arısı ektoparaziti *V. destructor*, Doğu Asya orijinlidir ve 20. yüzyılın ortalarında tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır. Varroa orijinal konakçısı Doğu bal arısı *Apis cerana*'dan Batı bal arısına (*A. mellifera*), nispeten yeni geçiş yapması nedeniyle dengeli bir konak-parazit ilişkisi eksiktir ve arıcıların uzun vadeli deneyimleri mevcut değildir.

Davranışsal gözlemler; foretik akarların, larvaların arkasına saklandıkları konukçu gözleri istila etmeden önce, çoğu zaman konukçu arının sternitleri altında korunaklı bir konumda bulunduklarını göstermektedir. Bundan dolayı, Varroa akarları, yalnızca işçi arılar onları uygun bir göze mümkün olduğunca yaklaştırdığında işçi veya erkek arı gözlerini istila edebilmektedir (Boot vd. 1994a). Varroa'ların, *A. mellifera* gözlerini istilasını, şeffaf bir arka duvara sahip olan gözlem kovanı kullanılarak peteklerin videoya kaydedilmesiyle incelenmiştir (Boot vd. 1990, 1992a, 1992b, 1994a, 1995a; Beetsma vd. 1999). Akarların, arılar üzerinden gözlerin kenarına kadar hareket ederek hızla içeriye yürüdükleri, larva ile göz duvarı arasında ilerleyerek gözün dibine indikleri ve besin içerisinde saklandıkları video kayıtlarında tespit edilmiştir (de Jong vd. 1982; Ifantidis 1988; Rath 1991; Boot vd. 1992a; Donzé ve Guerin 1997). Varroa akarlarının bakıcı arılardan üreme amacıyla bal arısı gözlerine transferini incelemek için geliştirilen davranışsal biyoanalizler sonucunda, Varroa dişileri tarafından uygun gözlerin bulunmasına kadar, akarların petekler üzerinde yürüyerek göz arayışına devam ettiğine dair kanıtlar da mevcuttur (Dillier vd. 2002a, b).

Varroa'ların başarılı bir üreme gerçekleştirebilmesi için gözlerin istila zamanlaması oldukça önemlidir. Akar, operkölasyondan hemen önce gözleri istila etmektedir (Dillier vd. 2006). Akarlar için yalnızca 5. evredeki (instar) larvaları cezbedici olmaktadır. Bu çekim, sırasıyla işçi larvası için 15-20 saat ve erkek arı larvası için 40-50 saat olan göz kapanmasından önce kısa bir süre devam etmektedir (Fuchs ve Müller 1988; Boot vd. 1990, 1992a; Blumer-Meyre vd. 1998; Berg vd. 1999). Kovan durumunun da gözlerin istilasını üzerinde etkileri mevcuttur. Kovanda bulunan ve gözleri istila eden foretik akarların fraksiyonu, uygun göz sayısının kolonideki arı sayısına oranı ile belirlenmektedir. Bu da gözlerin istilasının sadece Varroa'nın istila davranışına değil, aynı zamanda arı kolonisinin yavru miktarına, kalitesine ve bakıcı arıların işçi gücüne de bağlı olduğu anlamına gelmektedir.

Çalışmalar, Varroa akarları tarafından arı kovanındaki işçi gözlerine göre erkek arı gözlerinin tercih edildiğini bildirmiştir (Grobov 1977; Sulimanovic vd. 1982; Tewarson 1983; Ifantidis 1984; Issa vd. 1985; Rosenkranz vd. 1984; Schulz 1984; Otten ve Fuchs 1988; Fuchs ve Langenbach 1989; Le Conte vd. 1989; Fuchs 1990; Boot vd. 1992a, 1994b, 1995b; Vandame 1996; Calderone ve Kuenen 2001; Dillier vd. 2002a). Erkek arı gözlerinin çekicilik süresi, işçi gözlerinininkinden iki ila üç kat daha uzun olmaktadır (Boot vd. 1992a; Calis 2001) ve bu gözler, işçi gözlerine göre 11,6 kat daha sık istila edilmektedir (Boot vd. 1995b). Bunun nedeni, erkek arı larvalarının daha büyük

miktarlarda ve daha uzun süreler boyunca cezbedici bileşikler üretmesidir (Le Conte vd. 1989; Calderone ve Lin 2001). Bu tercih erkek arı gözünün 1,7 kat daha büyük göz yüzeyine sahip olmasından (Boot vd. 1995b), ve erkek arı larvalarının işçi larvalarına göre daha büyük olmasından (sırasıyla 346 mg ve 147 mg) kaynaklanabileceği de düşünülmektedir (Martin 1998; Beetsma vd. 1999). Ayrıca bakıcı arılar, erkek arı larvalarını daha sık ziyaret etmektedir. Çünkü işçi arılardan daha fazla besin tüketmektedirler (Fuchs 1990). Ana arı gözlerindeki akar yoğunluğu, kapalı göz aşamasında 8 ile 8,5 günlük gelişme süresinin, başarılı Varroa üremesi için çok kısa olduğu işçi gözlerine göre 15 kat daha düşüktür. Buna neden olarak, arı sütünün Varroa'ya karşı kovucu bir etkiye sahip olabileceği de bildirilmiştir (Le Conte 1990).

Le Conte ve ekibi tarafından yapılan olfaktometre çalışmalarında (Le Conte 1990, Le Conte vd. 1989, 1991; Trouiller vd. 1992, 1993, 1994), Varroa'nın erkek arı larvalarına bazı kimyasallar ile çekildiğine dair kanıtlar bulunmuştur. Erkek arı larvalarının n-heksan özütleri, özellikle metil palmitat, etil palmitat ve metil linolenat olmak üzere *in vitro* koşullarda çekime neden olduğu bildirilmiştir (Le Conte vd. 1989). Benzer bir biyoanalizde, kapatılmadan önce erkek arı gözlerinden toplanan larval besinler, Varroa'nın güçlü çekim tepkileri vermesini sağlamıştır (Nazzi vd. 2001). Larval besin özlerinde, GC-MS ve SPME-GC-MS analizi ile doğrusal, dallı ve aromatik karboksit asitlerin yanı sıra hidroksi asitler tanımlanmıştır. Test edilen tüm asitlerin, 2-hidroksiheksanoik asit dışında aktif olmadığı bildirilmiştir. Kapanmadan önce işçi gözlerine uygulanan yüz nanogram 2-hidroksiheksanoik asitin, kontrol gözleriyle karşılaştırıldığında, deney gözleri başına akar sayısını %36 artırdığı bildirilmiştir (Nazzi vd. 2004).

Zaitoun (1993), her yaştaki açık petek gözü ile temas halinde olan bakıcı arıların Varroa için daha cezbedici olduğunu bildirmiştir. Varroa'lar için yetişkin arılar da en az larvalar kadar çekici durumdadır (Kraus vd. 1986; Kraus 1993). Varroa akarları, tarlacı ve bakıcı arı arasında bir seçenek sunulması durumunda, tercihleri bakıcı arılardan yana olmaktadır (Kraus 1993; Kuenen ve Calderone 1998; Del Piccolo vd. 2010). Akarlar, petri kaplarındaki seçim testlerinde bakıcı arıları, tarlacı arıları ve larvaları ayırt edebilmektedir, ancak Y şeklindeki bir olfaktometrede yapılan testlerde, farklı yaştaki arılar için tercihlerde önemli bir fark bulunamamıştır (Kraus 1993, 1994).

2.5. Varroa ile Mücadele Yöntemleri

Varroa akarı, bal arısı koloni sayılarının azalmasında en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Dünya çapında doğal tozlayıcıların mevcut azalmasıyla birlikte, Varroa akarı gelecekteki tozlaşma sorunlarının şiddetlenmesine sebep olabilecek potansiyeldedir. Arıcılar tarafından, akar popülasyonlarını kontrol altında tutmak için çok çeşitli kimyasal maddeler ve mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. En yaygın mücadele yöntemi olan kimyasal mücadele, düzenli olarak uygulanmasıyla arıcılık maliyetlerini artırmakta ve arı ürünlerinde kimyasal kalıntı ve direnç gelişimi gibi riskler barındırmaktadır. Günümüzde Varroa ile mücadelede etkin, güvenli ve sürdürülebilir yöntemler, özellikle koordinasyonsuz araştırma çabaları tatmin edici bir çözümle sonuçlanmadığı için daha acil hale gelmiştir.

2.5.1. Kimyasal mücadele

Varroa ile mücadelede kimyasal yöntemler büyük önem taşımaktadır ve çok çeşitli akarisit kullanılmaktadır. Varroa akarlarını kontrol etmek için kullanılan bu akar öldürücü kimyasallara “varroasit” de denilmektedir (Akyol ve Yeninar 2009). Varroa'ya karşı kullanılan ve en çok dikkat çeken sentetik varroasitler arasında organofosfat kumafos, piretroid tau-fluvalinat, flumetrim ve formamidin amitraz gibi kimyasallar yer almaktadır (Milani ve Barbattini 1988; Ritter 1988; Milani ve Lob 1998). Kullanılan bu kimyasalların çoğunun uygulaması oldukça kolaydır ve akar biyolojisi hakkında detaylı bilgi gerektirmemektedir. Fakat bu kimyasalların birçok yan etkisi mevcuttur. Bal ve diğer arı ürünlerini sürekli olarak kirletebilmektedirler (Wallner 1999; Nasr ve Wallner 2003; Schroeder vd. 2004; Martel vd. 2007; Lodesani vd. 2008). Öte yandan Varroa akarları bu kimyasallara karşı direnç geliştirebilmektedir. Hatta, akrinatri ve flumetrim gibi piretroidlere karşı çapraz direnç oluşabilmektedir. Dirençli akar popülasyonlarının ise çoğalarak yayılabilme ve daha büyük problemler teşkil edebilme tehlikesi mevcuttur (Rosenkranz vd. 2010).

Varroa ile mücadelede kullanılan formik asit, oksalik asit, laktik asit ve timol gibi organik asitler ve esansiyel yağlar ise hafif akarisitler olarak adlandırılmaktadır. Bu bileşiklerin tekrarlı olarak uygulanması durumunda direnç gelişimi düşüktür. Ancak değişken etkinlikleri ve terapötik indekslerinin (parazit üzerindeki etkinliği ile konukçu toksisitesi arasındaki aralık) düşük olması en büyük dezavantajlarıdır (Rosenkranz vd. 2010).

2.5.2. Mekanik mücadele

Varroa ile mücadelede kimyasala dayalı olmayan, kovan manipülasyonlarını içeren alternatif mekanik yöntemler de mevcuttur. Bu yöntemler arasında; erkek arı gözü üretiminin sınırlandırılması, işçi arı gözü büyüklüğünün değiştirilmesi, arıların pudra şekeri ile tozlanması, tel kafesli ve çekmeceli taban kullanımı ve polen tuzağı kullanımı gibi uygulamalar bulunmaktadır. Ancak Varroa'ya karşı etkinliklerinin oldukça düşük olması nedeniyle diğer mücadele teknikleriyle birlikte kullanılmaları gerekmektedir. Öte yandan iş gücü ve tecrübe gereksiniminin fazla olması ve kısa sürede sonuç elde edilememesi de bu yöntemlerin dezavantajları arasındadır (Akyol ve Korkmaz 2006; Gregorc vd. 2022).

2.5.3. Biyoteknolojik mücadele

Literatürde, Varroa ile mücadelede genom düzenleme teknolojilerinin kullanımının rastlanmamış ancak biyoteknolojik bir yöntem olan RNAi uygulamaları mevcuttur. RNAi, RNA-aracılı diziye özgü post-transkripsiyonel gen susturucu bir mekanizma olarak kullanılmaktadır (Fire vd. 1998). İlk olarak Fire vd. (1998), saflaştırılmış dsRNA'yı doğrudan *Caenorhabditis elegans*'a aktararak gen susturmada indükleyicilerin biyokimyasını açık bir şekilde ortaya koymuştur. Campbell vd. (2010), Varroa'da RNAi'nin uygulanabilirliğini mu-sınıfı glutatyon S-transferaz genini (VdGST-mu1) kullanarak göstermişlerdir. Varroa'da VdGST-mu1 geninin baskılanması, enjeksiyondan 48 saat sonra olmuştur ve bu baskılama en az 72 saate kadar sürmüştür. Çalışmada enjeksiyon yönteminin yüksek mortaliteye neden olması nedeniyle, dsRNA'nın Varroa'ya aktarılmasında farklı yöntemleri de denemişlerdir. Topikal

uygulamayla dsRNA'nın aktarımı hedeflendiğinde, dsRNA'nın kütükülü geçememesi dolayısıyla başarısız olunmuştur. Akarları dsRNA solüsyonuna daldırma aracılığıyla dsRNA aktarma yönteminin, uygulama esnasında oluşan akar hasarlarını en aza indirerek gen susturmada başarılı olduğu vurgulanmıştır. Diğer bir çalışmada, Campbell vd. (2016), potansiyel akar kontrolü için iki nöral gen olan B tipi allatostatin geni ve bir kabuklu hiperglisemik hormon (CHH) benzeri genin hedeflenebileceğini göstermişlerdir. Yine enjeksiyon travmasını önlemek için daldırma yöntemi kullanılmıştır. Allatostatin ve CHH benzeri genin çift sarmallı RNA interferans (dsRNAi) tarafından yıkılması, Varroa'nın sırasıyla %85 ve %55 ölüm oranlarıyla sonuçlanmıştır. Varroa ile mücadelede RNAi kullanım olasılığını araştıran Huang vd. (2017) çalışmalarında, Varroa'nın yaşamsal fonksiyonlarında ve üremesinde etkili olan çeşitli genleri susturmanın Varroa akarının hayatta kalması ve üremesi üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Mikro enjeksiyon yöntemiyle gerçekleştirilen bu çalışmada Da ve Pros26S genlerinin susturulmasıyla Varroa akarlarında yüksek mortalite gözlemlenmiştir. Ayrıca, RpL8, RpL11 ve RpS13 genlerinin susturulması Varroa'nın hayatta kalmasını etkilemeyip yavru sayılarını azalttığı, dolayısıyla bu genlerin Varroa üremesini baskıladığı ifade edilmiştir.

RNAi'nin bitkilerden böceklerle, nematodlara aktarılması, (Steeves vd. 2006; Baum vd. 2007) ve ayrıca susturma sinyallerinin dikey transgenerasyonel aktarımı gibi yollarla çeşitli hastalık ve zararlılarla mücadelede kullanımı başarılı sonuçlar vermiştir (Rechavi vd. 2011). Bal arılarında beslenme yoluyla alınan ve sistemik olarak dsRNA'nın yayılabildiğinin gösterilmesi (Hunter vd. 2010), bal arısından Varroa'ya yatay olarak dsRNA'nın aktarılabilmesi ve arıların RNAi vektörleri olarak kullanılabileceği düşüncesini oluşturmuştur. Garbian vd. (2012), arılar tarafından beslenme yoluyla alınan dsRNA'nın Varroa akarına ve akarın konukçusuna aktarıldığını göstermişlerdir. Bu türler arası, dsRNA'nın arı ve Varroa arasındaki karşılıklı değişimi Varroa'nın yaşamsal genlerini hedefleyerek gen susturulmasına olanak vermiş ve akar popülasyonunda %60'ın üzerinde bir azalma görülmüştür. Arazi koşullarında gerçekleştirdikleri dsRNA stabilitesi çalışmalarında ise dsRNA'nın 6 güne kadar şekerli su solüsyonunda dayanabildiğini bildirmişlerdir. Bu dsRNA iletim yöntemiyle, RNAi ile Varroa mücadelesine yeni bir yaklaşım getirilmiştir.

Farklı ve nispeten daha ekonomik bir bakış açısı olarak Cedeño vd. (2015), bakteriyel olarak eksprese edilen dsRNA'ları arılara beslenme yoluyla vererek (bakterilerle birlikte yedirilmekte), RNA saflaştırmasına gerek duyulmadan arılarda ve Varroa dokularında dsRNA üretilmesi ve aktarılması için verimli bir *in vivo* alternatif sunduğunu göstermişlerdir. Bu stratejinin sadece hastalık ve zararlıları kontrol etmek için değil aynı zamanda gen susturulması ile arılardaki fonksiyonel çalışmalar için de kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

2.5.4. Varroa'ya karşı davranışsal mücadele

Varroa'ya dirençli bal arısı kolonilerinin ıslahı ve yetiştirilmesi birçok ülkedeki araştırma gruplarının ve projelerin temel amacı olmuştur. Dünya çapındaki kayıplara rağmen, bazı bal arısı ırklarında herhangi bir müdahale olmadan koloninin hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir. Bu ırkların doğal seleksiyonla sahip oldukları bazı fizyolojik özelliklerden dolayı hastalık ve parazitlere karşı bir veya daha fazla davranışsal direnç sahip olduğu bildirilmiştir (Fries vd. 2006; Le Conte vd. 2007; 2010; Seeley 2007). Davranışsal direnç genel olarak tımar davranışı ve hijyenik davranış olarak iki başlık

altında incelenmektedir. Bal arılarında en iyi bilinen davranışsal direnç mekanizması hijyenik davranıştır. Bu davranış ilk olarak Park (1937) tarafından tanımlanmıştır. Hijyenik davranışın birçok hastalığa ve Varroa akarına karşı etkili bir davranış mekanizması olduğu gösterilmiştir (Laidlaw ve Page 1997).

Hijyenik davranış, işçi arıların ölü veya enfekte yavruları tespit etmesi ve koloniden uzaklaştırması olarak tanımlanmaktadır (Rothenbuhler 1964a, b). Bu davranış, çoklu genetik lokuslar tarafından kontrol edilen kalıtsal bir özelliktir (Jones ve Rothenbuhler 1964; Momot ve Rothenbuhler 1971; Rothenbuhler, 1964a, b; Wilson-Rich vd. 2009). Araştırmacılar, hijyenik davranış açısından ıslah edilen bal arılarının Varroa yükü üzerinde olumlu etkileri olduğunu ve bu yöndeki ıslah faaliyetlerinin hızla arttığını bildirmişlerdir (Büchler vd. 2010; Rinderer vd. 2010; Sumpter ve Martin 2004). Hijyenik davranış gösteren arı kolonilerinde, Varroa ile bulaşık olan arılar kapalı gözlerden çıkarılarak uzaklaştırılmaktadır (Varroa duyarlı hijyen (VSH)); böylece Varroa istila oranını sınırlanarak, akarların üreme başarısı azaltılmaktadır (Harbo ve Harris 2009). Davranışın koloni performansına olumsuz etkisinin olmadığı ve bal üretimini artırdığı da bildirilmiştir (Spivak ve Reuter 1998). Doğada oldukça az miktarda koloninin ($\leq 10\%$) hijyenik davranış gösterdiği ve doğal yollarla enfekte olmuş kovanlardaki hijyenik davranış hakkındaki verinin çok az olduğu bildirilmektedir (Spivak ve Gilliam 1998). Meksika'da, Afrika bal arısında (*Apis mellifera scutellata*) doğal yollarla bulaşmış yavruları %32 oranında uzaklaştırırken aynı koşullarda Avrupa arıları (*A. mellifera*) %8 oranında uzaklaştırmıştır (Vandame vd. 1996). Tunus'daki *A. mellifera intermissa* arıları doğal yollarla bulaşmış kuluçka hücrelerini %15,5 oranında uzaklaştırırken, *A. mellifera carnica* kolonileri %16,6 oranında uzaklaştırmıştır (Boecking ve Drescher 1992). Ayrıca, Avustralya arılarının %20'sinin hijyenik davranış gösterdiği bildirilmiştir (Oxley vd. 2008). Konuyla ilgili doğal yollarla elde edilen veriler yetersiz olduğundan, araştırmacılar Varroa'ya karşı toleransın prensiplerini çözmek için son yıllarda değişik denemeler gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalar genellikle yapay yollarla hastalık veya parazit bulaştırılmış veya öldürülmüş yavruların bulunduğu kovanlarda yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, hijyenik davranış bakımından herhangi bir seleksiyona tabi tutulmamış 76 kolonide, her bir gözde yaşayan bir akar ile deneysel olarak bulaştırılmış yavruların uzaklaştırılma oranı ortalaması $23,5 \pm 18,2$ olarak bulunmuştur. Bu kolonilerin sadece %9,2'si %50'den fazla bulaşık yavruları uzaklaştırmıştır (Boecking ve Drescher 1998).

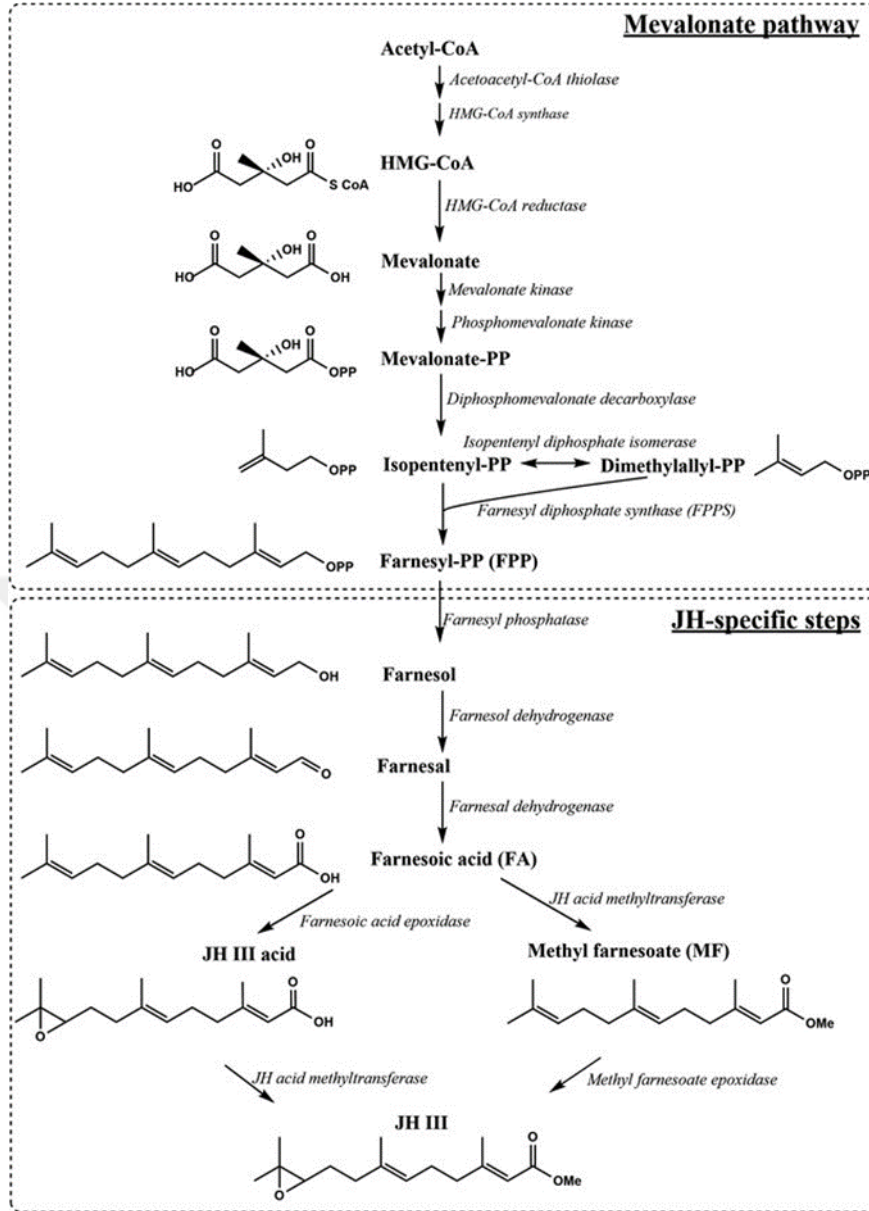
Tımar davranışı nispeten basittir ve yetişkin arıların dış yüzeylerindeki yetişkin akarların uzaklaştırılmasını ve etkisiz hale getirilmesini içermektedir (Pritchard 2016). Bal arılarında davranışsal direnç mekanizmalarından diğeri olan tımar davranışı, omurgalılar ve eklembacaklılar arasında ektoparazitlerden kurtulmak için yaygın görülen bir stratejidir. Bu davranış hem birey hem de koloni sağlığını korumak için evrimleşmiştir (De Figueiró Santos vd. 2016). Tımar davranışı, oto-tımar ve allo-tımar olarak iki farklı şekilde adlandırılmaktadır. Oto-tımar, ağız parçalarının veya pro-/mezotorasik bacakların hareketi ile kendi kendini temizleme davranışdır. Allo-tımar ise bire bir veya sosyal olarak birlikte hareket eden birkaç arının birbirini tımarlaması şeklinde gerçekleşmektedir. Tımar davranışının akar düzeylerindeki düşüşle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Andino ve Hunt (2011), laboratuvarda yapılan tımar analizlerinde arıların temizlediği akarların oranı ile kovan altlarına konan yapışkan levhalarındaki hasarlı Varroa oranı arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda tımar davranışının yüksek olduğu kolonilerin kovanlarının altında bulunan yapışkan

levhada yüksek etkisiz hale getirilmiş akar olduğunu göstermişlerdir. Daha yüksek seviyede tımar davranışı yapan kolonilerde ise akarların ısırlarak etkisiz hale getirildiği bildirilmiştir (Arechavaleta-Velasco ve Guzmán-Novoa 2001). Rosenkranz vd. (1997), İtalyan (*Apis mellifera ligustica*) ve Karniyol (*Apis mellifera carnica*) arılarında yapmış oldukları tımar davranışı çalışmasında ortalama %45 akar hasarı oranı kaydederken, Afrika bal arısında (*Apis mellifera scutellata*) %38,5 oranında akar hasarı kaydetmiştir. Aumeier (2001), yapay olarak istila edilmiş Karniyol arılarının (*Apis mellifera carnica*) % 66'sının ilk 30 saniye içinde vücutlarındaki akarların varlığına tepki verdiğini bildirmiştir. Bak ve wilde (2015), yapay olarak istila edilmiş arılarda Kafkas arılarının (*Apis mellifera caucasica*) tımar davranışı göstererek %86'sının akarlardan kurtulmaya çalıştığını bildirmişlerdir. van Alphen ve Fernhout (2020), İtalyan ırkının (*Apis mellifera ligustica*) ortalama %5,75 akar hasarı gösterdiğini bildirmiştir. Yıldız ve Karabağ (2022), farklı ırklar üzerinde yapmış oldukları çalışmada en yüksek tımar davranışı gösteren ırkın İtalyan arısı (*Apis mellifera ligustica*) olduğunu ve test edilen bireylerin %65 oranında tımar davranışı gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.6. Jüvenil Hormon Asit O-Metiltransferaz (JHAMT)

Jüvenil hormonlar (JH), böceklerde büyüme, gelişme ve üreme dahil birçok biyolojik sürecin kontrolünde merkezi rol oynayan bir seskiterpenoid hormon ailesidir (Gilbert vd. 2000). JH, ekdison etkisini modüle ederek metamorfozu önlemektedir. JH mevcut varlığında ekdison, böceğin en son aşamayı tekrarlamasına neden olmaktadır ve metamorfozun başlaması için ekdisonun, JH yokluğunda hareket etmesi gerekmektedir (Kinjoh vd. 2007). JH, böceklerin büyümesi ve gelişmesindeki rollerine ek olarak, faz polifenizmi ve kast farklılaşmasında da etkilidir (Nijhout 1994; Hartfelder 2000). Hemolenfdeki JH titrelerindeki değişiklikler birincil olarak corpora allata (CA) tarafından JH sentezindeki modülasyonlar tarafından düzenlenmektedir, fakat aynı zamanda spesifik enzimlerin etkisiyle JH katabolizması tarafından da düzenlenmektedir (Kinjoh vd. 2007).

JH'ler, CA adı verilen özel bir endokrin bezde de novo olarak sentezlenmektedir. CA'daki biyosentetik aktiviteden sorumlu bir dizi gen bildirilmiştir (Shinoda ve Itoyama 2003; Helvig vd. 2004; Noriega vd. 2006; Kinjoh vd. 2007). Bu genlerden bir tanesi de Jüvenil hormon asit O-metiltransferaz (JHAMT) genidir. JH asit O-metiltransferaz (JHAMT), metil farnesoat (MF) üretmek için S-adenozil-L-metiyoninden bir metil grubunu farnesoik asitlerin karboksil grubuna aktarmaktadır (Niwa vd. 2008), MF epoksidaz (MFE) tarafından JH'ye dönüştürülmektedir (Bomtorin vd. 2014) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Juvenil hormon asit metiltransferaz biyosentez yolağı (Picard vd. 2021)

Tütün boynuzlu kurdu (*Manduca sexta*) hemolenfinde JH varlığıyla gerçekleşen periyodik ekdisteroid dalgalanmaları deri değişimine neden olmaktadır. Son evrede, JH hemolenften kaybolduğunda, beslenme aşamasının sonunda meydana gelen ekdisteroid titresindeki dalgalanmalar, gezinme davranışı gibi erken metamorfik tepkileri indüklemektedir (Riddiford 1994). Beslenme periyodunun sonuna doğru, *M. sexta*'nın CA'sı JH salgılamayı bıraktığı ve bundan sonra sadece JH asidi (JHA) salgılamadığı gözlemlenmiştir (Bhaskaran vd. 1986; Janzen vd. 1991). Metamorfoz sırasında CA'da gözlenen bu fizyolojik değişimin, dokudaki JHA metiltransferaz (JHAMT) aktivitesinin kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir (Sparagana vd. 1984). Son evrenin başlangıcında CA'da JHAMT aktivitesinin benzer bir şekilde kaybolmasının, ipek böceğinde (*Bombyx mori*) de meydana geldiği öne sürülmektedir (Niimi ve Sakurai

1997). Shinoda ve Itoyama (2003)'nın metamorfoz sırasında CA'da JH biyosentezindeki fizyolojik değişikliklerin altında yatan moleküler olayları ortaya çıkarmak için ipek böceğinde (*B. mori*) mRNA diferansiyel gösterim analizi gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, larval deri değişimi sırasında spesifik olarak CA'da ifade edilen ancak metamorfoz sırasında ifade edilmeyen S-adenozil-L-metiyonin (SAM) bağımlı JHAMT'ı (BmJHAMT) kodlayan bir cDNA tespit etmişlerdir. Ayrıca, BmJHAMT'ın gelişimsel ekspresyon profili, genin transkripsiyonel olarak baskılanmasının, metamorfozdan önce CA'da JH biyosentezinin sonlandırılması için önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

Li vd. (2013), bal arılarında JHAMT geninin (AmJHAMT) klonlamasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, kantitatif RT-PCR ve immüno blotlama analizleri sonucunda, ana arı larvalarının kast gelişimi dönemlerinde işçi larvalarına göre önemli ölçüde daha yüksek AmJHAMT mRNA ve protein seviyeleri içerdiğini bildirmişlerdir. Aurori vd. (2021); *A. mellifera*'nın hem erkek hem de işçi larvalarında, gözlerin mühürlenmesinden sonraki ilk 30 saat boyunca altı zaman noktasında JH ve ekdizonun biyosentezinde yer alan genlerin diferansiyel ekspresyonlarını incelemişlerdir. JH sentezinde yer alan genler genel olarak aşağı doğru regülasyon gösterse de işçilere göre erkek arılarda artan bir ifadeye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. MF'nin sadece JH'nin bir öncüsü olarak değil, aynı zamanda bal arısı feromonu ve Varroa'daki JH benzeri hormonu olarak dikkat çektiğini bildirmişlerdir. Bu yüzden MF'nin akarları erkek arı gözlerine çekmek için olası bir kairomon etkisi gösterebileceğini, ek olarak Varroa'nın yumurtlamayı başlatmasını uyarak petek gözünün mühürlenmesinden sonra oogenezdaki potansiyel katılımına işaret edebileceğini bildirmişlerdir.

JHAMT ortologlarının biyolojik rolleri, farklı takımlardan birkaç böcek üzerinde incelenmiş olsa da JHAMT'ın hymenoptera'daki önemi hala net olarak bilinmemektedir.

2.7. Programlanabilir Gen Düzenleme Teknikleri

İnsanoğlu yıllardır geleneksel ıslah teknikleriyle bitki ve hayvanların genomlarında manipülasyonlar gerçekleştirmektedir. Spesifik özellikler için gerçekleştirilen yapay seçim, tatlı mısırdan tüysüz kedilere kadar çeşitli bitki ve hayvanlarla sonuçlanmıştır. Fakat, organizmaların sahip olduğu özelliklerin, sonraki nesillere aktarılması için gerçekleştirilen bu yapay seçim, doğal olarak oluşan varyasyonlarla sınırlı kalmaktadır (Phillips 2008).

1946 yılında genetik materyalin farklı türler arasında aktarılabilir olduğunun keşfedilmesiyle modern genetik modifikasyonların ilk adımları atılmaya başlanmıştır (Raman 2017). DNA çift sarmallı yapısının ortaya çıkarılmasının ardından, 1973'te Cohen ve ekibi tarafından, restriksiyon endonükleazları ve DNA ligaz “moleküler makas ve yapıştırıcı” olarak kullanılarak farklı türler arasında DNA'nın “kesilip yapıştırılmasını” içeren bir dizi çığır açan deney, dünyanın ilk genetiği değiştirilmiş organizmasının başarılı bir şekilde tasarlanmasıyla sonuçlanmıştır (Cohen vd. 1973). Genetik mühendisliği ve biyoteknolojideki gelişmelerin tarıma kazandırılmasıyla tarımda yeni bir dönem başlamıştır. Bu sayede iklim değişikliğinin zararlı etkilerini azaltan, daha az maliyet gerektiren ve sürdürülebilir çözümler sunulmuştur.

Araştırmacılar, organizmaların DNA ve RNA'sını etkili bir şekilde manipüle

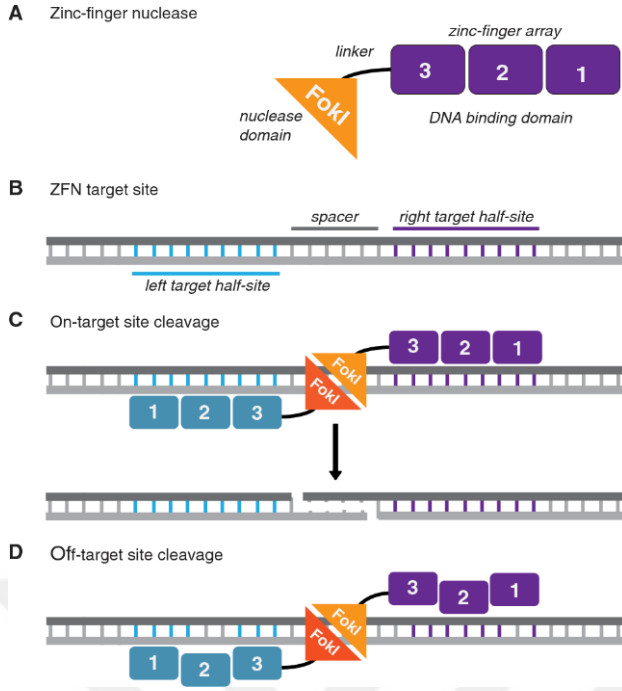
etmenin yollarını uzun yıllardır takip etmektedirler. Genetik tedirginlik, bilim insanlarının genlerin işlevlerinin araştırılmasına veya mutasyonları düzeltmesine olanak tanısa da bölgeye özgü nükleik asit hedefleme her zaman teknik bir zorluk olarak karşı karşıya kalınan bir durumdur (Knott ve Doudna 2018). Programlanabilir gen düzenleme teknikleri, organizmanın genomunun kesin ve isabetli bir şekilde, yabancı DNA kullanmadan modifiye edilmesini mümkün kılan biyoteknolojik araçlar sağlamaktadır. Çinko-parmak nükleazları (ZFN'ler) ve transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ile genom düzenleme milenyum çağının başlangıcından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda daha spesifik ve kolay uygulanabilir CRISPR teknolojisinin de geliştirilmesiyle, programlanabilir gen düzenleme tekniklerinin tarımsal alanda kullanımı ilgi odağı haline gelmiştir (Zhang vd. 2018). Özellikle çiftlik hayvanlarında karşılaşılan sorunlara ekonomik çözümler getirilerek, iyileştirilmiş özelliklere sahip hayvanların üretilmesinde başarılı şekilde uygulanmaktadır.

Tamamlanan bu tez projesinde CRISPR teknolojisi kullanılmıştır. Ancak, programlanabilir gen düzenleme yöntemlerinin özellikle hayvancılık alanında kullanımının daha iyi anlaşılması için kronolojik sırayla aşağıda özetlenmiştir.

2.7.1. ZFN (Çinko Parmak Nükleaz)

Çinko parmak nükleaz (ZFN) teknolojisi, belirli hedef bölgelerde çift zincirli DNA kırılmalarını mümkün kılarak organizmalarda gen düzenlemesinin gerçekleştirilmesi için çok yönlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu sentetik proteinler, doğal tip IIS restriksiyon enzimi FokI'in fiziksel olarak ayrılabilir bağlanma ve parçalama aktivitelerine sahip olduğu gözleminde sonra ortaya çıkmıştır (Li vd. 1992). Bölünme alanının belirgin bir dizi özgüllüğü yoktur ve doğal olanın yerine alternatif tanıma alanları kullanarak kırıkların yönlendirilebileceği gösterilmiştir (Kim ve Chandrasegaran 1994; Kim vd. 1996, 1998).

ZFN ile gerçekleştirilen çift sarmal kırıkları hem hedeflenen mutajeneze hem de hedeflenen gen değişimine yol açan hücresel DNA onarım süreçlerine tabidir (Carroll 2011). Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) DNA onarım yoluyla bir hücrede DSB'lerin kusurlu onarımı, küçük eklemeler ve silmelere (indeller) neden olabilmektedir (Kim 1996). Gen dizisinde indellerin oluşturulması, çerçeve kaymasına ve ardından bir genin susturulmasına neden olabilmektedir. Bu süreç, bir gen knockout (KO) oluşturmak için ZFN'lerin kullanımını açıklarken, transgenlerin entegrasyonu, ZFN kesim bölgesinde homolojiye yönelik onarım (HDR) yoluyla da gerçekleştirilebilmektedir (Urnov 2005). Çinko parmak nükleaz yapısı ve DNA kırığının oluşturulması Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Çinko parmak nükleaz yapısı. **a)** Çinko parmak nükleaz (ZFN) alt biriminin yapısı. Bir ZFN alt birimi, ardışık bir dizide düzenlenmiş üç ila altı çinko parmağı (burada üç parmaklı bir dizi görülmektedir) ve FokI endonükleazın katalitik alanını kapsamaktadır. Kısa bir bağlayıcı, iki alanı birbirine bağlamaktadır. **b)** ZFN hedef bölgesi. Hedef bölge, kısa bir DNA aralayıcısı ile ayrılan iki hedef yarım bölgeden oluşmaktadır. **c)** İki ZFN alt biriminin dimerizasyonundan sonra, nükleaz aktive edilmekte ve DNA'yı ayırıcı sekans içinde keserek 5'lük bir çıkıntı bırakmaktadır. **d)** ZFN hedef dışı aktivitesi. DNA bağlanmasının yetersiz özgüllüğü, ZFN'nin istenmeyen DNA bölgelerine bağlanmasına ve bu bölgelerde kesim yapmasına izin vermektedir (Rahman vd. 2011)

ZFN'ler çeşitli çiftlik hayvanlarında ve çeşitli hücre tiplerinde etkili bir şekilde uygulanmıştır. Yu vd. (2011), sığırlarda beta-lactoglobulin (BLG) lokusunda gen bozulmasını indüklemek için çinko parmak nükleazlarını kullanmışlardır. ZFN'ler, sığır fetus fibroblast hücrelerinde mutantları indüklemiştir. Analiz edilen 100 mutantın çoğunun, kısa parça delesyonları veya insersiyonları içerdiği bildirilmiştir. Bu hücreler somatik hücre klonlaması için nükleer donör olarak kullanılmıştır. Toplamda 8 adet klon hayvan doğmuştur ve dizi analizi, klonlanmış sığırların BLG lokusunda bi-allelilik bir mutasyon olduğunu göstermiştir. Başka bir araştırmada beta-laktoglobulin (BLG) geni, Song vd. (2015) tarafından keçilerde çalışılmıştır. Keçi beta-laktoglobulin (BLG) genini hedef alan ZFN füzyon proteinlerinin klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması araştırılmış ve bu ZFN proteinlerinin sırasıyla *in vitro* ve hücrelerde parçalanma aktiviteleri tespit edilmiştir. Saflaştırılmış ZFN proteininin hem *in vitro* hem de fibroblast hücrelerinde var olan BLG genini ve bölünme aktivitesini devre dışı bırakmak için bir gen modifikasyon aracı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Fan vd. (2011) Yabancı genlerin tavuk ovalbümin geninin 3'- transle edilmemiş

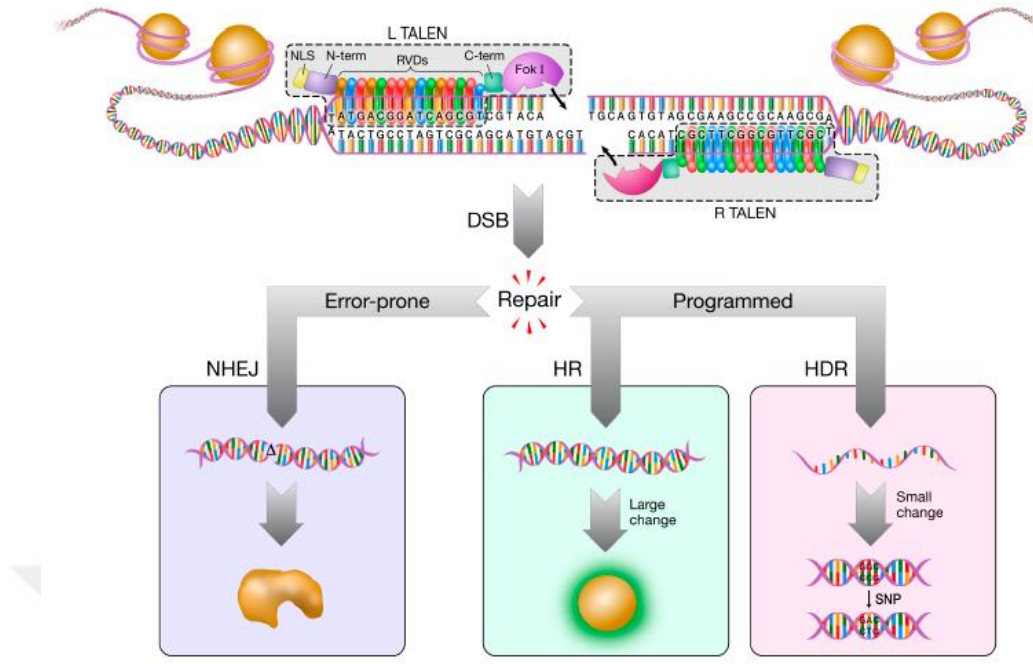
bölgesine yönelik entegrasyonunu kolaylaştırmak için ZFN ekspresyon vektörleri oluşturmuş ve bu ZFN yapılarının işlevselliğini test etmişlerdir. Farklı tek zincirli yarı dimerik ZFN'nin iki FokI alanı arasındaki esnek bağlayıcının farklı uzunluklarına ihtiyaç duyduğunu ve tek zincirli yarı dimerik ZFN'nin birleşiminin daha yüksek bir başarı şansı anlamına gelebileceğini bildirmişlerdir.

Çinko-parmak nükleaz destekli gen hedeflemesi ile meme bezinde antiviral proteinler lizostafini (Liu vd. 2013) ve insan lizozimi (Liu vd. 2014) üreten inekler geliştirmeyi başarılmıştır. Bu transgenik inekler tarafından üretilen süt *in vitro* antiviral aktivite göstermiştir.

Ancak yaklaşım bazı dezavantajlara sahiptir. ZFN'nin en büyük dezavantajlarından birisi, hedefe yönelik özgüllüktür. Bu durum, birçok hedef dışı kesime sebep olarak genomun parçalanmasına ve kararsızlığa neden olabilmektedir. Spesifik olmayan kesim aktivitelerinden ötürü hücrelerde toksisiteler de meydana gelebilmektedir (Khalil 2020). ZFN teknolojisinde nükleotid dizilerine spesifik bir bağlanma gerçekleştirmek için çinko parmak alanlarını dizayn etmek oldukça zordur (Ramirez vd. 2008). Ayrıca bu teknolojiyle hedeflenebilecek bölgeler de oldukça sınırlıdır (Gupta ve Musunuru 2014).

2.7.2. TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz)

TALEN'ler, ZFN'lere benzerdir ve spesifikleştirilebilir bir DNA bağlanma alanı yerleştirilmiş spesifik olmayan bir FokI nükleaz domaini içermektedir. Bu DNA bağlanma alanı, konukçu hücrelerde genlerin transkripsiyonunu manipüle etmek için *Xanthomonas* bakterilerinin ürettiği proteinler olan transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörlerden (TALE'ler) elde edilen korunmuş tekrarlardan oluşmaktadır (Boch ve Bonas 2010). Hedefleme özgüllükleri, 33-35 amino asit tekrarından oluşan bir merkezi tandem domaini olan ve ardından 20 amino asitlik tek bir kesik tekrar tarafından belirlenmektedir (Cermak vd. 2011). TALEN'in kullanılmaya başlanmasıyla genom düzenleme; etkinlik, hassasiyet ve tasarım olanakları açısından oldukça iyileştirilmiştir (Gupta ve Musunuru 2014). TALEN genom düzenleme tekniğinin detaylı yapısı ve çalışma prensibi Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Sol ve sağ TALEN kolları, DNA bağlanma alanını içeren tekrar değişken dizilimi (RVD) tarafından spesifik bir genomik DNA dizisine yönlendirilmektedir. Özgüllük, RVD'ler ve nükleotidler arasındaki bire bir etkileşimlerin yanı sıra TAL proteininin N-terminali tarafından tanınan bir 5'T ile elde edilmektedir. TALEN kollarının uzunluğu ve ara bölge TALEN aktivitesine katkıda bulunmaktadır; burada etkili olduğu gösterilen 15-15-15 (sol kol-ara bölge-sağ kol) tasarımı gösterilmektedir. 25 C-terminal alanı, FokI zorunlu heterodimer (veya homodimer) endonükleazı dimerize etmeye yaklaştırmaktadır. Ortaya çıkan çift sarmallı kırılma (DSB), ya hataya meyilli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ya da homolog rekombinasyon (HR) ya da bir ekzojen DNA donörü tarafından kolaylaştırılan homoloji yönelimli onarım (HDR) ile programlanmış gen onarımı ile onarılmaktadır. NHEJ tarafından yapılan onarım, kesim bölgesinde öngörülemez insersiyonlara / delesyonlara (indel) neden olmakta ve bu da protein fonksiyon kaybına yol açabilmektedir. HR ile onarım, bir endojen proteinin GFP tarafından floresan etiketlenmesi gibi genomdaki büyük değişiklikleri yönlendirmek için kullanılabilen uzun, çift sarmallı DNA donörleri gerektirmektedir. Tersine, kısa, tek sarmallı oligonükleotidler kullanan HDR, tek bir nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi küçük değişiklikler yapmak için kullanılabilir. NLS, nükleer lokalizasyon dizisini göstermektedir (Campbell vd. 2013)

TALEN'ler birçok türde başarılı şekilde uygulanmıştır. Park vd. (2014), TALEN aracılı gen hedefleme yoluyla spesifik knockout tavuklar üretmişlerdir. Bu çalışmada, tavuk primordial germ hücrelerinde ovalbumin (OV) geninde hedefli knockout gerçekleştirmişlerdir ve test-cross analizi yoluyla OV mutant yavruları oluşturulmuştur. TALEN'ler, delesyon mutasyonları ile ORF kaymalarını başarıyla indükleyerek tavuk OV gen fonksiyonunun kaybına neden olmuştur. Sonuç olarak, tavuk primer germ hücre hattında kullanılan TALEN tekniğinin, pratik uygulamalar için güvenli bir şekilde genomu düzenlenmiş tavukları oluşturmak için güçlü bir strateji olduğunu

göstermişlerdir.

Sığırcılıkta en önemli konulardan birisi boynuzsuzlaştırmadır. Normal şartlarda fiziksel olarak gerçekleştirilen bu işlem, sadece maliyet açısından değil hayvanlara acı vermesi nedeniyle sorun yaratmaktadır. Carlson vd. (2016), TALEN kullanarak iki erkek boğada PC POLLED Celtic (PC) alelini transfer ederek hedef dışı bir mutasyon olmadan iki boğanın da boynuz gelişimi olmadan erişkinliğe ulaştığını bildirmişlerdir.

Keçi sütünde bulunan alergen bir protein olan β -Laktoglobulin (BLG) Cui vd. (2015) tarafından TALEN ile indüklenen homolog rekombinasyon (HR) yoluyla knockout edilmiştir. Yu vd. (2016), kas büyümesinin negatif bir düzenleyicisi olan Myostatin (MSTN) genini tanıyabilen ve kesebilen bir çift TALEN (MTAL-2) tasarlamışlardır. Mutant somatik hücrelerin gelişimsel bozulma olmaksızın MSTN bölgesi mutasyona uğramış keçileri üretmek için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. TALEN mRNA'nın zigotlara doğrudan enjeksiyonu ile gen düzenlenmiş sığır ve koyunların üretilebileceği Proudfoot vd. (2015) tarafından bildirilmiştir. Her iki türde de miyostatin (MSTN) genini hedeflemişlerdir. Bu yöntemle istenen alellerin, hedef gen knockout veya introgresyon için somatik hücre nükleer transferine bir alternatif oluşturmuşlardır. TALEN'in başarıyla uygulandığı farklı bir tür olarak da ipek böceği *Bombyx mori*'dir. Ma vd. (2012), ipek böceğinde TALEN kullanarak başarılı hedefli mutajenez uygulanabileceğini bildirmişlerdir. İki çift TALEN'in eşzamanlı ifadesiyle şeffaf cilt fenotipinden sorumlu olan BmBlos2'nin 2. ve 3. eksonunu hedefleyerek kalıtsal delesyonlar üretmişlerdir.

TALEN ile ilgili çiftlik hayvanları kullanılarak insan sağlığını iyileştirmede fayda sağlayacak potansiyel çalışmalar da mevcuttur. Moghaddassi vd. (2014), rekombinant insan serum albüminine (rHSA) kaynak olacak genetiği değiştirilmiş sığır yaratmaya yönelik ilk adım olan, sığır albümin (bA) lokusunun TALEN ile indüklenmiş homolojiye yönelik onarım (HDR) ile modifikasyonunu bildirmişlerdir. Çalışmada primer sığır fibroblastlarında bA lokusuna 11,5 kb'lik bir parça yerleştirmek için TALEN ile uyarılan HDR'nin başarılı kullanımını, ortalama %11 hedefleme verimliliği bildirmişlerdir. Ayrıca, bu hedeflenen hücrelerin somatik hücre nükleer transferinde (SCNT) nükleer donörler olarak kullanılabileceğini, gelişimi blastosist aşamasına yönlendirebildiğini ve transgenik sığır embriyoları üretilbildiğini göstermişlerdir.

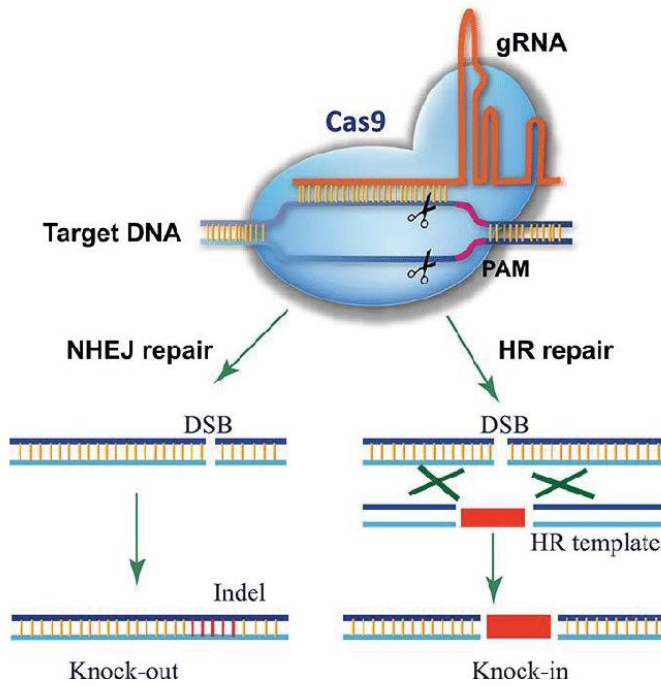
TALEN'in ZFN'ye göre avantajlarından bir tanesi üçlü bazların tanınması yerine her DNA bağlanma alanının yalnızca bir nükleotidi tanınmasıdır. TALEN'lerin dizaynı ZFN'lere göre daha kolaydır ve DNA bağlanma alanlarının hedef DNA arasındaki etkileşimi daha hızlıdır. Fakat ZFN ile karşılaştırıldığında boyutlarının büyük olması transfeksiyon aşamasında büyük sorunlar yaratmaktadır (Khalil 2020). Bununla birlikte, ZFN'ler ve TALEN'ler yüksek maliyet gerektirmektedir ve hedefleme yetenekleri protein manipülasyonlarına dayandığı için farklı bölgeler hedeflemek oldukça güçtür (Choudhary vd. 2017). Bu sebepler özellikle büyük ölçekli çalışmalarda kullanımlarını sınırlamıştır.

2.7.3. CRISPR (Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri)

CRISPR-Cas teknolojisini kullanan genom mühendisliği kısa sürede büyük ilerleme kaydetmiştir. 1980'lerin sonlarında, *Escherichia coli*'den alınan DNA'da düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) tespit edilmiştir. 1990'ların

başında CRISPR ile ilişkili sistemlerin (CAS) prokaryotlarda yaygın olduğu görülmüştür. Yaklaşık yirmi yıldır, esas olarak bakteriyel antiviral savunmadaki rolleri üzerinde çalışılmıştır. Beş yıldan biraz daha uzun bir süre önce, sistem DNA dizilerini parçalamak ve yeniden yazmak için son derece uyarlanabilir, hedeflenebilir bir araç olarak başarıyla tasarlanarak Science dergisi tarafından 2015 yılında yılın buluşu olarak seçilmiştir (Surridge 2018). Bu teknolojiyle diğer gen düzenleme tekniklerindeki birçok sınırlama geride kalmıştır. ZFN ve TALEN’de, büyük ölçüde her yeni hedef bölge için yeni proteinler tasarlama gerekliliğinden dolayı, CRISPR’a göre pahalı ve daha az çok yönlüdür (Doudna ve Charpentier 2014).

CRISPR, Cas nükleaz ve özelleştirilebilir tek rehberli RNA’dan (sgRNA) oluşan RNA aracılı bir DNA endonükleaz sistemidir. sgRNA, bir protospacer bitişik motifinden (PAM) hemen önce bir hedef diziye tamamlayıcı bir 18-20 nükleotid dizisini içerecek şekilde programlanabilmektedir (Tian vd. 2017). sgRNA rehberliğinde yönlendirilen Cas-sgRNA kompleksi, genom boyunca hedefi arayıp ve PAM bölgesinin yaklaşık 3 bç yukarısında küt uçlu çift iplikli kırılma oluşturmaktadır (Jinek vd. 2012). Oluşturulan kırık DNA onarım yolunu uyarmaktadır. Gerçekleşen DNA onarımı, homolog olmayan uç birleştirme veya homolog rekombinasyona dayalı onarım (Symington ve Gautier 2011), hedef genin knockout edilmesi veya istenen mutasyonun eklenmesi ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. CRISPR sisteminin çalışma mekanizması (Razzaq ve Masood 2018)

Cas proteininin yapı ve işlevlerine göre CRISPR sistemleri sınıf I, sınıf II olarak iki sınıfa ayrılmaktadır ve bunlar da tip I–VI olmak üzere altı tipe ayrılmaktadır (Makarova vd. 2015). Sınıf I, tip I, III ve IV’ü; sınıf II ise tip II, V ve VI’yı içermektedir (Mohanraju vd. 2016). Tip I, II ve V sistemleri DNA’yı, tip VI RNA’yı ve tip III hem

DNA hem de RNA'yı hedeflemektedir. Tip IV sistemin etkisi ise henüz bilinmemektedir. Özellikle, tip II (Cas9) sistemleri, gen düzenlemede en yaygın kullanılan sistemdir (Wang vd. 2019).

Programlanabilir endonükleaz aktivitesi için en çok çalışılan protein Cas9'dur. Cas9, PAM sunan oligonükleotid (PAMmer) dizisi ile tek sarmallı DNA'yı (ssDNA) veya tek sarmallı RNA'yı (ssRNA) hedefleyecek şekilde de programlanabilmektedir. PAMmer, tipik olarak hedef iplikçik ile birleşmek için ve Cas9'u aktive etmek için bir psödo-PAM bölgesi oluşturmak üzere tasarlanmaktadır (Feng 2021). Ayrıca, Cas9'un birçok varyantı, bir PAM dizisine ihtiyaç duymadan da doğal olarak RNA'yı hedeflemektedir (Sampson vd. 2013; Dugar vd. 2018; Rousseau vd. 2018; Strutt vd. 2018).

Cas9 protein domainlerinde manipülasyonlar meydana getirerek hedefleme spesifitesinin artırılması da mümkündür. sgRNA'yı tamamlayıcı olmayan DNA sarmalını hedefleyen bir RuvC nükleaz alanına ve tamamlayıcı sarmalı hedefleyen bir HNH nükleaz alanına sahiptir ve iki alandan birindeki mutasyonlar Cas9'u bir DNA nikazına dönüştürmektedir (Ren vd. 2014). Cas9'un mutant versiyonu olan Cas9 nikaz (Cas9n), DNA'da tek sarmal çentikler oluşturmaktadır. Hedeflenen bir bölgede kısa bir mesafede iki tek iplikçik kırılması oluşturarak etkili bir şekilde DSB'ler oluşturan eşleştirilmiş nikazlar, hedef dışı aktiviteyi azaltmak için geliştirilmiştir (Gopalappa vd. 2018).

CRISPR-Cas9 tabanlı genom düzenleme aracının geliştirilmesiyle çiftlik hayvanlarının genomları oldukça basit ve yüksek verimlilikle değiştirilebilmektedir (Urnov vd. 2010; Joung ve Sander, 2013; Laible vd. 2015; Lillico vd. 2016; Georges vd. 2019). Li vd. (2019), Tβ4 genini keçi CCR5 lokusuna yerleştirerek yüksek verimli kaşmir keçileri elde etmeye çalışmışlardır. CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak herhangi bir tarama ve floresan işaretleyici olmadan Tβ4 knockout keçiyi başarıyla elde etmişlerdir. İncelik ve kalite farklılığı olmaksızın %74,5 kaşmir veriminde artış elde etmişlerdir. Elde edilen canlıların büyüme ve gelişmeleri izlenerek, CCR5 komşu genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri takip edilmiştir ve gen düzenlenmiş keçinin güvenli olduğunu bildirilmiştir. Crispo vd. (2015); kas farklılaşması ve büyümesinin negatif bir düzenleyicisi olan Myostatin (MSTN) genini, koyunlarda CRISPR-Cas9 sistemi ile kas gelişimini teşvik etmek amacıyla hedeflemişlerdir. Koyun MSTN'sine spesifik CRISPR-Cas9 mRNA'ları oluşturup küçükbaş hayvan zigotlarının sitoplazmasına mikroenjeksiyonla iletmışlerdir. T7EI ve Sanger dizilimi ile analiz edilen yenidoğan 22 kuzudan on tanesi MSTN knockout olduğu bildirilmiştir. Bunlardan sekiz tanesi, her iki alelde mutasyonlar göstermiştir. Homozigot knockout mutantların yabani tiplere göre daha ağır olduğu da görülmüştür.

Sığır gibi uzun gebelik döngüsüne sahip çiftlik hayvanlarında da teknik başarılı şekilde uygulanabilmektedir. Ikeda vd. (2017), Japon siyah sığırlarında tek nükleotid değişimi (SNP) ile meydana gelen resesif bir hastalık olan izolösil-tRNA sentetaz (IARS) sendromuna CRISPR-Cas9 kullanarak mutasyon bölgesinin yakınında çift iplikli bir kırılma oluşturarak mutasyonu onarmayı başarmışlardır. Heo vd. (2015), üretmesi zor olan sığır pluripotent kök hücreleri ve CRISPR-Cas9 kullanılarak sığır genomunda yüksek verimli gen hedeflemesi gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

CRISPR sistemleri konukçu-patojen etkileşimlerini ortaya koyarak hayvan

ıslahında yeni imkanlar sağlamaktadır. Hellmich vd. (2020), tavuklarda miyeloid lökoz ve diğer tümörlere neden olan Avian Leukosis Virus (ALV)'e karşı, chicken Na⁺/H⁺ exchanger type 1 (chNHE1) reseptör geninde delesyon oluşturarak dirençli tavuk hattı oluşturmuşlardır.

CRISPR teknolojisi böcek türlerinde de başarıyla uygulanmaktadır. Bi vd. (2019), *B. mori*'deki Ovo geninin işlevini incelemek için transgenik tabanlı CRISPR-Cas9 genom düzenleme sistemini kullanmışlardır. Elde edilen BmOvo mutantlarının yumurtalıklarında anormal şekilli yumurtalara rastlanmıştır ve anormal gonad gelişimine neden olmuştur. Ayrıca bu genin kanat gelişimini de negatif etkilediğini bildirmişlerdir. Dong vd. (2020), AsCas12a, FnCas12a ve LbCas12a'nın *B. mori*'deki nükleopolihedrovirüs (BmNPV) genomlarını düzenleme yeteneğini araştırmışlardır. Üç Cas12a ile, *B. mori* BmNPV genomunu verimli bir şekilde düzenlenmişlerdir ve BmN-SWU1 hücrelerinde BmNPV replikasyonunu inhibe etmişlerdir. Gui vd. (2020), patates ve diğer Solanaceae familyasına ait bitkiler için önemli bir zararlı olan, Colorado patates böceği olarak bilinen *Leptinotarsa decemlineata*'da, kanat gelişiminden sorumlu olduğu bilinen vest geni CRISPR-Cas9 ile hedeflenerek bir knockout çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda kanatsız mutant fenotipler başarıyla elde edilmiştir.

Başarılı bir genom mühendisliği için en önemli aşama, CRISPR-Cas9 bileşenlerinin hücre çekirdeğine etkin bir şekilde iletilmesidir. CRISPR-Cas9 bileşenleri, plazmid DNA (pDNA), haberci RNA (mRNA) veya ribonükleoprotein (RNP, sgRNA ile Cas9 proteini kompleksi) formlarında hücrelere iletilebilmektedir (Wang vd. 2017). Bununla birlikte, DNA ve RNA tabanlı yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır.

DNA plazmidi bir hücreye transfekte edildikten sonra, Cas9 mRNA ve gRNA'nın transkripsiyonu için çekirdeğe girmesi gerekmektedir. Cas9 proteini işlenmiş mRNA'dan transle edilmekte ve son olarak Cas9/gRNA kompleksi, nükleer translokasyondan sonra kromozomal DNA'yı kesmektedir. Ancak bu süreç, olgun Cas9/gRNA ribonükleoprotein ekspresyonu ve uygun lokalizasyon için gereken birçok adımdan dolayı verimsiz olmaktadır. Ayrıca, hedef gen düzenlemesi bittikten sonra bile CRISPR sisteminin sürekli olarak ifade edilmesi nedeniyle hedef dışı mutasyon riski mevcut olmaktadır (Sioson vd. 2021). Diğer bir husus da Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan plazmitlerin tranfeksiyonunun, konukçu genomunda istenmeyen entegrasyonlara yol açabilmesidir. Rastgele entegrasyonlar, kritik genomik bölgelerde insersiyonel mutajenezler meydana getirebilmekte, bu da gen yapısının bozulmasına veya onkogeneze sebep olmaktadır (Bloomer vd. 2022).

mRNA iletimi, DNA transkripsiyonuna gerek olmadığı için plazmid iletimi ile karşılaştırıldığında faydalı bir yöntem olabilmektedir. CRISPR bileşenlerinin nükleer zarı geçmesine gerek olmadığı için bu işlem de avantajlıdır; ribozomların iletilen mRNA'yı ifade etmesi için yalnızca sitoplazmaya doğrudan iletim yeterli olmaktadır. Bununla birlikte, mRNA'nın fizyolojik ortamda RNaz'lara kararsız doğası nedeniyle güvenli iletim ve mRNA'nın hızlı bir şekilde translasyonu esastır. Aslında, mRNA'nın stabilitesi, gen düzenleme verimliliğini tehlikeye atmaktadır (Sioson vd. 2021).

CRISPR-Cas bileşenleri önceden oluşturulmuş Cas9-sgRNA RNP kompleksleri en basit ve en etkili şekilde iletilebilmektedir. Bu şekilde pDNA veya mRNA iletimi ile

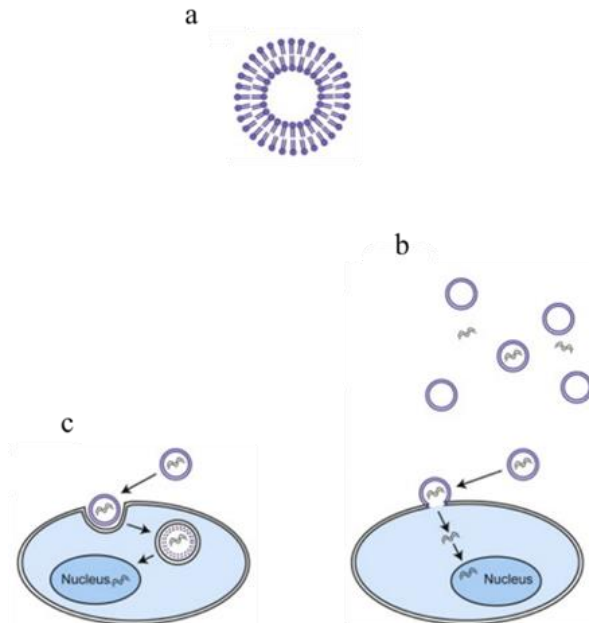
ilişkili engellerin aşılabileceği bir teknik sunmaktadır (Kim vd. 2014). RNP kompleksi tarafından kesici enzimlerden korunan sgRNA ve hücre içindeki hedef dışı mutasyonların şansını azaltan kompleks birçok avantajından dolayı çok sayıda çalışmada tercih edilmektedir (Shalaby vd. 2020).

2.8. Lipozom Temelli RNP Transfeksiyonu

Lipozom temelli transfeksiyon ya da lipofeksiyon, fosfolipid çift tabakasından yapıldığı için hücre zarıyla kolayca birleşebilen lipozomlar aracılığıyla genetik materyali hücreye ileten bir tekniktir (Şekil 2.9). Lipozomun ve hücrenin tipine bağlı olarak, lipozom endositozlanabilmekte veya genetik materyali hücrelere bırakmak için hücre zarıyla doğrudan birleşebilmektedir (Carter ve Shieh 2015).

Lipozomlar; çok yönlülükleri, yüksek biyouyumlulukları, biyo-bozunabilir ve yükleri korumaları nedeniyle viral olmayan gen iletim yöntemleri arasında en çok çalışılan ve en popüler yöntem haline gelmiştir (Goodwin ve Huang 2014; Sioson vd. 2021). Ticari kitlerle birlikte, transfeksiyon reaksiyonları 30 dakika içinde gerçekleştirilebilmekte ve gen ekspresyonu saatler içinde test edilebilmektedir (Carter ve Shieh 2015).

Lipofeksiyon tekniğinin geliştirilmesinden bu yana (Felgner vd. 1987), primer endotel hücreleri (Young vd. 2002), salgı epitel hücreleri (Lu vd. 1989), endometriyal stromal hücreler (Lascombe vd. 1996), primer astrosit kültürü (Yu vd. 1991; Bochelen vd. 1992), oligodendrositler (Guo vd. 1996), Spermatogonial kök hücreler (Nakami vd. 2022) ve sperm hücresi (Harel-Markowitz vd. 2009; Arias vd. 2017; Konoval vd. 2019) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde kullanılmıştır.



Şekil 2.9. lipozomlar aracılığıyla genetik materyalin hücreye iletilmesi. **a)** Çift tabaka lipid yapılı lipozom vezikülü; **b)** lipozomlar genetik materyali kaplayarak hücre zarıyla birleşmesi ve DNA'yı doğrudan hücrelere bırakması; Lipozom ile çevrili genetik materyalin hücrelere endositoz ile alınması (Carter ve Shieh 2015)

Son yıllarda, katyonik lipidler, immünoterapi ve aşı çalışmalarında da oldukça yaygın kullanılmaktadır. Güncel bir örnek olarak; COVID 19'a karşı geliştirilen yeni mRNA aşı teknolojileri de mRNA'yı hücrelere iletmek için lipid nano parçacıklarını kullanmaktadır (Verbeke vd. 2021).

Tamamlanan bu tez çalışmasında sperm hücrelerine CRIPR-Cas9 kompleksinin aktarılması için lipozom temelli RNP transfeksiyonu kullanılmıştır.

2.9. Programlanabilir Gen Düzenleme Teknikleri ve Etik

Aslında binlerce yıldır hayvanların ve bitkilerin genetik mühendisliği yapılmaktadır (Kuzma 2016). Renk, verim, davranış gibi istediğimiz özellikler doğrultusunda yapay seçimle organizmaların genlerinin modifiye edilmesi M.Ö 30.000 yıl kadar eski bir tarihte öğrenilmiştir. İri ve vahşi kurtlardan evcil ve itaatkâr köpekleri elde etmeyle başlayan bu süreç, genetiği değiştirilmiş bir keçiden antikoagülan olan ATryn üretimi (Şekil 2.11) ve dahası 25 Kasım 2018'de Çin'de Southern University of Science and Technology'de doçent olan Jiankui He, düzenlenmiş C-C kemokin reseptörü tip 5 (CCR5) genlerine sahip iki bebeğin Çin'de doğduğunu açıklaması ile büyük sansasyon uyandırarak devam etmektedir.

Genetik mühendisliği teknikleriyle üretilen tüm ürünler, detaylı güvenlik ve risk değerlendirmeleri yapılmasının ardından piyasaya sürülmektedir. Her ne kadar durum böyle olsa da CRISPR teknolojisinin gücü ve teknik sınırlamaları ile ilgili etik kaygılar mevcuttur. Bu kaygılar, düzenleme verimliliğinin sınırlı hedefler üzerinde olması, eksik düzenleme (mozaiklik) ve hatalı hedef içi veya dışı düzenleme ihtimallerinden dolayı kaynaklanmaktadır. Ayrıca genom istenilen şekilde düzenlenip istenilen fonksiyon kazandırılrsa bile, genotip ve fenotipler arasındaki karmaşık ilişkinin tam olarak anlaşılamayacağı da diğer bir husustur (Brokowski ve Adli 2019).

CRISPR-Cas9 genom mühendisliği ile ilgili önemli endişelerin başında insanlar ve çevre üzerinde bir tehdit oluşturabileceğinden hedef dışı (off-target) mutasyonlar gelmektedir. Zebra balığı ile karşılaştırıldığında insanlarda meydana gelen hedef dışı mutasyon oranı daha fazladır. Daha büyük genomlarda kesim için daha fazla özdeş bölge bulunmasından dolayı CRISPR istenmeyen kesimler yapabilmektedir (Shinwari 2018). Hedef dışı etkiler, genlerde fonksiyon kaybına, hayvanlarda kanser hücrelerinin oluşumuna ve bitkilerde hastalıklara duyarlılık gibi istenmeyen fenotiplere neden olan ölümcül mutasyonlara sebep olabilmektedir (Guilinger vd. 2014).

Büyük ölçüde ZFN, TALEN ve CRISPR ile düzenlenen ürünler, resmi olarak "genetiği değiştirilmiş organizmalar" olmadıkları için Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (USDA)'nın düzenleyici kapsamına dahil edilmemiştir. Nedeni ise üretilen ürünlerin yabancı DNA içermemiş olmasıdır (Schultz-Bergin 2018). Halk arasında, genetik mühendisliğine yönelik itirazların en önemli nedenlerinden biri doğal olmadığını ve "Tanrı'yı oynamak" anlamına geldiğini düşünmelerinden kaynaklıdır (Rollin 1996; Streiffer 2003; Macnaghten 2004; Streiffer ve Hedemann 2005; Schuppli vd. 2015). Bu düşüncenin temelinde ise bir türden başka bir türe gen aktarılmasıyla ilahi olarak belirlenmiş biyolojik tür sınırlarını aşmayı ahlaki olarak yanlış olduğunu kabul etmeleri vardır (Robert ve Baylis 2003). Gen düzenleme teknolojileri, tür sınırlarını aşmadığı ve ilgili düzenleyici koşulları geniş ölçüde atlattığı için, etik ve politik tartışmada önemli bir

ilerleme kaydedebilecektir (Schultz-Bergin 2018).

CRISPR, sonuca hızlı ve başarılı bir şekilde ulaşabilmesinden dolayı diğer genetik modifikasyon yöntemlerinin yerini kolayca alabilecek özelliktedir. Örneğin CRISPR, hayvanların kas kütlelerini artırmak, hastalıklara duyarlılığı azaltmak, besin içeriğini artırmak ya da boynuzsuz sığırlar üretmek için kullanılabilmektedir (Sugarman 2015). Biyoteknoloji şirketleri ve araştırma gruplarının değerlendirmelerine göre bu tarz düzenlemeler güvenli ve uygulanabilir bulunmaktadır. Fakat şu ana kadar, genetiği değiştirilmiş hiçbir hayvan insan tüketimi için onaylanmamıştır. İnsan tüketimi için genetiği değiştirilmiş somon balığının onayı yıllardır FDA (U.S. Food and Drug Administration)'da beklemektedir. GDO'ların yanlış anlaşılmasının ve güvensizliğinin CRISPR'ın bilimsel ilerlemesi ve geçerli kullanımlarını da engellemektedir. CRISPR uygulamaları için düzenlemeler ve araştırma etiği üzerinde düşünmek ve doğru bir şekilde yapmak, çalışmalar için etik bir çerçeve oluşturmaya fayda sağlayacaktır (Caplan vd. 2015).

2.10. Bal Arılarında Yapılan Programlanabilir Gen Düzenleme Çalışmaları

Bal arılarında CRISPR-Cas9 çalışması ilk kez 2016 yılında Takeo Kubo grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Kohno vd. (2016), *in vivo* gen fonksiyon analizi gerçekleştirmek için bal arılarında temel bir genom düzenleme tekniği oluşturmuşlardır. Araştırmacılar protokolün uygulanabilirliğini test etmek için, bal arısı gelişimini etkileme ihtimali düşük olan bir gen hedeflemişlerdir. Major royal jelly protein 1 (mrjp1) genini CRISPR-Cas9 ile başarı ile susturan (knockout) araştırmacılar en azından pupa aşamasına kadar normal erkek arı gelişimi için bu genin vazgeçilmez olduğunu bildirmişlerdir. Aynı grup başka bir çalışmada, erkek arılarda mKast genini (middle-type Kenyon cell-preferential arrestin-related protein) CRISPR-Cas9 yaklaşımıyla devre dışı bırakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda, mKast geninin erkek arılarda normal gelişim ve cinsel olgunlaşma için vazgeçilmez olduğunu bildirmişlerdir (Kohno ve Kubo 2018). Hu vd. (2019), Mrjp1 genini ve gelişim süreçlerinde yer alan bir transkripsiyon faktörü olan Pax6 genini hedefledikleri çalışmalarında, CRISPR-Cas9 gen düzenleme verimliliğini %70'in üzerine çıkarmayı başarmışlardır.

CRISPR ile indüklenen ilk morfolojik mutant işçi arıların üretildiği bir çalışmada (Roth vd. 2019), boyut polifenizmini yönlendiren tek faktörün beslenme olup olmadığını ve cinsiyet belirleme yolağından daha fazla genetik talimat gerekip gerekmediğini CRISPR-Cas9 kullanarak araştırmışlardır. CRISPR-Cas9 yoluyla indüklenen mutantların, beslenmeye verdikleri yanıtın, fem (feminizer) geni tarafından etkinleştirilen bir genetik programa dayandığını bildirmişlerdir.

Sinakevitch vd. (2020) yatığı bir çalışmada bal arılarında böcek GABAA reseptörü alt birimi Dielrin'e direnç (RDL) ve metabotropik glutamat reseptörü mGluR1'e (mGluRA) karşı geliştirilen antikörlerin özgünlüğünü kontrol etmek amacıyla CRISPR-Cas9 kullanmışlardır. Bu amaçla; RDL ve mGluR1 genleri, CRISPR-Cas9'un ocellar sistem yoluyla yetişkin bal arılarının beyne enjekte edilmesiyle devre dışı bırakılmıştır. Reseptörlerin dağılımı, enjeksiyondan 48 saat sonra bal arısı beyinlerinde analiz edilmiştir. Her ikisi için de mGluR1 CRISPR-Cas9 veya RDL CRISPR-Cas9 alımı başarılı olduğunda, karşılık gelen antikör boyama seviyesinde önemli ölçüde azalma görülmüştür. Bu da yetişkin arılarda KO prosedürünün başarılı olduğunu göstermiştir.

Yakın zamandaki CRISPR çalışmalarının hedefleri duyuşal reseptör genleri olmuştur. Değirmenci vd. (2020), CRISPR-Cas9 kullanarak bal arılarında elde edilen anlamsız (nonsense) mutasyonlarla ölçülebilir bir davranış değışikliğı gerçekleştirmişlerdir. Bal arılarının, temel karbonhidrat kaynağı olan nektarların ana bileşenlerini sakkaroz, glikoz ve früktoz oluşturmaktadır. Bal arıları bu şekerleri algılayabilen (AmGr1, AmGr2 ve AmGr3) üç farklı reseptör eksprese etmektedir. Araştırmacılar, işçi yumurtalarında CRISPR-Cas9 aracılığıyla, AmGr3 geninde anlamsız mutasyonlar oluşturduğunda, ortaya çıkan mutantlar, fruktoza karşı yanıt kaybı göstermiştir fakat şükroza karşı tepkileri normal olmuştur. Chen vd. (2021), orco (odorant receptor (OR) co-receptor) mutasyonlarının, sosyal davranış ve kimyasal iletişim için model organizma olan bal arısı beyninin gelişimini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. CRISPR ile düzenlenmiş mutant arıların, yabani tip arılara kıyasla anten lobunda önemli ölçüde daha az glomerül içermekte olduğunu ancak her glomerül hacminin ortalama olarak daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. RNA-Dizileme (RNA-Seq), orco geninin susturulmasının aynı zamanda sinirsel gelişimle ilgili genler ve koku reseptör genleri dahil olmak üzere antende yüzlerce genin farklı ifadesine neden olduğunu ve böylece kokuya özgü bir kncokout gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

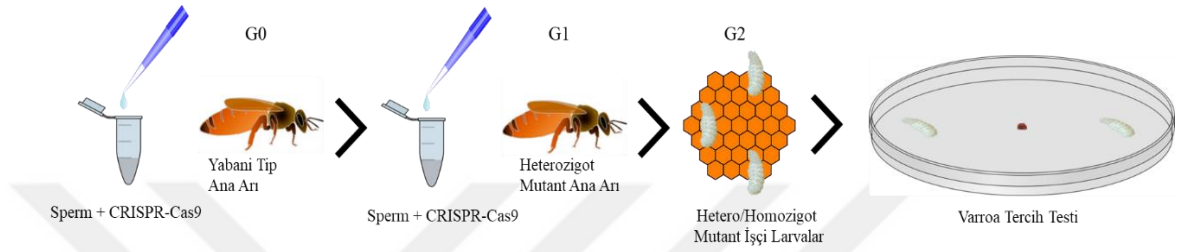
2021 yılında ilk kez, gözle ayırt edilebilen homozigot mutant erkek arılar Nie vd. (2021) tarafından üretilmiştir. Bu çalışmada bal arılarında Amyellow-y geninin pigmentasyondaki fonksiyonel rolünü anlamak için CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak bu gen üzerinde KO gerçekleştirmişlerdir. Düzenlenmiş mozaik işçi ve mutant erkek arıların kütiküllerinde siyah pigmentin azaldığını bildirmişlerdir.

Geng (2022), CRISPR-Cas9 ve görsel koşullandırma deneylerinin bir kombinasyonu yoluyla bal arısındaki opsin genlerinin işlevlerini araştırmıştır. CRISPR-Cas9 aracılığıyla Amlop1 ve Amlop2 yetişkin mutant arıları başarıyla oluşturmuştur. Mutant arıları, elektrik şoku cezasına dayalı olarak mavi ışığa doğru fototaksiyi engellemeyi öğrendikleri bir şartlandırma protokolü kullanarak test etmiştir. Amlop2 mutantları, mavi ışığa fototaksiyi engellemeyi öğrenirken, Amlop1 mutantları bunu başaramamıştır.

Bal arılarında; mrjp1, mKast, pax6, fem, Rdl, mGlutR1, Amgr3, orco, Amyellow-y, Amlop1 ve Amlop2 dahil birçok gen, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak susturulmuş (KO) ve bu teknolojinin gen fonksiyonlarının incelenmesi için uygun olduğu gösterilmiştir. Ancak, Varroa ile ilgili herhangi bir gende ilişkili bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

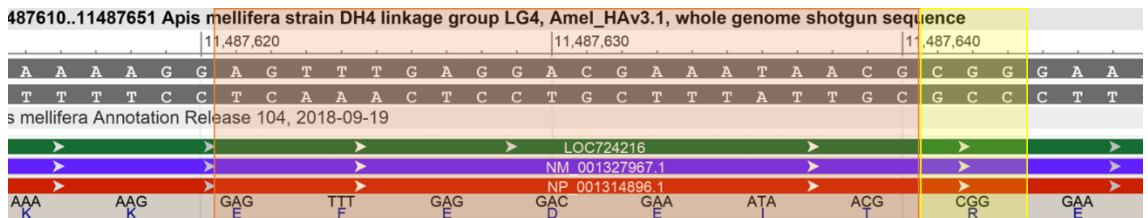
Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen çalışmalar sırasıyla aşağıda verilmiştir. Olgun erkek arılardan sağılan spermilere CRISPR-Cas9 uygulanarak JHAMT geni susturulmuş (KO) ve bu spermiler kullanılarak suni tohumlama yoluyla genç ana arılar döllelmıştır. Aynı işlemler tekrarlanarak iki generasyon kraliçe arı yetiştirilmiş ve JHAMT geni susturulmuş mutant arılar üretilmiştir. JHAMT geni susturulmuş larvalar ve yabani tip (wild-type) larvalar Varroa tercih testine tabi tutulmuştur. Tercih sonuçları istatistiksel olarak analiz edilerek JHAMT geni ile Varroa'nın larva tercihi arasındaki ilişki ortaya çıkartılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan çalışmaların grafiksel özeti

3.1. sgRNA ve Cas9 Proteininin Hazırlanması

Bu tez projesinde, Varroa'nın larva tercihinde rol oynadığı düşünülen Jüvenil Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) geninin düzenlenmesi hedeflenmiştir. NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanından elde edilen JHAMT (Gene ID: 724216) için gen sekansına dayanarak, bal arısı genomunda 'hedef dışı' olmayan uygun genom düzenleme hedef bölgeleri (N20NGG) araştırılmıştır. Genin hangi bölgesinin hedefleneceğinin belirlenmesinde, CRISPR-Cas9 ve TALEN için geliştirilmiş bir web aracı olan CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) çevrimiçi yazılımı kullanılmıştır. Yazılım; kodlama bölgeleri (coding regions), UTR'ler (Untranslated Region: translate edilmeyen bölgeler), birleşme yerleri (splice site) ve bireysel ekzonlar dahil olmak üzere protein kodlayan ve kodlamayan genlerin alt bölgelerine esnek hedefleme imkânı sağlamak ve görsel çıktılar oluşturmaktadır. Hedef olarak 20 nükleotidlik 5' AGTTTGAGGACGAAATAACG 3' bölge seçilmiştir. Hedef bölgenin seçiminde on-target ve off-target bölgeler yazılım aracılığıyla değerlendirilmiş ve verimliliği (efficiency) en yüksek olan bölge seçilmiştir (Şekil 3.2).



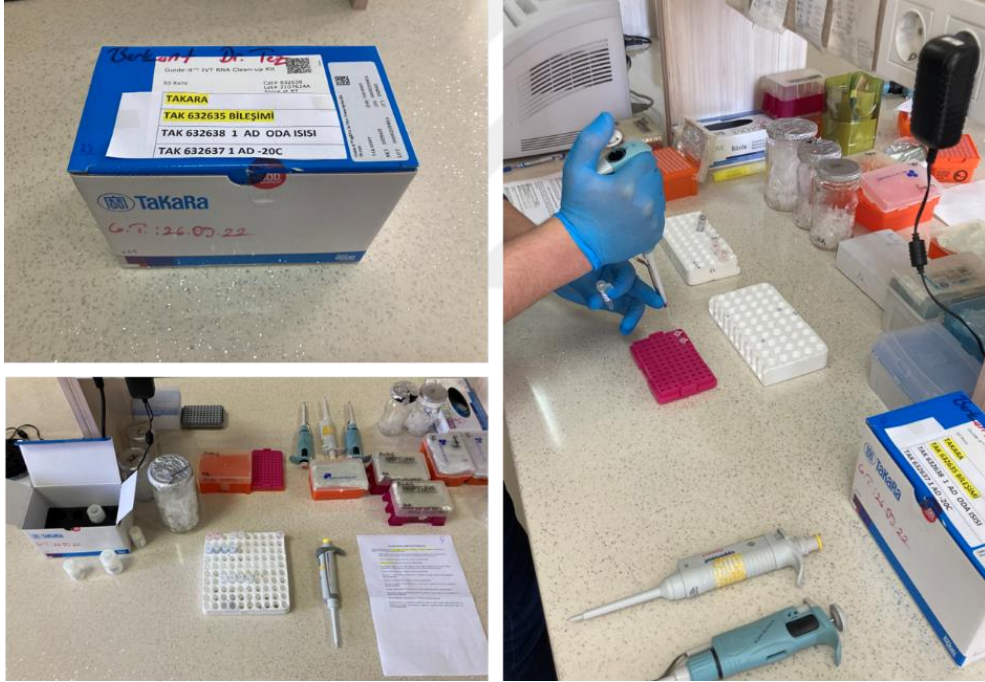
Şekil 3.2. NCBI kayıtlarından yararlanılarak JHAMT geni ekzon 5 bölgesi üzerinde bulunan 20 nükleotidlik hedef sekans (sarı renkli alan PAM sekansını belirtmektedir) ve kodladığı amino asitler

sgRNA'lar; T7 polimeraz bağlanma bölgesi, sgRNA hedef dizisi içeren ileri (Çizelge 3.1) ve geri primer ile PCR (Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler) yaklaşımıyla Guide-it sgRNA *in vitro* Transcription Kit (Takarabio, Japonya) kullanılarak üretilmiştir (Şekil 3.3). Guide-it Scaffold şablonu ile geri primer kit bileşenlerinden sağlanmıştır. Üretilen sgRNA'lar jel elektroforez (Thermo Scientific EC 300 XL) ve BioDrop spektrofotometre (BioDrop µLITE) ile değerlendirilmiştir. Cas9 proteini (Guide-it Recombinant Cas9) ticari olarak (Takarabio, Japonya) satın alınmıştır.

Çizelge 3.1. sgRNA template üretimi için kullanılan Takarabio'nun (Japonya) yönergelerine göre dizayn edilen ileri primer

İleri primer*	CCTCTAATACGACTCACTATAAGAGTTTGAGGACGAAATAACGGTTTAAGAGCTATGC
---------------	--

* Kırmızı renkli bölge: ekstra sekans, Mor renkli bölge: T7 polimeraz bağlanma bölgesi, Mavi renkli bölge: transkripsiyon başlangıç bölgesi, Siyah renkli bölge: sgRNA hedef sekansı (NGG içermeyen), Yeşil renkli bölge: Scaffold template bağlanma sekansı.



Şekil 3.3. Guide-it sgRNA *in vitro* Transcription Kit (Takarabio, Japonya) ile sgRNA'ların üretilmesi için gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarından görüntüler

3.1.1. sgRNA'nın PCR ile *in vitro* transkripsiyonu

- sgRNA şablonunun amplifikasyonu için kullanılan PCR bileşenleri (Çizelge 3.2.) 200 µl'lik bir PCR tüpünde birleştirilmiş ve iyice karışması için kısa süre vorteks yapıldıktan sonra santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.2. sgRNA amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Reaktifler	Miktar (μl)
PrimeSTAR Max Premix (2X)	12.5
Guide-it Scaffold Şablonu	1
İleri Primer (10 μM)	0.5
RNaz İçermeyen Su	11
Toplam	25

- Reaksiyonlar, önceden ısıtılmış PCR cihazına koyularak aşağıda Çizelge 3.3'te verilen program çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.3. sgRNA şablonu amplifikasyonu için gereken PCR programı

98°C	10 saniye	33 döngü
68°C	10 saniye	
4°C	∞	

- Elde edilen 5 μl PCR ürünü 50 bp DNA ladder ile %2 agaroz jelde yürütülerek yaklaşık ~130 bp büyüklüğünde tek bir bant olarak sgRNA şablonları görülmüştür (Şekil 3.4).

**Şekil 3.4.** sgRNA ileri primeri kullanılarak elde edilen sgRNA şablonunun jel görüntüsü

- sgRNA şablonları, saflaştırılmadan doğrudan *in vitro* transkripsiyon (IVT) reaksiyonu için şablon olarak kullanılmıştır. Aşağıda Çizelge 3.4'te verilen bileşenler 200 μl'lik bir PCR tüpünde birleştirilmiştir. Reaktiflerin iyice karışması için kısa süre vorteks yapıldıktan sonra santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.4. sgRNA IVT için kullanılan PCR reaksiyonu bileşenleri

Reaktifler	Miktar (µl)
sgRNA PCR Şablonu	5
Guide-it <i>in vitro</i> Transkripsiyon Tamponu	7
Guide-it T7 Polimeraz Karışımı	3
RNaz İçermeyen Su	5
Toplam	20

- Reaksiyonlar önceden ısıtılmış PCR cihazına koyularak aşağıda Çizelge 3.5'te verilen program çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.5. sgRNA IVT için gereken PCR programı

37°C	4 saat
4°C	∞

- 4 saatlik inkübasyonun ardından 20 µl IVT reaksiyonuna 2 µl Rekombinant DNaz-I (RNaz içermeyen) eklenmiştir. Reaktiflerin iyice karışması için kısa süre vortekslenip ardından santrifüj edilmiştir.
- Reaksiyonlar önceden ısıtılmış PCR cihazına koyularak aşağıda Çizelge 3.6'da verilen program çalıştırılmıştır. Ardından PCR ürünleri, Guide-it IVT RNA Clean-up kullanılarak saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.6. sgRNA inkübasyonu için gereken PCR programı

37°C	15 dakika
4°C	∞

3.1.2. Transkribe edilen sgRNA'ların saflaştırılması

sgRNA saflaştırılmadan önce, 24 ml %96-100 etanol eklenerek IVT yıkama tamponu hazırlanmış ve aşağıdaki adımlar sırasıyla yerine getirilmiştir:

- Toplam hacim 100 µl olacak şekilde reaksiyon karışımına 78 µl RNaz içermeyen su eklenmiştir. 100 µl'nin tamamı 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 30 µl IVT Bağlanma Tamponu eklenerek, 5 saniye vortekslenmiştir.
- 130 µl izopropanol eklenmiş ve 5 saniye vortekslenmiştir.

- Toplama Tüpüne, IVT RNA Clean-up Spin Kolonu yerleştirilmiş ve örnek kolona yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 11.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süzüntü atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- 600 µl IVT Yıkama Tamponu eklenmiş ve 11.000 g'de 30 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Süzüntü atılarak kolon tekrar Toplama Tüpüne yerleştirilmiştir.
- 250 µl IVT Yıkama Tamponu eklenmiş ve 11.000 g'de 2 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- IVT RNA Clean-up Spin Kolonu yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kolonun silika membranına doğrudan 10 µl RNaz içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 11.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- BioDrop cihazı ile 1 µl saflaştırılmış sgRNA'nın kalite ve miktarı ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda 1 µl örnekte 0.9 µg RNA tespit edilmiştir. sgRNA'lar transfeksiyon işleminde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Tez Materyali Arıların Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan bal arıları Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) arılığında sağlanmıştır (Şekil 3.5). Bu tez projesi kapsamında 10 adet JHAMT geni susturulmuş kraliçe arı üretilmesi hedeflenmiştir. Ancak, olası kraliçe kayıpları göz önünde bulundurularak 20 adet kraliçe arı ile çalışılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan genç ana arılar suni tohumlama gerçekleştirilinceye kadar anasız kolonilerde ve ana arı kafesinde muhafaza edilmiştir. Yeterli miktarda sperm elde etmek için 20 farklı kovandan 10'ar farklı erkek arı toplanmıştır. CRISPR uygulanmış ana arılar birkaç çerçevesi ruşet kovanlarda muhafaza edilmiştir. Gen düzenlenmiş arıların çevre üzerinde bir risk oluşturmaması için kovanlarda ana arı ızgarası kullanılarak ana arıların ve erkek arıların doğaya kaçmaları engellenmiştir. Aynı zamanda petekler düzenli olarak kontrol edilmiş ve erkek arı gözleri oluşması durumunda gözler bozulmuştur.



Şekil 3.5. Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği (MAYBİR) İncirköy arılığı

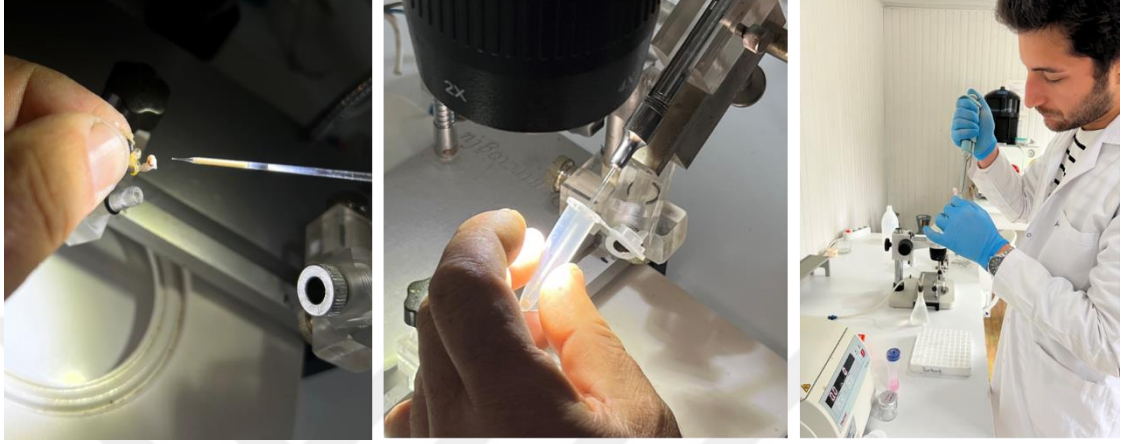
3.2.1. Spermelerin eldesi ve CRISPR-Cas9 sistemi ile transfeksiyonu

- Spermeler 10 farklı kovandan toplanan 200 adet olgun erkek arıdan elde edilmiştir. Erkek arı kafeslerinde laboratuvara taşınan arıların karın kısmının elle sıkılmasıyla endofallusun dışarı çıkması sağlanmış ve spermeler, içinde 1 ml salin (%2 gentamisin) solüsyonu bulunan şiringalar ile toplanmıştır. Salin solüsyonu ile spermelerin karışmaması amacıyla bir miktar hava boşluğunun ardından sperm şiringaya çekilmiştir.
- Toplam 200 erkek arıdan elde edilen spermeler (~100 µl) mikrosantrifüj tüplerinde toplanmıştır.
- Sperm hücrelerinin sgRNA ve Cas9 proteini (Ribonükleoprotein (RNP) kompleksi) ile transfeksiyonu Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Suni tohumlama için sperm ile CRISPR-lipofektamin kompleksi karışımının hazırlanması:

- Birinci tüpte; 100 µl Opti-MEM ortamı, 10 µl (100 µg) Cas9 proteini, 23 µl (~20 µg) gRNA, 250 µl Cas9 Plus reaktifi ile karıştırılmıştır.
- İkinci tüpte; 150 µl CRISPRMAX reaktifi, 100 µl Opti-MEM ortamında seyreltilmiştir.

- Solüsyonlar ayrı bir tüpe aktarılıp iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir böylece Cas9 nükleaz/sgRNA/transfektamin reaktif kompleksi elde edilmiştir.
- Hazırlanan kompleks sperm hücrelerinin bulunduğu ortama eklenmiştir. Ardından transfeksiyon için 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Erkek arılardan spermlerin toplanması ve CRISPR kompleksi ile muamele edilmesi

3.2.2. Ana arıların suni tohumlanması

Suni tohumlama yapılacak olan genç ana arılar, ana arı kafeslerinde laboratuvara taşınmıştır. İşleme başlamadan önce strafor kutularda ana arılara 2 dakika boyunca CO₂ verilerek bayılması sağlanmıştır. Ana arı, abdomeninin son 5-6. segmenti dışarıda kalacak şekilde suni tohumlama cihazındaki (Demircioğlu Suni Tohumlama Cihazı) tüpe baş aşağı olacak şekilde yerleştirilmiştir. Burada da CO₂ uygulamasına maruz bırakılarak ana arının yapay tohumlama işlemi süresince hareketsiz kalması sağlanmıştır. CO₂ akış miktarı dakikada 35 ml düzeyinde olmuştur (Güler 2006). Ventral ve dorsal kancalar yardımıyla ana arının iğne çemberi mikroskop altında açılmıştır, açma işinde önce ventral kanca yardımıyla iğne çemberine girilmiştir ve ventralin son sternumu yakalanarak şırıngadaki 2 µl transfekte sperm karışımından her ana arıya enjekte edilmiştir (Cobey 2007). Tüm işlemler oda sıcaklığında (25-28°C) gerçekleştirilmiştir. Her tohumlama işleminden sonra ana arının enfekte olmaması için karın kancası, tutaçlı iğne kancası, ana arı tutma tüpü, ana arı yetiştirme yardımcı tüpü ve şırınga ucundaki cam uç %70'lik etanol ile dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Ana arının, suni tohumlama cihazında transfekte spermlerle tohumlanması

Her neslin suni tohumlaması yapılırken, kontrol grubu olarak 3 adet ana arı CRISPR solüsyonu kullanılmadan sadece sperm ile tohumlanmıştır. Tohumlama işlemlerinin ardından ana arılar, numaralı etiketler ile işaretlenerek kayıt altına alınmış ve her biri ayrı ayrı bakıcı işçilerin bulunduğu ruşet kovanlara aktarılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Tohumlanan numaralandırılmış ana arının ruşet kovanlara aktarımı

3.2.3. CRISPR bireylerin yetiştirilmesi

Şekil 3.10'da görselleştirilerek özetlenen işlemler aşağıda sıralanmıştır.

- Transfekte edilen sperm solüsyonu kullanılarak, 20 adet çiftleşmemiş ana arı suni olarak tohumlanmıştır (G0). Döllenen bu ana arılar, genç işçilerin bulunduğu anasız ruşet

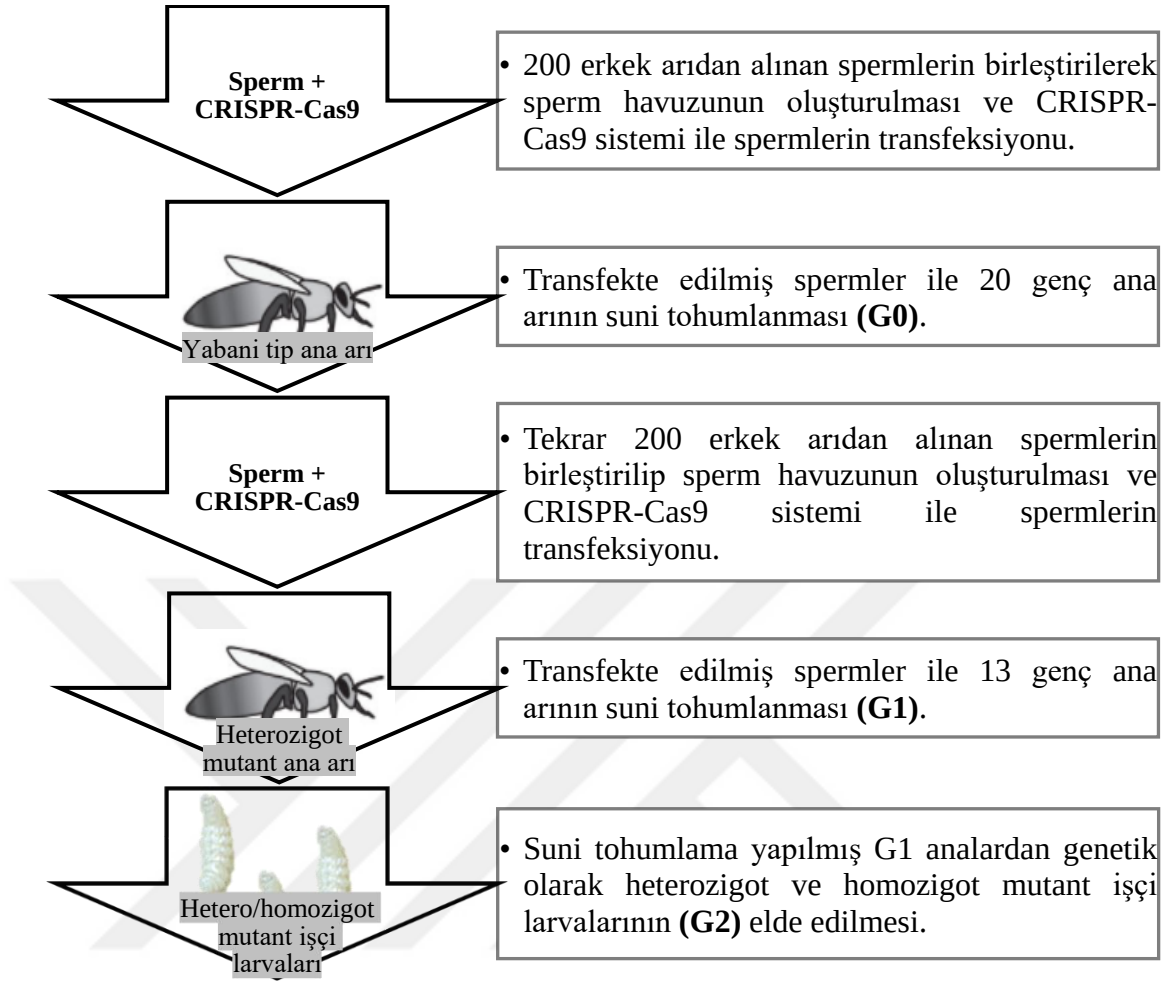
kovanlara verilmiştir. Bu ana arıların ürettiği yavrular teorik olarak genetik bakımdan heterozigot mutant durumdadır.

- Bu ana arıların yumurtlama performansını takiben larvaları ana arı yüksüklerine aktararak genç ana arılar yetiştirilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Ana arı yüksüklerinde G1 ana arıların yetiştirilmesi

- Üretilen ana arılardan 13 tanesi, tekrardan 200 erkekten alınan ve CRISPR kompleksi ile birleştirilen spermillerle suni tohumlama yoluyla döllenmiştir (G1).
- Döllenmiş ana arılar genç işçilerin bulunduğu ruşetlere aktararak yumurtlama performansları takip edilmiştir. Sonuç olarak döllenmiş yumurtalardan çıkan işçi larvalar genetik bakımdan heterozigot ve homozigot mutantlar olmuştur (G2). G2 işçi arı larvaları *in vitro* Varroa konukçu testinde kullanılmak üzere laboratuvara taşınmıştır. Ayrıca, her yetiştirme basamağında nesillerden örnek bireyler alınarak mutant olup olmadığı Sanger sekanslama yöntemi ile kontrol edilmiştir.



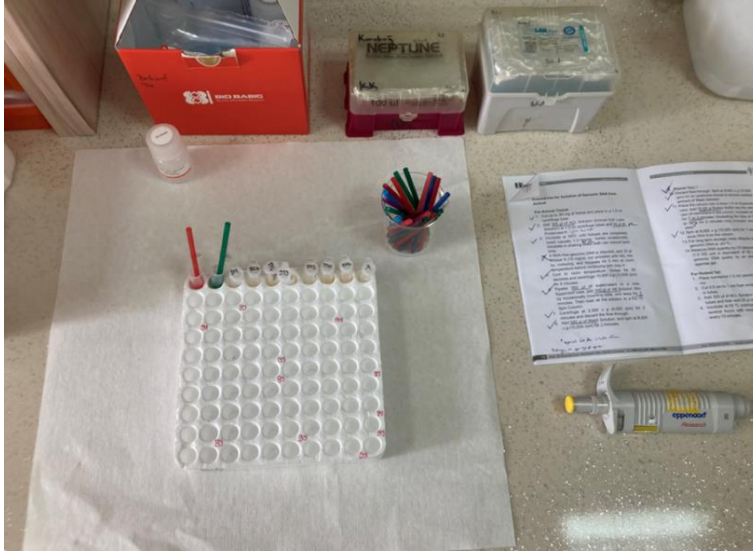
Şekil 3.10. CRISPR-Cas9 yöntemiyle JHAMT geni susturulmuş işçi arıların yetiştirilmesi

3.3. Total DNA Ekstraksiyonu

Total DNA ekstraksiyonunda Bio Basic Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Bio Basic, ABD) kullanılmıştır. Ekstrakte edilen DNA'nın kalite ve kantite kontrolleri jel elektroforezi (%1 agaroz, 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE), 1,5 µl Etidyum Bromür) ve BioDrop cihazı ile yapılmıştır.

Total DNA ekstraksiyonu aşamaları:

- Bal arısı larvaları önceden numaralandırılmış 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve steril plastik çubuklar yardımıyla homojenize edilmiştir. Her bir birey için farklı plastik çubuk kullanılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Larvaların steril plastik çubuklar yardımıyla homojenizasyonu

- Homojenize dokuların üzerine 300 µl ACL solüsyonu ve 20 µl proteinaz K eklenmiştir.
- 1 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda 55°C'de, ara ara vortekslenerek inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına soğutularak 20 saniye vortekslenmiştir ve 5 dakika 10.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Numaralandırılmış yeni mikrosantrifüj tüplerine 300 µl süpernatant aktarılacak üzerine 300 µl AB solüsyonu eklenmiştir. Ara ara tüpler ters düz edilerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından tüm karışım, EZ-10 spin kolonuna aktarılmıştır.
- 2.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süzöntü atılmıştır.
- 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek, 8.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir ve süzöntü atılmıştır.
- Yıkama solüsyonundan tamamen kurtulmak için ek olarak 1 dakika daha 8.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Kolonun tam orta kısmına 30-50 µl elüsyon tamponu eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Kolondan DNA'yı ayırtırmak için 1 dakika boyunca 8.000 g'de santrifüj edilmiştir.

- Elde edilen DNA'lar bir sonraki aşamada kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.4. Genotipleme Analizi

CRISPR bireylerin JHAMT gen bölgesindeki meydana gelen indelleri belirlemek için öncelikle PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; DNA üzerinde hedef gene özgün olarak tasarlanan Çizelge 3.7'de verilen primerler, Çizelge 3.8'de verilen reaksiyon bileşenleri (NucleoGene Hot Start PCR Master Mix (2X), NucleoGene, Türkiye) ve Çizelge 3.9'da verilen PCR programı kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan JHAMT gen fragmentlerinin nükleotid dizileri çift yönlü olarak Sanger sekanslama yöntemi ile belirlenmiştir. Böylece mutasyon olan ve olmayan bireylerin ayrımı kesinlik kazanmıştır. Gen fragmentlerinin sekanslanması Ankara'da bulunan "Sugenomik Biyoteknoloji" firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. PCR için JHAMT genine özgü tasarlanan primerlerin tanımlayıcı bilgileri (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>)

İleri Primer Kordinatları	İleri Primer	İleri Primer Tm (°C)	Geri Primer Kordinatları	Geri Primer	Geri Primer Tm (°C)	Ürün Büyüklüğü (bp)
NC_037641.1 :11487520- 11487542	CGACGAGG CAGAAATA Ttgaag	61.1	NC_037641.1 :11487787- 11487809	ccattccatttttaC GACGAAT	60.1	289

Çizelge 3.8. JHAMT geninin amplifikasyonu için gereken PCR reaksiyonu bileşenleri

Reaktifler	Miktar (µl)
Hot Start Master Mix (2X)	10
İleri Primer (10 µM)	0,5
Geri Primer (10 µM)	0,5
DNA Kalıbı	2
Nükleaz Free Su	7
Toplam	20

Çizelge 3.9. JHAMT geninin amplifikasyonu için gereken PCR programı

Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	3 dakika	
Denatürasyon	95°C	30 saniye	
Bağlanma	59°C	30 saniye	35 döngü
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	5 dakika	
Soğutma	4°C	∞	

PCR ürünleri, 1,5 µl Etidyum Bromür içeren %2'lik agaroz jelde 80 voltta 40 dakika koşturularak kontrol edilmiştir. Elektroforezde tampon çözeltisi olarak 1X TAE tamponu kullanılmıştır.

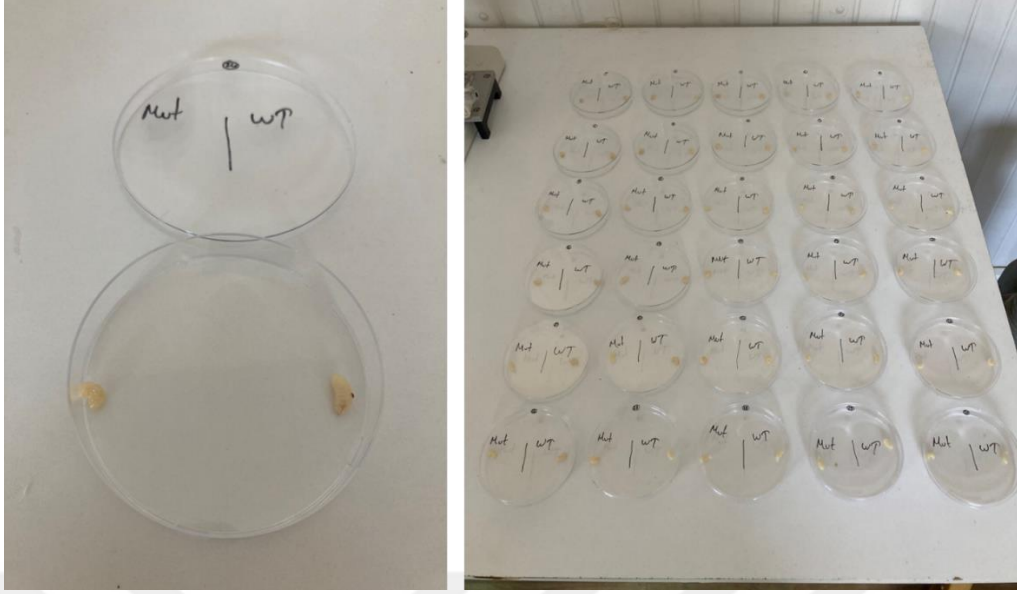
3.5. Varroa'nın Konukçu Tercih Testi

Varroa örnekleri kolonilerdeki erkek arı peteklerinden elde edilmiştir. Laboratuvar ortamına getirilen peteklerde bulunan gözler pens yardımıyla açılarak Varroa'lar tek tek toplanmıştır (Şekil 3.12) ve testte kullanılıncaya kadar petri kaplarında beyaz-göz fazındaki erkek arı pupalarıyla beslenmiştir. Varroa'lar petri kapları içerisinde 28° C'de ve %75 nispi nem (RH) ayarlı inkübatörde muhafaza edilmiştir (Huang vd. 2017).



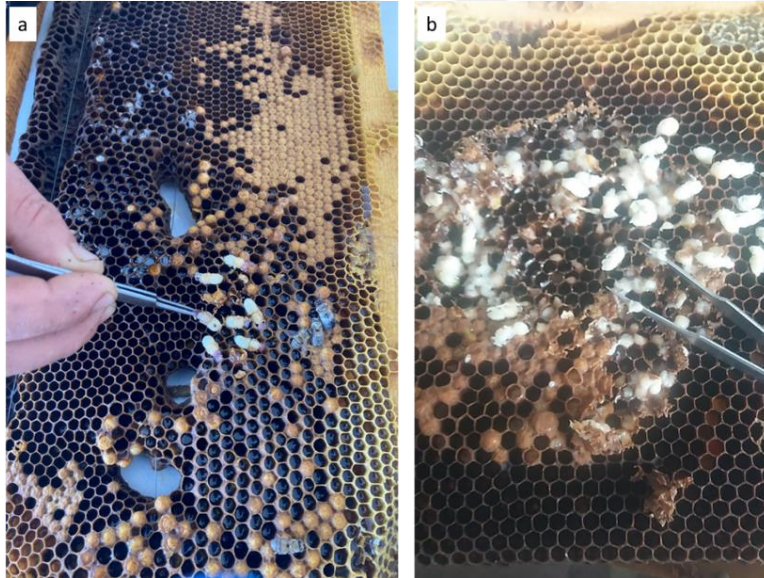
Şekil 3.12. Erkek arı gözlerinden pens yardımıyla Varroa'ların toplanması

Varroa'nın konukçu tercihinde JHAMT geninin rolünü belirlemek için Rosenkranz (1993) ve Nazzi vd. (2001) tarafından tarif edilen test yönteminin uyarlanmış versiyonu kullanılmıştır. 100 x 20 mm petri kutusuna merkezden eşit uzaklıklarla (4 cm) 2 adet işçi larvası (4. instar dönemi) yerleştirilmiştir. Larvalardan bir tanesi knockout mutant, diğeri ise kontrol grubu işçi larvalarından seçilmiştir. Kutunun tam merkezine bir adet yetişkin dişi Varroa, fırça yardımıyla yerleştirilmiştir. Varroa'nın yerleştirildiği andan itibaren kronometre tutulmuş ve 1 saat beklenmiştir. Bu süre boyunca her akar 15 dakikada bir kontrol edilerek konumu not edilmiştir. Kutuların üzeri ışık geçirmeyen bir örtü ile örtülmüştür ve 34,5°C'de ve %60-70 bağıl nem içeren bir odada tutulmuştur. Test sonunda mutant larvaları tercih eden Varroa'lar "tercih var (1)" ve kontrol larvaları tercih eden Varroa'lar "tercih yok (0)" olarak skorlanmıştır. Her akar ve petri kutusu yalnızca bir kere kullanılmıştır. Yeterli örneklem büyüklüğü elde etmek için toplamda 30 test gerçekleştirilmiştir (Şekil 3. 13).



Şekil 3.13. Petri kutularında *in vitro* konukçu tercih testlerinin gerçekleştirilmesi

Bu teste ek olarak; rastgele seçilen 3 adet kontrol grubu ve 3 adet JHAMT geni susturulmuş kolonilerden alınan birer petekte 100 adet kapalı yavru gözü açılarak Varroa sayımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3. 14). Bu şekilde JHAMT geninin Varroa'nın *in vivo* koşullardaki tercih durumuna etkisi de belirlenmiştir.



Şekil 3.14. a) Kontrol grubu petek gözlerinde Varroa sayımı **b)** Knockout mutant petek gözlerinde Varroa sayımı

3.6. İstatistiksel Analizler

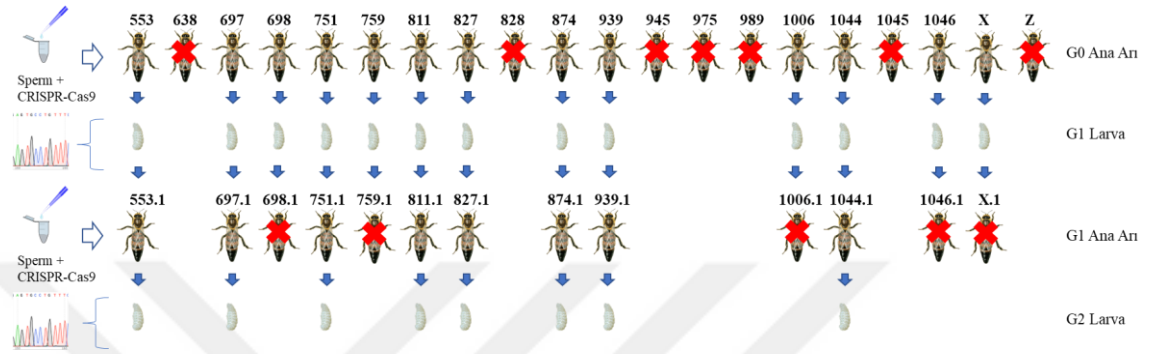
In vitro koşullarda Varroa konukçu tercihinin, JHAMT geninin susturulmasına bağlı olup olmadığı Ki-kare testiyle, petek gözlerindeki Varroa sayısının JHAMT geninin susturulmasına bağlı olup olmadığı ise Mann Whitney U testiyle analiz edilmiştir (IBM SPSS Statistics v.24). Gen fragmentlerinin sekans analizi SnapGene Viewer 6.2.2 ve DECODR v3.0 yazılımları ile gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Genotipleme Analizi Bulguları

Gen düzenlenmiş işçiler yetiştirilirken; her bir nesilde elde edilen bireylerin mutant olup olmadığının doğrulanması için JHAMT gen bölgesi PCR ile çoğaltılarak sanger sekans yöntemi ile DNA dizisi belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan ana arılar ve generasyonların oluşturulması Şekil 4.1’de görselleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Proje materyalini oluşturan kraliçe arılar ve CRISPR-CAS9 uygulamalarının sonucu üretilen generasyonlar. Deneme dışı arılar kırmızı ile işaretlenmiştir

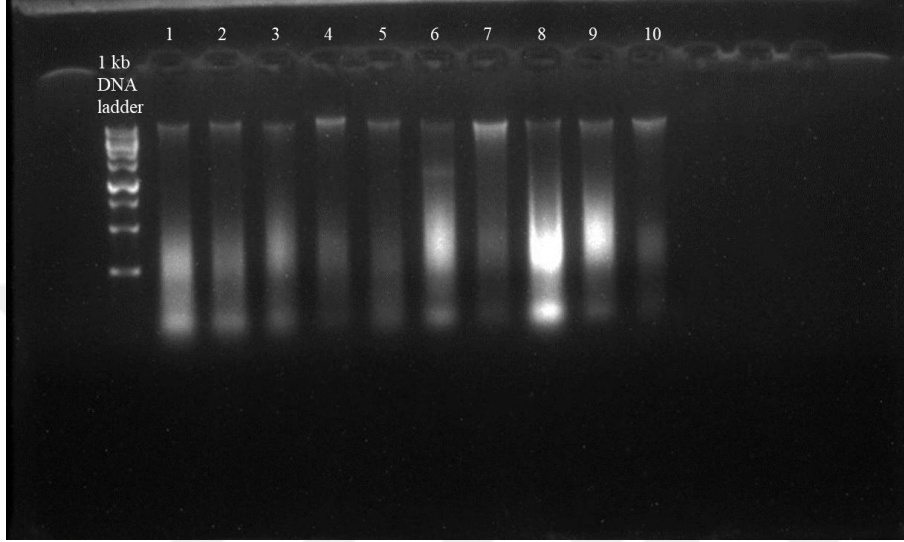
Transfekte spermlemlerle tohumlanan 20 ana arı numaralandırarak ruşet kovanlara verilmiştir (G0). Bu ana arılardan 7 adeti (638, 828, 945, 975, 989, 1045, Z) yumurtlama gerçekleşmemesinden, ruşet kovandaki işçi arıların kabul etmemesinden ya da diğer biyolojik sebeplerden dolayı deneme dışı tutulmuştur. Transfekte spermlemler ile tohumlanan ve sağlıklı bir şekilde 5 gün içerisinde yumurtlamaya başlayan 13 ana arı (G0) ile deneme sürdürülmüştür. Bu 13 kraliçeden larva transferi yöntemiyle 13 adet heterozigot mutant olduğu düşünülen genç kraliçe yetiştirilmiştir (G1). Aynı zamanda G0 anaların işçi arı larvalarından (G1 larva) birer örnek alınıp DNA izolasyonu yapılarak (Şekil 4.2) sgRNA hedefini içeren JHAMT gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.3). PCR sonucu elde edilen ampikonların Sanger sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans sonuçlarına göre, G1 generasyonunda CRISPR-Cas9 transfekte spermlemler ile yapay tohumlanmış toplam 13 anadan 6 tanesinin sgRNA hedef bölgesinde hedeflenen mutasyonların başarıyla gerçekleştiği saptanmıştır.

Kontrol grubu arıların yumurtlaması ise 10 gün sonra başlamıştır. Aynı işlemler eş zamanlı olarak kontrol grubu için de gerçekleştirilmiştir.

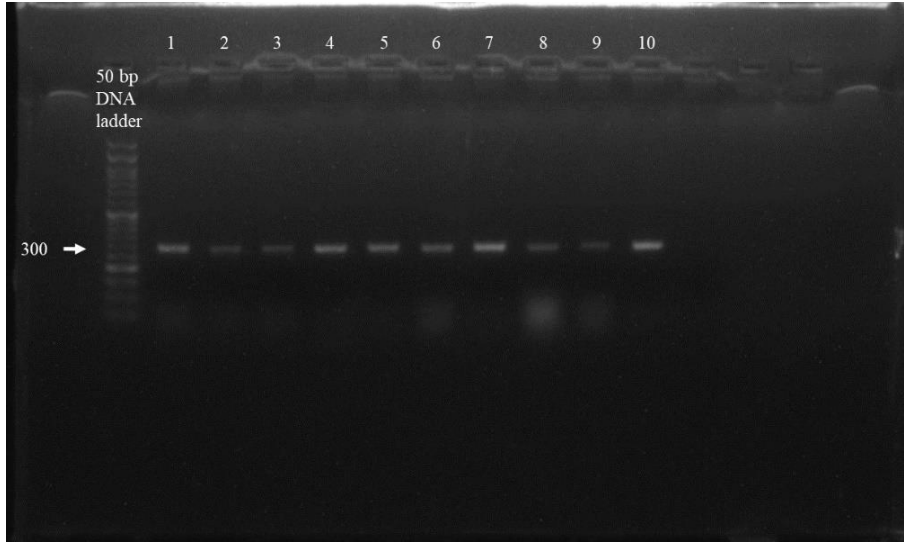
G1 generasyonunda kontrol grubu, gen düzenlenmemiş ve gen düzenleme gerçekleşmiş larvaların JHAMT geni DNA dizileri ve DECODR yazılımında hesaplanan bazı tanımlayıcı değerler Şekil 4.4-11’de verilmiştir.

G1 kraliçelerden JHAMT geni susturulmuş işçi arılar (G2) yetiştirmek için CRISPR-Cas9 uygulamaları tekrarlanmıştır. Tohumlanan ana arıların yumurtlama süresi 6 günü geçmemiştir. Transfekte spermlemler ile yapay tohumlanan G1 kraliçelerin sağlıklı bir şekilde yumurtlamayı başaran 8 adetine ait birer larva (G2) örneği alınıp DNA

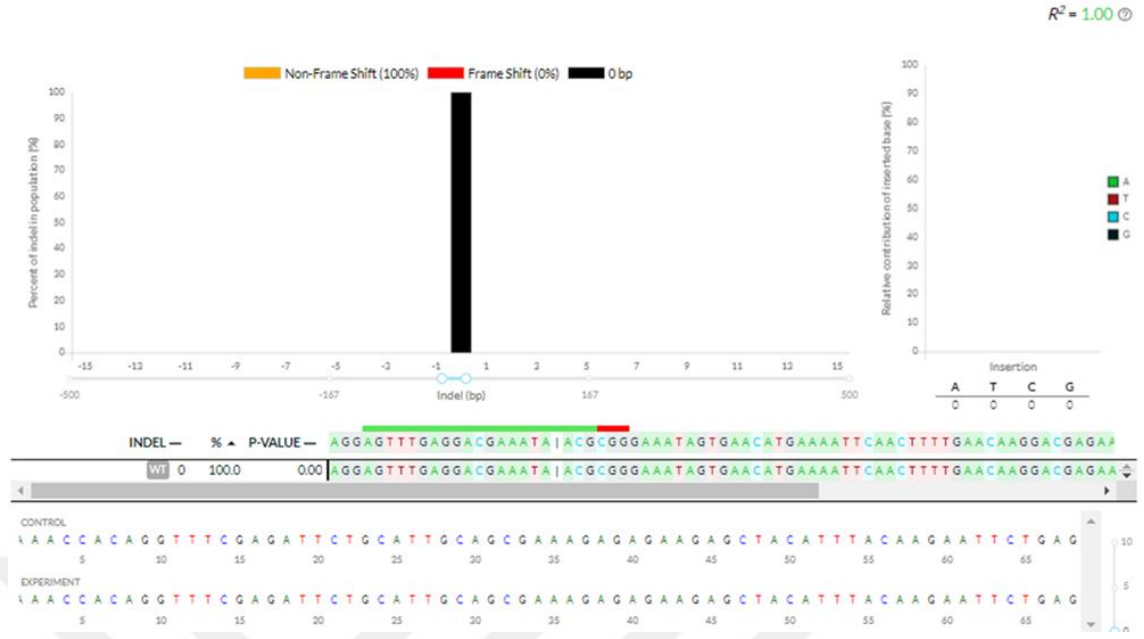
izolasyonu yapılarak (Şekil 4.12) sgRNA hedefini içeren JHAMT gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.13). PCR sonucu elde edilen ampliconların sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans sonuçlarına göre, 8 adet G1 kraliçenin ürettiği G2 larvalardan 3 larvada sgRNA hedef bölgesinde mutasyonların tam anlamıyla başarıldığı tespit edilmiştir. Aşağıda Şekil 4.14-18’de G2 generasyonu kontrol grubu, gen düzenlenmemiş ve gen düzenleme gerçekleşmiş larvaların sekansları ile DECODR yazılımı sonucu elde edilen tanımlayıcı değerler verilmiştir.



Şekil 4.2. G1 generasyonu larvalardan izole edilen DNA’ların agaroz jel görüntüsü

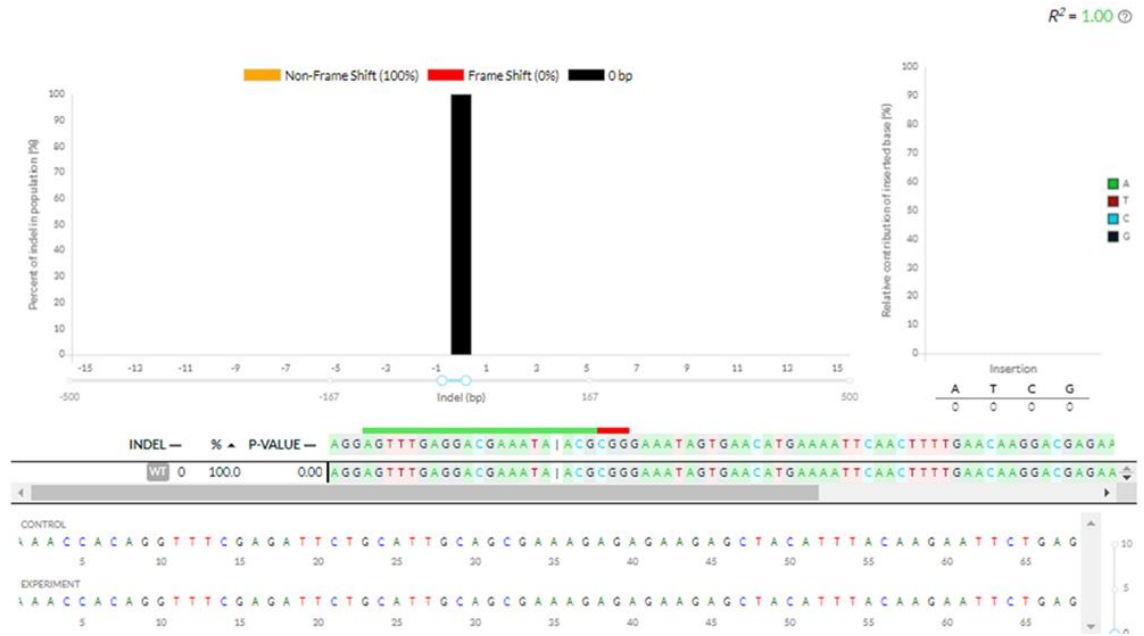


Şekil 4.3. G1 generasyonu larvaların JHAMT gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ampliconların agaroz jel görüntüsü



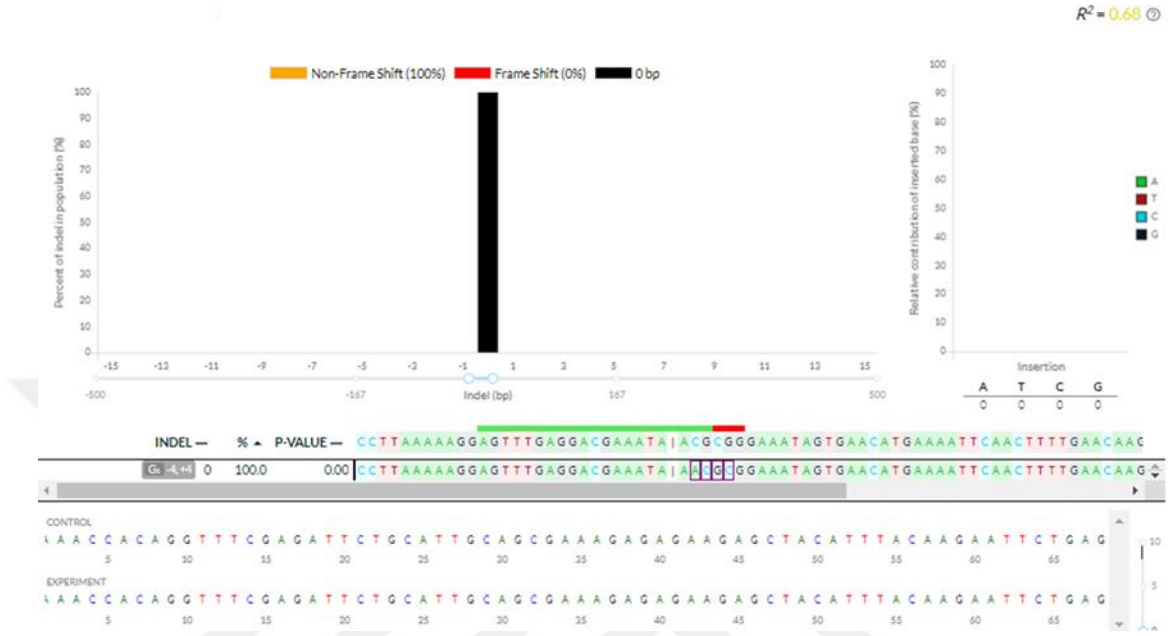
Şekil 4.4. G1 generasyonu kontrol grubu larvaların JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.4'te görseli verilen G1 kontrol grubuna ait JHAMT geni DNA dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde kontrol grubu bireylerde mutasyon olmadığı belirlenmiştir.



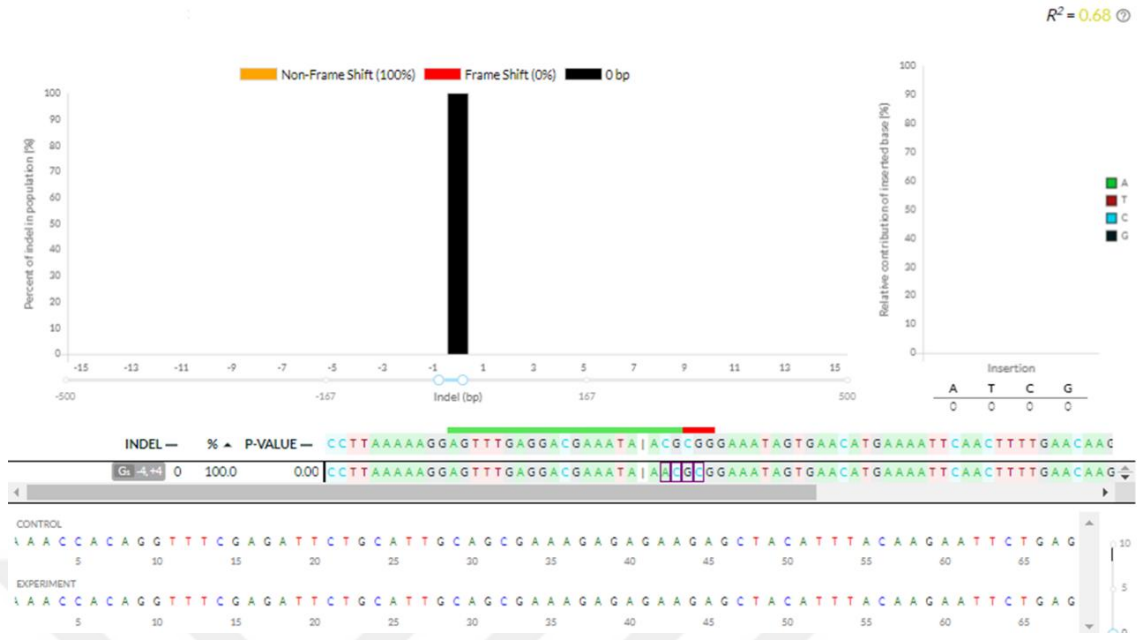
Şekil 4.5. G1 generasyonu CRISPR-Cas9 uygulanmış ve gen düzenleme gerçekleşmemiş larvaların JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.5'te görseli verilen G1 larvalarına ait JHAMT geni DNA dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde yedi G0 kraliçede CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olmadığı ve bu yedi kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşmediği belirlenmiştir.



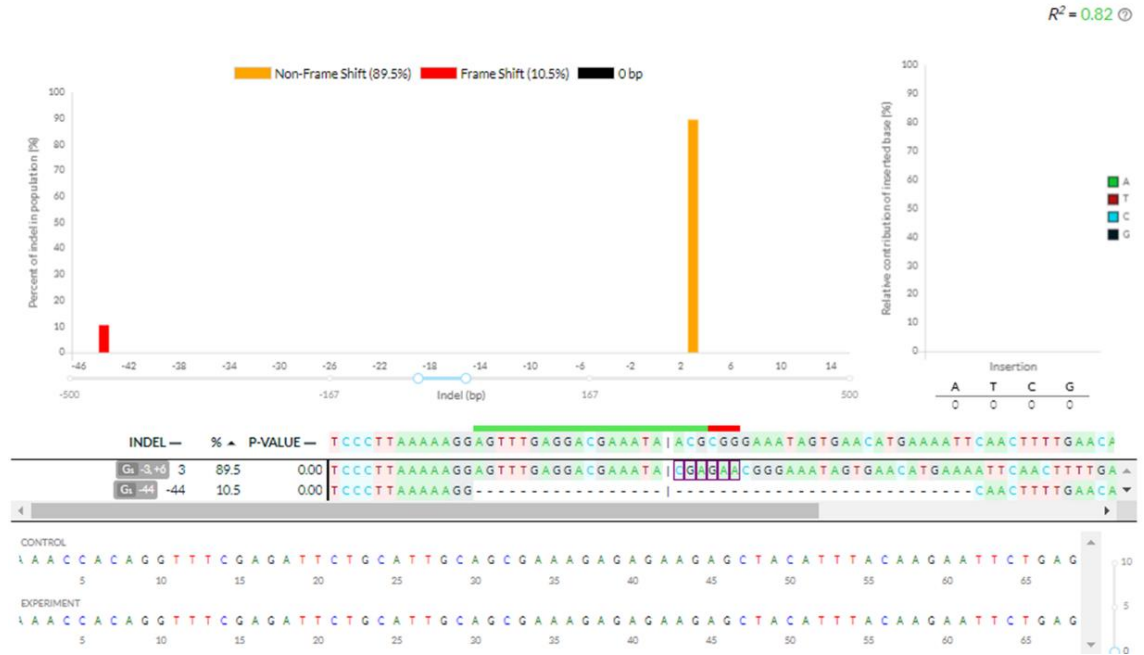
Şekil 4.6. 751 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.6'da görseli verilen 751 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %100 oranında baz ikamesi (-4, +4) meydana geldiği belirlenmiştir.



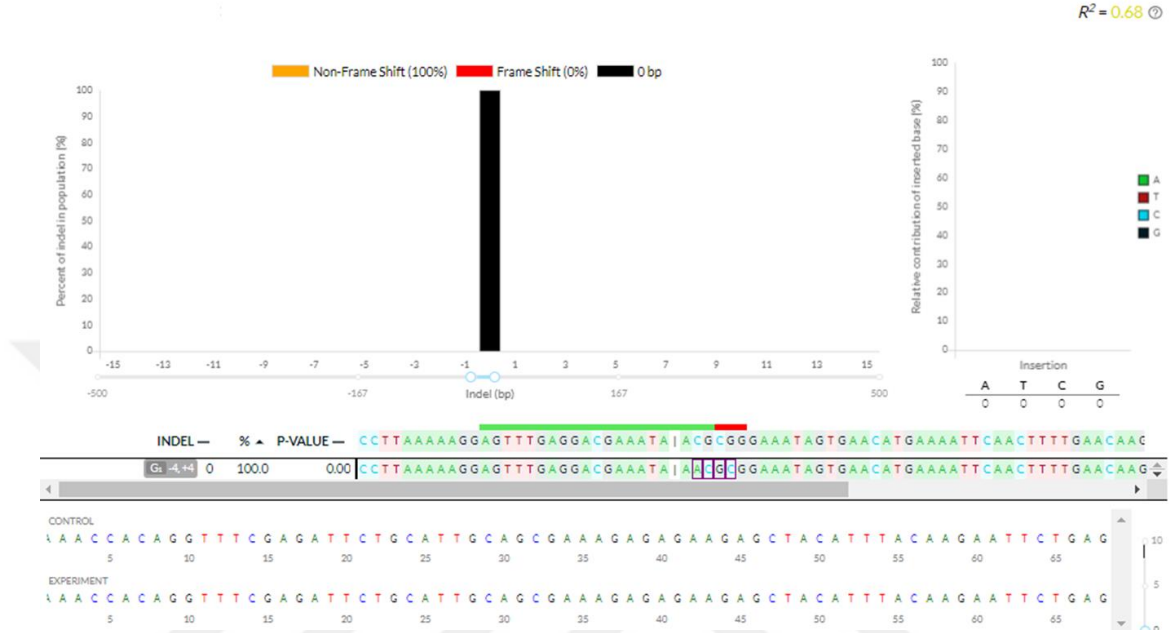
Şekil 4.7. 811 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.7’de görseli verilen 811 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %100 oranında baz ikamesi (-4, +4) meydana geldiği belirlenmiştir.



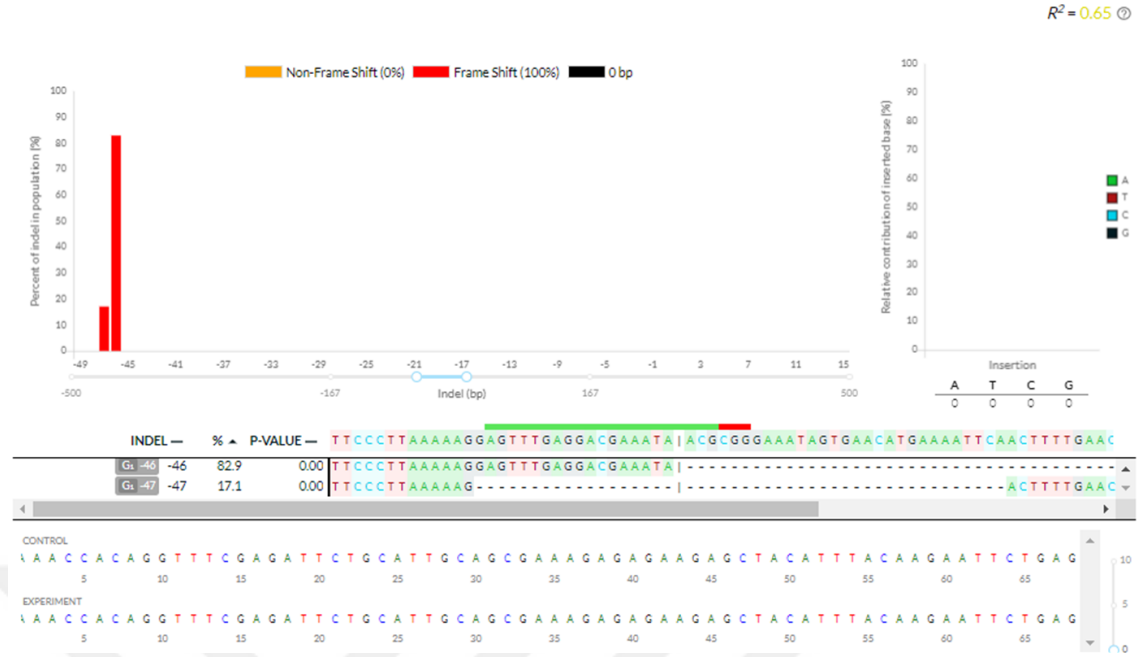
Şekil 4.8. 827 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.8’de görseli verilen 827 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %89,5 oranında +3 insersiyon; %10,5 oranında -44 delesyon/çerçeve kayması meydana geldiği belirlenmiştir.



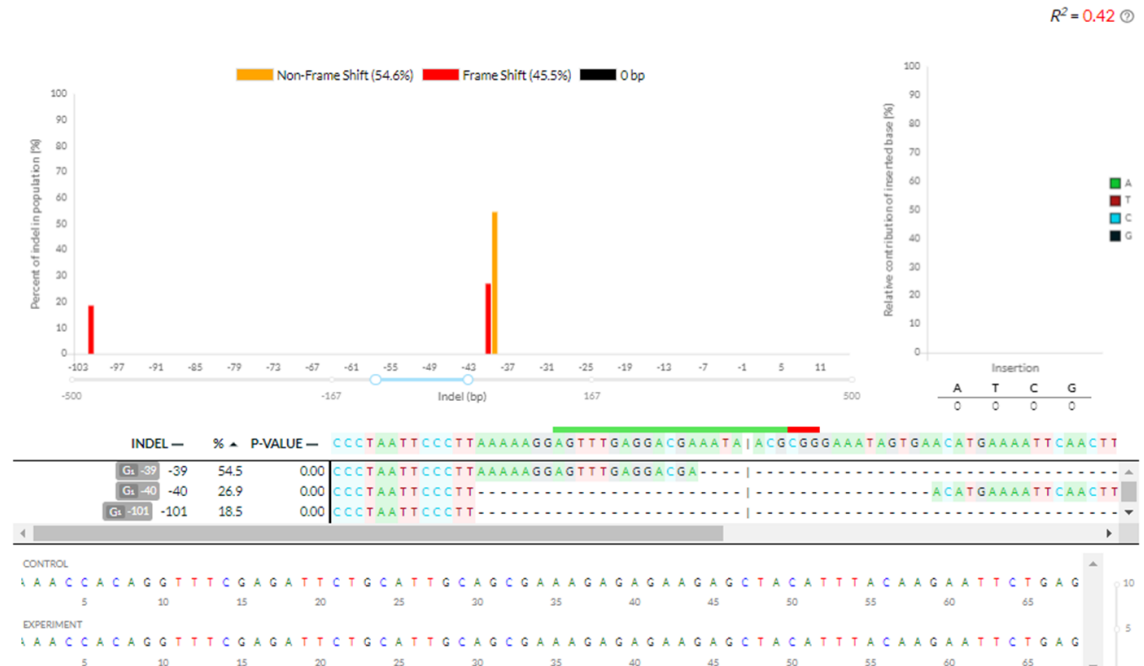
Şekil 4.9. 874 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.9’da görseli verilen 874 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %100 oranında baz ikamesi (-4, +4) meydana geldiği belirlenmiştir.



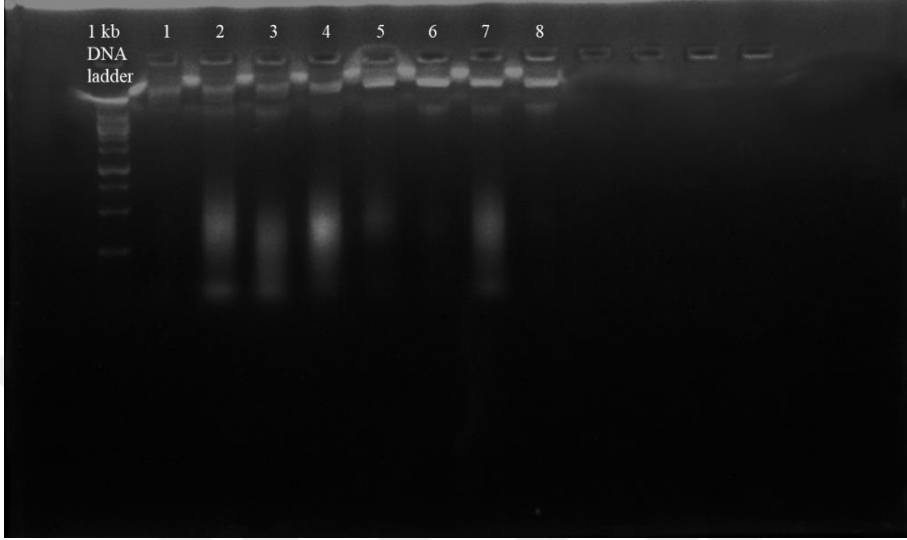
Şekil 4.10. 939 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.10’da görseli verilen 939 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %82,9 oranında -46 delesyon; %17,1 oranında -47 delesyon/çerçeve kayması meydana geldiği belirlenmiştir.

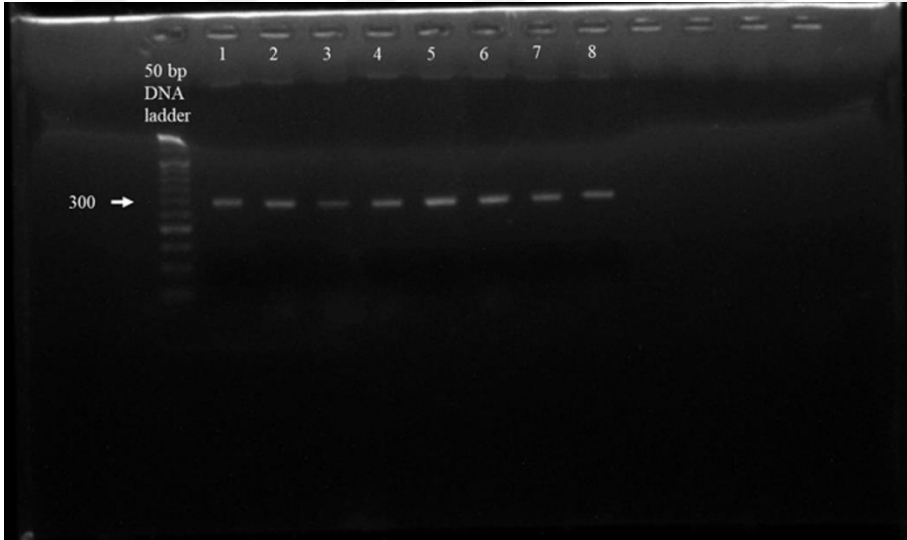


Şekil 4.11. 1044 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

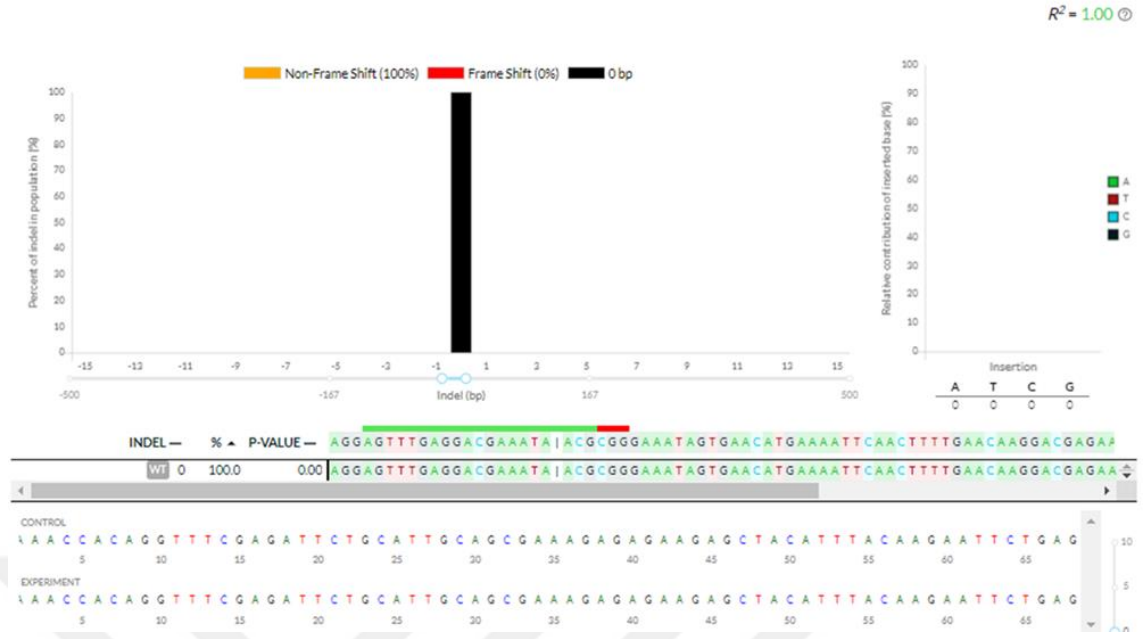
Şekil 4.11’de görseli verilen 1044 numaralı G0 kraliçenin G1 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %54,5 oranında -39 delesyon; %45,5 oranında -40, -101 delesyon/çerçeve kayması meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.12. G2 generasyonu larvalardan izole edilen DNA’ların agaroz jel görüntüsü

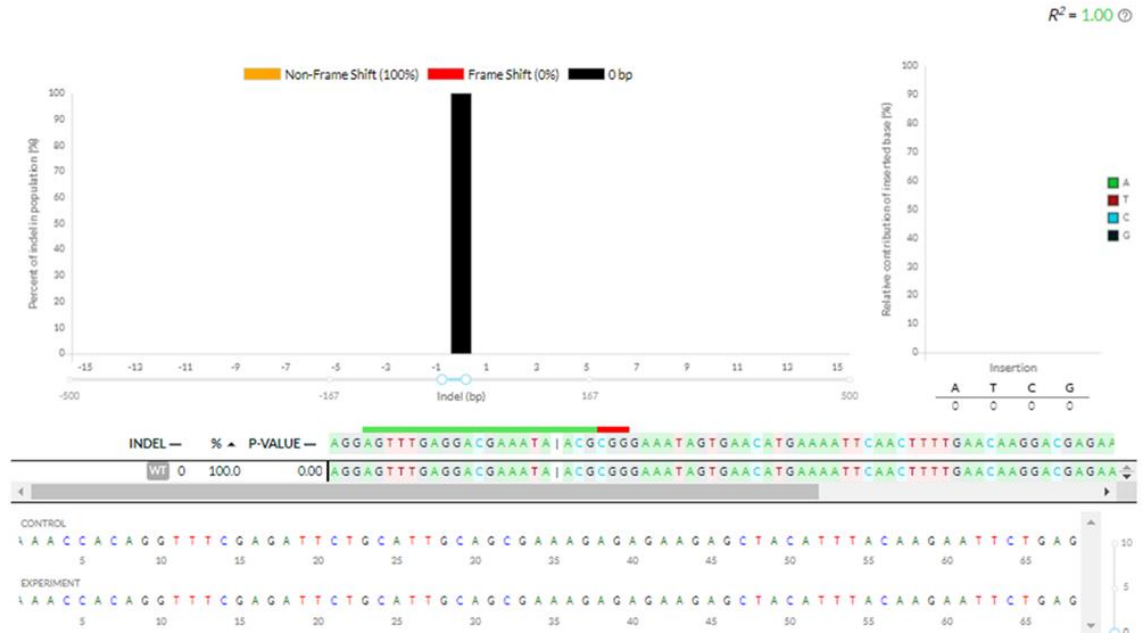


Şekil 4.13. G2 generasyonu larvaların JHAMT gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ampikonların agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.14. G2 generasyonu kontrol grubu larvaların JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.14'te görseli verilen G2 kontrol grubuna ait JHAMT geni DNA dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde kontrol grubu bireylerde mutasyon olmadığı belirlenmiştir.



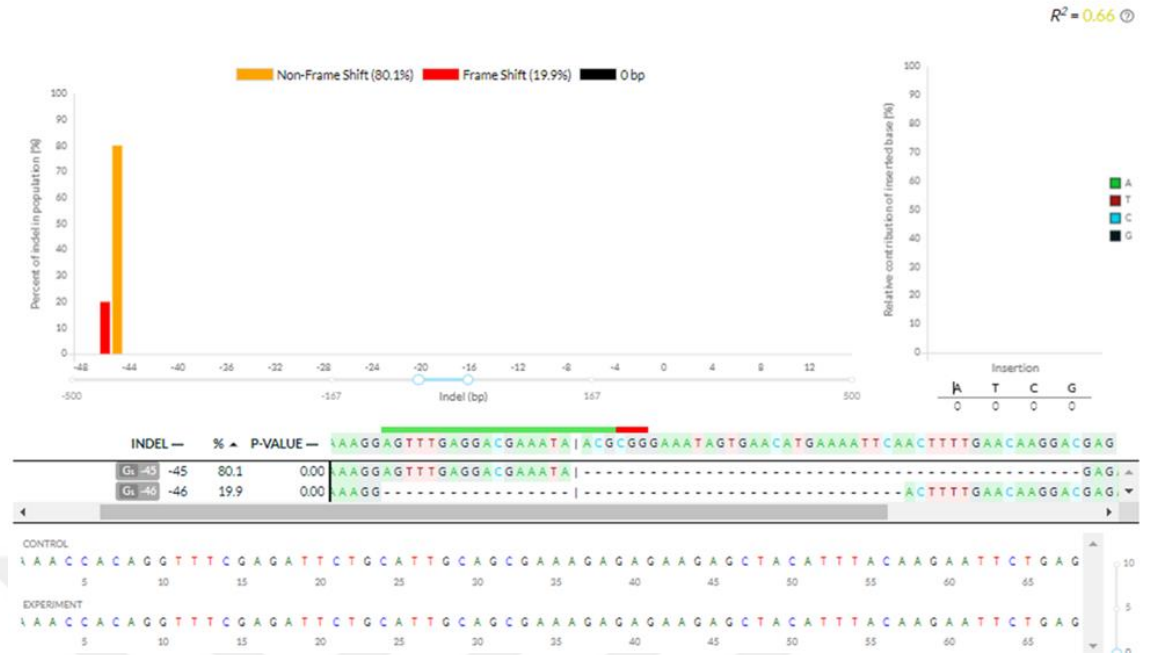
Şekil 4.15. G2 generasyonu CRISPR-Cas9 uygulanmış ve gen düzenleme gerçekleşmemiş larvaların JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.15’te görseli verilen G2 larvalarına ait JHAMT geni DNA dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde 5 adet G1 kraliçede CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olmadığı ve bu 5 kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşmediği belirlenmiştir.



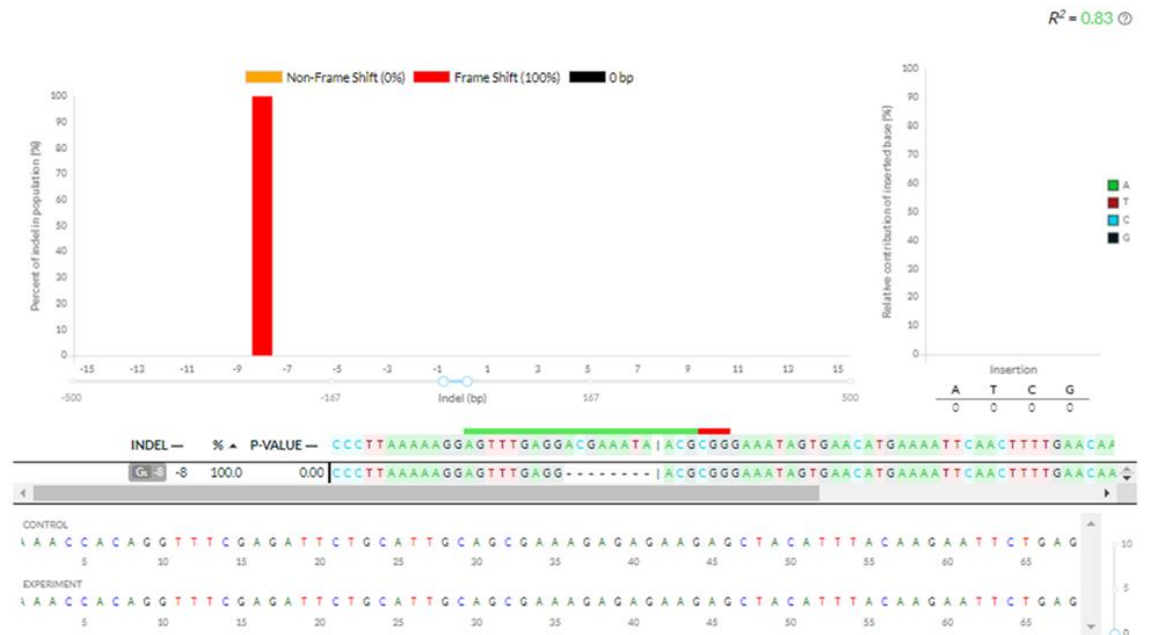
Şekil 4.16. 827.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.16’da görseli verilen 827.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %60,6 oranında -44, -106 delesyon/çerçeve kayması; %39,4 oranında -45 delesyon meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.17. 939.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.17’de görseli verilen 939.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %80,1 oranında -45 delesyon; %19,9 oranında -46 delesyon/çerçeve kayması meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.18. 1044.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni DNA dizisi

Şekil 4.18’de görseli verilen 1044.1 numaralı G1 kraliçenin G2 larvasına ait JHAMT geni dizisi DECODR yazılımında incelendiğinde CRISPR-Cas9 uygulamasının başarılı olduğu ve bu kraliçeye ait larvalarda gen düzenlemenin gerçekleşerek %100 oranında -8 delesyon/çerçeve kayması meydana geldiği belirlenmiştir.

JHAMT geninin knockout edilebilmesi için larvalarda meydana gelen indellerin çerçeve kayması mutasyonlarıyla sonuçlanması gerekmektedir. Bu yüzden bireylerde meydana gelen indel şekilleri ayrı ayrı incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, 3 kovanın 2 tanesinde (827.1 ve 939.1) heterozigot ve 1 tanesinde (1044.1) homozigot çerçeve kayması mutasyonu görülmüştür. Kontrol grubu, gen düzenlenmemiş ve gen düzenleme gerçekleşmiş bireylerin petekler üzerindeki görüntüsü ise aşağıda Şekil 4.19’da verilmiştir.

In vivo şartlarda yapılan fenotipik gözlemler sonucunda KO kraliçelerin aynı günde yumurtlamaya başladığı, petek gelişiminin birbirine çok benzer ve güçlü olduğu, bu bakımdan mutant kraliçelerin kontrol grubu kraliçelerden daha başarılı olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar umut verici olmakla birlikte mutant kraliçelerin kolonilerinin fenotipik performansları bakımından en az bir yıl boyunca takip edilmesi ile gen manipülasyonları sonuçlarının daha iyi anlaşılması bakımından faydalı olacaktır.

				
Kontrol grubu bireylerin petek üzerindeki görünümü	CRISPR kompleksi ile muamele edilmiş ve düzenleme görülmemiş bireylerin petek üzerindeki görünümü	827 numaralı kovanın soyundan gelen gen düzenlenmiş bireylerin petek üzerindeki görünümü	939 numaralı kovanın soyundan gelen gen düzenlenmiş bireylerin petek üzerindeki görünümü	1044 numaralı kovanın soyundan gelen gen düzenlenmiş bireylerin petek üzerindeki görünümü

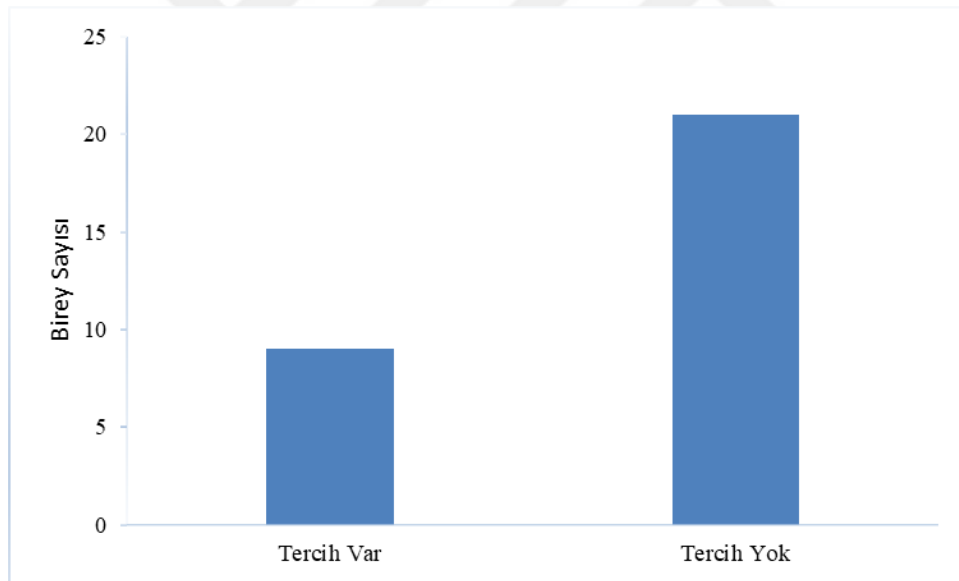
Şekil 4.19. Gen düzenleme çalışmaları sonucunda elde edilen kolonilerdeki gelişimin fenotipik sonuçları

4.2. Varroa'nın Konukçu Tercih Testi Bulguları

Uygulanan *in vitro* konukçu testi çalışmalarında Varroa'nın konukçu tercihi kontrol ve deneme grubu örneklerinde skorlanmıştır. Bir saatlik test süresi boyunca akarların gen düzenlenmiş larvaları tercih etmesi durumunda “tercih var (1)”, kontrol larvaları tercih etmesi durumunda “tercih yok (0)” olarak kaydedilmiştir. Otuz petri kabında gerçekleştirilen testler sonucunda 21 petri kabında (%70 oranında) akarlar kontrol grubu larvaları tercih etmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.20). JHAMT geninin susturulmasının, Varroa'nın konukçu tercihinin etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi amacıyla yapılan Ki-kare testi sonucunda, JHAMT geninin susturulmasının Varroa'nın konukçu tercihinde etkili olduğu belirlenmiştir ($p=0,002<0,05$).

Çizelge 4.1. Varroa konukçu tercih testi skorları

Tercih Türü	Birey Sayısı
Tercih var	9
Tercih yok	21
Toplam	30



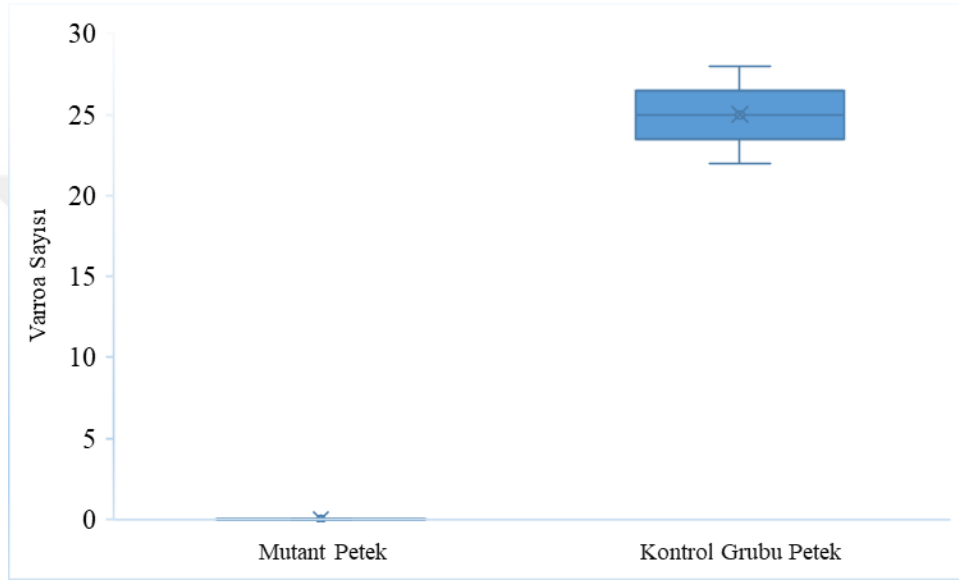
Şekil 4.20. Varroa'nın *in vitro* konukçu tercihinin histogram grafiği

Rastgele seçilen 3 adet kontrol grubu ve 3 adet JHAMT geni susturulmuş kolonilerden alınan birer petekte 100 adet kapalı yavru gözü açılarak Varroa sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sonucunda, gen düzenlenmiş peteklerin hiçbirinde Varroa tespit edilememiştir. Kontrol grubu peteklerde ise açılan gözlerin %25'inde Varroa olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2). Kontrol ve mutant peteklerdeki Varroa yüzdeleri ayrıca aşağıda Şekil 4.21'de grafik olarak verilmiştir. JHAMT geninin susturulmasının, Varroa'nın petek gözü tercihindeki etkisini belirlemek için Mann Whitney U testi

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda Varroa'ların *in vivo* koşullarda da petek gözü tercihinde JHAMT geninin etkili olduğu bulunmuştur ($p= 0,037<0,05$).

Çizelge 4.2. Varroa'nın petek gözü tercihi

Petek Türü	Varroa'lı Göz Yüzdesi
Kontrol	%25
Mutant	%0



Şekil 4.21. Varroa'nın *in vivo* şartlardaki konukçu tercihinin boxplot grafiği

5. TARTIŞMA

Ektoparazit akar *V. destructor*, *A. mellifera*'nın en önemli zararlısıdır ve bal arısı kayıplarında en büyük paya sahiptir. Ancak Varroa, sadece doğrudan zararlı etkisi nedeniyle değil, aynı zamanda arı virüslerinin vektörü olarak da arıcılık sektörü için önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Bu akara karşı kesintisiz sürdürülen mücadelede fiziksel, kimyasal ve davranışsal çözüm yolları denenmektedir. En yaygın kullanılan kimyasal ilaçlarla mücadele ise hem arı sağlığını hem de arı ürünlerinde kalıntı bırakması nedeniyle insan sağlığını da tehdit etmektedir (Pettis 2004; Maggi vd. 2010). Yan etkilerinden dolayı sınırlama getirilen kimyasal mücadele yerine Varroa'ya karşı dirençli genotiplerin geliştirilmesi gibi alternatif ve sürdürülebilir çözüm yollarını da kullanılmaktadır (Rosenkranz vd. 2010). Sürekli arayış içerisinde olan arıcılık sektörü arıcılığın en büyük sorunu durumunda olan Varroa'ya karşı henüz tam anlamıyla başarılı bir çözüm sağlanamamıştır. Bu sebepten dolayı tamamlanan bu tez çalışması Varroa ile mücadelede yeni, etkili ve sürdürülebilir bir çözüm önerisi bulmayı amaçlamıştır.

Varroa'nın yüksek konukçu özgülüğü gösterdiği ancak konukçu tercihinde nasıl bir mekanizmanın işlev gördüğü henüz aydınlatılmış değildir. Bu bağlamda bu çalışmada, Varroa akarının konukçu tercihi ile ilgili olabileceği bildirilen JHAMT geni CRISPR-Cas9 teknolojisi aracılığıyla susturulmuş ve elde edilen mutasyonun (KO) Varroa'nın konukçu tercihi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yapılan laboratuvar ve saha çalışmaları sonucunda 8 kovandan 3 tanesinde JHAMT gen bölgesinde çerçeve kayması gerçekleşmiş (2 heterozigot ve 1 homozigot) JHAMT geni susturulmuştur. Gen susturma gerçekleşmiş kraliçelerin işçi arıları hem *in vitro* ($p=0,002$) hem de *in vivo* ($p=0,037$) şartlarda Varroa tarafından tercih edilmemiştir. Bu sonuçlar Varroa'ya karşı moleküler genetik teknikler kullanılarak yeni bir mücadele yöntemi geliştirme hedefinin gerçekleştirilebileceği düşüncesini desteklemiştir.

Varroa'nın konukçu tercihiyle ilgili ilk genetik ipucuna Aurori vd. (2021)'nin JH ve ekdizonun biyosentezinde yer alan genlerin diferansiyel ifadelerini incelediği çalışmada rastlanmaktadır. Feromon etkisi bulunan MF sentezinde görevli JHAMT geninin yukarı regülasyonunun Varroa yükünde artış görülmesine neden olduğu dikkatlerini çekmiştir. Ayrıca erkek arılarda artan JHAMT geni ifadesinin, dişi akarın ovogenezi ve üreme döngüsünü başlatması için ihtiyacı olan hormonal eşikle bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise JHAMT geninin susturulmasının hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda Varroa'nın konukçu tercihinde etkili olduğu gösterilmiş olup bu ihtimal doğrulanarak güçlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında, JHAMT geni manipüle edilmiş arılarla ilgili çarpıcı gözlemlerden biri de arılıkta Varroa ile bulaşık kontrol kolonileri olmasına rağmen mutant kovanlar incelendiği zaman kolonide Varroa'ya rastlanılmamış olmasıdır (Şekil 4.19).

JHAMT geninin Varroa'ya etkisiyle ilgili literatürde sadece bir çalışma bulunmakla birlikte kimyasal ipuçlarının, çalışmamızda elde edilen sonuçlarda görüldüğü gibi Varroa konukçu tercihinde önemli roller oynadığı bildirilmiştir. Le Conte vd. (1989), düz zincirli yağ asitlerinin metil ve etil esterlerinin Varroa'nın davranışına etkilerini belirledikleri çalışmalarında, *A. mellifera*'nın hem erkek arı hem de işçi larvalarının kütikülünden ekstrakte edilen; metil linolenat, metil palmitat ve etil palmitat'ın *in vitro* koşullarda Varroa'yı çektiğini göstermişlerdir. Bu esterlerden özellikle metil palmitat

tarafından Varroa'ların erkek arı larvalarına çekildiğini bildirmişlerdir. Y tüpü testi ve petri testi kullanan Kraus (1990), bal arısı zehir bezlerinin ürettiği kokunun ve alarm feromonu bileşenlerinin büyük kısmının akarlar karşı caydırıcı etkisi olduğunu bildirmiştir. Varroa'nın arıdan ayrılması için önemli kimyasal tetikleyici olarak da 1-octanol bildirilmiştir. Pernal vd. (2005), Bal arısı Nasonov feromon bileşiği olan geraniol ve nerolik asidin konukçu seçim sürecinde caydırıcı etki gösterdiğini, kimyasallardaki küçük miktar farklılıklarının dahi akar aktivitesinde önemli etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, Piccolo vd. (2010) tarafından toplayıcıların kütüklerinde bakıcılara göre daha yüksek miktarda bulunan (Z)-8-heptadecene, dişi Varroa'lar için caydırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir. Bal arılarındaki kimyasal profilde plastisitenin de mümkün olduğu durumlar mevcuttur (Cervo vd. 2014). Cervo vd. (2014), orta ya da yüksek Varroa yükü olan kolonilerde, bal arılarının kimyasal profillerini değiştirebildiklerini ve bu şekilde akarların tarlacı arılara geçmesine neden olarak kolonideki akar yükünü azalttığını bildirmişlerdir.

Bununla birlikte bazı çalışmalarda Varroa tercihinin direkt olarak kimyasal ipuçlarından değil bazı ek faktörlerden de etkilenmesi söz konusudur. Bakıcı arılar veya larva ve tarlacı arılar için yapılan tercih testinin, akarların test için laboratuvara getirilmeden önce bakıcı arılar, larvalar veya tarlacı arılardan hangisinin üzerinde tutulduğuna bağlı olarak etkilendiği bildirilmiştir. Foretik dönemdeki akarlar, yine işçi arıları larvalara göre daha fazla tercih etmiştir. Bu nedenle konukçu tercihi, yalnızca gelecekteki konukçudan kaynaklanan faktörlerden değil, aynı zamanda dişi akarın üreme aşamasına bağlı olan geçmiş deneyimlerinden veya içsel faktörlerden de etkilendiği bildirilmiştir (Dillier vd. 2006). Calderone ve Lin (2001), dişi Varroa akarlarının üreme için uygun gözlere nasıl yönlendirildiğine dair farklı hipotezleri tartışmışlar ve konukçu tercihinin farklı bileşenleri olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bunlar; kimyasal ipuçları, fiziksel parametreler, kimyasal ve fiziksel ipuçlarının etkileşimi ve bakıcı arılar tarafından pasif taşınma olmak üzere 4 farklı hipotezden oluşmaktadır. Bu hipotezler konukçu tercihindeki mekanizmanın kompleksliğini basit bir şekilde özetlemiştir. Bu hususlar dikkate alınarak, tamamlanan bu tez çalışmasının başarısı hem laboratuvar koşullarında hem de sahada kovan içerisinde gösterilmiştir. Ancak, JHAMT geni susturulmuş larvaların *in vitro* tercih testlerinde %30 oranında da olsa Varroa'lar tarafından tercih edilmiş olması mekanizmanın kompleksliği ile açıklanabilir. *In vitro* koşullarda kontrol ve mutant larvaların aynı petri kutusunda bir arada bulunması sebebiyle iki larvanın feromonlarının birbirine karışmış olması ihtimalinden dolayı tercih testine tabi tutulan Varroa'ların %30 oranında bir yanılma ile mutant larvalara yönelmiş olmaları da söz konusu olabilir.

JHAMT geninin *B. mori*'de tanımlanmasından itibaren JHAMT geni ortologları *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Aedes aegypti*, *Acyrtosiphon pisum*, *Apis mellifera*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Blattella germanica* gibi birçok böcekte karakterize edilmiştir. JHAMT geninin susturulmasının JH titresini düşüreceği ve larvalarda erken metamorfoza neden olacağı bu sebeple vitellogenin sentezini inhibe edeceği bildirilmiştir (Yang vd. 2021). İpek böceği (*B. mori*) ve meyve sineğindeki (*D. melanogaster*) gelişimsel ekspresyon profili çalışmalarında JHAMT transkripsiyonunun baskılanmasının larva-pupa metamorfozunun indüklenmesi için kritik olduğu, ancak bunu ispatlamak için *in vivo* kanıtların eksik olduğu öne sürülmektedir (Minakuchi vd. 2008). Minakuchi vd. (2008) yaptıkları çalışmada; kırmızı un böceği (*Tribolium*

castaneum), *B. mori* ve *D. melanogaster* 'de JHAMT genine homolog olan üç metiltransferaz geni (TcMT1, TcMT2 ve TcMT3) belirlemiştir. Larva aşamasında TcMT3'ün RNA interferans aracılı susturulmasının, erken gelişmiş larva-pupa metamorfozu ile sonuçlandığını ve TcMT1 veya TcMT2'nin susturulmasının metamorfoz üzerinde görünür bir etki oluşturmadığını bildirmişlerdir. Yang vd. (2021), gölet kurt örümceğinde (*Pardosa pseudoannulata*) JHAMT-1, JHAMT-2 ve JHAMT-3 genlerinin transkripsiyonel susturulması sonucunda örümcek yavrularının daha iri olmasına ve erken deri değiştirmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, çöl çekirgesinde (*Schistocerca gregaria*) JHAMT'ın RNA interferans aracılı susturulması gerçekleştirilmiştir. Bu türde JHAMT transkripsiyon seviyelerinin baskılanması, JH salınımını önemli ölçüde azaltmıştır ve daha küçük bazal oositler üretmelerine sebep olmuştur. Bu da JHAMT'ın dişi çöl çekirgelerinin üremesinde etkili olduğunu göstermiştir (Marchal vd. 2011). Aslında direkt olarak JHAMT geninin büyüme ve gelişmeyi etkilemeyeceğine dair de kanıtlar mevcuttur. Niwa vd. (2008), JHAMT geninin *D. melanogaster*'da *in vivo* işlevini belirlemek için RNAi aracılığıyla yıkımını gerçekleştirmişlerdir. DmJHAMT geninin RNAi aracılı yıkımının, büyüme ve gelişme açısından gözle görünür bir etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Bal arısında JHAMT geni transkripsiyonel olarak ilk kez bu tez çalışmasında susturulmuş olup elde edilen mutantlarda üreme performansında artma ve nesiller arasında kısalma dışında dikkat çekici morfolojik ve fizyolojik farklılıklar saptanmamıştır.

Gen düzenlemenin başarısı; hücre materyali yoğunluğu, inkübasyon süresi ve CRISPR bileşenlerinin konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz gen düzenleme verimliliğinin yüzdesine bakıldığında ilk olarak bileşenlerin konsantrasyonlarının yeterli olmadığı akıllara gelmektedir. Çünkü bal arısı semenindeki sperm hücre miktarı oldukça yükündür. 1 µl bal arısı semeninde yaklaşık 2-9 milyon sperm hücresi içermektedir (Yániz vd. 2020). Modifikasyon başarısını yükseltmek için CRISPR bileşenlerinin konsantrasyonlarının artırılması faydalı olacaktır. Ancak hücrelere yüksek dozlarda CRISPR aktarımının toksisiteyi ve hedef dışı etkileri artıracağından dolayı yine de mümkün olan en düşük doz tercih edilmelidir (Wang vd. 2016).

CRISPR-Cas9 sistemi için seçilen iletim stratejisi de gen düzenleme başarısını etkileyen önemli faktörler arasındadır. Çalışmamızda RNP formunun kullanılmış olması sistemin gönderilen hücre içerisinde transkripsiyon ve translasyon ihtiyacını ortadan kaldırarak oldukça hızlı bir genom düzenlemesi sağlamıştır. RNP'nin, yüksek düzenleme verimliliği elde etmenin yanında hedef dışı etkileri, insersiyonel mutajenezi ve bağışıklık tepkilerini de azaltmaktadır (Chandrasekaran vd. 2018; Lattanzi vd. 2019). Ancak, Plazmid yerine RNP kullanılan çalışmalarda daha kısa inkübasyon sürelerinin uygulanması gerektiği; çünkü hücrelerdeki RNP seviyelerinin, hücresel bozulma nedeniyle transfeksiyondan 24 saat sonra düştüğü bildirilmiştir (Shalaby vd. 2022). RNP'nin hücrelere iletimi için kullanılan en yaygın ajan ise lipozomlardır (katyonik lipidler). Lipozomlar yüksek genom düzenleme verimliliği ve düşük hedef dışı etkileri açısından avantajlar sağlamaktadır. Mikroenjeksiyon, elektroporasyon ve biyolistik (gen tabancası) gibi diğer yöntemlerle kıyaslandığında hücre hasarına neden olmamaktadır (Zhang vd. 2021). Yöntemin sınırlamaları arasında; Cas9 proteininin, elektrostatik etkileşim yoluyla taşıyıcılar tarafından kompleks oluşturmaya karşı dirençli olması,

oldukça katyonik ve büyük boyutlu bir protein olmasıdır. Fakat yeni geliştirilen ticari transfeksiyon reaktifleriyle bu sorun minimuma indirilmiştir. Bununla birlikte, lipozom bazlı reaktiflerin hücre geçirgenliğini artırarak kullanılan antibiyotiklerin hücrelere geçişine yol açtığı, bunun toksisiteye ve iletim etkinliğinin azalmasına neden olduğu da bildirilmiştir (Shalaby vd. 2022).

Diğer yandan, bazı durumlarda gen düzenlemenin başarısı yüksek olsa bile elde edilen başarı fenotipte yeteri kadar kendini gösteremeyerek beklentileri karşılamamaktadır. Fenotipik belirti eksikliğinin olası bir açıklaması, düzenlenmiş hücre miktarındaki yetersizliktir. Sperm ya da yumurta gibi canlının daha erken adımlarında CRISPR iletimi, istenen başarının elde edilmesinde avantaj sağlayacaktır (Lamas-Toranzo vd. 2019). Bal arılarında CRISPR ve transgen çalışmalarında, yumurta ve larva mikroenjeksiyonu gibi seçenekler mevcut olsa da bu seçenekler sadece transfer başarısını değil bireylerin yetiştirilmesini de etkilemektedir. Çünkü işçi arılar, manipüle edilmiş yumurta ve embriyolarda normal gelişimdeki bozulmaları fark etmekte ve bunlara bakmayı reddetmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, manipüle edilmiş bal arısı embriyolarını yetişkinlere dönüştürmek gibi zor bir işle baş etmek zorunda kalınmaktadır. Ortaya koyduğumuz sperm aracılı transfeksiyon protokolü ile sperm hücreleri başarılı şekilde transfekte edilerek hızlı ve pratik olarak gen düzenlenmiş ergin arılar elde edilmiştir.

Bal arılarındaki CRISPR ve transgen uygulamalarında, uygulama hasarı oluşturmada çalışma yapma imkânı sağlayan sperm transfeksiyonu ilk olarak Robinson vd. (2000) tarafından kullanılmıştır. Sperm aracılı gen transferi (SMGT: Sperm Mediated Gene Transfer/ Sperm Aracılı Gen Transferi) ile bal arılarına yabancı bir DNA materyali aktararak transgenik arılar üretmeyi başarmışlardır ve birkaç nesil boyunca transgenik hattı koruyabilmişlerdir. Bal arıları ve diğer organizmaların arasındaki ilginç fark ise arı spermasına yabancı bir DNA aktarmadan önce yıkama işlemi gerekmemesidir (Pen 2018). Bal arılarında sperme CRISPR (plazmit) uygulama (STAGE: Sperm Transfection Assisted Gene Editing/ Sperm Transfeksiyon Yardımlı Gen Düzenleme) girişimi ilk kez Pen (2018) tarafından gerçekleştirilmiş ancak spermi transfekte edememiş ve bir modifikasyon başarısı sağlanamamıştır. Aslında sperm aracılı çalışmalarda en önemli aşama hücrelerin transfekte edilmesidir. Bu açıdan, gelecekte yapılacak olan CRISPR ile sperm transfeksiyonlarında bir GFP ya da farklı bir işaretleyici kullanılması ile transfeksiyon başarısının, transkripsiyon ve translasyonun test edilmesi önerilmektedir. Bu sayede istenilen hedefe ulaşmada başarının artacağına inanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında ortaya konan mücadele stratejisi, başarısı ve sürdürülebilirliği bakımından değerlendirildiğinde diğer mücadele yöntemlerine göre oldukça avantaj sağlamaktadır. Son yıllarda en çok ilgi gösterilen Varroa'ya karşı davranışsal direnç temelli ıslah çalışmaları kapsamında seleksiyon programının yavaş ve sınırlı düzeyde işlediği bilinmektedir. Bu durumun, sebebinin ise hala kesin bir şekilde ortaya konulmamış olan fizyolojik mekanizmalardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Büchler 2010). Islah çalışmalarında çevresel faktörlerin oldukça etkili olduğu dolayısıyla çevre varyansının yüksek olması da yöntemin dezavantajları arasındadır. Varroa akarlarına karşı davranışsal dirençlerin etkinliğinin ve yoğunluğunun değerlendirilmesinin oldukça zor olduğu da yöntemin kısıtlayıcı faktörlerindendir (Yıldız ve Karabağ 2022). Öte yandan hem hijyenik davranışta hem de tımar davranışında elde edilen başarı oranları nispeten düşüktür. Doğal koşullarda; Afrika bal arısında (*A.m*

scutellata) %32 (Vandame vd. 1996), *A.m. intermissa*'da %15,5, *A.m. carnica*' %16,6 (Boecking ve Drescher 1992), Avusturalya arılarının %20'sinin (Oxley vd. 2008) hijyenik davranış gösterdiği bildirilmiştir. Kontrollü koşullar altında yapılan bir çalışmada ise 76 kolonide sadece %9.2'si %50'den fazla bulaşık yavruları uzaklaştırmıştır (Boecking ve Drescher 1998). Tımar davranışında hijyenik davranışa göre oranlar biraz daha yüksek (Rosenkranz vd. (1997): %45; Aumeier (2001): %66; Bak ve Wilde (2015): % 86; Yıldız ve Karabağ (2022): %65) gibi görünse de gösterilen tımar davranışı sadece yetişkin akarların arı üzerinden atılarak uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır ve çoğu durumda akara herhangi bir zarar verilmemektedir. Literatürde mücadeleye yardımcı biyoteknolojik teknikler arasında sadece RNAi teknolojisi bulunmaktadır. Strateji genel olarak RNAi ile Varroa'nın yaşamsal ve üreme ile ilgili genlerinin hedeflenmesini içermektedir. dsRNA iletim yolu olarak; direk olarak enjeksiyon, topikal uygulama, dsRNA solüsyonuna daldırma, beslenme yoluyla bal arısına verilen dsRNA'nın Varroa'ya yatay olarak aktarılması, bakteriler tarafından eksprese edilen dsRNA'larının arılara beslenme yoluyla verilmesi ve yine yatay olarak akara aktarılması gibi yöntemler bulunmaktadır. Elde edilen başarılar ise; %55, %85 (Campbell vd. 2016), %60 (Garbian vd. 2012) oranları arasında değişmektedir. Yöntem umut vad ediyor gibi görünse de RNAi teknolojisinin maliyetli olması ve dsRNA stabilitesinin, pratik olarak RNAi kullanımını etkilemesi en önemli dezavantajlar arasındadır. Çünkü dsRNA aktivitesi canlının hemolenfinde sınırlı bir süreye kadar dayanmaktadır ve bu sürenin sonunda tekrardan dsRNA verilmesi gerekmektedir (72 saat (Campbell vd. 2010)). Diğer yandan, Varroa'da hedeflenen genlerin, bal arısındaki genlerle yüksek homoloji göstermesinin, bal arılarında da mortaliteye neden olabileceği büyük endişe konusudur.

6. SONUÇLAR

Amaç ve hedeflere başarıyla ulaşılarak tamamlanan bu tez çalışmasında CRISPR-Cas9 teknolojisi aracılığıyla Anadolu bal arısının bir ekotipi olan Muğla bal arısında *Varroa destructor* ile arı arasındaki moleküler ilişkiyle ilgili olabileceği düşünülen JHAMT geni susturularak mutant işçi arılar elde edilmiştir. JHAMT geni bakımından mutant işçi arılar ile normal işçi arılar *Varroa*'nın konukçu tercihi bakımından *in vitro* ve *in vivo* koşullarda karşılaştırılarak JHAMT geninin tercih üzerine etkisi belirlenmiştir. *In vitro* tercih testine tabi tutulan *Varroa*'lara, JHAMT mutant işçi larvası ve yabancı tip işçi larvası sunulduğunda *Varroa*'lar yüksek oranda (%70) yabancı tip işçi larvalarını tercih etmiştir ($p=0,002$). *In vivo* koşullarda ise kontrol grubu kolonilerden alınan petek örnekleri ve gen düzenlenmiş kolonilerden alınan petek örnekleri incelendiğinde, mutant peteklerde *Varroa* tespit edilememiştir ($p=0,037$). Bu sonuçlar, *Varroa*'nın konukçu tercihinde JHAMT geninin etkili olduğu kanaatini doğrulamıştır.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar juvenil hormon yolağı manipüle edilerek *Varroa*'ya karşı yeni ve sürdürülebilir bir çözüm önerisi geliştirilebileceğini göstermiştir. Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan gen düzenlemeler sonucunda akarlar tarafından tercih edilmeyen kolonilerin yetiştirilebilme olasılığı bu alanda yeni ufuklar açacaktır. Bu sayede, akarlar mücadelesinde kullanılan kimyasal gerekliliği ortadan kalkacaktır. Tarımsal girdiyi azaltıp maliyeti düşürecek ve kimyasalların başta arılar olmak üzere insan sağlığına ve çevreye verdiği zarar engellenebilecektir. Gen düzenlemenin arılarda oluşturabileceği fizyolojik ve metabolik sonuçların arazi koşullarında daha kapsamlı şekilde değerlendirilmesi ve koloni performansı üzerine etkilerinin araştırılması ayrıca gerekmektedir.

Mevcut literatür incelendiğinde, *Varroa*'nın kompleks konukçu tercih mekanizmasına rağmen konuyla ilgili moleküler çıktı sayısı oldukça azdır. Bu durum göz önüne alındığında, farklı moleküler tekniklerin de konuya adapte edilerek mekanizmanın aydınlatılmaya devam edilmesi gerekmektedir. Moleküler verilerin *Varroa* sorununu ortadan kaldırmaya yardımcı olacak etkin yöntemler geliştirmeye ciddi katkılar sağlayacağı çalışma sonucunda ortaya koyulmuştur.

Yakın zamanda keşfedilmiş, adaptif bir bakteriyel bağışıklık sisteminden türetilen CRISPR-Cas teknolojisi güçlü bir gen düzenleme yöntemi sunmuştur. Birçok canlı türünde kullanımı hızla yaygınlaşan ve birçok gen fonksiyonun ortaya çıkarılmasında başarı sağlayan bu teknolojinin dünyadaki yerine bakıldığında özellikle çiftlik hayvanları bakımından ülkemizin istenilen seviyede olmadığı görülmektedir. Bu sebeple, benzer çalışmaların ülkemizde de yapılmasının zorunluluk haline geldiği anlaşılmaktadır.

Bu çalışma; CRISPR-Cas9 yönteminin, bal arısı kayıplarının en büyük sorumlusu olan *Varroa* ile mücadelesinde kullanılmasıyla alanında ilk olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca literatürdeki bal arısı CRISPR çalışmaları arasında, CRISPR RNP kompleksinin kullanılması ve CRISPR'ın bal arısı sperm hücrelerine başarılı bir şekilde uygulanması bakımından da ilktir. Alanındaki birçok ilkleri barındıran bu çalışmadaki sonuçlar titizlikle yorumlanmalı ve *Varroa* ile mücadelesinde sunduğu yeni stratejiye odaklanılmalıdır. Ortaya koyulan mücadele stratejisi ve biyoteknolojik tekniklerin kullanım şekli, sadece bal arılarında değil yakın türlere ya da diğer çiftlik hayvanlarına adapte edilerek etkin sonuçlar sağlama potansiyeli bulundurması açısından da önemlidir.

7. KAYNAKLAR

- Adam, B., 1987. In Search of the Best Strains of Bees. Northern Bee Books, West Yorkshire, UK, 2006 pp.
- Akyol, E. and Korkmaz, A. 2006. Varroa destructor'un biyolojik kontrol yöntemleri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 6(2): 62-67.
- Akyol, E. and Yeninar, H. 2009. Use of oxalic acid to control Varroa destructor in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 33(4): 285-288.
- Amdam, G.V. 2011. Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell*, 10(1): 18-27.
- Anderson, D.L. and Trueman, J.W.H. 2000. Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165-189.
- Andino, G.K. and G.J. Hunt, 2011. A scientific note on a new assay to measure honey bee mite-grooming behavior. *Apidologie*, 42(4): 481-484.
- Anonim, 2022a. Web sitesi: https://agritech.tnau.ac.in/farm_enterprises/fe_api_castesofhoneybee.html [Son erişim tarihi: 31.10.2022].
- Anonim, 2022b. Web sitesi: <https://blogs.ifas.ufl.edu/entnemdept/2020/07/17/research-update-anatolian-arabian-honey-bees> [Son erişim tarihi: 26.10.2022].
- Anonim, 2022c. Web sitesi: <https://www.flickr.com/search/?text=varroa%20destructor> [Son erişim tarihi: 7.11.2022].
- Anonim, 2023. Web sitesi: <https://www.beeculture.com/just-mite-work/> [Son erişim tarihi: 05.06.2023].
- Arechavaleta-Velasco, M., Guzmán-Novoa E., 2001. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite Varroa destructor in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 32: 157-174.
- Arias, M.E., Sánchez-Villalba, E., Delgado, A. and Felmer, R. 2017. Effect of transfection and co-incubation of bovine sperm with exogenous DNA on sperm quality and functional parameters for its use in sperm-mediated gene transfer. *Zygote*, 25(1): 85-97.
- Aumeier, P. 2001. Bioassay for grooming effectiveness towards Varroa destructor mites in Africanized and Carniolan honey Bees. *Apidologie*, 32: 81-90.
- Aurori, C.M., Giurgiu, A.I., Conlon, B.H., Kastally, C., Dezmirean, D.S., Routtu, J. and Aurori, A. 2021. Juvenile hormone pathway in honey bee larvae: A source of possible signal molecules for the reproductive behavior of Varroa destructor. *Ecology and evolution*, 11(2): 1057-1068.
- Bak, B. and Wilde, J. 2015. Grooming behavior by worker bees of various subspecies of honey bees to remove Varroa destructor mites. *Journal of Apicultural Research*, 54(3): 207-215.
- Bailey, L. and Ball, B.V. 1991. Honey Bee Pathology (2nd Ed.). Academic Press, London, 208 pp.

- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25: 1322–1326.
- Beetsma, J., Boot, W.J. and Calis, J.N.M. 1999. Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* (Oud.): from bees into brood cells. *Apidologie*, 30: 125-140.
- Berg, S., Schmidt-Bailey, J. and Fuchs, S. 1999. Zeit als begrenzender Faktor des Eindringens von *Varroa jacobsoni* in Drohnenbrutzellen. *Soziale Insekten, IUSSI-Tagung Hohenheim*, 15.
- Bhaskaran, G., Sparagana, S.P., Barrera, P. and Dahm, K.H. 1986. Change in corpus allatum function during metamorphosis of the tobacco hornworm *Manduca sexta*: regulation at the terminal step in juvenile hormone biosynthesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 3(4): 321-338.
- Bi, H., Xu, X., Li, X., Zhang, Y., Huang, Y., Li, K. and Xu, J. 2019. CRISPR Disruption of *BmOvo* Resulted in the Failure of Emergence and Affected the Wing and Gonad Development in the Silkworm *Bombyx mori*. *Insects*, 10(8): 254.
- Bloomer, H., Khirallah, J., Li, Y. and Xu, Q. 2022. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated genome and epigenome editing in mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 181: 114087.
- Blumer-Meyre, P., Fluri, P. and Guerin, P. 1998. Aspekte der olfaktorischen Orientierung von *Varroa jacobsoni*. *Mitteilungen des Schweizerischen Zentrums für Bienenforschung*, 31:1-19.
- Boecking, O. and Drescher, W. 1992. The removal response of *Apis mellifera* L colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud and to freeze-killed brood. *Experimental and Applied Acarology*, 16: 321-329.
- Boecking, O. and Drescher, W. 1998. Research on *Varroa* resistant traits in European honey bee races (p. 22). EUROBEE AIR3-CT94-1064, EU, Brussels, final report.
- Boecking, O. and Genersch, E. 2008. Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(2): 221-228.
- Boch, J., and Bonas, U. 2010 *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 419-436. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
- Bochelen, D., Eclancher, F., Kupferberg, A., Privat, A. and Mersel, M. 1992. 7 β -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxycholesteryl-3-esters reduce the extent of reactive gliosis caused by an electrolytic lesion in rat brain. *Neuroscience*, 51: 827-834. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90523-5.
- Bomtorin, A.D., Mackert, A., Rosa, G.C.C., Moda, L.M., Martins, J.R., Bitondi, M.M.G., Hartfelder, K. and Simões, Z.L.P. 2014. Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. *PLoS One*, 9(1): e86923.
- Bortolotti, L. and Costa, C. 2014. Chemical communication in the honey bee society. In: Mucignat, C. and Caretta, C. (Eds.), *Neurobiology of Chemical Communication*.

- Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. pp. 143-206.
- Boot, W.J., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1990. Invasion of Varroa mites in honeybee brood cells: observation of Varroa mite behaviour. *Proceedings of the International Symposium on Bee Pathology*, 43-44.
- Boot, W.J., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1992a. Differential periods of Varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental & Applied Acarology*, 16: 295-301.
- Boot, W.J., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1992b. Invasion Behaviour of Varroa Mites Into Honeybee Brood Cells. Proceeding Symposium on Asian Honeybees and Bee Mites, pp. 1-7, Bangkok.
- Boot, W.J., Beetsma, J. and Calis, J.N.M. 1994a. Behaviour of Varroa mites invading honey bee brood cells. *Experimental & Applied Acarology*, 18: 371-379.
- Boot, W.J., Sisselaar, D.J.A., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1994b. Factors affecting invasion of Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) into honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), brood cells. *Bulletin of Entomological Research*, 84: 3-10.
- Boot, W.J., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1995a. Does time spent on adult bees affect reproductive success of Varroa mites? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75: 1-7.
- Boot, W.J., Schoenmaker, J., Calis, J.N.M. and Beetsma, J. 1995b. Invasion of Varroa jacobsoni into drone brood cells of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 26: 109-118.
- Bouga, M., Alaux, C., Bienkowska, M., Büchler, R., Carreck, N.L., Cauia, E., Chlebo, R., Dahle B., Dall'Olio, R., Rua, P.D., Gregorc, A., Ivanova, E., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kozmus, P., Kryger, P., Le Conte, Y., Lodesani, M., Murilhas, A.M., Siceanu, A., Soland, G., Uzunov, A. and Wilde, J. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*, 50: 51-84.
- Brokowski, C. and Adli, M. 2019. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *Journal of molecular biology*, 431(1): 88-101.
- Büchler, R., Berg, S. and Le Conte, Y. 2010. Breeding for resistance to Varroa destructor in Europe. *Apidologie*, 41: 393-408.
- Calis, J.N.M. 2001. Parasite-host interactions between the Varroa mite and the honey bee. A contribution to sustainable Varroa control. Dissertation, Wageningen, NL Wageningen Universiteit, pp.
- Calderone, N.W. and Kuenen, L.P.S. 2001. Effects of western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony, cell, type, and larval sex on host acquisition by female Varroa destructor (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, 94: 1022-1030.
- Campbell, E.M., Budge, G.E. and Bowman, A.S. 2010. Gene knockdown in the honey bee mite Varroa destructor by a non- invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. *Parasites & Vectors*, 3: 73-82.
- Campbell, E.M., Budge, G.E., Watkins, M. and Bowman, A.S. 2016. Transcriptome

- analysis of the synganglion from the honey bee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70: 116–126.
- Campbell, J.M., Hartjes, K.A., Nelson, T.J., Xu, X. and Ekker, S.C. 2013. New and TALENed genome engineering toolbox. *Circulation research*, 113(5): 571-587.
- Caplan, A.L., Parent, B., Shen, M. and Plunkett, C. 2015. No time to waste-the ethical challenges created by CRISPR: CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells. *EMBO Reports*, 16(11): 1421-1426.
- Carlson, D.F., Lancto, C.A., Zang, B., Kim, E.S., Walton, M., Oldeschulte, D., Seabury, C., Sonstegard, T.S., and Fahrenkrug, S.C. 2016. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature Biotechnology*, 34(5): 479-481.
- Carroll, D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4): 773-782.
- Carter, M., and Shieh, J. 2015. Gene delivery strategies. In: Carter, M., and Shieh, J. (Eds.), *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 239-252.
- Cedeño, A.G, Nakaya, P., Niz, J., Sciocco-Cap, A. and Salvador, R. 2015. Double-stranded RNA synthesized in bacteria can be transferred to bee and *Varroa* tissues. *Journal of Apicultural Research*, 54 (2): 99-100.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12): e82-e82.
- Chandrasekaran, A.P., Song, M., Kim, K.S. and Ramakrishna, S. 2018. Different methods of delivering CRISPR/Cas9 into cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 159: 157-176.
- Chen, C., Liu, Z., Pan, Q., Chen, X., Wang, H., Guo, H., Liu, S., Lu, H., Tian, S., Li, R. and Shi, W. 2016. Genomic Analyses Reveal Demographic History and Temperate Adaptation of the Newly Discovered Honey Bee Subspecies *Apis mellifera sinisxinyuan* n. ssp. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1337-1348.
- Chen, Z., Traniello, I.M., Rana, S., Cash-Ahmed, A.C., Sankey, A.L., Yang, C. and Robinson, G.E. 2021. Neurodevelopmental and transcriptomic effects of CRISPR/Cas9-induced somatic orco mutation in honey bees. *Journal of Neurogenetics*, 35(3): 320–332.
- Choudhary, C., Mushtaq, M., Singh, A.K., Mukhtar, S. and Shah, A.A. 2017. Genome editing using Crispr/Cas system: new era genetic technology in agriculture to boost crop output. *European Journal of Experimental Biology*, 7(3): 20.
- Cobey, S.W. 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4): 390-410.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W. and Helling, R.B. 1973. Construction of

- biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11): 3240-3244.
- Crane, E. 1999. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. New York: Routledge.
- Crispo, M., Mulet, A.P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., Nguyen, T.H., Crénéguy, A., Brusselle, L., Anegón, I. and Menchaca, A. 2015. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS one*, 10(8), e0136690.
- Cui, C., Song, Y., Liu, J., Ge, H., Li, Q., Huang, H., Hu, L., Zhu, H., Jin, Y. and Zhang, Y. 2015. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Scientific Reports*, 5(1): 1-11.
- De Figueiró Santos, J., Coelho, F.C. and Bliman, P.A. 2016. Behavioral Modulation of Infestation by *Varroa destructor* in Bee Colonies. Implications for Colony Stability. *PLOS One*, 11(9): e0160465. DOI: 10.1371/journal.pone.0160465.
- De Jong, D., Morse, R.A. and Eickwort, G.C. 1982. Mite pests of honeybees. *Annual Review of Entomology*, 27: 229-252.
- Değirmenci, L., Geiger, D., Rogé Ferreira, F.L., Keller, A., Krischke, B., Beye, M., Steffan-Dewenter, I. and Scheiner, R. 2020. CRISPR/Cas 9-mediated mutations as a new tool for studying taste in honeybees. *Chemical Senses*, 45(8): 655-666.
- Del Piccolo, F., Nazzi, F., Della Vedova, G. and Milani, N. (2010). Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons. *Parasitology*, 137(6): 967-973.
- Dillier, F.X., Fluri, P. and Guerin, P. 2001. Die Varroamilbe riecht mit den Beinen. *Schweizerische Bienen-Zeitung*, 124: 28-31.
- Dillier, F.X., Fluri, P. and Guerin, P. 2002a. Identifizierung von chemischen Orientierungsstoffen von Varroamilben (*Varroa destructor*) im Hinblick auf eine biologische Bekämpfung des Bienenparasiten. Schlussbericht und Datenverzeichnisse. *Mitteilungen des Schweizerischen Zentrums für Bienenforschung*, 45: 1-56.
- Dillier, F. X., Dettli, M. and Fluri, P. 2002b. Aktive Suche nach Bienenbrutzellen als mögliche Strategie der Varroamilben (*Varroa destructor*)? *Mitteilungen des Schweizerischen Zentrums für Bienenforschung*, 52: 1-22.
- Dillier, F. X., Fluri, P. and Imdorf, A. 2006. Review of the orientation behaviour in the bee parasitic mite *Varroa destructor*: sensory equipment and cell invasion behaviour. *Revue Suisse de Zoologie*, 113(4): 857-878.
- Dong, Z., Qin, Q., Hu, Z., Zhang, X., Miao, J., Huang, L., Chen, P., Lu, C. and Pan, M. 2020. CRISPR/Cas12a Mediated genome editing enhances *Bombyx mori* resistance to BmNPV. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 841.
- Donzé, G. and Guerin, P.M. 1997. Time-activity budgets and space structuring by the different life stages of *Varroa jacobsoni* in capped brood of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Behavior*, 10: 371-393.

- Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213).
- Dugar G., Leenay R.T., Eisenbart S.K., Bischler T., Aul B.U., Beisel C.L. and Sharma C.M. 2018. CRISPR RNA-Dependent Binding and Cleavage of Endogenous RNAs by the *Campylobacter jejuni* Cas9. *Molecular cell*, 69(5): 893-905. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.032.
- Eliash, N., Singh, N.K., Kamer, Y., Pinnelli, G.R., Plettner, E. and Soroker, V. 2014. Can we disrupt the sensing of honey bees by the bee parasite *Varroa destructor*? *PloS one*, 9(9): e106889. DOI: 10.1371/journal.pone.0106889.
- Endris, J.J. and Baker, T.C. 1993. Aktionspotentiale, abgeleitet am ersten Laufbein von *Varroa jacobsoni*, nach olfaktorischer Stimulierung. *Apidologie*, 24: 488-489.
- Engel, M.S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees. *Journal of Hymenoptera Research*, 8:165–196.
- Evans, G.O. 1992. Principles of Acarology. CAB International, University Press, Cambridge, UK, Wallingford, 563 pp.
- Fan, B., Huang, P., Zheng, S., Sun, Y., Fang, C. and Sun, Z. 2011. Assembly and in vitro functional analysis of zinc finger nuclease specific to the 3' untranslated region of chicken ovalbumin gene. *Animal Biotechnology*, 22(4): 211-222.
- Felgner, P.L., Gadek T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop J.P., Ringold G.M. and Danielsen, M. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 84: 7413-7417. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7413.
- Feng, W., Newbigging, A.M., Tao, J., Cao, Y., Peng, H., Le, C., Wu, J., Pang, B., Li, J., Tyrrell, D.L., Zhang, H. and Le, X.C. 2021. CRISPR technology incorporating amplification strategies: molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules. *Chemical Science*, 12(13): 4683-4698.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans*. *Nature*, 391: 806–811.
- Fries, I., Camazine, S. and Sneyd, J. 1994. Population dynamics of *Varroa jacobsoni* - a model and a review. *Bee World*, 75: 5-27.
- Fries, I., Imdorf, A. and Rosenkranz, P. 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37: 564-570.
- Fuchs, S. 1990. Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 21: 193-199.
- Fuchs, S. and Langenbach, K. 1989. Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 20: 257-266.
- Fuchs, S. and Müller, K. 1988. Invasion of Honeybee Brood Cells by *Varroa jacobsoni* in Relation to the Age of the Larvae. European Research on Varroa Control, Proceedings of a meeting of the EC Expert's Group, pp. 77-79, Bad Homburg.
- Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S. and Sela, I. 2012. Bidirectional transfer of

- RNAi between honey bee and Varroa destructor: Varroa gene silencing reduces Varroa population. *PLOS Pathogens*, 8(12).
- Gençer, V.H. 1996. Orta Anadolu bal arısı (*A. m. anatoliaca*) ekotiplerinin ve bunların çeşitli melezlerinin yapısal ve davranışsal özellikleri üzerinde bir araştırma. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 100 s.
- Gençer, H.V. and Karacaoğlu, M. 2003. Kafkas ırkı (*Apis mellifera caucasica*) ve Kafkas ırkı ile Anadolu Arısı-Ege Ekotipi (*Apis mellifera anatoliaca*)'nin Karşılıklı Melezlerinin Ege Bölgesi Koşullarında Yavru Yetiştirme Etkinlikleri ve Bal Verimleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(1): 61-65.
- Geng, H. 2022. Molecular analyses of visual processing and learning in honey bees. Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Georges, M., Charlier, C. and Hayes, B. 2019. Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nature Reviews Genetics*, 20: 135-156.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A. and Roe, R.M. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(8-9): 617-644.
- Gisder, S., Aumeier, P. and Genersch, E. 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90: 463-467. DOI: 10.1099/vir.0.005579-0.
- Goodwin, T. and Huang, L. 2014. Nonviral vectors: we have come a long way. In: Huang, L., Liu, D. Wagner, E. (Eds.), *Advances in Genetics*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp.1-12.
- Gopalappa, R., Suresh, B., Ramakrishna, S. and Kim, H. 2018. Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption. *Nucleic Acids Research*, 46(12), e71-e71.
- Gregorc, A., Domingues, C., Tutun, H. and Sevin, S. 2022. What has been done in the fight against Varroa destructor: from the past to the present. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69(2): 229-240.
- Grobov, O.F. 1977. Varroaosis in bees. In: Grobov, O.F. (ed.), *Varroaosis a Honeybee disease*. Apimondia Publishing House, Bukarest, pp. 46-70.
- Gui, S., Taning, C. N. T., Wei, D. and Smagghe, G. 2020. First report on CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of insect physiology*, 121: 104013.
- Guilinger, J.P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Joung, J.K. and Liu, D.R. 2014. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature Methods*, 11(4): 429-435.
- Guo, Z., Yang, N.S., Jiao, S., Sun, J., Cheng, L., Wolff, J. and Duncan, I. 1996. Efficient and sustained transgene expression in mature rat oligodendrocytes in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 43: 32-41. DOI: 10.1002/jnr.490430104.
- Gupta, R.M. and Musunuru, K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs,

- TALeNs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation*, 124(10): 4154-4161.
- Güler, A. 2006. Bal Arıları (*Apis mellifera* L.)’nda yapay tohumlama ve Türkiye için önemi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(3): 370-378.
- Halling, L.A., Oldroyd B.P., Wattanachaiyingcharoen, W., Barron, A.B., Nanork, P. and Wongsiri, S. 2001. Worker policing in the bee *Apis florea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49: 509-513.
- Harbo J.R. and Harris, J.W. 2009. Responses to Varroa by honey bees with different levels of Varroa sensitive hygiene, *Journal of Apicultural Research*, 48: 156-161.
- Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shore, L. S., Katz, A., Stram, Y. And Shemesh, M. (2009). Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 80(5): 1046-1052.
- Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone: from" status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 157-177.
- Hellmich, R., Sid, H., Lengyel, K., Flisikowski, K., Schlickerrieder, A., Bartsch, D., Thoma, T., Bertzbach, L. D., Kaufer, B. B., Nair, V., Preisinger, R. and Schusser, B. (2020). Acquiring resistance against a retroviral infection via CRISPR/Cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. *Frontiers in Genome Editing*, 2: 3.
- Helvig, C., Koener, J.F., Unnithan, G.C. and Feyereisen, R. 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12): 4024-4029.
- Heo, Y.T., Quan, X., Xu, Y.N., Baek, S., Choi, H., Kim, N.H. and Kim, J. 2015. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells and Development*, 24: 393-402.
- Hu, X.F., Zhang, B., Liao, C.H. and Zeng, Z.J. 2019. High-Efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9: 1759-1766. DOI: 10.1534/g3.119.400130.
- Huang, Z.Y., Bian, G., Xi, Z. and Xie, X. 2017. Genes important for survival or reproduction in Varroa destructor identified by RNAi. *Insect Science*, 26(1): 68-75.
- Hunter, W., Ellis, J., Vanengelsdorp, D., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., Williams, M., Sela, I., Maori, E., Pettis, J., Cox-Foster, D. and Paldi, N. 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathogens*, 6(12): e1001160.
- Ifantidis, M.D. 1984. Parameters of the population dynamics of the Varroa mite on honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 23: 227-233.
- Ifantidis, M.D. 1988. Some aspects of the process of Varroa jacobsoni mite entrance into honeybee *Apis mellifera* brood cells. *Apidologie*, 19: 387-396.

- Ikeda, M., Matsuyama, S., Akagi, S., Ohkoshi, K., Nakamura, S., Minabe, S., Kimura, K. and Hosoe, M. 2017. Correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in Japanese black cattle. *Scientific Reports*, 7(1): 1-9.
- Issa, M. R., De Jong, D. and Goncalves, L. S. 1985. Study of the preference of the mite *Varroa jacobsoni* for *Apis mellifera* drones. *Apimondia*, pp. 159-160, Oct. 10-16, Nagoya, Japan.
- Jack, C.J. and Ellis, J.D. 2021. Integrated pest management control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the most damaging pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) colonies. *Journal of Insect Science*, 21(5): 1-32.
- Janzen, W.P., Menold, M. and Granger, N.A. 1991. Effects of endogenous esterases and an allatostatin on the products of *Manduca sexta* larval corpora allata in vitro. *Physiological Entomology*, 16(3): 283-293.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-821.
- Jones R.L. and Rothenbuhler W.C. 1964. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. II. Response of two inbred lines to various amounts of cyanide-killed brood. *Animal Behaviour*. 12: 584-588. DOI: 10.1016/0003-3472(64)90083-1.
- Joung, J.K. and Sander, J.D. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 49-55.
- Khalil, A.M. 2020. The genome editing revolution. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1): 1-16.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. and Kim, J.S. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24: 1012-1019.
- Kim, Y.G. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 93: 1156-1160.
- Kim, Y.G. and Chandrasegaran S. 1994. Chimeric restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 91: 883-887.
- Kim, Y.G., Cha J. and Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 93: 1156-1160.
- Kim, Y.G., Smith, J., Durgesha M. and Chandrasegaran, S. 1998. Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to FokI cleavage domain. *Biological Chemistry*, 379: 489-495.
- Kinjoh, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K. and Shinoda, T. 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8): 808-818.
- Knott, G.J. and Doudna, J.A. 2018. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361(6405): 866-869.
- Koca, A.Ö. and Kandemir, I. 2013. Comparison of two morphometric methods for

- discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 37(2): 205-210.
- Kohno, H. and Kubo, T. 2018. mKast is dispensable for normal development and sexual maturation of the male European honeybee. *Scientific Reports*, 8(1): 1-10.
- Kohno, H., Suenami, S., Takeuchi, H., Sasaki, T. and Kubo, T. 2016. Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoological Science*, 33(5): 505-512.
- Konoval, O., Korol, P., Tabaka, P., Kostenko, S., Lizhi, L., Chepiha, A., Doroshenko, M., Drahulian, M., Xingchen, B., Xuetao, H. and Liumeng, L. 2019. Generation of transgenic ducks by crispr/CAS9-mediated gene inser-tion combined with the sperm-mediated gene transfer (SMGT). *Biopolymers and Cell*, 35(6): 427-36.
- Kotthoff, U., Wappler, T. and Engel, M.S. 2013. Greater past disparity and diversity hints at ancient migrations of European honey bee lineages into Africa and Asia. *Journal of Biogeography*, 40: 1832-1838.
- Kraus, B. 1993. Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Journal of Apicultural Research*, 32: 57-64.
- Kraus, B. 1994. Factors influencing host choice of the honey bee parasite *Varroa jacobsoni* Oud. *Experimental & Applied Acarology*, 18: 435-443.
- Kraus, B., Koeniger, N. and Fuchs, S. 1986. Unterscheidung zwischen Bienen verschiedenen Alters durch *Varroa jacobsoni* Oudemans, und Bevorzugung von Ammenbienen im Sommervolk. *Apidologie*, 17: 257-266.
- Kuenen, L.P.S. and Calderone, N.W. 1997. Transfers of varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age-and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 10(2): 213-228.
- Kuenen, L.P.S. and Calderone, N.W. 1998. Positive anemotaxis by *Varroa* mites: responses to bee odour plumes and single clean-air puffs. *Physiological Entomology*, 23: 255-264.
- Kuzma, J. 2016. Reboot the debate on genetic engineering. *Nature*, 531(7593): 165-167.
- Laible, G., Wei, J. and Wagner, S. 2015. Improving livestock for agriculture-technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnology Journal*, 10: 109-120.
- Laidlaw, H.H. and Page, E.R. 1997. Queen Rearing and Bee Breeding. Wicwas Press, Cheshire, Connecticut, USA. 224 p.
- Lamas-Toranzo, I., Galiano-Cogolludo, B., Cornudella-Ardiaca, F., Cobos-Figueroa, J., Ousinde, O. and Bermejo-Álvarez, P. 2019. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. *Scientific Reports*, 9(1): 14900.
- Lascombe, I., Mougin, P., Vuillermoz, C., Adessi, G. and Jouvenot, M. 1996. Gene transfer into subcultured endometrial cells using lipofection. *Biotechniques*, 20: 88-91. DOI: 10.2144/96201st03.
- Lattanzi, A., Meneghini, V., Pavani, G., Amor, F., Ramadier, S., Felix, T., Antoniani, C., Masson, C., Alibeu, O., Lee, C., Porteus, M.H., Bao, G., Amendola, M., Mavilio,

- F. and Miccio, A. 2019. Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements. *Molecular Therapy*, 27(1): 137-150.
- Le Conte, Y. 1990. Contribution à l'étude des relations abeille-Varroa: approches comportementale, chimique et génétique. Thèse, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Paris, 188 pp.
- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Hivet, H., Masson, C., Chappe, B. and Ourisson, G. 1991. Semiochemicals involved in the honeybee-Varroa mite relationship: kairomones and brood pheromones. In: Goodman, L. J. & Fisher, R. C. (eds). *The Behaviour and Physiology of Bees*. CAB International, Oxon, UK, pp. 69-76.
- Le Conte, Y., Arnold, D., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B. and Ourisson, G. 1989. Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*, 245: 638-639.
- Le Conte, Y., de Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.C. and Bécard, J.M. 2007. Honey bee colonies that have survived Varroa destructor. *Apidologie*, 38: 566-572.
- Le Conte, Y., Ellis, M. and Ritter, W. 2010. Varroa mites and honey bee health: Can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41: 353-63.
- Li, L., Wu, L.P. and Chandrasegaran, S. 1992. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89(10): 4275-9.
- Li, W., Huang, Z. Y., Liu, F., Li, Z., Yan, L., Zhang, S., Chen, S., Zhong, B. and Su, S. 2013. Molecular cloning and characterization of juvenile hormone acid methyltransferase in the honey bee, *Apis mellifera*, and its differential expression during caste differentiation. *PloS One*, 8(7): e68544.
- Li, X., Hao, F., Hu, X., Wang, H., Dai, B., Wang, X., Liang, H., Cang, M. and Liu, D. 2019. Generation of T β 4 knock-in Cashmere goat using CRISPR/Cas9. *International Journal of Biological Sciences*, 15(8): 1743.
- Lillico, S.G., Proudfoot, C., King, T.J., Tan, W., Zhang, L., Mardjuki, R., Paschon, D.E., Rebar, E.J., Urnov, F.D., Mileham, A.J., McLaren D.G. and Whitelaw, C.B. 2016. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. *Scientific Reports*, 6: 21645.
- Lindauer, M. 1961. *Communication Among Social Bees*. Harvard University Press, Cambridge.
- Liu, X., Wang, Y., Guo, W., Chang, B., Liu, J., Guo, Z., Quan, F. and Zhang, Y. 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nature Communications*, 4(1): 1-11.
- Liu, X., Wang, Y., Tian, Y., Yu, Y., Gao, M., Hu, G., Su, F., Pan, S., Luo, Y., Guo, Z., Quan, F. and Zhang, Y. 2014. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1780): 20133368.
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R. and Sabatini, A.G. 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*,

39(3): 324-333.

- Lu, L., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B. and Craig, R.W. 1989. Gene transfer by lipofection in rabbit and human secretory epithelial cells. *Pflügers Archiv*, 415: 198-203. DOI: 10.1007/BF00370592.
- Ma, S., Zhang S., Wang F., Liu Y., Liu Y., Xu H., Liu C., Lin Y., Zhao P. and Xia Q. 2012. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLOS One*, 7: e45035.
- Maa, T.C. 1953. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honeybees (Hymenoptera). *Treubia*, 21(3): 525-640.
- Macnaghten, P. 2004. Animals in their nature: A case study on public attitudes to animals, genetic modification and 'nature. *Sociology*, 38(3): 533–551.
- Maga, J.A. 1983. Honey flavor. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 16: 65-68.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P. and Eguaras, M.J. 2010. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research*, 107: 1189-1192.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa F, Shah S.A., Saunders, S.J. and Koonin, E.V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11): 722–36.
- Marchal, E., Zhang, J., Badisco, L., Verlinden, H., Hult, E.F., Van Wielendaele, P., Yagi, K.J., Tobe, S.S. and Broeck, J.V. 2011. Final steps in juvenile hormone biosynthesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4); 219-227.
- Martel, A.C., Zeggane, S., Aurieres, C., Drajnudel, P., Faucon, J.P. and Aubert M. 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol 50. *Apidologie*, 38(6): 534-544.
- Martin, S. 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modelling*, 109: 267-281.
- Maurizio, A. and Hodges, F.E.D. 1950. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee preliminary report. *Bee World*, 31(2): 9-12.
- Milani, N. and Barbattini R. 1988. Effectiveness of Apistan (Fluvalinate) in the control of *Varroa jacobsoni* Oudemans and its tolerance by *Apis mellifera* Linnaeus. *Apicoltura*, 4: 39-58.
- Milani, N. and Lob, M. 1998. Plastic strips containing organophosphorous acaricides to control *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal*, 138: 612-615
- Minakuchi, C., Namiki, T., Yoshiyama, M. and Shinoda, T. 2008. RNAi-mediated knockdown of juvenile hormone acid O-methyltransferase gene causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *The FEBS Journal*, 275(11): 2919-2931.
- Moghaddassi, S., Eyestone, W. and Bishop, C.E. 2014. TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLOS One*, 9(2): e89631.

- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V. and Van der Oost, J. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299).
- Momot J.P. and Rothenbuhler W.C. 1971. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. V. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research*, 10: 11-21. DOI: 10.1080/00218839.1971.11099665.
- Moritz R.F.A., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P. and Paxton, R.J. 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, 41(3): 227-242.
- Muz M.N., Solmaz, H., Yaman, M. and Karakavuk, M. 2012. Kış Salkımı Erken Bozulan Arı Kolonilerinde Paraziter ve Bakteriyel Patojenler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3): 147-150.
- Nakami, W.N., Nguhiu-Mwangi, J., Kipyegon, A.N.E., Ogugo, M., Muteti, C. and Kemp, S. 2022. Comparative Efficiency for in Vitro Transfection of Goat Undifferentiated Spermatogonia Using Lipofectamine Reagents and Electroporation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 15: 11-20.
- Nasr, M. and Wallner, K. 2003. Residues in honey and wax. Implications and safety. In Proc. of the North American Apicultural Research Symposium, *American Bee Journal*, (40): 322.
- Nazzi, F., Milani, N. and Della Vedova, G. 2004. A semiochemical from larval food influences the entrance of Varroa destructor into brood cells. *Apidologie*, 35: 403-410.
- Nazzi, F., Milani, N., Della Vedova, G. and Nimis, M. 2001. Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of Varroa destructor. *Apidologie*, 32: 149-155.
- Nie, H.Y., Liang, L.Q., Li, Q.F., Zhu, Y.N., Guo, Y.K., Zheng, Q.L., Lin, Y., Yang, D., Li Z. and Su, S.K. 2021. CRISPR/Cas9 mediated knockout of Amyellow-y gene results in melanization defect of the cuticle in adult Apis mellifera. *Journal of Insect Physiology*, 132: 104264.
- Niimi, S. and Sakurai, S. 1997. Development changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in-vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, Bombyx mori. *Journal of Insect Physiology*, 43(9): 875-884.
- Nijhout, H.F. 1994. Insect Hormones. Princeton University Press, Princeton.
- Niwa, R., Niimi, T., Honda, N., Yoshiyama, M., Itoyama, K., Kataoka, H. and Shinoda, T. 2008. Juvenile hormone acid O-methyltransferase in Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 714-720.
- Noriega, F.G., Ribeiro, J.M.C., Koener, J.F., Valenzuela, J.G., Hernandez-Martinez, S., Pham, V.M. and Feyereisen, R. 2006. Comparative genomics of insect juvenile hormone biosynthesis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(4): 366-374.
- Oldroyd, B.P. 1999. Coevolution while you wait: Varroa jacobsoni, a new parasite of western honey bees. *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 312-315.

- Oldroyd, B.P. and Ratnieks, F.L.W. 2000. Evolution of worker sterility in honey-bees (*Apis mellifera*): how anarchistic workers evade policing by laying eggs that have low removal rates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47: 268-273.
- Otten, C. and Fuchs, S. 1988. Individual differences in *Varroa jacobsoni* of preference for drone larvae to worker bee larvae. European research on varroaosis control, Proceedings of a Meeting of EC-Expert's Group, pp. 69-71, Bad Homburg.
- Oxley, P., Oldroyd, B. and Gladsy, H. 2008. Development of two markers for hygienic behavior of honeybees. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 2: 1-31.
- Page Jr, R.E. and Peng, C.Y.S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36(4-6): 695-711.
- Palmer, K. (2019). Honey Bee and Varroa Destructor Population Dynamics. Honor Thesis, University of South Dakota, ABD, 37 p.
- Park, O.W. 1937. Testing for resistance to American foulbrood in honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 30(3): 504-512.
- Park, T.S., Lee, H.J., Kim, K.H., Kim, J.S. and Han, J.Y. 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35): 12716-12721.
- Pen, A.E. 2018. CRISPR-Cas9 gene editing in honeybee and pig. PhD Thesis, Aarhus University, Aarhus, 126 p.
- Pernal, S.F., Baird, D.S., Birmingham, A.L., Higo, H.A., Slessor, K.N. and Winston, M.L. 2005. Semiochemicals influencing the host-finding behaviour of Varroa destructor. *Experimental & Applied Acarology*, 37(1): 1-26.
- Pettis, J.S. 2004. A scientific note on Varroa destructor resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie*, 35: 91-92.
- Phillips, T. 2008. Genetically modified organisms (GMOs): Transgenic crops and recombinant DNA technology. *Nature Education*, 1(1): 213.
- Picard, M.È., Cusson, M., Sen, S.E. and Shi, R. 2021. Rational design of Lepidoptera-specific insecticidal inhibitors targeting farnesyl diphosphate synthase, a key enzyme of the juvenile hormone biosynthetic pathway. *Journal of Pesticide Science*, 46(1): 7-15.
- Pritchard, D.J. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research*, 55(1): 38-48.
- Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R., Long, C.R., Pryor, J.H., King, T.J., Lillico, S.G., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Whitelaw, C.B. and Fahrenkrug, S.C. 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*, 24: 147-153.
- Raina, S.K., Kioko, E., Zethner, O. and Wren, S. 2011. Forest habitat conservation in Africa using commercially important insects. *Annual Review of Entomology*, 56: 465-485.
- Rahman, S.H., Maeder, M.L., Joung, J.K. and Cathomen, T. 2011. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Human gene therapy*, 22(8): 925-933.

- Raman, R. 2017. The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM Crops & Food*, 8(4): 195-208.
- Ramirez, C.L., Foley, J.E., Wright, D.A., Müller-Lerch, F., Rahman, S.H., Cornu, T. I., Winfrey, R.J., Sander, J.D., Fu, F., Townsend, J.A., Cathomen, T., Voytas, D.F. and Joung, J.K. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods*, 5(5): 374-375.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis J.D., Hawthorne, D. and vanEngelsdorp D., 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5): 1792-1801.
- Rath, H.W. 1991. Investigations on the parasitic mites Varroa jacobsoni (Oud.) and Tropilaelaps clareae (Delfinado and Baker) and their hosts Apis cerana (Fabr.), Apis dorsata (Fabr.) and Apis mellifera L. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn, Bonn, 148 p.
- Ratnieks, F.L.W. 1995. Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honey bee. *Journal of Apicultural Research*, 34: 31-37.
- Ratti, V., Kevan, P. and Hermann, E. 2013. A mathematical model for population dynamics in honeybee colonies infested with Varroa destructor and the Acute Bee Paralysis Virus. *Canadian Applied Mathematics Quarterly*, 21(1): 63-93.
- Razzaq, A. and Masood, A. 2018. CRISPR/Cas9 system: a breakthrough in genome editing. *Molecular Biology*, 7(210): 2.
- Rechavi, O., Minevich, G. and Hobert, O. 2011. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in C. elegans. *Cell*, 147: 1248-1256.
- Ren, X., Yang, Z., Mao, D., Chang, Z., Qiao, H. H., Wang, X., Sun, J., Hu, Q., Cui, Y., Liu, L. P., Ji, J. Y., Xu, J. and Ni, J. Q. 2014. Performance of the Cas9 nickase system in Drosophila melanogaster. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(10): 1955-1962.
- Rickli, M., Guerin, P.M. and Diehl, P.A. 1992. Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite Varroa jacobsoni on a servosphere. *Naturwissenschaften*, 79: 320-322.
- Riddiford, L.M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. In: Evans, P.D. (Ed.), *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, Cambridge, pp. 213-274.
- Rinderer, T.E., Harris, J.W., Hunt, G.J. and de Guzman, L.I. 2010. Breeding for resistance to Varroa destructor in North America. *Apidologie*, 41: 409-424.
- Ritter, W. 1988. Medications registered in Western Europe for Varroa tosis control. *Apidologie*, 19(2): 113-116.
- Robert, J.S., and Baylis, F. 2003. Crossing species boundaries. *American Journal of Bioethics*, 3(3): 1-13.
- Robinson, G. E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review*

- of Entomology*, 37: 637–665.
- Rollin, B.E. (1996). The Frankenstein Syndrome: Ethical and social issues in the genetic engineering of animals. New York: Cambridge University Press.
- Rosenkranz, P. 1993. A bioassay for the test of the host finding behaviour of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 24: 486-488
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 96-119.
- Rosenkranz, P., Fries, I., Boecking, O. and Stürmer, M. 1997. Damaged *Varroa* mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. *Apidologie*, 28(6): 427-37.
- Rosenkranz, P., Tewarson, N.C. and Engels, W. 1984. Optimal host selection by reproductive female *Varroa jacobsoni*. In: Engels, W. et al. (eds.), *Advances in Invertebrate Reproduction*, Elsevier Science Publishers, pp. 317-336.
- Roth, A., Vleurinck, C., Netschitailo, O., Bauer, V., Otte, M., Kaftanoglu, O., Page, R.E. and Beye, M. 2019. A genetic switch for worker nutrition-mediated traits in honeybees. *PLoS Biology*, 17(3): e3000171.
- Rothenbuhler, W.C. 1964a. Behavior genetics of nest cleaning in honey bee. I. Responses of four inbred lines to disease killed brood. *Animal Behaviour*. 12: 578-583.
- Rothenbuhler W.C. 1964b. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist*, 4: 111-123. DOI: 10.1093/icb/4.2.111.
- Rousseau B.A., Hou Z., Gramelspacher M.J. and Zhang Y. 2018. Programmable RNA Cleavage and Recognition by a Natural CRISPR-Cas9 System from *Neisseria meningitidis*. *Molecular Cell*, 69: 906-914. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.025.
- Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrk, M.K. and Page, R.E. 2007. Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Experimental Gerontology*, 42(10): 1020-1032.
- Sampson T.R., Saroj S.D., Llewellyn A.C., Tzeng Y.L. and Weiss D.S. 2013. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 497: 254-257. DOI: 10.1038/nature12048.
- Schroeder, A., Wallner, K. and Weber, D. 2004. Amitraz als *Varroa* zid–Einfluss auf die Honigqualität. *Apidologie*, 35(5): 535-536.
- Schultz-Bergin, M. 2018. Is CRISPR an ethical game changer? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 31(2): 219-238.
- Schulz, A.E. 1984. Reproduktion und Populationsentwicklung der parasitischen Milbe *Varroa jacobsoni* (Oud.) in Abhängigkeit vom Brutzyklus ihres Wirtes, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 15: 401-420.
- Schuppli, C.A., Molento, C.F.M. and Weary, D.M. 2015. Understanding attitudes towards the use of animals in research using an online public engagement tool. *Public Understanding of Science*, 24(3): 358-374.
- Seeley, T.D. 1991. Age polyethism for the hive duties in honey bees-illusion or reality.

Ethology, 87:284-297.

- Seeley, T.D. 2007. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie*, 38: 19-29.
- Shalaby, K., Aouida M. and El-Agnaf, O. 2020. Tissue-specific delivery of CRISPR therapeutics: strategies and mechanisms of non-viral vectors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 7353. DOI: 10.3390/ijms21197353.
- Shalaby, K.E., Aouida, M., Gupta, V., Ghanem, S.S. and El-Agnaf, O. 2022. Rapid Assessment of CRISPR Transfection Efficiency and Enrichment of CRISPR Induced Mutations Using a Dual-Fluorescent Stable Reporter System. *Frontiers in Genome Editing*, 4, 12.
- Shimanuki, H., Calderone, N.W. and Knox, D.A. 1994. Parasitic mite syndrome the symptoms, *American Bee Journal*, 134: 827-828.
- Shimanuki, H., Knox, D.A., Furgala, B., Caron, D.M. and Williams, J.L. 1992. Diseases and pests of honey bees. In the hive and the Honeybee, Graham, J. (ed.), Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, pp. 1083- 1151.
- Shinoda, T. and Itoyama, K. 2003. Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21): 11986-11991.
- Shinwari, Z.K., Tanveer, F. and Khalil, A.T. 2018. Ethical issues regarding CRISPR mediated genome editing. *Current Issues in Molecular Biology*, 26(1): 103-110.
- Sinakevitch, I., Kurtzman, Z., Choi, H.G., Pardo, D.A.R., Dahan, R.A., Klein, N., Bugarija, B., Wendlandt, E. and Smith, B.H. 2020. Anti-RDL and Anti-mGluR1 Receptors Antibody Testing in Honeybee Brain Sections using CRISPR-Cas9. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e59993.
- Sioson, V.A., Kim, M. and Joo, J. 2021. Challenges in delivery systems for CRISPR-based genome editing and opportunities of nanomedicine. *Biomedical Engineering Letters*, 11, 217-233.
- Song, Y., Cui, C., Zhu, H., Li, Q., Zhao, F. and Jin, Y. 2015. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expression and Purification*, 112: 1-7.
- Sparagana, S.P., Bhaskaran, G., Dahm, K.H. and Riddle, V. 1984. Juvenile hormone production, juvenile hormone esterase, and juvenile hormone acid methyltransferase in corpora allata of *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Zoology*, 230(2): 309-313.
- Spivak, M. and Gilliam, M. 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee world*, 79(4): 169-186.
- Spivak, M. and Reuter, S.G. 1998. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary, *Apidologie*, 29: 291-302.
- Steeves, R.M., Todd, T.C., Essig, J.S. and Trick, H.N. 2006. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera*

- glycines reproduction, *Functional Plant Biology*, 33: 991-999.
- Streiffer, R. 2003. In defense of the moral relevance of species boundaries. *American Journal of Bioethics*, 3(3): 37-38.
- Streiffer, R. and Hedemann, T. 2005. The political import of intrinsic objections to genetically engineered food. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 18(2): 191-210.
- Strutt S.C., Torrez R.M., Kaya E., Negrete O.A. and Doudna J.A. 2018. RNA-dependent RNA targeting by CRISPR-Cas9. *Elife*, 7: e32724. DOI: 10.7554/eLife.32724.
- Sugarman, J. 2015. Ethics and germline gene editing. *EMBO Reports*, 16: 879-880.
- Sumpter, D.J.T. and Martin, S.J. 2004. The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73: 51-63.
- Sulimanovic, D., Ruttner, F. and Pechhacker, A. 1982. Studies on the biology of reproduction in Varroa jacobsoni. *Honeybee Science*, 3: 109-112.
- Surridge, C. 2018. A crispr definition of genetic modification. *Nature Plants*, 4: 233.
- Symington, L.S. and Gautier, J. 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics*, 45: 247-271.
- Tewarson, N.C. 1983. Nutrition and reproduction in the ectoparasite honeybee (Apis sp.) mite Varroa jacobsoni. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 125 pp.
- Tian, S., Jiang, L., Gao, Q., Zhang, J., Zong, M., Zhang, H., Ren, Y., Guo, S., Gong, G., Liu, F. and Xu, Y. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Reports*, 36(3): 399-406.
- Trouiller, J., Arnold, G., Le Conte, Y. and Masson, C. 1993. The production of kairomones of Varroa jacobsoni and brood pheromones by honey bee larvae. In: Conner, L.J., Rinderer, T., Sylvester, H.A. and Wongsiri, S. (eds.), Proceedings of the first International Conference on the Asian honey bees and bee mites, Wicwas Press, Cheshire, Connecticut USA, pp. 447-453.
- Trouiller, J., Arnold, G., Chappe, B., Le Conte, Y. and Masson, C. 1992. Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by Varroa jacobsoni. *Journal of Chemical Ecology*, 18: 2041-2053.
- Trouiller, J., Arnold, G., Chappe, B., Le Conte, Y., Billon, A. and Masson, C. 1994. The kairomonal esters attractive to the Varroa jacobsoni mite in the queen brood. *Apidologie*, 25: 314-321.
- Underwood, R. and vanEngelsdorp, D. 2007. Colony collapse disorder: Have we seen this before? *Bee Cult*, 35: 13-18.
- Urnov, F.D. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435: 646-651.
- Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S. and Gregory, P.D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11: 636-646.
- Uygur Ş.Ö. and Girişgin, A.O. 2008. Bal arısı hastalık ve zararlıları. *Uludağ Arıcılık*

- Dergisi*, 8(4): 130-142.
- vanAlphen, J.J.M. and Fernhout, B.J. 2020. Natural selection, selective breeding, and the evolution of resistance of honeybees (*Apis mellifera*) against Varroa. *Zoological Letters*, 6: 6.
- Vandame, R. 1996. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acarier parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en climat tropical humide du Mexique. Thesis, Université Claude Bernard, Lyon, France, 111 p.
- Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S.C. and Dewitte, H. 2021. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release*, 333: 511-520.
- Visscher, P.K. and Dukas, R. 1997. Survivorship of foraging honey bees. *Insectes Sociaux*, 44(1): 1-5.
- Wallner, K. 1999. Varroa cides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30(2-3): 235-248.
- Wang, F., Wang, L., Zou, X., Duan, S., Li, Z., Deng, Z., Luo, J., Lee, S.Y. and Chen, S. 2019. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnology advances*, 37(5): 708-729.
- Wang, H., La Russa, M., and Qi, L.S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85: 227-264. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- Wang, M., Glass, Z. A. and Xu, Q. 2017. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Therapy*, 24(3): 144-150.
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A.V., Weaver, D. and Tsutsui, N.D. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314: 642-645.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H. and Starks, P.T. 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 54: 405-423.
- Winston, M.L. 1991. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press.
- Xie, X., Huang, Z.Y. and Zeng, Z. 2016. Why do Varroa mites prefer nurse bees? *Scientific Reports*, 6(1): 1-6.
- Yániz, J.L., Silvestre, M.A. and Santolaria, P. 2020. Sperm quality assessment in honey bee drones. *Biology*, 9(7): 174.
- Yang, Z. M., Wu, Y., Li, F. F., Zhou, Z. J., Yu, N. and Liu, Z. W. 2021. Genomic Identification and Functional Analysis of JHAMTs in the Pond Wolf Spider, *Pardosa pseudoannulata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21): 11721.
- Yıldız, B.İ. and Karabağ, K. (2022). Quantitation of neuroxin-1, ataxin-3 and atlastin genes related to grooming behavior in five races of honey bee, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 46(1): 3-11.

- Young, A., Lakey, J., Murray, A. and Moore, R. 2002. Gene therapy: A lipofection approach for gene transfer into primary endothelial cells. *Cell Transplant*, 11: 573-582. DOI: 10.3727/000000002783985495.
- Yu, A., Lee, Y. and Eng, L. 1991. Inhibition of GFAP synthesis by antisense RNA in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 30: 72-79. DOI: 10.1002/jnr.490300109.
- Yu, B., Lu, R., Yuan, Y., Zhang, T., Song, S., Qi, Z., Shao, B., Zhu, M., Mi, F. and Cheng, Y. 2016. Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Developmental Biology*, 16(1): 1-8.
- Yu, S., Luo, J., Song, Z., Ding, F., Dai, Y. and Li, N. 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*, 21(11): 1638-1640.
- Zaitoun, S. 1993. Initial studies on the attractivity of honeybee brood for *Varroa jacobsoni* Oudemans. Dissertation, Universität Hohenheim, Hohenheim, 87 pp.
- Zhang, S., Shen, J., Li, D. and Cheng, Y. 2021. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, 11(2): 614.
- Zhang, Y., Massel, K., Godwin, I.D. and Gao, C. 2018. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology*, 19(1): 1-11.

ÖZGEÇMİŞ

Berkant İsmail YILDIZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2019-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Hayvansal Biyoteknoloji BD, Antalya
Yüksek Lisans 2017-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Hayvansal Biyoteknoloji BD, Antalya
Lisans 2013-2017	Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

- 1- Araştırmacı, 2022- . Apis mellifera anatoliaca Bal Arısında CRISPR-Cas9 Kullanılarak Juvenil Hormon Asit O-metiltransferaz (JHAMT) Nakavt Mutantların Üretilmesi ve Varroa destructor Üzerine Etkisinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FDK-2022-6006. (34.911,114 TL).
- 2- Araştırmacı, 2019-2021. Antalya Habitatında Bulunan Bombus terrestris dalmatinus Arılarında Sıcak Şok Proteinleri (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) Bakımından Genetik Potansiyelinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FKA-2019-4461. (54.253,28 TL).
- 3- Araştırmacı, 2019-2019. Bazı Bal Arısı Irklarında Tımar Davranışı ile ilgili Aday Genlerin RT-PCR Yöntemiyle Kantitasyonu. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FYL-2019-4245. (16.425,10 TL).

4- Araştırmacı, 2018-2020. Afyonkarahisar Yöresi Ticari Yumurtacı Tavuk İşletmelerinde ALV Hastalığının ve Tümör Baskılayıcı Gen Metilasyonlarıyla İlişkisinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FBA-2018-3614. (57.389,00 TL).

BURLAR VE ÖDÜLLER

- TÜBİTAK Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2022).
- TÜBİTAK 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği (2022).
- TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu (2018-2019).

ESERLER

SCI ve SCI-Expanded Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- 1- **YILDIZ B.İ.**, TÜTEN SEVİM E, AYDIN S, KARADUMAN ASLAN Y, ÇETİN R, SUR E, KARABAĞ K, **2023**. A case of whether the genetic variation decreased or not in the protected Caucasian bee, *Apis mellifera caucasica* Pollmann, 1889 (Hymenoptera: Apidae) population in isolated regions. Turkish Journal of Entomology (Accepted).
- 2- HALAWA W, AL-ATİYAT R.M, OMAR J.A, RASHAYDEH F.S, ULLAH F, Shakirullah, **YILDIZ B.İ.**, **2023**. Effect of Natural and artificial sucking on performance and mortality of newborn Assaf lambs. Pakistan Journal of Zoology (Accepted).
- 3- **YILDIZ B.İ.**, KARABAĞ K, **2022**. Quantitation of neuroxin-1, ataxin-3 and atlastin genes related to grooming behavior in five races of honey bee, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), in Turkey. Turkish Journal of Entomology, 46(1), 3-11. DOI: 10.16970/entoted.992984.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

- 1- RASHAYDEH F.S, **YILDIZ B.İ.**, MEYDAN H, AL-ATİYET R, **2023**. Neoplastic Diseases in Sheep. “4. International Cukurova Agriculture and Veterinary Congress”, November 27-28, Adana/TURKIYE, Congress Book, Page: 4 (Sözlü/Özet).
- 2- KARABAĞ K, **YILDIZ B.İ.**, **2022**. Biotechnological Studies in Honey Bee. “7. International Muğla Beekeeping & Pine Honey Congress”, November 15-19, Muğla/TURKIYE, Congress Book, Page: 155 (Sözlü/Özet).
- 3- **YILDIZ B.İ.**, KARABAĞ K, **2022**. Some Genes and Chemical Compounds Effective in Host Preference of the Honey Bee Ectoparasite *Varroa destructor*. “VI. International Congress on Animal Breeding, Genetics and Husbandry (ICABGEH-2022)”, October 03-05, Samsun/TURKIYE, Congress Book, Page: 34-36 (Sözlü/Tam Metin).

- 4- **YILDIZ B.İ.**, TÜTEN SEVİM E, KARABAĞ K, **2021**. Programmable Gene Editing Techniques and Their Use in Livestock. “3rd International and 12th National Animal Science Conference”, November 27-28, Bursa/TURKIYE, Congress Book, Page: 207-217 (Sözlü/Tam Metin).
- 5- **YILDIZ B.İ.**, KARABAĞ K, **2021**. RNAi as a Potential Struggle Against the Honey Bee Ectoparasite Varroa destructor. “3rd International and 12th National Animal Science Conference”, November 27-28, Bursa/TURKIYE, Congress Book, Page: 201-205 (Sözlü/Tam Metin).
- 6- KARABAĞ K, **YILDIZ B.İ.**, ERSAL M, **2019**. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) in Poultry. “International Biological, Agricultural and Life Science Congress”, November 07-08, Lviv/UKRAINE, Congress Book, Page: 71-75 (Sözlü/ Tam Metin).
- 7- KARABAĞ K, ERSAL M, **YILDIZ B.İ.**, **2019**. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function of Bumblebees. “International Biological, Agricultural and Life Science Congress”, November 07-08, Lviv/UKRAINE, Congress Abstract Book, Page: 41 (Sözlü/Özet).
- 8- ERSAL M, **YILDIZ B.İ.**, KARABAĞ K, **2019**. Molecular Diagnosis of Oncogenic Viruses in Poultry. “International Congress on Animal Breeding, Genetics and Husbandry (ICABGEH-2019)”, September 11-13, Prague/CZECHIA, Congress Book, Page: 18 (Sözlü/Özet).
- 9- **YILDIZ B.İ.**, Ersal M, KARABAĞ K, **2019**. Effects of Neural Gene Expression on Grooming Behavior in Honey Bee: A Brief Review. “International Congress on Animal Breeding, Genetics and Husbandry (ICABGEH-2019)”, September 11-13, Prague/CZECHIA, Congress Book, Page: 19 (Sözlü/Özet).
- 10- ERSAL M, **YILDIZ B.İ.**, KARABAĞ K, **2019**. Mini Review: The Determination of Hsp Regions in Bumblebee by qPCR. “World Conference on Sustainable Life Sciences”, June 30- July 07, Budapest/HUNGARY, Congress Abstract Book, Page: 41 (Sözlü/Özet).
- 11- KARABAĞ K, **YILDIZ B.İ.**, **2019**. Possible Roles of Insulin Signaling Pathway in Grooming Behavior. “World Conference on Sustainable Life Sciences”, June 30- July 07, Budapest/HUNGARY, Congress Abstract Book, Page: 45 (Sözlü/Özet).
- 12- BENER L, ERSAL M, **YILDIZ B.İ.**, ÖZDEMİR D, KARABAĞ K, **2019**. Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Tespiti ve Ölçümünde Kullanılan Farklı Gerçek Zamanlı PCR Kimyasallarının Karşılaştırılması. “4. Uluslararası Anadolu Tarım, Gıda, Çevre ve Biyoloji Kongresi”, 20-22 Nisan, Afyon/TURKIYE, Congress Book, Page: 430-430 (Sözlü/Özet).
- 13- KARABAĞ K, **YILDIZ B.İ.**, **2018**. Oncogenic Viruses in Poultry. “International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch” May 09-12, Niğde-Kapadokya/TURKIYE, Congress Book, Page: 132-133 (Poster).
- 14- KARABAĞ K, TÜTEN SEVİM E, **YILDIZ B.İ.**, TOPARSLAN E, **2018**. Effect of SNP’s on the Secondary Protein Structure of Ghrelin Gene in Long-Term Selected

Japanese Quail. “International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch” 09-12 May, Niğde-Kapadokya/TURKIYE, Congress Book, Page: 163-165 (Poster).

SCI Kapsamı Dışındaki Diğer Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1- **YILDIZ B.İ**, KARABAĞ K, **2021**. İnsektisitlerin Bal Arısı Davranışı ve Fizyolojisi Üzerine Etkileri. Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology, 9(5): 863-867. DOI: 10.24925/turjaf.v9i5.863-867.4027

2- **YILDIZ B.İ**, ERSAL M, KARABAĞ K, **2020**. Oncogenic viruses and their molecular diagnosis in poultry. Black Sea Journal of Engineering and Science, 3(4): 165-172. DOI: 10.34248/bsengineering.703353.

3- **YILDIZ B.İ**, KARABAĞ K, **2020**. The effect of insulin signaling pathway on honey bee grooming behavior. Black Sea Journal of Engineering and Science, 3(3): 124-127. DOI: 10.34248/bsengineering.688130.

4- **YILDIZ B.İ**, KARABAĞ K, **2020**. Effects of neural gene expressions on grooming behavior in honey bees. Black Sea Journal of Engineering and Science, 3(2): 57-60. DOI: 10.34248/bsengineering.646925.

5- BENER L, ERSAL M, **YILDIZ B.İ**, **2019**. The comparison of various real time PCR chemistries used in detection and quantification of genetically modified organisms. Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology, 7(1): 133-137. DOI: 10.24925/turjaf.v7isp1.133-137.2782.