

**KIRKLARELİ BAL ARISI POPULASYONLARINDA (*Apis mellifera* L.) mtDNA COI
VE ND5 GEN BÖLGELERİNDE PCR-RFLP ANALİZİ İLE GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

İLKNUR GÖZE

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KIRKLARELİ BAL ARISI POPULASYONLARINDA (*Apis mellifera* L.) mtDNA COI
VE ND5 GEN BÖLGELERİNDE PCR-RFLP ANALİZİ İLE GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

İLKNUR GÖZE

ORCID: 0000-0001-9429-5249

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

ŞUBAT-2022

Her hakkı saklıdır.

ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ BEYANI

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak sunulan ve Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışması; Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmada herhangi bir destek alınmamıştır.

İlknur GÖZE

22/02/2022



ÖZET

KIRKLARELİ BAL ARISI POPULASYONLARINDA (*Apis mellifera* L.) mtDNA COI VE ND5 GEN BÖLGELERİNDE PCR-RFLP ANALİZİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

İlknur GÖZE

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Bu araştırmada, Kırklareli bal arısı populasyonlarını temsil eden bal arıları mitokondriyel genomda COI ve ND5 gen bölgeleri temelinde incelenmiştir. *Apis mellifera* populasyonlarının tanımlanmasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yönteminden faydalanılmıştır. Bu çalışmada, Türkiye'nin Kırklareli bölgesinde bulunan bal arısı populasyonları COI ve ND5 gen bölgelerinde PCR-RFLP yöntemi ile *NcoI*, *SspI*, *StyI*, *AluI*, *HincII*, *FokI* restriksiyon enzimleri kullanılarak incelenmiştir. Kırklareli ilini temsil eden bal arısı populasyonlarının yanı sıra Tekirdağ yöresinden de olmak üzere toplam 117 adet işçi arı örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, COI gen bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesimi sonucunda farklı varyasyon ve mutasyon noktaları tespit edilmiştir. COI/*NcoI* kesiminde G→A transizyonu sonucu CCATGG şeklinde olan DNA dizisi CCATGA şeklinde yeni bir kesim noktası oluşturmuştur ve bu haplotip C haplotipi olarak adlandırılmıştır. COI/*SspI* kesimi sonucu daha önce literatürde bildirilen C haplotipi tespit edilmiştir. COI/*StyI* enzimi ile muamele sonucunda G→A transizyonu sonucu, CCWWGG şeklinde olan DNA dizisi, CCWWGA şekline dönmüş ve literatürde daha önce bildirilen kesim noktası ve B haplotipi tespit edilmiştir. ND5/*AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu tüm örneklerde C haplotipi elde edilmiştir. ND5/*FokI* ve ND5/*HincII* enzimleri ile incelenen tüm populasyonlarda kesim tespit edilememiş ve tek bir bant profili sonucu B haplotipi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera* L., Kırklareli bal arısı, COI, ND5, PCR-RFLP

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN KIRKLARELİ HONEY BEE POPULATIONS (*Apis mellifera* L.) BY PCR-RFLP ANALYSIS IN mtDNA COI AND ND5 GENE REGIONS

İlknur GÖZE

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

In this study, honey bees representing Kırklareli honey bee populations were investigated based on COI and ND5 gene regions in the mitochondrial genome. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was used to define the *Apis mellifera* populations. In this study, honey bee populations in the Kırklareli province of Turkey were investigated via COI and ND5 gene regions by PCR-RFLP method using *Nco*I, *Ssp*I, *Sty*I, *Alu*I, *Hinc*II, *Fok*I restriction enzymes. A total of 117 worker bee samples were used as material from Kırklareli and Tekirdağ region. In this study, different variation and point mutation was determined as a result of cutting the COI gene region with the *Nco*I enzyme. The DNA sequence of CCATGG as a result of the G→A transition in the COI/*Nco*I segment formed a new restriction site as CCATGA and this haplotype was determined as the C haplotype. As a result of the COI/*Ssp*I restriction, the C haplotype previously reported in the literature was determined. As a result of the treatment with COI/*Sty*I enzyme, the cut-off point previously reported in the literature was determined from the mutation of the G→A transition and the CCWWGG DNA sequence changed as CCWWGA, and this profile was expressed as the B haplotype. C haplotype was obtained in all the samples as a result of restricting with ND5/*Alu*I restriction enzyme. No digestion was found in all of the populations analyzed with ND5/*Fok*I and ND5/*Hinc*II enzymes, and only B haplotype was observed.

Keywords: *Apis mellifera* L., Kırklareli Honey Bee, COI, ND5, PCR-RFLP

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Bal Arısı Biyolojisi ve Bal Arılarında Gelişim.....	2
1.2 Bal Arılarının Sınıflandırılması	5
1.3 Bal Arılarının Kökeni ve Coğrafi Dağılımı	8
1.4 Orta Doğu'da Yayılım Gösteren Bal Arısı Irkları	14
1.5 Morfolojik Yöntemlere Göre Bal Arılarının Karakterizasyonu.....	16
1.6 Moleküler Yöntemlere Göre Bal Arılarının Karakterizasyonu.....	19
1.6.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
1.6.2 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	21
1.7 Mitokodri ve Mitokondriyel DNA (mtDNA) Molekülü.....	23
1.7.1 Bal Arısı mtDNA'sı	25
1.7.2 Bal Arılarında Çalışılan Mitokondriyel Lokuslar	30
1.7.2.1 Sitokrom C Oksidaz I Geni (COI)	30
1.7.2.2 NADH Dehidrogenaz 5 Lokusu (ND5)	31
1.8 Literatür Özeti	33
1.9 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	43
2. MATERYAL VE METOD.....	46
2.1 Materyal	46
2.1.1 Örnek alınan bölgeler.....	46
2.1.2 Kullanılan araçlar ve gereçler	47
2.1.3 Tampon çözeltiler	48
2.2 Metod	48
2.2.1 Genomik DNA örneklerinin seçimi	48
2.2.2 PCR optimizasyonu	49
2.2.2.1 PCR Protokolü Seçimi	49

2.2.3 Çalışılan mitokondriyel DNA PCR-RFLP gen bölgeleri.....	50
2.2.4 Mitokondriyel DNA COI ve ND5 bölgelerinin PCR ile çoğaltılması.....	52
2.2.5 Sonuçların agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.....	54
2.2.6 Mitokondriyel DNA COI bölgesinin <i>NcoI</i> , <i>SspI</i> , <i>StyI</i> ve ND5 bölgesinin <i>AluI</i> , <i>FokI</i> , <i>HincII</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.....	56
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	58
3.1 COI Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması.....	58
3.1.1 COI gen bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesilmesi.....	58
3.1.2 COI gen bölgesinin <i>SspI</i> enzimi ile kesilmesi.....	59
3.1.3 COI gen bölgesinin <i>StyI</i> enzimi ile kesilmesi.....	60
3.2 ND5 Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması.....	62
3.2.1 ND5 gen bölgesinin <i>AluI</i> enzimi ile kesilmesi.....	62
3.2.2 ND5 gen bölgesinin <i>FokI</i> enzimi ile kesilmesi.....	63
3.2.3 ND5 gen bölgesinin <i>HincII</i> enzimi ile kesilmesi.....	64
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bal arılarının taksonomik sınıflandırılması.....	6
Çizelge 1.2. Coğrafi yayılım gösteren bal arısı alttürleri	11
Çizelge 1.3. Bal arılarında morfolojik ölçümlerde kullanılan karakterler.....	18
Çizelge 1.4. Orta Doğu bölgesinin arı ırklarına yönelik verilen bazı morfometrik veriler	19
Çizelge 1.5. Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıklar	22
Çizelge 1.6. İnsan, maya, mısır, <i>Drosophila yakuba</i> ve bal arısı mtDNA'larının taşıdığı genler	25
Çizelge 1.7. <i>Apis mellifera</i> ırklarına ait mtDNA büyüklükleri.....	29
Çizelge 1.8. Farklı bal arısı türlerinin kökenlerini belirlemek için yapılmış çalışmalar	32
Çizelge 2.1. Bal arısı örneklerinin alındığı bölgeler ve örnek sayısı.....	46
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan araçlar ve gereçler.....	47
Çizelge 2.3. Elektroforez işlemlerinin ve agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltilerin bileşimleri	48
Çizelge 2.4. COI-ND5 PCR Optimizasyonu	49
Çizelge 2.5. PCR-RFLP sırasında kullanılan primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynak	50
Çizelge 2.6. Kullanılan restriksiyon enzimleri, saflaştırıldıkları organizmalar ve kesim yaptıkları özgün tanıma dizileri.....	52
Çizelge 2.7. PCR reaksiyonu, konsantrasyonları ve kullanılan miktarlar	53
Çizelge 2.8. PCR sıcaklık ve döngüler	54
Çizelge 2.9. COI ve ND5 bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu.....	56
Çizelge 2.10. Restriksiyon enzimlerinin konsantrasyonları	56
Çizelge 2.11. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve fragment büyüklükleri	57
Çizelge 3.1. Çalışılan populasyonlarda mtDNA COI bölgesine uygulanan enzimler sonucu oluşan bant profilleri, parça uzunlukları ve haplotipleri.....	65
Çizelge 3.2. Çalışılan populasyonlarda mtDNA ND5 bölgesine uygulanan enzimler sonucu oluşan bant profilleri, parça uzunlukları ve haplotipleri.....	66
Çizelge 3.3. Gen bölgesindeki populasyonların haplotip çeşitliliği	66
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri ile gen bölgeleri bakımından <i>Apis mellifera</i> türlerinin karşılaştırılması	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kovan bireyleri.....	4
Şekil 1.2. İşçi arılarda gelişim	5
Şekil 1.3. Arılarda kuluçka dönemi gün sayıları	5
Şekil 1.4. Bal arısı ekotip ve alt türlerinin dağılımı	8
Şekil 1.5. Batı bal arılarının temel bileşen ve morfolojik özelliklere göre üç genetik soya dağılımı.....	9
Şekil 1.6. Batı bal arılarının SNP belirteçlerinden yararlanılarak dört genetik soya dağılımını gösteren Neighbour-Joining ağacı	12
Şekil 1.7. <i>Apis mellifera</i> alt türlerinin evrimsel ilişkisini gösteren Neighbour-Joining ağacı..	12
Şekil 1.8. <i>Apis mellifera</i> L' nin kökeni ve yayılımı	13
Şekil 1.9. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü	21
Şekil 1.10. PCR-RFLP ile genetik farklılık ve benzerliklerin belirlenmesi	22
Şekil 1.11. Mitokondrinin yapısı	23
Şekil 1.12. Mitokondriyel DNA' nın yapısı.....	24
Şekil 1.13. Bal arısı (<i>Apis mellifera</i>) mtDNA' sı.	26
Şekil 1.14. <i>Apis mellifera</i> L. mtDNA genomunun kesim haritası.....	27
Şekil 2.1. Proje örneklerinden bir kısmının görüntüsü.....	46
Şekil 2.2. Örnek alınan yerlerin harita üzerinde gösterilmesi	47
Şekil 2.3. mtDNA COI gen bölgesi nükleotid dizisi	51
Şekil 2.4. mtDNA ND5 gen bölgesi nükleotid dizisi	51
Şekil 2.5. Örneklerin PCR cihazında görüntüleri	53
Şekil 2.6. Agaroz jel elektroforezinin uygulama aşamaları.....	54
Şekil 2.7. Analizlere ait görseller	55
Şekil 3.1. COI gen bölgesi PCR ürünleri.....	58
Şekil 3.2. COI gen bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi	59
Şekil 3.3. COI gen bölgesinin <i>SspI</i> enzimi ile kesimi	60
Şekil 3.4. COI gen bölgesinin <i>StyI</i> enzimi ile kesimi.....	61

Şekil 3.5. COI restriksiyon enzimi kesim noktaları	61
Şekil 3.6. ND5 gen bölgesi PCR ürünleri.....	62
Şekil 3.7. ND5 gen bölgesinin <i>AluI</i> enzimi ile kesimi	63
Şekil 3.8. ND5 gen bölgesinin <i>FokI-BtsCI</i> enzimi kesim sonucu	63
Şekil 3.9. ND5 gen bölgesinin <i>HincII</i> enzimi kesim sonucu	64
Şekil 3.10. ND5 restriksiyon enzimi kesim noktaları.....	64



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
dk	Dakika
ml	Mililitre
mM	Milimolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
sn	Saniye

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin nükleotidi
A	Tropikal Afrika
ADP	Adenozin difosfat
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
AKG	Arka kanat genişliği
AKU	Arka kanat uzunluğu
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Doğu Avrupa
C	Sitozin nükleotidi
CO ₂	Karbondioksit
COI	Sitokrom C oksidaz I
COII	Sitokrom C oksidaz II
Cytb	Sitokrom b geni
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DU	Dil uzunluğu
FU	Femur uzunluğu
G	Guanin nükleotidi
KI	Kubital index
M	Batı Avrupa
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mtDNA	Mitokondriyel DNA
ND5	NADH dehidrogenaz 5
ng	Nanogram
O	Orta Doğu

ÖKG	Ön kanat genişliği
ÖKU	Ön kanat uzunluğu
P	Fosfor
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SNPs	Tek nükleotid polimorfizmleri
STR	Ardışık basit tekrarlar
T	Timin nükleotidi
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-borik asit-EDTA tampon çözeltisi
TE	Tris-EDTA çözeltis
tRNA	Taşıyıcı RNA
TU	Tibia uzunluğu
V	Voltaj

TEŞEKKÜR

Akademik eğitim sürem boyunca yüksek lisans tez çalışmamda değerli bilgilerini benimle paylaşan, laboratuvarda karşılaştığım sorunların çözümünde bana bilgileri ile yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini, sabrını benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fulya ÖZDİL'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarımnda bana her zaman tecrübeleri ile yardımcı ve yol gösterici olan, bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Raziye IŞIK' a teşekkür ederim.

Kızları olmaktan gurur duyduğum, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem ve bu günleri göremese bile benimle daima gurur duymasını istediğim rahmetli babama, kardeşlerime sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca beni her koşulda destekleyip yanımda olan, manevi gücünü her zaman hissettiğim, bana sonsuz güvenen, bu yolda arkamda olduğunu bildiğim yol arkadaşım, sevgili eşim Aydın GÖZE 'ye teşekkür ederim.

İlknur GÖZE
Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Eski çağlardan bu yana Anadolu'nun en etkin üretim faaliyetlerinden biri arıcılık olmuştur. Bal arısı, tarihten bu yana insanoğlunun dikkatini çekmiş, ilk olarak bal avcılığıyla başlayan girişimlerden sonra, sepet veya kütük benzeri yuvalara arıların alınmasıyla ilk arıcılık faaliyetlerinin başladığı bilinmektedir. Bal arısının 17. yüzyıla kadar sadece Avrupa, Afrika ve Yakın Doğu'da yayılarak gelişme gösterdiğini, 17. yüzyıldan sonra ise göçmenler ile taşındığını ve tüm yerleşim alanlarında arıcılık yapıldığını bildirmiştir (Fıratlı, 1988). Eskiden sadece aile ihtiyacını karşılayacak şekilde bal üretmek için yapılırken artık ticari bir iş kolu haline gelmiştir. Tarımsal yönden diğer iş kollarına göre arıcılığın doğaya daha fazla bağımlı bir faaliyet olduğu bilinmektedir ve Türkiye iklim deseni, zengin florası ile arıcılık için avantajlı bir konumdadır.

74-146 milyon yıl önce çiçekli bitkiler ortaya çıktıktan sonra böceklerin evrimi hız kazanmış ve yeni tozlayıcı böcek grupları ortaya çıkmıştır. Kretase döneminde (Tebeşir Dönemi) ilk kez ortaya çıkan başlıca böcek grupları; arılar, eşek arıları, karıncalar, kelebekler ve termitlerdir. Milner (1996), çiçekli bitkilerin tozlaşması (polinasyon) için arılara, arıların da beslenebilmesi için çiçekli bitkilere gereksinimi olduğunu bildirmiştir. Bitkilerle birlikte bazı böceklerin türemesi ve çoğalması için uygun çevre şartlarının oluşumu ile arıların 120 milyon yıl önce evrimleştiğini bildirmiştir (Birand, 2001).

Wilson (2001), gerçek sosyal böcekler, tüm karıncalar, termitler ve bazı arılar ve eşek arılarının dünyadaki böcek biyokütlesinin yüzde 75'ini oluşturduğunu bildirmiştir. Sosyal böcekler, toprak ve yiyecek için diğer böceklere ve hatta daha büyük hayvanlara da üstün gelebilir. Bir sığınağı hızla inşa edebilir ve gerektiğinde genişletebilirler ve işleri her şeyin hızlı bir şekilde yapılmasını sağlayacak şekilde bölebilirler. Bir sosyal arı kolonisinin onbinlerce olabildiği ve yüz milyonlarca karıncanın birbirine bağlı yuvaların süper kolonisinde birlikte yaşayabildiği bildirilmektedir.

Bal arıları koloniler şeklinde yaşayan sosyal böceklerdir. Koloni; tek bir ana arı, mevsime göre sayıları değişen erkek arılar ve işçi (dişi) arılardan oluşmaktadır. Koloni içinde ana arı, etrafına salgıladığı feromonlar ile yaşamı boyunca koloniyi bir arada tutar ve bu şekilde koloninin devamlılığını sağlamak için yumurtlama faaliyetini gösterir. İşçi arılar ise, yaşlarına bağlı olarak larvaların, ve ana arının beslenmesinden, kovanın havalandırılmasından, temizlenmesinden ve nektar, polen ve propolis toplanmasından sorumludur. Erkek arıların tek görevi ise, ana arıların döllenmesidir (Wilson, 1971). Moritz (1994)'e göre bal arısı

biyolojisinde önemli sayılabilen çalışmalar, işçi arıların dans dilinin anlaşılmasını (von Frisch, 1965) ve ana arının koloni üzerindeki denetimini feromonlar (*pheromones*) yoluyla belirlenmesini (Buttler, 1973) ortaya koyan araştırmalarla başlamıştır. Bal arısı biyolojisi üzerinde yirminci yüzyılda yapılan çalışmalarda, bireyler arasındaki iletişim ve davranış ekolojisi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak çoğu zaman davranış ekolojisi üzerine yoğunlaşan çalışmalar her zaman güçlü olmamış ve modern araştırma alanına bal arıları “Genetik Model Sistem” olarak girmiştir (Moritz, 1994). Bal arılarında haplo-diploid cinsiyet belirleme sistemi koloninin genetik yapısını etkileyen önemli bir mekanizmadır.

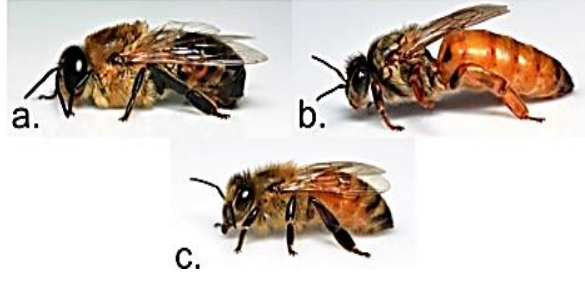
Arı ürünlerinin insanlar tarafından tarih boyunca sevilen, doğallığından şüphe duyulmayan, sağlık ve koruma amaçlı da kullanılan ürünler olduğunu bildirmişlerdir (Dadant, 1984; Gösterit ve Gürel, 2004). Hemen hemen dünyanın her yerinde bal arısı yayılış göstermiş ve polen, arı sütü, propolis, bal, bal mumu, arı zehri gibi çeşitli doğal ürünler sağlayarak ekonomiye katkıda bulunmuştur ve bal arılarından elde edilen bu ürünler dışında da ekosistem açısından oldukça önemlidir. Çünkü bal arılarının tüm çiçekli bitkilerin ve aynı şekilde tarımsal ürünlerin de tozlaşmasına katkı sağlamaları ekosistem açısından oldukça önemlidir. Tozlaşmaya olan katkıları yönünden bakıldığında, dünyada yetiştiriciliği yapılan en değerli hayvanlar olup tarımsal üretime sağladıkları katkı, bal ve yan ürünleriyle sağladıkları katkıdan çok daha fazladır. Böcekler tarafından çiçekli bitkilerin yaklaşık 3/4’ü, diğer büyük çoğunluğunun ise bal arıları tarafından döllendiğini bildirmişlerdir (Fries, 1993; Kaftanoğlu, Kumova ve Bek, 1993; Özbilgin, Alataş, Balkan, Öztürk ve Karaca, 1999).

1.1 Bal Arısı Biyolojisi ve Bal Arılarında Gelişim

Bal arısı, karınca, eşek arısı ve termitler koloni halinde yaşam düzenine sahip sosyal organizmalardır. Ergin koloni üyeleri, iki veya daha fazla kuşaktan koloni üyeleriyle birlikte çalışırlar ve bu kolonilerde sosyal sınıfta değerlendirildiğinde üreyen veya üreyemeyen olarak ayrıldığını bildirmişlerdir. Bal arısı kolonilerinin erkek arı, ana arı ve işçi arı olmak üzere üç sisteme (Şekil 1.1) ayrıldığını bildirmişlerdir (Wilson ve Holldobler, 2005).

Tipik bir kolonide üreme yeteğine sahip sadece bir ana arı vardır. Ana arının başlıca görevi, yılda ortalama 200.000 yumurta bırakarak koloninin devamlılığını sağlamaktır. Ana arı; en uzun abdomen yapısına sahiptir. Ayrıca, üremenin yanı sıra kimyasal yapıdaki feromonları salgılayarak kolonideki işleri kontrol edip düzenlendiğini bildirmişlerdir (Ambrose vd., 1992). Ana arının 2-3 yıl verimli şekilde yumurtlayabildiği ancak ticari olarak arıcılar kolonilerindeki

ana arıların her yıl değişmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Page ve Peng, 2001). İşçi arılar koloni içinde bulunan üreme yeteneği olmayan dişilerdir. İşçi arılar; vücut yapısı diğer kaslara göre en küçük olandır. Sayılarının 10.000 – 60.000 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Moritz ve Southwick, 1992). Adından da anlaşılacağı üzere işçi arılar koloni içindeki iş gücünü sağlamaktadırlar. Aralarında yaşa ve koloni şartlarına bağlı iş bölümü bulunmaktadır. Bal arılarının ilk günlerinde uçamadığını ve sokma eğilimlerinin olmadığını bildirmişlerdir (Winston, 1987; Calderone, 1998). Bu görev periyodunda petek gözü temizliği kalan zamanda ise tımar yapma görevinde olduğunu bildirmiştir (Seeley, 1982). Bakıcılık görevini 4-12 günlük işçi arıların üstlendiğini bildirmişlerdir (Ribbands, 1953; Seeley, 1982). Gözlerdeki larvaları kuluçka yemi denilen bünyelerinde işledikleri bir yem ile bakıcı arılar beslerler (Michener, 1974). Bakıcı arıların başka bir görevi ise ana arının etrafını sararak beslenmesini sağlamaktır (Winston, 1987). Orta yaş arılar 12-21 günlük arılar olarak adlandırılmışlardır. Orta yaştaki arıların, yuvaya yayılmış bir görev dağılımı vardır. Görevleri bakıcılıkla örtüşmekle beraber, davranışları oldukça farklıdır. Bunun sebebi orta yaş arıları, bakıcı arılar gibi yavruyla ilgilenmezler. Orta yaştaki arıların görevleri; petek örme, nektar veya polenin alınıp işlenmesi ve kovan girişinin korunması olduğunu bildirmişlerdir (Seeley, 1982; Trumbo vd., 1997). Tarlacılık görevi 21 günden sonra olup bal arılarında yaşam sonuna kadar devam etmektedir. Bal arıları, tarlacı olduktan sonra kovan içindeki görevlerle ilgilenmedikleri bildirilmektedir (Winston 1987; Seeley, 1995). Bunun yerine, dışarıda bulunan ve koloninin ihtiyaç duyduğu dört kaynağa polen, nektar, propolis ve suya yoğunlaşırlar (Robinson, 1992; Seeley, 1995; Calderone, 1998). Polen ve nektar toplama tarlacılık faaliyetlerinin çoğunu oluşturur. Ancak koloni sıcaklık stresine girdiği zaman tarlacı arılar daha çok suya yönelmektedir (Seeley, 1995). Tarlacı arıların, aralarında dans dilini kullanarak yiyecek kaynakları ve yeni yuva alanlarını birbirlerine tarif ettiği bildirilmektedir (Seeley, 1995; Vries ve Biesmeijer, 1998). İşçi arıların ömrü yaz aylarında 3-6 hafta arasında değişirken kış aylarında yaklaşık 4 ay olmaktadır (Page ve Peng, 2001). Erkek arı miktarı sezona ve kolonideki koşullara bağlı olup oğul mevsiminde sayıları 500-2000 arasındadır ve tek görevlerinin ana arı ile çiftleşmek olduğunu bildirmişlerdir (Ambrose vd., 1992). Erkek arı; daha geniş göğüs ve abdomen yapısı ile ayırt edilir. Ayrıca, üç kast arasında en büyük gözlerle sahiptirler. Erkek arıların, yaşam uzunluğu ortalama 21 gündür. Fakat çiftleşme sırasında ya da yaz sonunda işçi arılar tarafından dışarı atılarak öldüklerinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Page ve Peng, 2001).



Şekil 1.1. Kovan bireyleri (Haga D, 2015)

Bal arıları, çok farklı fizyolojik yapılaraya sahiptirler ve çevreden kaynaklanan strese değişik şekillerde yanıtlar vermektedirler. Diğer bir çok böcek gibi bal arılarının da gelişimi dört aşamadan oluşur (Şekil 1.2). Bu aşamaları yumurta, larva, pupa ve yetişkin olarak sıralayabiliriz. İlk aşamada yumurtanın oluşumu, yumurta hücreleri haline gelen oositlerde ve ana arının yumurtalıktaki dişi germ hücrelerinde başladığını bildirmişlerdir (Guizeit vd., 1993). Yumurta hücreleri olgunlaşmaya başladıkça bakıcı hücreleri besin maddesi olarak kullanırlar. En son aşamada yumurta gelişimini tamamlamak için folliküler yumurta hücreleri üzerine koriyon salgıladığını bildirmiştir (Fleig, 1995). Olgun bir yumurta, inci beyazı rengindedir ve oval bir şekle sahiptir. Baş, karının sonundan daha kalın olarak gelişir. Yumurtanın petek gözüne ana arı tarafından dikey bir şekilde bırakıldığını bildirmiştir (Winston, 1987).

Larva, yumurtladıktan sonraki günlerde üç gün içinde oluşmaya başladığı bilinmektedir. Başlangıçta bölünme hücreleri gelişir (ilk 14 saat boyunca) yumurtanın yüzeyinde blastoderm oluştururlar. Devam eden saatlerde blastoderm bölünmeye uğrar ve yumurtanın her iki ucunda net bir boşluk izlenebilir (10 saat). Yumurtlamadan yaklaşık 35 saat sonra, blastoderm kalınlaşır ve bağırsak oluşumu başlamaktadır. Yumurtlamadan 49 saat sonra kafanın görünür hale geldiği ve bu süreci vücut bölmelerinin oluşmasının takip ettiğini bildirmişlerdir (Milne vd., 1988). Larva oluşumundan yaklaşık iki saat önce koriyonun tamamen eridiği ve trakeal tabaka gözle görülebilir olduğu bilinmektedir. Larvanın tamamen oluşup C şeklini alması 72-76 saatler arasında olduğunu bildirmiştir (Collins, 2004).

Bakıcı arılar larva aşamasında petek gözlerine başlarını sokarak larvaları beslerler. Larvalar dış iskeletin her gün değişmesiyle hızlı bir şekilde gelişir ve bu durum beş aşamada gerçekleşir. Altıncı gün sonunda bakıcı arılar petek gözlerini bal mumu ile kapatırlar. Bundan sonraki aşamada pupa dönemine girmiş olurlar. Petek gözlerinin kapanması değişmektedir. İşçi arılarda 5,5 gün, ana arı için 4-6 gün ve erkek arı için 6-3 günlerinde olur.

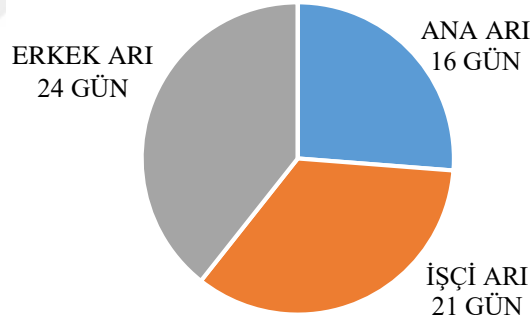
Pupa aşaması, baş, gözler, ağız, antenler, bacaklar, göğüs ve karın kısmının oluştuğu aşamadır. Bu aşamada en belirgin olarak ortaya çıkan özellik üst derinin koyulaşmasıdır. Pupa dönemi sekiz ile dokuz gün sürmektedir. Ana arılarda bu süre dört ile beş gün arasındadır. Bal arısı pupa döneminde ergin döneme geçer ve petek gözünün üstüne kapalı olan bal mumunu yiyerek dışarıya çıkarlar.



	Yumurta	Larva	Pupa	Toplam
İşçi Arı	3 Gün	5.5 Gün	12 Gün	21 Gün

Şekil 1.2. İşçi arılarda gelişim (Chan, 2009)

Erkek arı, ana arı ve işçi arı gelişim sürelerine bakıldığında zaman, sırayla 24, 16, 21 gün şeklinde olduğu bildirilmektedir. (Winston, 1987) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Arılarda kuluçka dönemi gün sayıları

1.2 Bal Arılarının Sınıflandırılması

Bal arılarında tür düzeyinde ilk sınıflandırma C. Linnaeus tarafından 1758 yılında “bal yapan” anlamına gelen *Apis mellifera* isminin kullanılarak yapıldığı bilinmektedir. Bütün bal arısı türleri, Hymenoptera takımında, Apidae familyası içindeki *Apis* cinsinde yer almaktadır. Buttel-Reepen (1906) tarafından tür düzeyinde üçlü isimlendirme sistemi daha sonra yapılmıştır (*Apis mellifera carnica* vb.).

Tüm hayvanların, arılarda dahil olmak üzere ökaryotlar içinde taksonomik bir sistem ile sınıflandırıldığını bildirmişlerdir (Linksvayer vd., 2012). (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Bal arılarının taksonomik sınıflandırılması (Engel, 1999)

Alem	Animalia	Hayvanlar
Şube	Arthropoda	Eklem bacaklılar
Sınıf	Insecta	Böcekler
Alt Sınıf	Pterygota	Kanatlı böcekler
Takım	Hymenoptera	Zar Kanatlılar
Bölüm	Aculeata	İğneliler
Süper Familya	Apoidea	Arılar
Familya	Apidae	Arılar
Alt Familya	Apinae	Arılar
Cins	<i>Apis</i>	Bal Arıları
Tür	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus (1758)	Batı bal arısı
	<i>Apis cerana</i> Fabricius (1793)	Doğu bal arısı
	<i>Apis florea</i> Fabricius (1787)	Küçük (cüce) bal arısı
	<i>Apis dorsata</i> Fabricius (1793)	Dev bal arısı

Filogenetik analizler, bal arılarını üç büyük kümede sınıflandırır. Bu sınıflandırmada morfolojik analiz sonuçlarını etkili bir şekilde desteklemektedir. Bu gruplar;

- Cüce arılar (*A. andreniformis* ve *A. florea*),
- Dev arılar (*A. dorsata*, *A. binghami* ve *A. laboriosa*),
- Kapalı alanda yuva yapan arılar şeklindedir (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis*, ve *A. nigrocincta*) (Arias ve Sheppard, 2005).

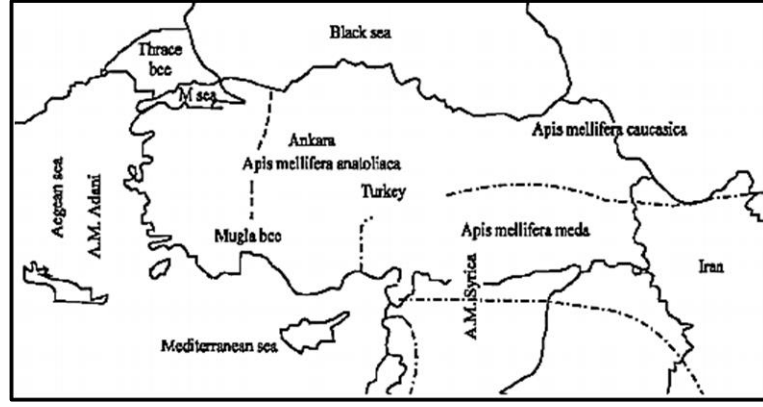
Sonraki yapılan araştırmalar sonucu dört *Apis* türü tanımlanmıştır. Ruttner vd (1978) 'e göre bal arısı 4 türde incelenmektedir. Bu türler;

- Batı bal arısı (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758)
- Dev arı (*Apis dorsata* Fabricius, 1793)
- Doğu bal arısı (*Apis cerana* Fabricius, 1793)
- Cüce arı (*Apis florea* Fabricius, 1787) olarak sınıflandırılmıştır.

Apis dorsata ve *Apis florea*, tropik bölgelerde bulunan eski türlerden olduğu ve bu türlere ait kolonilerin ağaç dallarında açık alanda koloni kurarak yaşadıkları bilinmektedir. *Apis cerana* da doğal olarak ağaç kovuklarında yaşamaktadır ve bir diğer tropikal türdür. Yuva yapımı ve haberleşmesi açısından *Apis mellifera*, *Apis cerana*'ya benzediği ve bu benzerlik nedeniyle bu iki türün genetik olarak birbirlerine daha yakın iki tür olabileceği bildirilmiştir (Ruttner, 1988a). Dünya üzerindeki bal arılarının dağılımına bakıldığında, Avrupa, Afrika, ve Batı Asya'da *A. mellifera* doğal olarak bulunurken, Güney Asya'da ise *Apis florea*, *Apis dorsata*, *Apis cerana* ise doğal olarak yayılmaktadır. Günümüzde Antartika kıtası hariç *Apis mellifera* tüm dünyaya dağılmış durumdadır. Aslında bu doğal yayılmada insan eliyle taşınma söz konusudur diyebiliriz.

İlerleyen süreçlerde yapılan çalışmalara yeni türler eklenmiştir. Bu türler; *Apis nuluensis*, *Apis laboriosa*, *Apis koshevnikovi*, *Apis nigrocincta* ve *Apis adeniformis*, *Apis binghami* şeklinde bildirilmiştir (Otis, 1906). Yapılan çalışmalar sonucu *Apis* cinsine ait 10 türün tanımlandığını bildirmişlerdir (Engel, 1999; Arias ve Sheppard, 2005).

Buzul çağının etkisi ve bitki örtüsünün değişimiyle birlikte bal arıları doğal olarak farklı coğrafik alanlara (Avrupa, Afrika, Batı Asya) dağılmış ve bu dağılım *Apis mellifera* türünün çok geniş bir morfolojik ve davranış farklılığı göstermesi ile sonuçlandığı ve günümüzde de birçok bal arısı alt türü geniş bir coğrafyanın farklı bölgelerine ve çeşitli iklim şartlarına adaptasyon gösterdiğini bildirmiştir (Ruttner, 1988a). Biyoçeşitlilik bakımında Türkiye, sahip olduğu farklı iklim, vejetasyon koşulları, zengin su kaynakları ve coğrafi konumundan dolayı önemli bir gen merkezi olduğunu bildirmiştir (Terzioğlu, 1994). Buldukları coğrafyada hem yapay hem de doğal seleksiyonun ortak etkisi sonucu bal arısı alttürleri ortaya çıkmıştır. Bugünkü davranışsal ve morfolojik özelliklerini, oluştukları coğrafik bölgelerin ekolojisi, bitki örtüsü gibi her türlü çevre şartlarına bağlı kazandıklarını bildirmişlerdir (Alpatov, 1929; Ruttner, 1988a; Whitfield vd., 2006). Bal arılarının bu özelliklerinden dolayı oluşan düşüncelerden hareketle coğrafik ırk tanımı ortaya atılmıştır. Bal arılarındaki coğrafi ırk kavramının tercih edilmesi çiftlik hayvanlarındaki ırk kavramının karşılığı olarak kabul edilebilir. Ekolojik özelliklere uyum sağlamış coğrafi ırk içindeki grupların da ekotip olduğunu bildirmiştir (Ruttner, 1988a). Doğaroğlu (1981), farklı iklim koşullarında farklı ekotiplerin ortaya çıktığını bildirmiştir.



Şekil 1.4. Bal arısı ekotip ve alt türlerinin dağılımı (Akyol, Şahinler ve Özkök, 2006)

Bal arısı populasyonlarının sınıflandırılmasında Türkiye’ de yapılan çalışmalarda pek çok ekotip (Muğla, Trakya, Yığılca, Gökçeada vb.) ve 5 alttür olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 1.4). Bölgelere göre Türkiye’ de, Kafkas arısı (*A. m. caucasica*) Kuzeydoğu Anadolu’da, İran arısı (*A. m. meda*) Güneydoğu Anadolu’da, Anadolu arısı (*A. m. anatoliaca*) Orta Anadolu’da, Suriye arısı (*A. m. syriaca*) Hatay yöresinde, Karniyol arısı (*A. m. carnica*) Trakya bölgesinde; Muğla arısı Ege kıyılarında, Gökçeada arısı Gökçeada yöresinde, Yığılca arısı Düzce yöresinde gibi ekotiplerin varlığından bahsetmişlerdir (Doğaroğlu, Özdemir ve Polat, 1992; Palmer, Smith ve Kaftanoğlu, 2000; Akyol vd, 2006; Kandemir vd. 2006; Kekeçoğlu ve Soysal, 2010, Ünal ve Özdil, 2018).

1.3 Bal Arılarının Kökeni ve Coğrafi Dağılımı

Türkiye’deki bal arıları, Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) türü içinde sınıflandırılmıştır. Afrika, Avrupa ve Orta Doğu’yu da kapsayan çok geniş bir coğrafyada Batı bal arısının yayılım gösterdiğini bildirmişlerdir (Ruttner, Tassencourt ve Louveaux, 1978; Ruttner, 1988a).

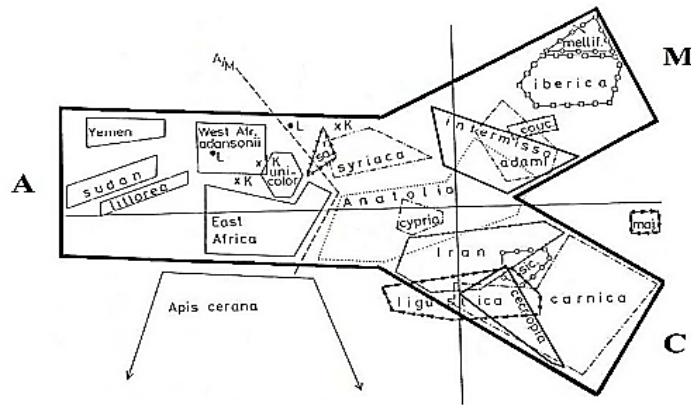
Avrupa’nın tekrardan yaşanabilir bir iklime kavuşmasından sonra küçük izole populasyonlar Avrupa ülkelerine geri döndüğünü ve birbirleriyle gen alışverişinde bulunduğunu bildirmişlerdir (Ruttner, 1988a; Smith, 1991). Tarihsel süreç içerisinde meydana gelen iklimsel değişiklikler sebebiyle bu kadar çok *Apis mellifera* ırkının küçük izole populasyonların oluşumuna bağlandığını bildirmiştir (Smith, 2002).

Bu küçük populasyonlarda genetik sürüklenmenin etkisinin daha yüksek olduğu bilinmekte ve mutasyonun yeni tür ya da alt tür oluşumunda tek başına bir neden olamayacağı, ancak genetik sürüklenme, mutasyon, seleksiyon ve uyumun birlikte etkisiyle türleşmenin söz konusu olabileceğini bildirmiştir (Klug, 2002). Birçok araştırmacının da bildirdiği gibi bal arılarında bu şekilde geniş bir varyasyonun görülmesi bilimsel gerçeklerin bir sonucudur (Ruttner, 1988a; 1988b, 1992; Smith, 1991; Hewitt, 1996; Sheppard vd., 2000).

Apis mellifera'nın yayılışına ve kökenine ilişkin üç hipotez (Şekil 1.5) öne sürülmüştür (Rothenbuhler ve Kerr, 1968; Wilson ve Brown, 1953; Ruttner, 1988a).

- Bal arılarının Afrika'da ortaya çıktığı ve Orta doğu üzerinden Avrupa'ya yayıldığı (Wilson ve Brown, 1953).
- Asya'nın güneydoğusu veya Hindistan'da ortaya çıktığı (Rothenbuhler ve Kerr, 1968).
- Hazar denizinin güneyinde ortaya çıktığı ve Anadolu yolu ile Avrupa'ya, Arap yarımadası boyunca Afrika'ya yayıldığı bildirilmiştir (Ruttner, 1988a).

Batı bal arısı alt türleri ilk yapılan çalışmalarda *Mellifera* (M), Afrika (A) ve Carnica (C) olmak üzere temel bileşenler analizi ve morfolojik analizler sonucunda üç ana genetik soy içerisinde sınıflandırıldığını bildirmişlerdir (Ruttner vd., 1978) (Şekil 1.5)



Şekil 1.5. Batı bal arılarının temel bileşen ve morfolojik özelliklere göre üç genetik soya dağılımı (Ruttner vd., 1978)

Apis mellifera Ruttner (1988a)'e göre 50.000 yıl önce *Apis cerana*'dan ayrılmış bir tür olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. İran, Pakistan ve Afganistan'da yapılan araştırmalar buradaki *A. mellifera* ve *A. cerana*'ya ilişkin örneklerin birbirine yakınlık derecesinin daha fazla olduğunu göstermiştir ve bu sonuçlar bu iki türe ilişkin eski çağ popülasyonlarının burada birbirinden ayrıldığını yani *A. mellifera*'nın İran'dan köken aldığı hipotezini desteklemiştir. Buzul çağının sona ermesinden sonra araştırmalar bal arısı popülasyonlarının çeşitli kollardan coğrafik alanlara yayıldığı bildirilmiştir.

Morfolojik karakterlere bağlı olarak yaptığı temel ögeler analizi ile Ruttner (1988a; 1992), *Apis mellifera* ırklarını 4 temel kola ayırmıştır:

1. Batı Avrupa (M): Kuzey Afrika ırklarını (Kuzey ve Batı Avrupa siyah arıları *A.m. mellifera*, İspanya ve Portekiz arıları *A. m. iberica*, Kuzey Afrika arıları, *A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* ve *A. m. major*) ve Kuzey ve Batı Avrupa'da dağılım gösteren ırkları içermektedir.

2. Tropikal Afrika (A): Afrika'nın orta ve güney kesimlerinde dağılım gösteren ırkları (Mısır arısı *A. m. lamarckii*, Afrika'nın güneyinden *A. m. scutellata*, *A. m. capensis* ve diğer bazı Orta Afrika ırklarını ve Madagaskardan *A. m. unicolor*'ı) içermektedir.

3. Doğu Avrupa (C): Kuzey Akdeniz ve Doğu Avrupa ırklarını (Avusturya ve Yugoslavya'dan *A. m. carnica* ve İtalyan arısı *A. m. ligustica*, Yunanistan ve Bulgaristan'dan *A. m. macedonica*, Yunanistan'ın orta ve güney kesimlerinden *A. m. cecropia* ve *A. m. sicula*, Yunanistan'ın kuzeyi ve Bulgaristan'dan *A. m. macedonica*) içermektedir.

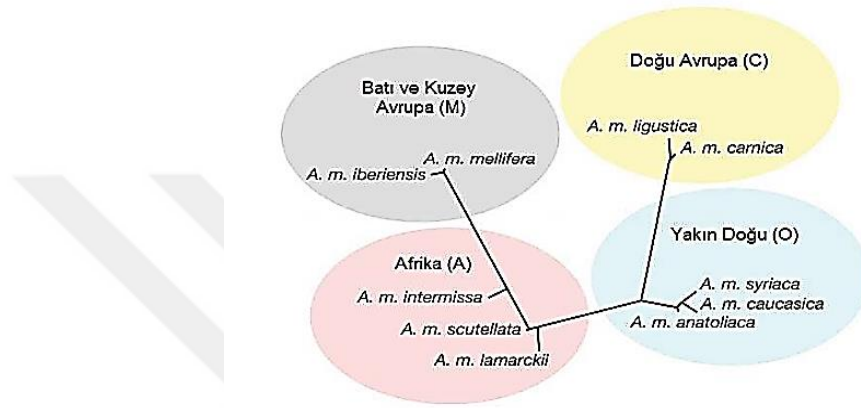
4. Ortadoğu (O): Doğu Akdeniz ve İran'da dağılım gösteren ırkları (Kafkaslardan ve Karadeniz bölgesinin doğusundan *A. m. caucasica*, Türkiye'den *A. m. anatoliaca*, Türkiye, İran, Irak Suriye'den *A. m. meda*, Girit adasından *A. m. adami*, Suriye'den *A. m. syriaca*, Kıbrıs'tan *A. m. cypria* ve Ermenistan'dan *A. m. armeniaca*) içermektedir.

Yapılan ilk çalışmalarda morfometrik karakterlere dayanarak *Apis mellifera*'nın tanımlanmış 27 alt türü, son olarak ise bugüne kadar tanımlanan 29 *Apis mellifera* ırkı (alt türü) bulunmaktadır (Çizelge 1.2).

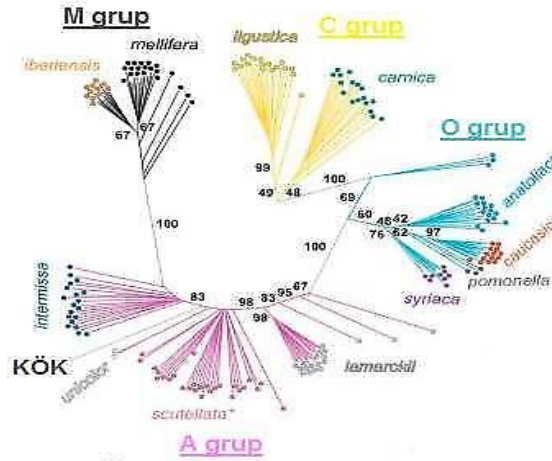
Çizelge 1.2. Coğrafi yayılım gösteren bal arısı alttürleri (Ruttner, 1992)

Irkların Adapte Olduğu Bölgeler	Irkların isimleri
	<i>A. mellifera adamii</i> (Ruttner, 1975)
	<i>A. mellifera pomonella</i> (Meixner, 2003)
	<i>A. mellifera cypria</i> (Pollman, 1879)
Ortadoğu (Kuzeydoğu Akdeniz): O	<i>A. mellifera syriaca</i> (Buttel-Reepen, 1907)
	<i>A. mellifera meda</i> (Skorikov, 1929)
	<i>A. mellifera caucasica</i> (Gorbachev, 1916a)
	<i>A. mellifera armeniacaca</i> (Skorikov, 1929)
	<i>A. mellifera anatoliaca</i> (Maa, 1953)
	<i>A. mellifera lamarkii</i> (Cockerell, 1906b)
	<i>A. mellifera yemenitica</i> (Ruttner, 1975)
	<i>A. mellifera litorea</i> (Smith, 1961)
	<i>A. mellifera adonsonii</i> (Latreille, 1804)
Afrika (Tropical): A	<i>A. mellifera scutellata</i> (Lepeletier, 1835)
	<i>A. mellifera monticola</i> (Smith, 1961)
	<i>A. mellifera capensis</i> (Escholtz, 1821)
	<i>A. mellifera unicolor</i> (Latreille, 1804)
	<i>A. mellifera macedonica</i> (Ruttner, 1988)
	<i>A. mellifera ligustica</i> (Spinola, 1806)
	<i>A. mellifera carnica</i> (Pollman, 1879)
Avrupa (Orta ve Doğu): C	<i>A. mellifera cecropia</i> (Kiesewetter, 1860)
	<i>A. mellifera sicula</i> (Montagana, 1911)
	<i>A. mellifera ruttneri</i> (Sheppard ve vd., 1997)
	<i>A. mellifera mellifera</i> (Linneaus, 1758)
	<i>A. mellifera iberica</i> (Goetze, 1964)
Avrupa (Batı ve Kuzey)	<i>A. mellifera major</i> (Ruttner, 1978)
Afrika (Kuzey): M	<i>A. mellifera sahariensis</i> (Baldensperger, 1924)
	<i>A. mellifera intermisa</i> (Buttel-Reepen, 1906)

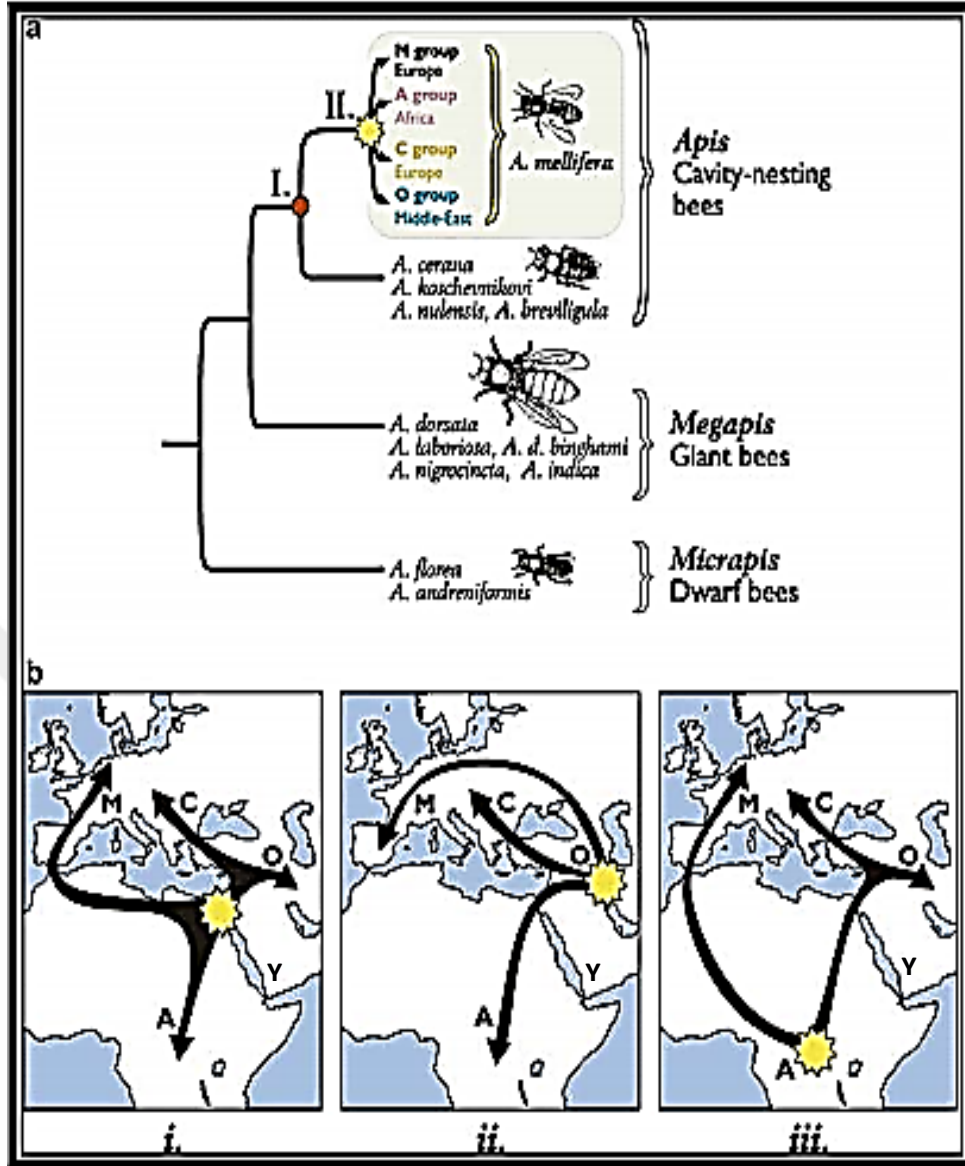
Standart olarak morfometrik karakterler ele alınarak bal arısı soylarının veya alt türlerinin ayrımı ile ilgili yapılan çalışmalara ek olarak mitokondriyel DNA (mtDNA) markerleri (Smith, 1991; Garnery vd., 1992; Arias ve Sheppard, 1996; Palmer vd., 2000; Franck vd., 2000a; 2001, Kandemir vd., 2006) ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) (Whitfield vd., 2006) kullanılarak yapılan çalışmalarda, Ruttner (1988a) ve Kauhausen-Keller vd. (1997) tarafından morfometrik verilere dayanarak yaptıkları çalışmalarda bu dört soyun varlığını destekleyen çalışmalar ortaya koyduklarını bildirmişlerdir (Şekil 1.7, Şekil 1.8).



Şekil 1.6. Batı bal arılarının SNP belirteçlerinden yararlanılarak dört genetik soya dağılımını gösteren Neighbour-Joining ağacı (Anonim, 2006; Whitfield vd., 2006)



Şekil 1.7. *Apis mellifera* alt türlerinin evrimsel ilişkisini gösteren Neighbour-Joining ağacı (Whitfield vd., 2006)



Şekil 1.8. *Apis mellifera* L' nin kökeni ve yayılımı (Gupta, 2014)

a) Morfolojik çalışmalara göre ayrılan bal arısı türleri (Han vd., 2012)

b) Bal arısı alt türleri için öne sürülen 4 hipotez (Han vd., 2012)

Ancak yapılan çalışmalarda, bazı alt türlerin morfometrik karakterlere göre ayrıldıkları ve ana soylardan diğer soylara kaydıkları bildirilmiştir (Arias ve Sheppard, 1996; Franck vd., 2000a, 2000b; 2001; Whitfield vd., 2006). Örneğin Yemen bal arısı (*A. m. yemenitica*), Kauhausen-Keller (1997) tarafından A soyu içinde değerlendirilmiş olsa da Franck vd. (2001), tarafından yapılan çalışmada Etiyopya'dan temin ettikleri Yemen bal arılarını, mtDNA ve mikrosatelit analizleri temelinde Y soyu olarak ifade edilen beşinci bir genetik soy içerisinde değerlendirmenin daha uygun olacağını bildirmişlerdir.

1.4 Orta Doğu'da Yayılım Gösteren Bal Arısı Irkları

Orta Doğu'daki bal arıları genel olarak morfolojik yapılarına göre düşünüldüğünde Anadolu'nun batısındaki bal arısı populasyonları (İstanbul-İzmir-Bursa hattının batısı) morfolojik olarak Güneydoğu Avrupa, Orta Akdeniz ve Kuzey Afrika arılarıyla benzer olduğu bulunmuştur. Bu sonuçtan hareketle *Apis mellifera*'nın genetik merkezinin doğudan Anadolu olduğu belirtilmiştir (Ruttner, 1988a). Orta Doğu bal arıları genel özelliklerine göre değerlendirildiğinde, Orta Doğunun en küçük arısı *A. m. syriaca* iken en büyük arısı *A. m. caucasica*'dır. Gri Kafkas dağ arısı (*A. m. caucasica*) hariç tüm Orta doğu arıları sarı bantlıdır.

Güney arı varyeteleri (*A. m. cypria* ve *A. m. syriaca*) kuzey arı varyetelerine göre daha küçük ve renkleri daha sarıdır. Fakat *A. m. adami*, *A. m. caucasica* kadar büyük ve *A. m. armeniaca* kadar sarıdır. Yapılan ilk araştırmalarda 7 farklı Orta Doğu ırkı tanımlanmıştır. Daha sonrasında ise *A. m. pomonella*'nın tanımlanmasıyla birlikte Orta Doğu grubundaki ırk sayısı 8'e çıkmıştır (Sheppard ve Meixner, 2003).

Orta Doğu'daki bal arısı ırkları morfometrik karakterlerine göre karşılaştırıldığında *A. m. cypria* ve *A. m. armeniaca*'nın *A. m. anatoliaca*'ya diğer üç *Apis mellifera* ırkından daha yakın bulunmuştur. *A. m. caucasica*-*A. m. armeniaca* ve *A. m. caucasica*-*A. m. meda* gruplarının coğrafik alanları diğerlerinin coğrafik alanlarına göre birbirlerine daha yakın olmakla birlikte bu alt türler morfometrik yapı bakımından birbirlerine çok daha uzak bulunmuşlardır. Zıt iklim koşullarında morfolojik açıdan benzer arılar bulunabilirken, aynı iklim koşullarında farklı morfolojik yapıda bal arılarının da bulunabildiği belirtilmiştir (Louveaux, 1969).

***Apis mellifera anatoliaca*:** Bu alt tür Batı ve Orta Anadolu'da farklı coğrafik alanlarda bulunmaktadır. *A. m. anatoliaca*, *A. m. ligustica*'dan daha büyüktür ve birbirlerine çok benzerdirler. Bu arılar sarı arılar olarak kabul edilirler ama turuncudan kahverengiye doğru bir renk geçisi görüldüğünü bildirmiştir (Maa, 1983). En önemli karakteristik özellikleri ise kanat damarları ve açılardaki farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir (Maa, 1953; Adam, 1983).

***A. m. adami*:** Girit arılarının Yunanistan arılarından çok Anadolu ve Doğu Akdeniz sahillerinin arıları (*A. m. syriaca*)'na benzer özellikler taşıdığı bildirilmiştir (Ruttner, 1980). *A. m. adami* aynı gruptaki daha iri olması ile karakterize edilmiştir (Adam, 1983). Bu tür morfolojik karakterleri açısından kolaylıkla tanımlanabilmesine rağmen coğrafik yaşam alanı bakımından doğudaki sınırının çizilemediği bildirilmiştir.

A. m. cyprica: Bu tür Orta Doğu grubunda yer alan ada arısıdır. Dış görünüşü olarak ekzotik bir arıdır ve bu arılar için gerçek bir "Apostic beauty" terimi kullanılmıştır (Pollman, 1889). *A. m. cyprica*'nın coğrafik konumu nedeniyle komşu arı ırkları ile ortak özellikler gösterdiği belirtilmiştir (Adam, 1983). Bu alt tür ada alt türüdür. Kıbrıs adasında bulunmaktadır. *A. m. cyprica* morfolojik olarak onunla aynı grupta yer alan *A. m. anatoliaca*, *A. m. syriaca* ve *A. m. meda*'ya benzemektedir. Bu alt türün rengi "parlak turuncu" rengindedir ve oldukça farklıdır.

A. m. syriaca: İki farklı coğrafya arasındaki (Anadolu arısı ve İran arısının bulunduğu) dar bir alandadır (Ruttner, 1988a). Farklı iklimi ve coğrafik özellikleri olan alanlara yayılım gösterdiğini bildirmiştir (Skorikov, 1929b). Bu alt türün, Güneydoğu Anadolu'da Hatay civarında yayılış gösterdiği bildirilmiştir. *A. m. syriaca* için Ortadoğu'daki küçük bal arısı alt türlerinden birisidir denilebilmektedir (Ruttner, 1988a).

A. m. meda: İlk kez Lübnan'da tanımlanmıştır ve Türkiye'nin güneydoğusu, Kuzey Irak, İran bu alt türün yayılış alanını oluşturduğunu bildirmiştir (Ruttner, 1988a). *A. m. meda*'nın yayılımının genel zoocoğrafik kurallara uymadığı, çok farklı coğrafik özellikleri, farklı iklimi olan alanlara yayıldığı bilinmektedir. Örneğin Güneydoğu Anadolu (Van gölünden Antakya'ya kadar)'da bulunan *A. m. meda* popülasyonu dış görünüş itibariyle çok küçük olmaları, geniş bir metatarsiye sahip olması ve uzun dil karakterleri bakımından *A. m. cyprica*'ya daha yakın ayrı bir grup özelliği gösterdiğini bildirmiştir (Skorikov, 1929b).

A. m. caucasica: Tüm dünyada en fazla bilinen bal arısı türlerinden birisidir. Kafkaslarda, Karadeniz'in doğusunda, Rusya ve Azerbaycan'ın bir parçasında doğal olarak bulunduğunu bildirmişlerdir (Alpatov, 1948; Bilash, Makarov ve Sedich, 1976; Awetisjan, 1978). *A. m. caucasica*, arıcılar tarafından gri Kafkas dağ arısı olarak bilinmektedir. Ekonomik açıdan önemli bir alt türdür.

Apis mellifera carnica: *A. m. carnica* C soyundan olup Trakya'da yayılış gösteren bir alt tür olduğunu bildirmiştir (Kandemir vd., 2000). Karniyol bal arısının doğal yayılış alanı Avusturya, Hırvatistan, Romanya, Macaristan, eski Yugoslavya sınırları ve Bulgaristan olduğunu bildirmiştir (Pollman, 1879)

Ekonomik olarak dünya üzerinde değeri en yüksek ırklar olarak İtalyan arısı (*A. m. ligustica*) ve Karniyol arısı (*A. m. carnica*)'da Doğu Avrupa grubunda yer almaktadır. Bir diğer açıdan *A. m. carnica* doğal olarak Viyana'dan Avusturya'ya, Dalmaçya sahillerine, tüm

Yugoslavya ve Alplerin güneyine kadar yayılmıştır (Ruttner, 1965). *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* ile birlikte değerlendirildiğinde *Apis mellifera* ırklarının en büyük arılarından biri olduğu bilinmektedir. Morfolojik olarak bakıldığında Karniyol arısı (*A. m. carnica*)'nın İtalyan arısı (*A. m. ligustica*)'na benzediği ancak İtalyan arısının ona göre daha küçük olduğu belirlenmiştir. *A. m. carnica* mükemmel bir bal üreticisi ırk ve en centilmen *Apis mellifera* ırkı olarak bilinmektedir (Pollmann, 1889). *A. m. caucasica*' da olduğu gibi *A. m. carnica*'nın da farklı coğrafik bölgelere göre varyeteler oluşturduğunu bildirmiştir (Adam, 1983). *A. m. macedonica*'nın diğer Avrupa ırklarına göre daha ince ve uzun bir yapıda olduğu ve oldukça koyu renge sahip olduğu bildirilmektedir. *A. m. macedonica* sıkı bir kış popülasyonu oluşturur. *A. m. macedonica* için çam üzerinde yaşayan biyolojik bir böcek olan "Marchalina Helenica'nın yapmış olduğu biyolojik salgının en önemli bal kaynağı olduğunu bildirmiştir (Adam, 1954).

1.5 Morfolojik Yöntemlere Göre Bal Arılarının Karakterizasyonu

Buttel-Reepen (1906) tarafından yapılan üçlü sınıflandırmadan sonra araştırmacılar, bal arısında; vücut ölçüleri, kübital indeks, renk gibi morfolojik karakterler ve bunların ölçümleri ile Avrupa'daki arı ırklarını tanımlamışlardır (Ruttner vd., 1978). Farklı bölgelerde dağılım gösteren bal arılarının hastalıklara direnç, boy, renk, kanat, kanat damarlanması, oğul eğilimi, savuma gibi davranışsal özellikler, morfolojik ve fizyolojik özellikler bakımından farklılıklar gösterebileceği bilinmektedir (Smith, 2002).

Morfoloji, bir canlının genel vücut yapısının verilerle ve sınıflandırılarak tanımlanmasıdır. (Alpatov, 1929). Morfometride amaç; ölçüm yapılan vücut/vücut organlarında biçimsel benzerlikleri ölçmek ve matematiksel modeller yardımı ile sayısal hale dönüştürmek olduğunu bildirmişlerdir (Sokal ve Rohlf, 1973). Morfoloji, Ricklefs & Miles (1994)'a göre fenotipteki ekolojik değişimleri ortaya koymakta, organizma ile çevresi arasındaki ilişki hakkında bizlere bilgi vermektedir. Bal arılarında (*Apis mellifera* L.) ilk morfolojik çalışmayı renk farklılığına dayanarak Aristotle ve Columella'nın yaptıkları bildirilmiştir.

Morfometrik tekniklerin daha ucuz olması ve kolay yapılabilmesi bu tekniklerin kullanımını daha avantajlı hale getirmiştir (Sheppard ve Smith, 2000). Gen ekspresyonlarının önemli derecede çevresel koşulların etkisi altında olması morfometrik karakterlere ilişkin filogenetik araştırmalar için bir dezavantajdır. Bu amaca dayanılarak güvenilir sonuçlar vermediği düşünülmektedir.

Yükseklere çıkıldıkça kanat, bacak ve dil uzunluğu kısalır (Rench kuralı); soğuk iklim popülasyonlarında kıl uzunluğu daha fazladır (Allen kuralı). Bu nedenle farklı lokasyonlarda coğrafik konumları ve iklim yapıları benzer olan aynı morfolojik yapıdaki bal arılarına rastlamak mümkündür (Alpatov, 1929; Ruttner 1988a, 1988b; Daly vd., 1991, 1995).

Verimle ve morfolojik karakterler ile ilgili özellikler arasında doğrusal bir ilişki olduğunun belirlenmesi ise ırk tanımlamalarında morfometrik çalışmaları hala önemli kılan bir unsur olmuştur (Ruttner 1988a; Karacaoğlu ve Fıratlı, 1998; Güler ve Kaftanoğlu, 1999c). Karacaoğlu ve Fıratlı (1998) tarafından, kanat uzunluğu ve bal veriminin bir ilişkisi olduğu bildirilmektedir. Güler vd. (1999c) ise, fizyolojik karakterler ve vücut büyüklüğü gibi morfolojik karakterler arasında doğrusal bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Geometrik morfometrik yöntem, bir tür, alt tür veya ırkın karakter ya da karakterlerinin tamamının aynı anda kartezyen koordinatları alınarak analitik boyutta incelenmesi yöntemidir (Adams vd., 2004). Klasik morfometrik teknik, aynı bölgeden tekrarlı ölçümler alarak tekrarlı ölçümler sonucu oluşan taraflı/ön yargılı yaklaşım (bias) gibi ve ölçümlerden kaynaklanan varyasyonun artması nedeniyle oluşan sorunların aşılmasında genel kabul gören bir çözüm bulunmaması nedeniyle eleştirilmiştir (Mayr ve Ashlock, 1991; Zelditch vd., 2004). Morfolojik çalışmalarda pek çok araştırmacı bazı karakterlerin (özellikle üç boyutlu organların) ölçüm zorluğunu belirtmişlerdir. Bu zorluğun ölçülen karakterlerdeki varyasyonu artırması nedeniyle söz konusu karakterlerin hepsini kullanmamışlardır.

Morfometrik ölçümler için geliştirilen ve sayıları devamlı artan 42 karakter üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Çizelge 1.3). Morfolojik yapının incelenmesi sayesinde arı ırk ve tiplerinin karakterizasyonu, tanımlanması, bunların saflaştırılması ve saflıkların kontrol edilmesi mümkündür (Güler, 1995).

Çizelge 1.3. Bal arılarında morfolojik ölçümlerde kullanılan karakterler (Ruttner, 1987)

Karakter Türü	Karakterler
Kıl	Tergit üzerindeki kıllar
	Tergit üzerindeki tomentumun genişliği
	Tomentumun posterior çizgisinin genişliği
Büyüklik	Proboscis uzunluğu
	Femur uzunluğu
	Tibia uzunluğu
	Metatarsus uzunluğu ve genişliği
	Tergit uzunluğu
	Siternit uzunluğu
	Siternit mum ayarlarının uzunluğu ve genişliği
	Siternit mum ayarları arasındaki uzaklık
	Siternit uzunluğu ve genişliği
	Ön kanat uzunluğu ve genişliği
Ön Kanat	Kübital A
	Kübital B
	Ön kanatta 11 aç: A4, B4, D7, E9, G18, I10, I16, K19, L13, N23, O26
Renk	Tergit üzerindeki renklenme
	Scutellumda renklenme

İlerleyen süreçlerde yapılan çalışmalarda bal arılarındaki fenotipik varyasyonun ortaya koyulması için tüm karakterlerin ölçülmesine gerek olmadığı anlaşılmıştır. Arılarda ırk tanımlamasının ön kanat hücrelerindeki 13 aç ve kanat boylarının ölçülmesi ile yapılabileceğini DuPraw (1965) bildirmiştir. Cornuet ve Fresnaye (1989)'da Avrupa alt türlerinin, metatarsal indeks, tergit rengine ve kubital indeksine bakılarak tanımlanabileceğini ve bu amaç için 4 yada 5 karakterin yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Daly (1985), Afrika arıları için 19 karakter kullanmıştır. Afrika arılarında yaptıkları çalışmalarda elde edilen morfometrik verilere istatistiksel analizlerin uygulanabilmesi için 10 karakterin incelenmesinin yeterli olabileceğini Ruttner vd. (1978) belirtmişlerdir. Türkiye bal arılarında morfometrik karakterizasyonda Darendelioğlu ve Kence (1992) 23 adet, Kandemir vd. (1995) 12 adet, Güler ve Kaftanoğlu (1999a) 21 adet, Güler ve Kaftanoğlu (1999b) 20 adet ve Güler, (2002) 19 adet morfometrik karakter kullanmıştır (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Orta Doğu bölgesinin arı ırklarına yönelik verilen bazı morfometrik veriler (Sheppard ve Meixner, 2003)

<i>Apis mellifera</i> ırkları	Kübital indeks	Dil uzunluğu	Ön kanat uzunluğu
<i>Carnica</i>	2.59	6.39	9.40
<i>Ligustica</i>	2.55	6.35	9.21
<i>Caucasica</i>	2.16	7.04	9.32
<i>Anatoliaca</i>	2.24	6.46	9.19
<i>Meda</i>	2.56	6.33	8.97
<i>Armeniaca</i>	2.61	6.64	9.07
<i>Macedonica</i>	2.59	6.45	9.18
<i>Adami</i>	1.89	6.46	9.09
<i>Cypria</i>	2.72	6.39	8.87
<i>Pomonella</i>	2.24	6.41	-
<i>Syriaca</i>	2.28	6.17	8.48

Bu karakterlerin arasındaki ilişkiye bağlı olarak alt türler arasındaki dağılımın ortaya çıktığı bilinmektedir. Morfometrik karakterler arasındaki ilişkiye (korelasyona) bağlı olarak bireylerin gruplara dağılımını anlaşılır. Bu karakterlerin ölçülmesi sonucu elde edilen sonuçlara diğer bal arılarına ilişkin sonuçlar da temel alınarak diskriminant fonksiyon analizleri uygulanır ve günümüze kadar da 29 arı ırkının tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında bu şekilde yapılan morfometrik çalışmalar yol gösterici olmuştur.

1.6 Moleküler Yöntemlere Göre Bal Arılarının Karakterizasyonu

Bireyler arasında var olan genetik benzerlik ve farklılıkların tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda morfolojik, fizyolojik ve genotipik farklılıklar dikkate alınmaktadır. Ele alınan hemen her popülasyonda bireyler arasındaki bu farklılıkların göze çarptığı bilinmektedir ve bu şekilde doğada birbirinin aynı olan bireyler elde etmek imkansızdır.

Popülasyonlar arasındaki bu benzerliklerin ve farklılıkların DNA molekülü düzeyinde belirlenmesi amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bazı yöntemlerden faydalanılmıştır. DNA-DNA hibridizasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bu amaçla geliştirilen yöntemler arasındadır.

Bunların dışında Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Basit Dizilim Tekrarları (SSR), Ardışık Basit Tekrarlar (STR), mikrosatellitler ve DNA dizi analizi (DNA sequencing) gibi farklı yöntemlerin yer aldığı bilinmektedir (zdil, 2007).

1.6.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte onu takip yıllarda yapılan araştırmalarda bir devrim yaratarak, biyoteknoloji sektöründe patlamaya neden olmuştur. Daha sonra PCR adı verilen bu teknik geliştirilmiş ve biyolojik araştırmalarda hızlı bir Şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

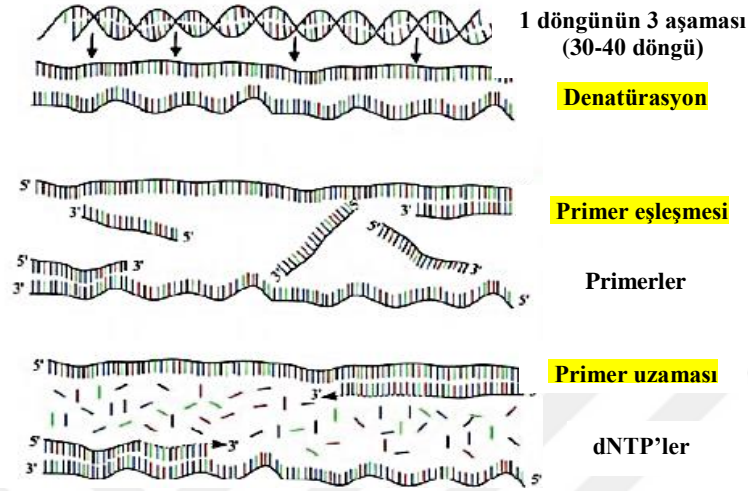
Bu yöntem, DNA molekül topluluğunun, hedef DNA dizisinin direk olarak çoğaltılmasına dayanmaktadır ve bu yöntemin kullanılabilmesi için, çok az miktarlarda da DNA yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltmak için, hedef DNA'nın nükleotid dizisinin bilinmesi gerekir. Çünkü bu bilgiden yararlanılarak tek zincir haline getirilen DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerlerin sentezi için kullanılır. Çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle bu primerler hibridize olur. Isıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi sayesinde ise çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezlenmesinin sağlandığı bilinmektedir (Avisse, 2004).

Farklı basamaklardan oluşan PCR reaksiyonunda;

- Kalıp DNA ift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyon),
- Primerlerin komplementer dizilere bağlanması (bağlanma)
- Polimeraz enzim aktivasyonu ile zincirin uzaması (uzama)

Şeklinde meydana gelen olayların tümüne "döngü (cycle)" adı verilmektedir. Bu döngü 30-40 kez tekrarlanarak istenilen DNA bölgesi oğaltılmış olmaktadır. Her döngü bitiminde DNA molekülü, iki katına çıkarılarak üssel bir artışla hedeflenen DNA parçacığı çoğaltılmaktadır (Şekil 1.9).

Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) reaksiyonları “thermalcycler” adı verilen cihazlarda, otomatik olarak gerçekleşmektedir. Bu programlarda döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla cihaz çalıştırılmadan önce cihaza girilir.



Şekil 1.9. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü

1.6.2 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

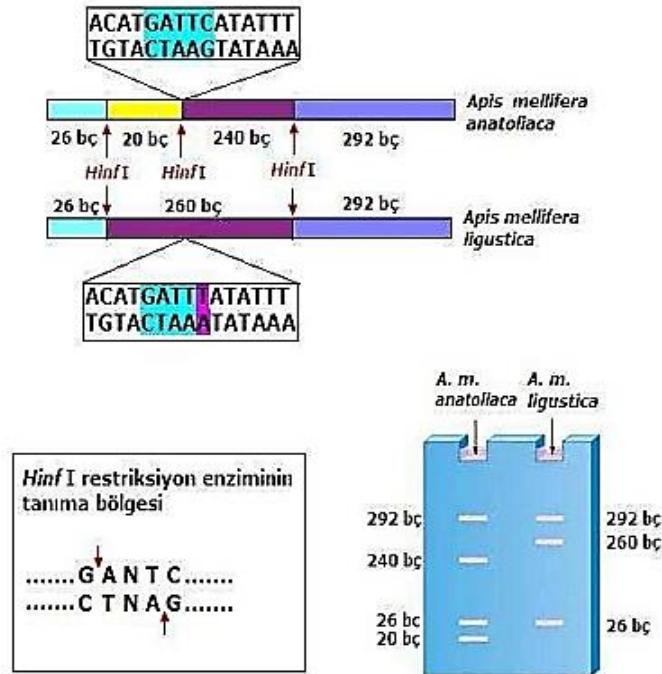
PCR yönteminin gelişmesi ile birlikte, mtDNA molekülünün hedef kısmının PCR ile çoğaltılmış RFLP analizi, populasyon genetiği çalışmalarında da başvurulan bir yöntem olmuştur.

Bu yöntemde ise standart olarak PCR işlemiyle üzerinde çalışılan lokus çoğaltılmakta, uygun enzimler (restriksiyon endonükleaz) kullanılarak kesilmekte ve bu sayede restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) elde edilmektedir. Kesim sonucunda oluşan parçacık modellerine göre kesim noktasının varlığı yada yokluğuna göre bireyler arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilebilmektedir. RFLP ile bireyler arasında ortaya çıkan polimorfizm, enzimlerin tanıma bölgesinde bir nükleotidin eksilmesi, nükleotidin eklenmesi yada bir nükleotidin değişmesi şeklinde ortaya çıkabilmekte ve nokta mutasyonlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Tanıma bölgesi arasında meydana gelen parça ilavesi veya parça çıkmasıyla oluşan uzunluk farklılıkları da yine RFLP olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde rutin olarak yapılan PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotid primerler kullanıldığı için güvenilir bir çoğaltım yapılabildiğini bildirmişlerdir (Botstein, vd., 1980; Hall, 1998; Özdil, 2007).

RFLP yönteminde, kullanılan restriksiyon enzimleri bakteriyel kökenlidir ve çift sarmal DNA molekülünü 4-8 baz çiftlik DNA sıralarından tanıyarak bu bölgelerden özgün şekilde kesim yapan enzimlerdir. Kesim sonucunda bazı enzimlerin DNA'yı kestiklerin de yapışkan uçlu tek iplikçikli serbest uçlar oluşturduğu; bazılarının ise küt uçlu çift iplikçikli uçlar oluşturduğu bilinmektedir (Çizelge 1.5) (Şekil 1.10). Böylece her bir restriksiyon endonükleaz enziminin kendine özgün nükleotid dizilerini içeren DNA parçacıkları oluşmaktadır. Restriksiyon enzimlerinden yararlanılarak evrim ve populasyon genetiği çalışmalarında çok önemli genetik farklılıklar tespit edilmiştir. Hem çekirdek ve hem de mitokondriyel genomda RFLP tekniği oldukça faydalı bilgiler ortaya koyduğu görülmektedir (Griffiths vd., 1996).

Çizelge 1.5. Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları

Enzim	Tanım bölgesi	Kesim sonrasında elde DNA parçaları
HinI	5'... G↓ANTC...3' 3'...CTNA↑G...5'	5'...G ANT C...3' 3'...CTNA G...5'
DraI	5'...TTT↓AAA...3' 3'...AAA↑TTT...5'	5'...TTT AAA...3' 3'...AAA TTT...5'

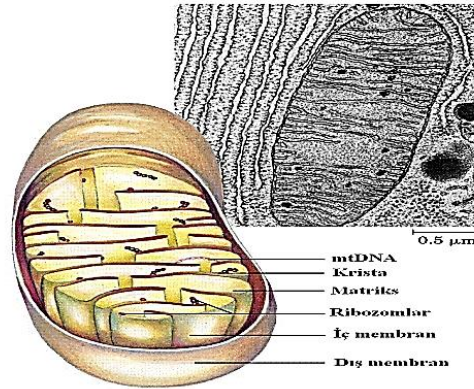


Şekil 1.10. PCR-RFLP ile genetik farklılık ve benzerliklerin belirlenmesi (Özdil, 2007)

1.7 Mitokodri ve Mitokondriyel DNA (mtDNA) Molekülü

Mitokondri, organizma için gereken reaksiyonlarda enerjinin temin edildiği tüm ökaryotik canlılarda bulunan organellerinden birisidir. İki hücre membranına sahip, kendine özgü DNA molekülü (mtDNA) olan ve ribozomları olan, çeşitli enzimleri sentezleyebilen, adenosin trifosfat (ATP) formunda enerji sentezini gerçekleştiren bir organeldir (Rokas vd., 2003). Bir hücredeki mitokondrinin sayısı, hücrenin tipine, fonksiyonuna ve enerji ihtiyacına göre birkaç adet veya binlerce adet olabildiği bilinmektedir (Şekil 1.11).

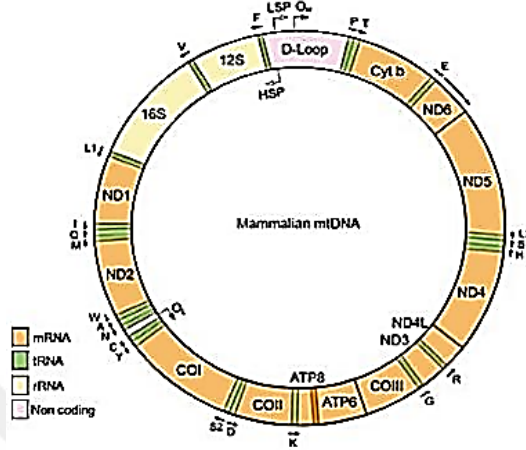
Yüksek enerji ihtiyacı olan doku hücrelerinde (karaciğer ve kas gibi) mitokondri sayısı oldukça yüksektir. Mitokondrinin esas görevine değinecek olursak, hücrede oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleştirilmesini sağlar. Oksidatif fosforilasyonun merkezi olduğu Eugene Kennedy ve Albert Lehinger (1949), tarafından ortaya konulmuştur Oksidatif fosforilasyon, oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların oksijene aktarılırken açığa çıkan enerji ile ADP'den adenosin trifosfat (ATP) sentezlenmesi olayıdır (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.11. Mitokondrinin yapısı

Eşeyli çoğalma gösteren türlerde mtDNA molekülünün çoğunlukla daire şeklinde olduğu ve anaya ait (maternal) kalıtım gösterdiği bilinmektedir. mtDNA'nın sekansının 1981'de tamamlandığı ve 16.569 baz çiftinden oluşan çift-sarmallı molekül olduğu bildirilmiştir (Anderson, Bankier ve Barrell, 1981). Mitokondriler birçok mtDNA kopyasına sahiptir ve bir hücrede yüzlerce mtDNA kopyası vardır. Buna poliplasmi denilmektedir. mtDNA, yapısındaki replikasyon, transkripsiyon, translasyon ve olaylarının nükleer genlere bağımlı olduğunu bildirmişlerdir (Taanman, 1999; Leonard ve Schapira, 2000).

İnsan, hayvan ve böceklerin mtDNA'sı halkasal moleküldür ve yaklaşık olarak 16.000-17.000 bp uzunluğundadır. Bu türlerde mtDNA'nın 13 protein kodlayan gen bölgesi, 22 adet tRNA geni ve 2 adet ribozomal DNA (16S ve 12S) geni ve yalnızca replikasyon orjini içeren protein kodlamayan bazı gen bölgelerinden oluştuğu bilinmektedir (Anderson vd., 1982) (Şekil 2.12).



Şekil 1.12. Mitokondriyel DNA'nın yapısı

mtDNA'nın kopya sayısının çok yüksek olması onun en önemli özelliklerinden birisidir. Çünkü her mitokondri hücre çekirdeğinden farklı olarak birkaç kopya mtDNA içerir. Bu nedenle moleküler genetik çalışmalarında hayvansal dokulardan yeterince mtDNA izole etmenin önemli olduğunu bildirmişlerdir (Rokas, Ladoukakis, Zouros ve Antonis, 2003). Ayrıca bilimsel çalışmalarda mtDNA'nın tercih edilmesinin bir diğer sebebi de boyutunun küçük olması olduğunu bildirmiştir (Smith, 1991).

mtDNA'nın bir diğer önemli özelliği, üzerinde bulunan bir bölgenin evrimleşme hızıdır ve farklı gen bölgelerinin evrimleşme hızları farklıdır. Bu nedenle filogenetik çalışmalarda türlerin birbiriyle olan ilişkisini incelemeye sık kullanılan genetik bir araçtır. Örneğin omurgasız hayvanların A+T nükleotitleri bakımından zengin, protein kodlamayan gen bölgeleri çok hızlı evrimleşirken COI, COII ve rRNA gen bölgeleri çok yavaş evrimleşir. mtDNA üzerinde hızlı evrimleşen gen bölgeleri (COI-COII: protein kodlamayan gen bölgesi) ancak evrimleşmenin başlangıcındaki türleri birbirinden ayırmakta faydalıyken, yavaş evrimleşen gen bölgelerin türlerin çok eskiye dayanan geçmişinin araştırılması için faydalı olduğu bilinmektedir (Smith vd., 1991).

Genelde taksonomik sınıflandırması aynı olan canlılarda protein kodlayan genlerin genom üzerindeki yerlerinin bazı türler arasında değiştiği ve bazı türlerde ise aynı olduğu bildirilmektedir (Moritz, Hawkins, Crozier ve Mackinley, 1986; Crozier vd., 1991, 1992, 1993).

1.7.1 Bal Arısı mtDNA'sı

Apis mellifera türlerinin, *Drosophila yakuba*'dan sonra mtDNA materyali hakkında en fazla araştırma yapılan böcek grubu olduğu bilinmektedir. Bu sayede protein elektroforezi aracılığı ile alloenzim polimorfizmi çalışılan ilk organizmalar arasında yer aldığı bildirilmektedir (Mestriner, 1969; Mestriner ve Contel, 1972).

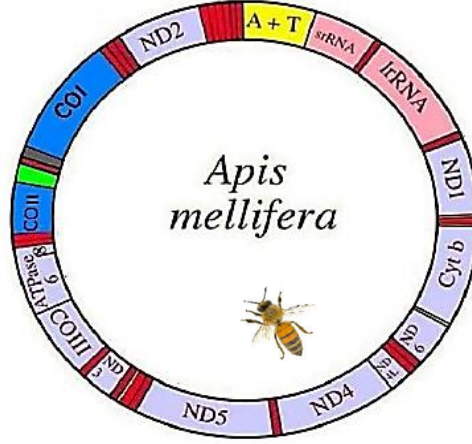
Apis mellifera türlerinin mtDNA genomunda, replikasyon orijininin, protein kodlanmayan bölgenin COI-COII gen bölgesinde olduğu bildirilmiştir (Crozier ve Crozier, 1993). Replikasyon orijini diğer omurgalı mtDNA'larında sadece ağır zincirinde yer alırken, *Apis mellifera* ve *Drosophila yakuba*'nın her iki zincirinde bulunduğu bilinmektedir (Brown, 1985; Wolstenholme vd., 1987). Farklı türlerin mtDNA'ları ile *Apis mellifera* mtDNA'sının protein kodlayan genleri ve düzeni bakımından çok az farklılıkları vardır (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. İnsan, maya, mısır, *Drosophila yakuba* ve bal arısı mtDNA'larının taşıdığı genler

Gen Ürünleri	İnsan	Maya	Mısır	Drosophila	Bal Arısı
1rDNA	+	+	+	+	+
srDNA	+	+	+	+	+
5srDNA	-	-	+	-	-
tRNA	22	25	?	22	22
Replikasyon orijini (D-loop, SL)	2	7	?	+	+
Sitokromoksidaz (COI, COII, COIII)	+	+	+	+	+
Apositokrom-b (Cyt-b)	+	+	+	+	+
NADH-dehidrogenaz 6 alt birim)	+	?	?	+	+
ATP sentetaz (6, 8ve 9)	+*	+	+	+*	+*

+:var, -:yok, *: altbirim 9 yok. Ayrıca mayalarda bazı RNAase genleri var (Topaktaş 2004)

Apis mellifera mtDNA'sının yaklaşık olarak 16.000-17.000 bp uzunluğunda halkasal bir molekül olduğu ve tüm mitokondriyel genomun dizilendiği ilk Hymenoptera alt türünün *Apis mellifera ligustica* olduğu bildirilmiştir (Crozier, 1993) (Şekil 1. 13).



Şekil 1.13. Bal arısı mtDNA' sı

COI, COII ve COIII sitokrom C oksidaz 1, 2, 3 genlerini ve Cyt B sitokrom B genini, ND1-6 ve ND4L, NADH dehidrogenaz genlerinin 1-6 alt ünitelerini göstermektedir. A+T olarak gösterilen bölge replikasyon orijinini içeren zengin bölgeyi göstermektedir ve oklar kodlayan bölgelerin transkripsiyon yönünü ifade etmektedir (Crozier ve Crozier 1993)

Birçok türde de olduğu gibi bal arıları da mitokondriyel genom üzerinde 37 gen içerdiği bildirilmiştir (Şekil 1.13) (Moritz, 1986; Cornuet and Garnery, 1991; Moritz, 1994). Bu genleri sıralayacak olursak;

I. 2 adet ribozomal RNA geni

- Ribozomun büyük alt birimi (lrRNA), Ribozomun küçük alt birimi (srRNA)

II. 22 adet transfer RNA geni

tRNA molekülü olarak;

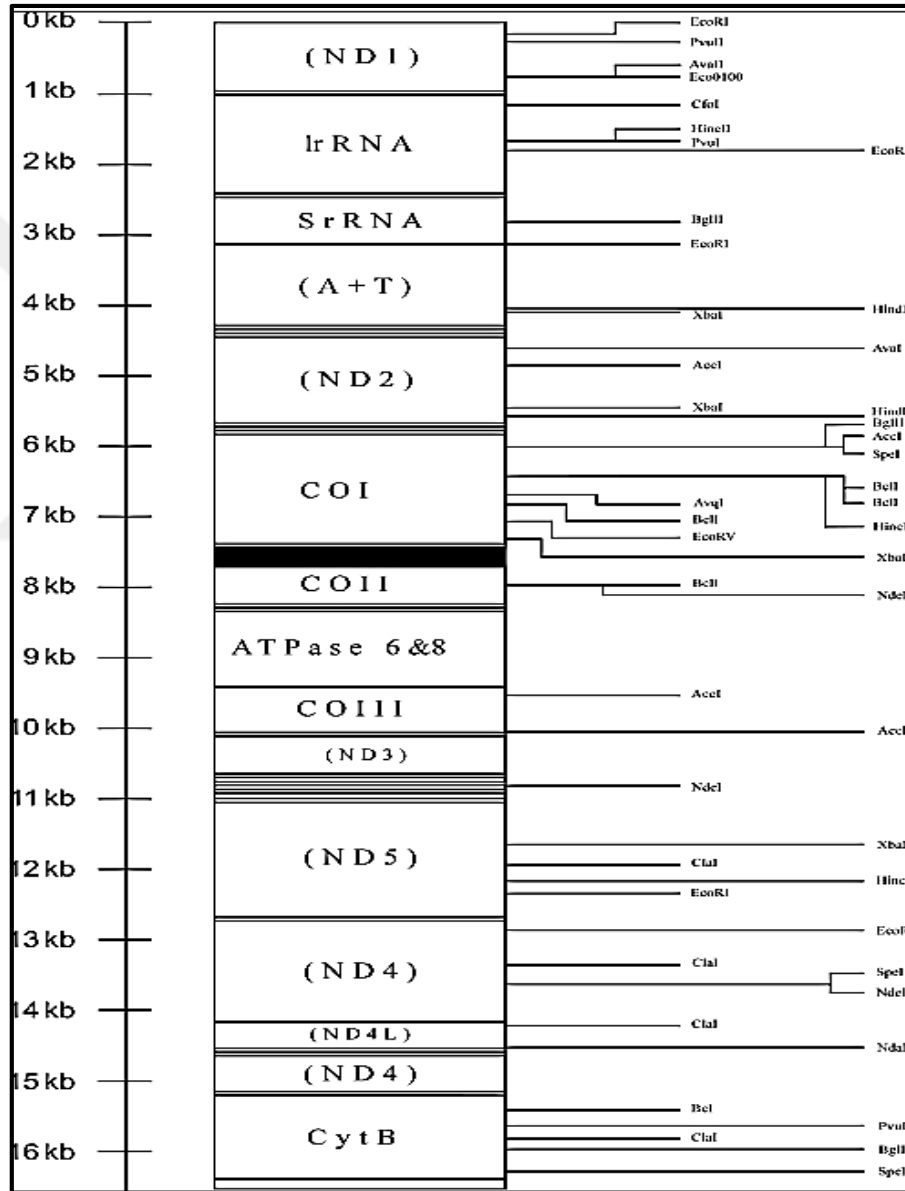
- tRNA^{Glu}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Met}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Phe}, tRNA^{His}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} ve tRNA^{Val} şeklindedir.

Aminoasit birimi olarak;

- Histidin (His, H) Glutamik asit (Glu, E), Serin (Ser, S), Metiyonin (Met, M), Glutamin (Gln, Q), Alanin (Ala, A), İzolösin (Ile, I), Sistein (Cys, C), Tirozin (Tyr, Y), Triptofan (Trp, W), Lösin (Leu, L), Aspartik asit (Asp, D), Lizin (Lys, K), Glisin (Gly, G), Arjinin (Arg, R), Asparagin (Asn, N), Fenilalanin (Phe, F), Treonin (Thr, T), Prolin (Pro, P), Serin (Ser, S), Lösin (Leu, L) ve Valin (Val, V)

III. Solunum zincirinde yer almakta olan ve yapısal proteinleri belirleyen 13 gen;

- 1 adet sitokrom b (cyt b) geni,
- 3 adet sitokrom C oksidaz (COI, COII, COIII) alt birimlerini kodlayan genler,
- 2 adet ATP sentaz (ATPaz 6 ve ATPaz8) geni ve
- 7 adet NADH (Nikotinamid adenin dinükleotid) dehidrogenaz alt birimlerini (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 ve ND6) şeklinde belirleyen genler olduğu bildirilmektedir.



Şekil 1.14. *Apis mellifera* L. mtDNA genomunun kesim haritası (Smith, 1991)

Soldan sağa; kb (1 kb =1000 nükleotid), tRNA genlerin konumu (Y, W, L, D ve K sırası ile tirozin, triptofan, lösin, aspartat ve lizin) gen haritası ve enzim kesim noktaları şekilde bildirilmektedir (Cornuet ve Garnery 1991).

mtDNA'nın genom haritasına göre alt türlerin arasındaki ilişki değerlendirildiğinde (UPGMA (Unweighted pair group analyse) üç ana mtDNA haplotip grubunun belirlendiği bildirilmiştir (Smith, 1991). Bu gruplar; Doğu Akdeniz grubu (C) (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasiaca* ve *A. m. lamarckii*), Afrika grubu (A) (*A. m. intermissa*, *A. m. scutellata*, *A. m. capensis* ve bazı *A. m. iberica* ırkları ile *A. m. unicolor*) ve Batı Avrupa grubu (M) (*A. m. mellifera* ve bazı *A. m. iberica* ırkları) dur.

RFLP yöntemi esas alınarak yapılan çalışmaların ortak sonucunda incelenen bal arısı popülasyonlarında yalnızca birkaç enzime ilişkin kesimlerin (Cytb/BglII, 1rRNA/EcoRI, COI/HincII, XbaI) varlığına ya da yokluğuna göre popülasyonların bu mtDNA haplotip gruplarından hangisine ait olduğunu tanımlamanın mümkün olabileceği bildirilmiştir. Bu sayede incelenen mtDNA bölgesinde kesim enzimlerinin oluşturduğu bant profilleri dikkate alınarak örneklerin Afrika orijinli mi, batı Avrupa orijinli mi yoksa doğu Avrupa orijinli mi olduğunun kolayca belirlendiğini bildirmişlerdir (Hall ve Smith, 1991; Garnery vd., 1993; Nielsen vd., 2000, Moritz vd., 1986; Sheppard ve Berlocher, 1984a; Sheppard vd., 1991a,1991b;1997).

Daha sonraki yıllarda mtDNA'nın tamamının değil de yalnızca belirli bir gen bölgesinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu oluşan farklı bant profillerinin karşılaştırılmasına dayanan araştırmalar yapıldığı bilinmektedir (Moritz vd., 1986, Cornuet ve Garnery, 1991; Garnery vd., 1991, 1992, 1993, Arias ve Sheppard, 1996). Bunun yanı sıra mtDNA'nın bazı gen bölgelerinin (ND2, COI-COII) nükleotit dizi analizi yapılarakta, mikrosatellit bölgeleri incelenerekte (Garnery vd., 1992; Estoup vd., 1995a, 1995b, 1995c; Frank vd., 1998) bal arılarının genetik varyasyonunun araştırıldığı ve bu varyasyonlardan bulunan farklılıklardan da bal arılarının evrimsel tarihi ile ilgili yorumlar yapıldığı bilinmektedir.

Yapılan araştırmaya göre *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. dorsata* ve *Bombus leucorum*'un tRNA^{leu}-COII gen bölgesinin nükleotit dizisi karşılaştırıldığında *A. mellifera* ve *A. cerana*, 3'-COI, tRNA^{leu} gen bölgelerine homolog ekstra bir bölge ile diğer bal arısı türlerinden ayrıldığı bildirilmiş ve bu araştırmada COI ve tRNA^{leu} gen bölgesinin duplikasyonu *A. mellifera* ve *A. cerana* türlerinin ortak özelliği olarak belirlendiği bildirilmektedir (Smith, 1991). Bu bakımından *A. cerana*'ya en yakın *Apis mellifera* grubunun ise Doğu Akdeniz grubu (*A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* ve *A. m. lamarckii*) olduğu belirtilmiştir (Cornuet vd., 1991). Ayrıca Doğu Akdeniz (Doğu Avrupa) grubundaki *Apis mellifera* alt

türlerinin ve *Apis cerana*'nın COI-COII gen bölgesi diğer gruplardan daha kısa bulunduğu (Smith, 1991) ve mtDNA varyasyonuna göre belirlenen bu araştırma sonuçlarında Ruttner (1988a)'ın *Apis mellifera*'nın kökeni ve yayılmasına ilişkin hipotezinin desteklendiği bildirilmiştir (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7. *Apis mellifera* ırklarına ait mtDNA büyüklükleri (Smith, 1991)

<i>Apis mellifera</i> tür ve ırkları	Uzunluk sınıfı	Bcl kesimi sonucu tRNA ^{leu} -COII
<i>A.cerana</i>	S	
<i>A. mellifera</i>	S	1.05 kb
<i>ligustica</i>	S	
<i>carnica</i>	S	
<i>caucasica</i>	S	
<i>lamarcii</i>	S	
<i>intermissa</i>	M	1.14 kb
<i>scutellata</i>	M	
<i>unicolor</i>	M	
<i>mellifera</i>	M	
<i>intermissa</i>	L	1.32 kb
<i>scutellata</i>	L	
<i>mellifera</i>	L	
<i>scutellata</i>	XL	1.56 kb
<i>mellifera</i>	XL	
<i>scutellata</i>	XL	1.86 kb

mtDNA bal arılarının genetik çalışmasında iki nedenden dolayı çok önemlidir;

- ✓ Kolonideki tüm bireylerin ana arının döllerini taşıdığı, aynı mtDNA'lar taşıdığı ve koloninin analizlerinde bir birey olarak ele alındığı bildirilmektedir (Garnery, Cornuet ve Solignac, 1992).
- ✓ Generasyonlar boyunca mtDNA molekülünün büyük ölçüde korunarak dölden döle aktarıldığı için evrim sürecinde de anaya ait kalıtım modellerinin belirlenmesinde ve takip edilmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Özdil, 2007).

1.7.2 Bal Arılarında Çalışılan Mitokondriyel Lokuslar

RFLP markerleri kullanılarak bal arılarında yapılan çalışmalarda, mitokondriyel DNA (mtDNA) ve nükleer (çekirdek) DNA (nDNA) bölgelerinde hem uzunluk ve hem de farklı restriksiyon enzimlerin kesim noktalarının var olup olmamasına dayanan çeşitli farklılıklar üzerinde durulduğu bildirilmiştir. Tüm batı bal arısı türlerinde (*Apis mellifera* L' nin de içinde yer aldığı) mitokondriyel genomda yapılan genetik çalışmaların ilk kez Smith ve Brown tarafından 1990 yılında başlatıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada restriksiyon enziminin kesimlerinden faydalanılarak değişen farklı uzunlukların var olduğu ve sonrasında Cornuet ve Garnery (1991)'nin tespit edilmiş bu uzunluk farklılıklarına kabul edilebilir açıklamalar getirdiği bilinmektedir.

Bal arısının populasyon genetik çalışmalarında mitokondriyel genom etkili olmuştur. Bal arılarının mitokondriyel genomunda yapılan çalışmalarda özellikle uzunluk ve dizi varyasyonları, evrimsel soyları ve alt tür gruplarını ayırt etmede yararlı olduğunu bildirmişlerdir (Hall ve Smith, 1991; Garnery vd., 1992, 1993; Franck vd., 2000; Palmer vd., 2000).

Bal arılarında genetik yapının belirlenmesi üzerinde çok sayıda literatürde çalışma bulunmaktadır. COI, ND5, COI-COII arası intergenik bölge, *cyt-b* geni olmakla beraber başka çalışılan gen bölgeleri de vardır. Bu tez çalışmasında araştırılan lokuslar Sitokrom C oksidaz I (COI) geni ve NADH dehidrogenaz 5 (ND5) genidir.

1.7.2.1 Sitokrom C Oksidaz I Geni (COI)

Yunanistan' dan ve Güney Kıbrıs'ın farklı yörelerinden alınan 72 kolonide farklı gen (16S rDNA, COI ve ND5) enzim kombinasyonları ile varyasyonun araştırıldığı bir çalışmada Bouga vd (2005), COI lokusunda *NcoI*, *Sau3AI*, *FokI*, *BclI*, *SspI*, *StyI*, *BstUI* ve *XhoI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile bölgeler arasında elde edilen kesim modelleri temelinde farklılıkların bulunduğunu bildirmişlerdir. Yunanistan ve Kıbrıs'a özgü bal arısı örneklerinde COI geni-*NcoI* enzimi ile kesim sonucu, incelenen populasyonlarda 595 ve 433 bp uzunluğunda bant profili veren A haplotipi ve kesim olmayan B haplotipi 1028 bp olarak bildirmişlerdir. *SspI* enzimi ile yapılan muamelede *SspI* enzimi ile yapılan kesim sonucu tüm populasyonların A haplotipinde (487, 277 ve 264 bp) olduğunu bildirmişlerdir. *SytI* enzimi ile COI genin kesimi sonucu belirtilen bu kesim noktası ve B haplotipi (626, 402), Yunanistan ve Kıbrıs'a özgü bal arısı örneklerinde *A. m. macedonica*'da da bildirilmiştir.

Türkiye bal arısı populasyonlarını mtDNA farklılıklarını incelediği çalışmada Kekeçoğlu (2007), *NcoI* enzimi ile COI genin kesimi sonucu incelenen tüm populasyonların 1028 bç uzunluğunda tek bir bant oluştuğunu bildirmiştir. COI geninde PCR ürününün 1028 bç uzunluğunda olduğunu göre Türk bal arısı populasyonlarının mtDNA genomunun COI geninde bu enzimin tanıma bölgelerinin olmadığını yağıığı bu çalışmada bildirmiştir. *SspI* enziminin COI genin PCR ürünlerine uygulanması sonucu *SspI* enzimi ile yapılan kesim sonucu iki haplotip (B: 580, 439 bç ve A: 487, 277, 264 bç) bildirmişlerdir. *StyI* enzimi ile COI genin kesim sonucu incelenen populasyonlarda 1028 bç uzunluğunda tek bir bant oluştuğunu bildirilmiştir. Buradan sonuçla mtDNA genomunun COI geninde bu enzimlerin tanıma bölgelerinin olmadığını bildirmiştir.

Özdil vd. (2012), Türkiye bal arılarında mtDNA da yaptıkları çalışmada *SspI* enziminde COI genin kesimi sonucu incelenen populasyonlarda 523, 213, 175, 85 ve 32 bç uzunluğunda bant oluşturduğunu ve C haplotipi olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında bu çalışma ile aynı sonuçlar bulunmuştur.

Ivanova vd. (2010), Bulgaristan bal arısı populasyonunda yaptıkları çalışmada bal arısı populasyonları mtDNA genomunun COI geninde *NcoI* enzimin tanıma bölgesinin olmadığını ve 1028 bç uzunluğunda tek bant meydana geldiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde *SspI* ve *StyI* enzimin tanıma bölgesinin olmadığını ve 1028 bç uzunluğunda tek bant meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Stevanović vd. (2010), Sırbistan, Bosna-Hersek ve Makedonya bal arılarının mtDNA analizlerine dayalı biyocoğrafik çalışmasında COI geninde *NcoI* ve *StyI* enziminin tanıma bölgesi olmadığını ve tek bant meydana geldiğini bildirmişlerdir.

1.7.2.2 *NADH Dehidrogenaz 5 Lokusu (ND5)*

Yunanistan' dan ve Güney Kıbrıs'ın farklı bölgelerinden alınan 72 kolonide farklı gen (16S rDNA, COI ve ND5) enzim kombinasyonları ile varyasyonun araştırıldığı bir çalışmada, ND5 lokusunda *DraI*, *TaqI*, *NlaIII*, *AluI*, *HincII*, *FokI* ve *SspI* restriksiyon enzimleri ile bölgeler arasında elde edilen kesim modelleri temelinde farklılıkların bulunduğunu bildirmişlerdir Bouga vd (2005). *AluI* enzimi yapılan kesim sonucu 2 haplotip (A: 554, 268; B: 554, 171 ve 97 bç uzunluğunda) elde ettiklerini bildirmişlerdir. *HincII* enzimi ile ND5 genin kesimi sonucu incelenen tüm populasyonların 418 ve 404 bç uzunluğunda bant oluşturan A haplotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

FokI enzimi ile ND5 genin kesimi sonucu incelenen tüm populasyonların 430 ve 392 bç uzunluğunda bant oluşturan A haplotipinde olduklarını bildirmişlerdir.

Özdil vd. (2012), Türkiye bal arılarında mtDNA da yaptıkları çalışmada *AluI* enzimi ile ND5 genin kesimi sonucu incelenen tüm populasyonların 554, 211 ve 57 bç uzunluğunda bant oluşturan C haplotipini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında bulunan sonuçlar bu çalışma ile aynıdır.

Ivanova vd. (2010), Bulgaristan bal arısı populasyonunda yaptıkları çalışmada bal arısı populasyonlarının mtDNA genomunun ND5 geninde *FokI* ve *HincII* enzimin tanıma bölgesinin olmadığını ve 822 bç uzunluğunda tek bant meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 1.8. Farklı bal arısı türlerinin kökenlerini belirlemek için yapılmış çalışmalar (Meixner vd., 2013)

Gen Bölgeleri Enzim	Kesim oluşturan	Kesim oluşturmayan	Yazarlar
COI			
<i>NcoI</i>	<i>A.m.macedonica</i>	<i>A.m.adami</i> <i>A.m.cypria</i> <i>A.m.cecropia</i>	Bouga vd., 2005 Stevanoviç vd.,2010 Kekeçoğlu, 2007
<i>StyI</i>	<i>A.m.macedonica</i>	<i>A.m.adami</i> <i>A.m.cypria</i> <i>A.m.cecropia</i>	Bouga vd., 2005 Stevanoviç vd.,2010 Kekeçoğlu, 2007
<i>SspI</i>	Greek	Bulgarian	Ivanova vd.,2010 Kekeçoğlu, 2007 Özdil vd., 2012
ND5			
<i>AluI</i>	<i>A.m.macedonica</i>	<i>A.m.adami</i> <i>A.m.cypria</i> <i>A.m.cecropia</i>	Bouga vd., 2005 Özdil vd., 2012
<i>HincII</i>	Greek	Bulgarian	Ivanova vd.,2010
<i>FokI (BtsCI)</i>	Greek	Bulgarian	Ivanova vd.,2010

1.8 Literatür Özeti

Anadolu, genel olarak dağlık, her türlü iklim ve topoğrafik yapının mevcut olduğu birbirinden farklı coğrafik bölgelerden oluşmuştur. Böyle zengin bir ekolojik yapı içerisinde bal arılarının (*Apis mellifera* L.) bu bölgelere adaptasyonu ile önemli arı gen merkezlerinden biri haline geldiği bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (Bodenheimer, 1941; Adam, 1983). Bu nedenle bu bölgelerdeki populasyonun morfolojik, fizyolojik ve davranış özellikleri üzerine bugüne kadar birçok bilimsel çalışma yapılmıştır (Bodenheimer, 1941; Maa, 1953; Adam, 1983; Doğaroğlu vd, 1992; Settar, 1983; Karacaoğlu, 1989; Öztürk, 1990; Budak, 1992; Kaftanoğlu vd, 1993; Güler, 1995; Genç vd, 1997; Akyol, 1998; Gençer & Fıratlı, 1999; Güven, 2003; Güler & Toy, 2008; Güler vd, 2013).

Bodenheimer (1941) ‘‘Türkiye’ de Balarısı ve Arıcılık Hakkında Çalışmalar’’ adı ile yayınlanan kitabında, Alpatov (1927)’un belirlediği morfolojik karakterleri esas alarak Anadolu arı populasyonu üzerine yürüttüğü çalışmada yedi farklı bölgede yedi arı ekotipi belirlediğini bildirmiştir. Araştırmacı Kuzeydoğu Anadolu’da (Kars) *A. m. caucasica*, Orta Anadolu ve Doğu Anadolu'nun batı kısmında (Ankara-Elazığ) Trans Kafkas (*A. m. remipes*); Kuzey ve Kuzeydoğu Anadolu’da (Sinop-Erzurum-Artvin) *A. m. caucasica*; Kuzeybatı Anadolu’da (Bursa-İstanbul) *A. m. syriaca* ve *A. m. ligustica*; Akdeniz Bölgesinde (Mersin-Adana-Hatay) *A. m. syriaca*; İç Anadolu Bölgesinin güneyinde (Niğde-Nevşehir) *A. m. syriaca* ve *A. m. remipes* ve Balkan yarımadasındaki arı populasyonu da *A. m. carnica* olarak tanımlanmıştır.

Ruttner (1988a) coğrafik bölge ve ekolojik farklılığa bağlı adaptasyon sonucu çok değişik tiplerin oluştuğunu ve bunların kısmen tanımlamalarının 19’uncu yüzyıl başlarında yapılmasına rağmen daha sonraki taksonomik sınıflandırma çalışmalarında bu tanımlama metotlarının yeterli olmadığını bildirmiştir. Bal arılarının sistematik olarak taksonlara ayrılmasının tür içi sınıflandırmayı zorunlu kıldığını bildirmişlerdir (Güler ve Kaftanoğlu, 1999a). Aynı araştırmacılar, tür seviyesinde tanımlama metodunun Maa (1953) tarafından geliştirildiğini bildirmişlerdir. Maa (1953) üç müze örneğinde yaptığı biyometrik çalışma sonucunda Anadolu arısını alt tür seviyesinde *A. m. anatoliaca* ırkı olarak tanımlamıştır.

Bal arılarında (*Apis mellifera* L.) ilk morfolojik çalışmayı renk farklılığına dayanarak Aristotle ve Columella’nın yaptıkları bildirilmiştir. Ayrıca, cins, tür ve coğrafik ırk veya çeşit metodunun ise Buttel-Reepen (1906) tarafından geliştirildiği bildirilmektedir (Güler, 1995).

Bal arısı alt türleri (ırkları) coğrafi bölge veya alanlara göre oluşmuşlardır ve her ırk bir coğrafi bölge adı ile tanımlanmıştır. Dolayısı ile ırkların morfolojik olarak tanımlanmalarında sadece renk ve vücut büyüklüğü tanım ve karakterizasyon için yeterli olmamaktadır. Ruttner (1988a)'e göre sayısal tanımlama, klasik tanımlamadan tamamen farklıdır ve sayısal tanımlamada iki esas kural geçerli olduğunu bildirmiştir. Bunlar;

1. *Apis mellifera* L.'da en küçük taksonomiye koloninin oluşturması nedeniyle bireylere ait verilerden ziyade koloniye ait verilerden yararlanır.

2. Sınıflandırma veya taksonomik birim, biyometrik ölçümler alınıp elde edilen sayısal verilerin istatistiki değerlendirilmeleri neticesinde yapılmaktadır (Güler, 1995).

Adam (1977; 1983), Anadolu'yu üç kez (1954; 1962 ve 1972) baştanbaşa gezmiş ve birbirinden belirgin şekilde farklı ırkların ve bu ırklara benzerlik gösteren ekotiplerin bulunduğunu ve Anadolu'yu arı genetik zenginliği yönünden eşi ve benzeri olmayan yer olarak tanımlamıştır. Genelde mevcut popülasyonu dört farklı bölgesel tip olarak sınıflandırmıştır. Bunları, Batı Anadolu, Kuzeydoğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu arı tipleri olarak tanımlamıştır. Orta Anadolu Bölgesi arı popülasyonunun renk yönünden varyasyon gösterdiğini, ancak fizyolojik özellikler yönüyle temelde benzerliğin mevcut olduğunu ve kışlama kabiliyeti iyi, verimli, oğula gitme eğilimi düşük, olumsuz şartlara fevkalade dayanıklı ve çalışkan bir ırk olarak tanımlamıştır. Ancak bu çalışmaya ek olarak bu ırkın bazı hastalıklara duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Güler ve Kaftanoğlu, 1999a).

Birçok araştırmacı Trakya bölgesinde *Apis mellifera carnica* ırkının olduğunu bildirmişlerdir (Smith vd., 1997; Palmer vd., 2000; Kandemir vd., 2000, 2005). Bazı çalışmalar yapıldığında Kırklareli'nin Lüleburgaz ilçesinden alınan örneklerin ve Tekirdağ'ın Hayrabolu ilçesinden alınan örneklerin diğer bölge popülasyonlarından ayrı bir grup oluşturduğu bildirilmiştir. Fakat çalışma kapsamında Trakya bölgesi için belirlenen morfometrik ölçüm değerleri göz önüne alındığında daha önce Karniyol arı ırkı (*A. m. carnica*) için belirlenen değerlerin uyuşmadığı bildirilmiştir. *A. m. carnica*'nın yüksek kubital index değerinin olduğu yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (Pollmann, 1889). Bu çalışmada Trakya bölgesinde en yüksek KI değeri bakımından Malkara (2.54) ve Muratlı (2.53) popülasyonlarının ilk sırada yer aldığı daha önce Kandemir vd. (2000)'nin Kırklareli popülasyonu için bildirdiği KI değeri (2.74)'nin aksine Trakya bölgesinin en düşük kubital index değeri Kırklareli (2.24) ve Lüleburgaz (1.99) popülasyonlarında görüldüğünü bildirmişlerdir.

Tüm Trakya bölgesinden alınan bal arısı örneklerinin haplotiplere göre dağılımı araştırıldığında tüm Türkiye’de yaygın bulunan ve Kafkas ile Anadolu arısına ait Tip 1 haplotipinin % 58 oranında Trakya bölgesinde yaygın olan haplotip olduğunu bildirmişlerdir. İller bazında dağılımları ele alındığında özellikle Kırklareli ve Edirne illerinde Tip 2 haplotipinin sırasıyla % 87 ve % 75 oranında yaygın bulunan haplotipler olduğunu bildirmişlerdir. DNA dizi analizi sonucu özellikle Tip 2 haplotipinin Makedonya ve Karniyol arısı ile aynı kümede yer aldığı düşünülmüş ve Kırklareli-Edirne illerindeki bal arılarının Makedonya ve Karniyol arısı ile benzer orijinden gelmiş olabileceği fikrini bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar sonucunda Trakya bölgesinde tüm Türkiye’deki bal arısı alt türlerinden farklı olan yeni bir alt türün var olduğuna dair açıklanan hipotezleri bu çalışmalar ile destekleyip bildirmişlerdir (Moritz vd., 1986; Solignac, 1991).

Kaftanoğlu vd. (1993), GAP Bölgesinde farklı balarısı ırklarının performanslarını belirleme ve bölgedeki arı popülasyonunun ıslahı amacıyla yürüttükleri çalışmada, Güneydoğu Anadolu, İtalyan, Karniyol, Ege, Trakya ve Kafkas gruplarında dil uzunluğu ortalamalarının sırası ile 6.274, 6.536, 6.334, 6.621, 6.492 ve 6.495 mm; ön kanat uzunluğunu 9.246, 9.423, 9.461, 9.389, 9.098 ve 9.204 mm; Kübital indeksi 2.134, 2.006, 2.413, 2.075, 2.299 ve 2.024; 3 ve 4. tergit genişliğini 4.519, 4.977, 5.062, 5.192, 5.062 ve 4.930 mm ve kıl uzunluğunu 0.226, 0.271, 0.291, 0.295 ve 0.323 mm olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar uyguladıkları varyans analizi sonucunda Ege ve İtalyan arılarının uzun dil, Karniyol ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri arılarının ise kısa dilli arılar olduğunu, kübital indeksi en büyük olan grubun Karniyol arısı, en düşük olan grupların ise İtalyan ve Kafkas olduğunu, arka bacak uzunluğu en fazla olan grupların Ege ve Trakya arıları en düşük grubun ise Güneydoğu Bölgesinin yerli arısı olduğunu bildirmişlerdir (Güler, 1995).

Güler (1995), Anadolu, Kafkas, Muğla, Gökçeada, Trakya ve Alata genotiplerinde morfolojik ve fizyolojik karakterler üzerine yaptığı çalışmada genotiplere ait toplam 41 ayrı morfolojik karakterin biyometrik ölçümlerini aldığını bildirmiştir. İncelediği morfolojik ve fizyolojik karakterlerin birbirleriyle ve verim üzerinde önemli etkilerinin olduğunu bildirmiştir. Yaptığı çalışma sonucunda Trakya, Anadolu ve Kafkas genotiplerinin Akdeniz Bölgesi koşullarında saf yetiştiriciliğinin yapılmasının gerektiğini bildirmiştir.

Smith vd. (1997)’nin, Türk bal arılarının mtDNA varyasyonu bakımından araştırılmasına ilişkin yaptığı ilk çalışmalarda, Gürcistan sınırına yakın olan yerlerden alınan örneklerin %77’si, Erzurum yakınlarından alınan örneklerin %29’u ve Van çevresinden alınan

örneklerin ise %25'inin *A. m. caucasica* mtDNA haplotipi ile uyumlu bulunduğunu ve Trakya bölgesinden alınan örneklerin %24 oranında *A. m. carnica* mtDNA haplotipi ile uyumlu bulunduğunu bildirmişlerdir.

Güler ve Kaftanoğlu (1999a,b), Orta Anadolu Bölgesi (Beypazarı), Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi (Posof) Trakya Bölgesi (Saray), Marmara Bölgesi (Gökçeada) ve Akdeniz Bölgesinde (Erdemli) yaygın yetiştiriciliği yapılan önemli bal arısı (*A. mellifera* L.) genotiplerinin morfolojik yapılarını yaptıkları çalışmalar ile incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda genotiplerde 41 morfolojik karakterin biyometrik ölçümlerini yapmışlar ve çalışma sonucunda morfolojik yapı itibarı ile genotiplerin ayrı karakterlere sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Smith (2002), Trakya bölgesindeki bal arılarının Anadolu'daki bal arılarından daha farklı olduğunu, Trakya bölgesindeki bazı arıların Avusturya, Slovenya ve Hırvatistan'da yayılım alanı bulan *A.m. carnica* arıları ile benzer morfolojik ve genetik özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir. Buna göre Trakya, Balkan ve Avusturya arıları arasında bir melezleme olabileceğini, bu yüzden Trakya arılarının Balkan ve Anadolu arıları arasında bir köprü konumunda olabileceğini bildirmiştir.

Trakya'daki bal arısı popülasyonu için Anadolu'nun *carnica* grubuna yakın coğrafi bir ekotipi olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç Ruttner (1988a)'ın bildirişleri, Güler ve Kaftanoğlu (1999a)'nın bulguları ve Doğaroğlu (2007)'nin ve Giray (2007)'in sözlü ifadeleri ile de uyduğu bilinmektedir. Giray (2007), Kırklareli ekotipinin korunması ile ilgili yapılan toplantıda Kırklareli ekotipinin Avusturya *A. m. carnica*'sından daha üstün Trakya'ya özgü bir ekotip olduğunu bildirmiştir.

Güler vd. (2010), Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinden 60 adet Kafkas ve Trakya Bölgesinden 8 adet Trakya genotipi ile Almanya'dan bir özel yetiştirici tarafından getirilmiş 7 adet Karniyol ırkı ana arının kazandırıldığı kolonilerden olmak üzere toplam 75 işçi arı örneğinde standart olarak kabul edilen kanat damar (A4, B4, D7, E9, G18, J10, J16, K19, L13, N23, O26) açıları ile ön kanat uzunluğu, genişliği ve cubital indeks karakterlerinin biyometrik ölçümlerini yapmışlardır. Uygulanan diskriminant analizi Stepwise yönteminde kanat A4 açısı, kanat uzunluğu ve cubital indeks karakterlerinin önemli ayırt edici karakterler oldukları ve genotip grupların ayrımını güvenle sağladıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda Trakya bölgesi arısı ile Karniyol ırkı örnekleri tamamen birbirinden farklı olsalar da bu iki arı genotipinin aynı kaynaktan geldiklerinin düşünüldüğünü bildirmişlerdir.

Kandemir vd (2000), Güneydoğu Anadolu ile Doğu Anadolu Bölgesi dahil çeşitli bölgelerde toplam 36 ilden temin ettikleri bal arılarında 10 adet morfolojik özellik incelemiştir. Diskriminant analizi sonuçlarına göre, Türkiye'nin 7 coğrafik bölgesinden alınan örneklerin 3 ana kümede toplandığını bildirmişlerdir. Mahalonobis uzaklıklarına göre; Trakya Bölgesinden ve Güneydoğu Anadolu'dan alınan örneklerin ayrı birimler olarak kaldığını, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgesi örneklerinin oldukça yakın bir küme oluşturduğunu, Ege ve Orta Anadolu Bölgesi arıları da Akdeniz Bölgesi örnekleri ile birlikte daha büyük bir küme oluşturduğunu bildirmiştir (Özbakır, 2011).

Güler vd (2010), Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinden 60 adet Kafkas ve Trakya Bölgesinden 8 adet, Trakya genotipi ile özel yetiştirici tarafından getirilmiş 7 adet Karniyol ırkı ana arının kazandırıldığı kolonilerden olmak üzere toplam 75 işçi arı örneğinde standart olarak kabul edilen kanat damar (A₄, B₄, D₇, E₉, G₁₈, J₁₀, J₁₆, K₁₉, L₁₃, N₂₃, O₂₆) açıları ile ön kanat uzunluğu, genişliği ve kübital indeks karakterlerinin biyometrik ölçümlerini yaptıklarını bildirmişlerdir. Uygulanan diskriminant analizi, Stepwise yönteminde kanat A₄ açısı, kanat uzunluğu ve kübital indeks karakterlerinin önemli ayırt edici karakterler oldukları ve genotip grupların ayrımını güvenle sağladıklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda Trakya bölgesi arısı ile Karniyol ırkı örnekleri tamamen birbirinden farklı olduğunu ve bu iki arı genotipinin aynı kaynaktan geldiğini düşündüklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden alınan bal arısı örneklerinde tRNA^{Leu}-Cox2 arası bölgede *DraI* restriksiyon enzimi ile COI geninde ise *TaqI* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri ile analiz yapıldığı ve tüm mitokondriyel genomun *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 3 farklı model elde edildiğini bildirmişlerdir. *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* için özgün olan mtDNA modeli % 97,9 oranında; Hatay yöresinden alınan örneklerde ise Afrika modeli %1,8 oranında bulduklarını bildirmişlerdir. Balıkesir'den alınan bir örnekte ise daha önce bildirilmemiş yeni bir model tespit edildiğini bildirmişlerdir. tRNA^{Leu}-Cox2 arası bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 7 haplotip elde edildiği ve Türkiye bal arısı popülasyonlarında Tr-*DraI* olarak tanımlanan haplotipin en yaygın bulunan haplotip olduğunu bildirmişlerdir (Kandemir vd., 2006)

Türkiye bal arısı popülasyonları mitokondriyel genomda sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge bakımından tanımlanmıştır. Türkiye'nin 20 farklı yöresinden toplam 244 adet işçi arı örneği materyal olarak kullanılmış ve bal arısı popülasyonlarının tanımlanmasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizi

yöntemlerinden yararlanılmıştır. COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 4 banttıan oluşan kesim modeli elde edilmiş ve Türkiye bal arılarında 5 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotipler DNA dizi analizi sonuçları ile kesin bir şekilde belirlenmiştir. Bunlardan üçü (47/41/64/420 bç-C1; 47/40/64/420 bç-C2 ve 47/39/64/420 bç) daha önceki çalışmalarda bildirilmiş, diğer ikisi ise (47/41/64/419 bç ve 47/39/64/418 bç) ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışılan tüm örneklerde *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu literatürde C genetik soyu için bildirilen ve 4 banttıan oluşan kesim model elde edilmiş ve bu sonuçla Türkiye bal arısı populasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz (C) genetik soyu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. (Özdil ve Yıldız, 2008).

Bir çok çalışmada Trakya Bölgesi bal arıları Türkiye’de yayılım gösteren diğer bal arısı ırk veya ekotipleri ile karşılaştırılırken tek bir grup olarak ele alınmıştır (Kaftanoğlu vd., 1993; Güler ve Kaftanoğlu, 1998; Kandemir, 1999; Kandemir vd., 2000; Çınar, 2006; Kekeçoğlu, 2007 ve Güler vd., 2010). Ancak bazı çalışma sonuçlarında tek bir grup olarak ele alınan Trakya Bölgesi bal arılarının diğer gruplardan ayrıldığı bildirilmiştir. Trakya Bölgesi bal arılarının morfometrik olarak genetik varyasyon gösterdiği görülmüştür.

Türkiye’nin yedi coğrafi bölgesinden 54 farklı ilden ve 2 Ege Ada’sından bal arısı örneği alınarak genetik yapıyı ve filogenetik ilişkileri saptamaya çalışan Kekeçoğlu vd. (2009) mtDNA’nın COI ve 16s rRNA bölgeleri üzerinde *SspI* restriksiyon enzimi kullanarak RFLP analizi yapmışlardır. COI geninin RFLP sonucuna göre 2 farklı mitotip belirlenmiş olup, bir mitotip yalnızca merkezi Anadolu olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları Yunanistan bal arıları ile yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılarak 16s rRNA/*DraI* varlığının sadece Türkiye bal arılarına özgü olduğu sonucu çıkarılmıştır. Komşu ülkelerin bal arılarının yerel populasyonların genetik yapılarını değiştirebileceğinden çalışmanın önemi bildirilmiştir.

Özdil vd. (2009a), Türkiye’nin 19 farklı yöresinden toplam 244 adet işçi arı örneği ile mitokondriyel genomda ribozomun büyük alt birimi (*IsrRNA/EcoRI*), sitokrom oksidaz b (*cyt b/BgIII*) genlerinde PCR-RFLP analizine göre kesim noktası olup olmadığını araştırdıkları çalışmada bildirmişlerdir. Ayrıca tRNA^{Leu}-Cox2 arası bölge, *DraI* kesim enzimi ile kesildiğini, RFLP analizi ve toplam 40 örnekte tRNA^{Leu}-Cox2 arası bölgede DNA dizi analizi yapıldığını, belirtilen lokuslardaki kesim bölgelerinin varlığına/yokluğuna bağlı olarak Türkiye bal arısı populasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmada DNA dizi analizi sonucunda toplam 11 haplotipin

belirlendiğini ve bu haplotiplerden 7'sinin ilk kez bu çalışma sonucunda tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Türkiye bal arısı populasyonları ve İran'dan örneklenen bal arısı populasyonlarında tRNA^{Leu}-Cox2 arası bölgede *Hinf*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda 2 farklı haplotip ya da enzim kesim modeli tespit edilmiştir. Bu farklı haplotipler CoxI-II/*Hinf*I-I (294, 260 ve 26 bç lik 2 kesim noktası) ve CoxI-II/*Hinf*I-II (294, 240, 26 ve 20 bç'lik 3 kesim noktası) olarak ifade etmişlerdir. Söz konusu çalışmada Bolu/Yığılca'dan alınan bir örnek, İran'dan Karaj, Ardebil, Tabriz ve Hamadan'dan alınan örneklerde ve *A. m. ligustica* ve Buckfast örneklerinde 294, 260, 26 bç lik kesim veren CoxI-II/*Hinf*I-I haplotipi elde edilirken, çalışılan diğer tüm Türkiye ve İran örneklerinde 294, 240, 26, ve 20 bç.lik CoxI-II/*Hinf*I-II haplotipi elde ettiklerini bildirmişlerdir (Özdil vd., 2009b).

Özkan, Çakmak, Nentchev ve Kandemir (2010), çalışmalarındaki MANOVA testi ve Pairwise testi sonuçlarına göre tüm guruplar arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Söz konusu çalışma, Yunanistan adalarından toplanan örnekler çıkarılarak yeniden yapıldığında Trakya grubu yine farklılık gösterirken, Bulgaristan ve Yunanistan gruplarının bir birinden farklı olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Tüm bu tartışmalar ve sonuçlara göre Trakya Bölgesi bal arılarındaki çalışmaların artırılarak bölge içi varyasyonun ve genetik yapıların (ırk ve ekotip) ortaya konması gerektiğini bildirmişlerdir.

Kekeçoğlu ve Soysal (2010), Türkiye'nin 56 farklı yöresinden topladıkları bal arısı örneklerinde 12 morfometrik özellik üzerinde yapmış oldukları istatistiksel analizler sonucunda farklı bölgelere göre yapılan UPGMA dendogramında arıların 4 ana grupta kümelendiğini (Trakya'da Karniyol; Kuzey Anadolu'da Kafkas; Güney ve Güney Anadolu'da İran ve Orta Anadolu'da Anadolu) bildirmişlerdir.

Yunan bal arılarının filogenetik ilişkilerini bulabilmek, gezgin yetiştiricilik ve ticari yetiştiriciliğin sonucu oluşan gen akışını tespit edebilmek amacıyla Martimianakis vd (2011), bal arılarının mtDNA'larının ND5 ve COI genleri üzerinde araştırma yapmışlardır. Kıbrıs, Yunanistan, Türkiye (Osmaniye, Bartın), İtalya, Bulgaristan, Slovenya ve Arnavutluğun çeşitli bölgelerindeki populasyonlardan alınan örneklerde yedi farklı haplotip COI genine bağlı, sekiz farklı haplotip ND5 genine bağlı olarak tespit edilmiştir.

Turan vd (2011), Trakya Bölgesindeki bal arılarını (*Apis mellifera* L.) geometrik morfometrik yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Bu amaçla erkek ve işçi arılardaki sağ ön kanat örnekleri il bazında (Edirne, Tekirdağ, Kırklareli ve İstanbul ile kontrol grubu olarak Kafkas ve Gökçeada) gruplandırılarak kullanılmıştır. Çalışmada diğer araştırmalardan farklı olarak erkek arı örnekleri de kullanılmıştır. İşçi arılarda yapılan MANOVA analizi sonucunda kontrol grubu Kafkas arısı (*A.m. caucasica*) ve Gökçeada arısı ile iller bazında bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı şekilde erkek bireylerde de, Çanakkale (G.Ada) ve Kafkas grubunun tüm gruplardan farklı olduğu, bununla birlikte Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli grupları arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Türkiye'nin 5 bölgesine (Kırklareli, Yığılca, Muğla, Hatay ve Artvin) ait 24 koloniden 237 işçi arı örneği incelenerek Türkiye'deki sabit ve gezgin bal arısı (*A. mellifera* L.) popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliği inceleyen Karakaş (2013), incelenen bal arılarının popülasyon yapısının korunduğunu göstermiştir.

Çakmak, (2014) Karadeniz Bölgesi'nden Trakya'ya uzanan kara şeridinde yayılış gösteren bal arısı popülasyonlarını ayırt etmek için yapılan bir çalışmada, örnekler Oberursel Veri Bankası'ndaki referans örneklerle karşılaştırılmış, Türkiye'nin Trakya'ya kadar uzanan kuzey kesiminde *Apis mellifera anatoliaca*'nın baskın alttür olduğunun doğrulandığı ifade edilmiştir. Doğu Karadeniz lokasyonlarında *Apis mellifera caucasica*'nın yaygın olduğu fakat bu alttürün Trakya'nın kuzeyine kadar dağınık halde bulunmasında arıcı faaliyetlerinin etkin olduğuna dikkat çekilmiştir. Çalışmada Trakya'nın güneyindeki arıların *Apis mellifera anatoliaca* olduğu, kuzeyindeki arıların ise karışık olmakla birlikte *Apis mellifera carnica* ile yakın ilişki gösterdiği bildirilmektedir.

Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nin 4 ili (Tekirdağ, Kırklareli, Edirne ve Çanakkale/Gelibolu) ve Gökçeada'dan örneklenen bal arılarında mitokondriyel DNA molekülü bakımından genetik yapının tanımlanması amacıyla 16S ve ND5 gen bölgeleri *DraI*, *MboII* ve *SwaI* restriksiyon enzimleri ile kesim ve DNA dizi analizi yöntemlerinden yararlanılarak araştırıldığı çalışmada Trakya Bölgesi bal arısı popülasyonlarında elde edilen haplotipler bildirilmiştir. Söz konusu bal arısı popülasyonlarının büyük bir kısmı benzer haplotipler olduğu ve az sayıda örnekte varyasyon tespit edildiği bildirilmiştir. Varyasyon bulunan örneklerin bir kısmının *A. m. caucasica* orijinli olabileceği ve bu durumun sebebi olarak bölgeye zaman

zaman yoğun bir şekilde Kafkas ana arısı getirilmesi ve gezginci arıcılığın neden olabileceği bildirilmiştir (Güder, 2017).

Kırklareli ili izole bölgesinde yetiştirilen bal arısı kolonilerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesi başlıklı çalışmada, izole bölgede yetiştiriciliği yapılan bal arılarının genetik çeşitliliği (ırk ve ekotip), geometrik morfometrik yöntemle ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, çalışmada kullanılan bal arısı örnekleri Kırklareli ili izole bölgesini temsil eden 9 bölgeden 45 farklı işletmeden temin edilmiştir. İşçi arıların sağ ön kanat örnekleri ilçe bazında gruplandırılmıştır. Yapılan MANOVA analizi sonucunda; gruplar arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur. P.Kurudere ile P.Merkez hariç ($P>0,05$), diğer tüm gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak oldukça önemli bulunmuştur ($P<0,001$). Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz bulgulara göre izole bölge arısının kontrol grubu olan Kafkas ve Gökçeada arısından ayrıldığı görülmüştür (Özsoy, 2017).

Tekirdağ, Kırklareli ve Yığılca bal arısı popülasyonları sağ ön kanat üzerinde belirlenen 20 karaktere göre karşılaştırıldığında A4, B4 ve AREA6 karakterlerinin popülasyonları ayırmada çok önemli ($p<0.01$) karakterler olduğu B3, G7, J10, K19, L13, Q21 ve CI karakterleri gruplar arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmakta önemlilik arz etmediği ($p>0.05$) sonucunu bildirmişlerdir (Gür vd.,2018).

Bir diğer araştırmada 2018'de arıcılık faaliyetlerindeki öneminden dolayı seçilen beş ilden (Artvin, Düzce, Hatay, Kırklareli ve Muğla) dört yaygın bal arısı ırkının (*Apis mellifera anatoliaca*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera syriaca*) genetik yapıları ve filogenetik analizleri otuz mikrosatellit lokusu kullanılarak güncellenmeye çalışılmıştır. Popülasyonlar arası genetik mesafe 0.30 ile 0.70 arasında değişmiştir. Genetik varyasyonlar, popülasyonlar arasında % 8.96, popülasyonlardaki bireyler arasında % 44.9 ve tüm bireyler arasında % 46.1 olarak hesaplanmıştır. Bal arısı ile ilgili daha fazla genetik araştırma, gelecekteki potansiyel sorunlardan kaçınmak için avantajlı olacağı vurgulanmıştır (Karabağ vd., 2020).

Puškadija vd (2020), *Apis mellifera carnica*'nın, Orta Avrupa'daki Batı bal arısının önemli bir alt türü olduğu ve Hırvatistan'ın büyük bir bölümünü temsil ettiğini bildirmişlerdir. Arıcılar tarafından denetlenmeyen ithalat nedeniyle hibridizasyonun olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, Hırvatistan ve Slovenya'nın arıcılar tarafından yönetilen bal arısı kolonilerinden örnekler alınarak; alt türlerin tanımlanması, kanat geometrik morfometrik özelliklerine dayanılarak çalışmalar yapılmıştır. İncelenen tüm kolonilerin *A. m. carnica* olduğunu sadece referans olarak kullanılan bazı örneklerin farklı sonuçlarda ölçüm gösterdiğini bildirmişlerdir. Buradan sonuçla incelenen bal arısı popülasyonlarının fenotipik karakterizasyonuna ve gelecekteki koruma stratejilerine yönelik talimatlara daha derin bir anlayış sağlayacağını bildirmişlerdir.

Muñoz ve De la Rúa (2021), çalışmalarında, maternal ve kodominant moleküler belirteçleri kullanarak genetik varyasyonları, farklılaşmaları ve karışımları hakkında daha fazla veri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Filocoğrafik analiz sonucunda, örneklenen coğrafi aralık boyunca mitokondriyal haplotiplerin belirgin dağılım gösterdiğini ve haplotip çeşitliliğinin bireysel seyrekleşme eğrilerinin, örnekleme *ligustica*, *carnica* ve *macedonica* setlerini temsil ettiğini, ancak *cecropia* setini temsil etmediğini, dolayısıyla bu setin yalnızca referans amaçlı kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu popülasyonların bazılarında yabancı haplotiplerin varlığı, melez popülasyonların yaratılması nedeniyle yerli bal arısı popülasyonlarının genetik bütünlüğü için ciddi bir tehdit oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada iki farklı mitokondriyal bölgenin dizilenmesiyle (COI ve ND5) *Apis* türlerinde filogenetik etkileşimleri tanımlamaya dayalı iki Asya ırkında (*A. cerana* ve *A. dorsata*) çalışılmıştır. COI gen bölgesi, Pakistan'daki Avrupa bal arısı (*A. mellifera*) türleri ve 20 (*A. cerana*), 18 (*A. dorsata*) ve 23 (*A. mellifera*) bal arısı türünde incelenmiş ve NCBI veri tabanından elde edilen diziler ile karşılaştırıldığında önemli genetik çeşitlilik ve sapma gösterdiği tespit edilmiştir. ND5 gen bölgesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, bal aralarında ayrıntılı genetik ve filogenetik çalışmalar için COI gen bölgesinden ziyade *Apis* cinsi içinde, ND5 gen bölgesinin türler arasındaki etkileşimleri gösterme bakımından daha önemli olduğu ortaya konulmuştur (Khan vd. 2021).

1.9 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.), yüksek adaptasyona sahip olmasından dolayı dünyanın her bölgesine yayıldığı ve bulunduğu bölgelerin ekolojik koşullarına adapte olmuş olduğu bilinmektedir. Çok sayıda coğrafik ırk, bu ırklar içerisinde farklılaşan ekotipleri oluşturmuştur. Adam (1983), Türkiye' nin, farklı iklimsel özelliklere sahip olmasından dolayı Afrika, Avrupa ve Asya arasında doğal olarak bir geçiş noktası konumunda bulunduğunu bu yüzden de birçok arı ırkını ve ekotipini içinde barındıran bir gen havuzu konumunda olduğunu bildirmiştir. Türlerin yayılmasında en önemli faktörün iklim olduğu bilinmektedir. Türkiye sadece doğal zenginlikleri açısından değil, bununla birlikte sahip olduğu arı gen kaynakları sebebiyle de arıcılıkta söz sahibi ülkeler arasında yer aldığı bilinmektedir. Soysal (2004), Türkiye'nin mevcut koşullarda arıcılık alanında hak ettiği yere ulaşabilmesi için en önemli avantajının sahip olduğu bu gen kaynakları olduğunu bildirmiştir. Bal arısı populasyonları bakımından Türkiye'nin sahip olduğu bu geniş genetik varyasyonun hem belirlenmesinde hem de korunmasında yapılacak ıslah çalışmalarının önemli olduğu bilinmektedir.

Moritz (1994), bal arılarını diğer organizmalardan ayıran üstün ve temel genetik çalışmalarında kullanılmasını faydalı kılan başlıca özellikler şu şekilde özetlemiştir:

- a) Tek kromozom yapısına sahip olmaları nedeniyle erkek arıların, haploidlerde gen ürünlerinin çalışılmasına olanak sağladığı,
- b) Davranışlarındaki çeşitliliği ve sosyal yapı bakımından bal arılarının davranış genetiği çalışmalarında başlıca kullanılabilceği,
- c) Embriyonik gelişimlerinin yavaş olması ve erken gelişim evrelerinde gen organizasyonlarının ve ürünlerinin çalışmalarına birçok olanak sunacağını bildirmiştir.

Son zamanlarda Türkiye'de göçer arıcılık yapanların sayısında artış görüldüğü bilinmektedir. Bu nedenden dolayı da oluşan kontrol edilemeyen genetik hibridizasyonlar ile bal arısı populasyonlarının birbirleri arasında gen akımı artmaktadır. Türkiye, bal arısı populasyonundaki bu geniş genetik varyasyon sayesinde, kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır. Türkiye'nin bu çok yönlü ekosistem ve habitat çeşitliliğinin beraberinde önemli bir tür çeşitliliğininde gelmiş olduğu bilinmektedir. Terzioğlu (1994), dünyanın ballı bitkiler florasının dörtte üçüne ve farklı iklim koşullarına sahip bir ülke konumunda olduğunu bildirmiştir.

Dünya üzerinde farklı coğrafyalarda dağılım gösteren 29 arı ırkının taksonomik sınıflandırılmasının yapıldığını bildirmişlerdir (Ruttner, 1988a; Güler, 2006). Bal arılarının % 100 düzeyde çevreye bağımlı olmaları, çevresel etmenler bu ırk ve ekotiplerin oluşumunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle gerek morfolojik gerekse fizyolojik tanımlama ve sınıflandırmada coğrafik bölge yapısının dikkate alınmasının bir gereklilik olduğunu bildirmişlerdir (Ruttner vd., 1978; Güler, 2006).

Ekonomik olarak üstün potansiyellere sahip karakterlerin veriminin artırılmasında uygulanacak ıslah yönteminin başarısı, populasyonun genetik yapısının iyi bilinmesine ve tanımlanmasına bağlıdır. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda populasyonların genetik özelliklerinin daha iyi tanımlanmasına yönelik teknikler geliştirilmiştir. Bunlar bilindiği üzere populasyondaki kalıtsal varyasyonun ortaya çıkarılmasına olanak sağlayan “Elektroforetik” yöntemler olmuştur. Bal arılarının gen kaynaklarının korunması ve ilerleyen süreçlerde de ekonomik üretimlerinin sürdürülebilmesindeki en önemli aşama, arı ırklarının önce morfometrik ardından genetik yapılarının çeşitli boyutlarda tanımlanması olmuştur. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknolojisinin de geliştirilmesiyle birlikte farklı marker yöntemlerinden faydalanılarak bal arısı populasyonlarının orijinlerinin ve filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, tanımlanması gibi birçok konuda oldukça yararlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu tip marker teknikleri ile yapılan araştırmalar morfolojik çalışmalarla da desteklenerek daha doğru sonuçların elde edilmesinin sağlandığını bildirmişlerdir (Moritz vd. 1986, Cornuet ve Garnery, 1991, Hall ve Smith, 1991, Garnery vd. 1991, 1992, 1995, Arias ve Sheppard, 1996, Smith vd. 1997, Franck vd. 1998, 2000a, 2000b, Palmer vd. 2000, De La Rua vd. 2001, 2009, Özdil vd 2007, 2009, 2011).

Yörelere özgü gen kaynaklarının saklanması ve tanımlanması çok önemlidir. Bu açıdan gen kaynaklarının korunmasında, koruma altına alınacak gen kaynaklarının hepsinin belirli bir süre olmaksızın elde tutulmasındaki bazı zorluklar koruma altına almada öncelik verilecek ırkların genetik yapılarının ve ırklar arasındaki genetik ilişkilerin ortaya konulmasını zorunlu hale getirmektedir. Bir ırkın belirlenmesi ve tanımlanmasında morfolojik özelliklere, kan gruplarına ve biyokimyasal genetik polimorfizmlere ek olarak, son yıllarda çekirdek (nükleer) DNA (nDNA) ve mitokondriyel DNA (mtDNA) yapılarındaki farklılıkları doğrudan hedef alan güncel yöntemlerin de yaygın olarak kullanılmaya başlandığını bildirmişlerdir (Whitfield vd., 2006; Özdil 2007; De la Rua, Jaffé, Dall’Olio, Muñoz, Serrano, 2009).

Türkiye'nin bal arısı popülasyonlarının morfolojik ve ekolojik temellere dayanarak birbirinden farklılık gösterdiği bu coğrafya düşünüldüğünde, bazı araştırmacılar Anadolu (*A. m. anatoliaca*), Kafkas (*A. m. caucasica*), İran (*A. m. meda*) ve Hatay arı ırklarının var olduğunu bildirmişler, Trakya bölgesinde ise beşinci alt türün varlığını yapılan morfolojik ve genetik marker çalışmaları sonucunda bildirmişlerdir (Smith, Slaymaker, Palmer ve Kaftanoğlu, 1997; Palmer, Smith, Kaftanoğlu, 2000; Kandemir, Kence, Sheppard,2006).

Bu tez çalışmasında, Kırklareli ilindeki bal arılarının genetik yapısını belirlemek amacıyla COI ve ND5 genlerinde olası mtDNA varyasyonları tespit edilecek ve genetik markerler belirlenmeye çalışılacaktır. COI geninde *NcoI*, *SspI* ve *StyI* kesim enzimleri ile ND5 geninde ise *AluI*, *FokI* ve *HincII* kesim enzimleri ile çalışılacak ve olası kesim noktaları belirlenecektir. Elde edilen kesim profillerinden yararlanılarak referans olarak ele alınan *A.m. anatoliaca*, *A.m. carnica* ve *A.m. caucasica* örnekleri arasında genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya konulacaktır. Bu sayede Kırklareli arısına özgü PCR-RFLP markerleri tespit edilecektir. Bu tip markerlerin tespit edilmesi durumunda ileriki çalışmalarda Kırklareli arısının tanımlanması ve tescil çalışmalarında bu markerlerden yararlanmak mümkün olabilecektir.

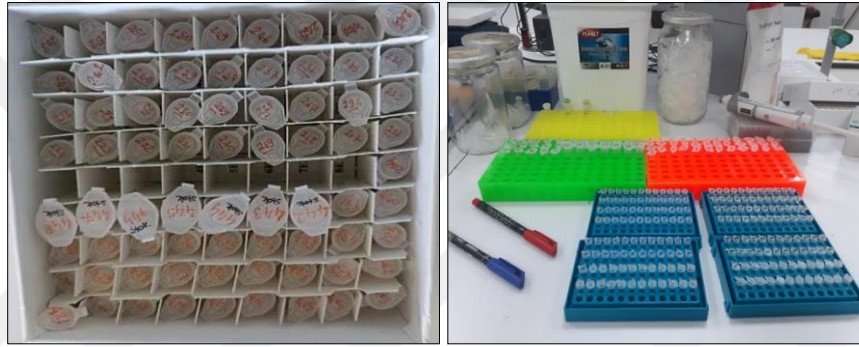
2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Örnek alınan bölgeler

Yapılan bu tez çalışmasında, tez danışmanının yürütücülüğünde tamamlanmış olan Tübitak 3001 Projesi (TOVAG-1140883) kapsamında Kırklareli ilinden alınmış olan bal arısı örneklerinden izolasyonu yapılan DNA'lar materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 2.1).

Trakya bölgesini temsil edecek bal arısı populasyonlarından örneklenen Kırklareli ve Tekirdağ olmak üzere toplamda 117 adet bal arısı mtDNA'sı ile çalışılmıştır (Çizelge 2.1, Şekil 2.2).

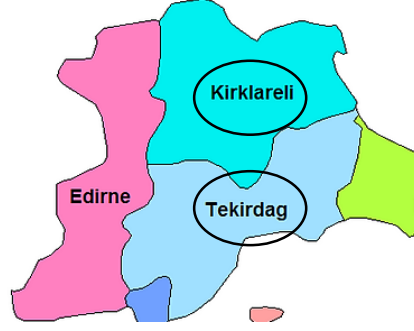


Şekil 2.1. Proje örneklerinden bir kısmının görüntüsü

Çizelge 2.1. Bal arısı örneklerinin alındığı bölgeler ve örnek sayısı

Örnek Alınan Bölgeler	Çalışılan Örnek Sayısı (n)
Kırklareli	107
Tekirdağ	10
Toplam	117

Örnek alınan bölgelerde her bir populasyonda o bölgeyi maksimum düzeyde temsil eden örneklerin alınmasına özen gösterildiği bilinmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Örnek alınan yerlerin harita üzerinde gösterilmesi

2.1.2 Kullanılan araçlar ve gereçler

PCR, RFLP ve Elektroforez çalışmaları esnasında kullanılan araçların ve gereçlerin listesi, aşağıdaki Çizelge 2.2’ de kullanım amaçları ve cihaz markaları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan araçlar ve gereçler

Cihaz Adı	Kullanım Amacı
Saf Su Cihazı	Tampon çözeltilerin hazırlanması
pH metre (HANNA)	Tampon çözeltiler için gerekli pH’ ı belirlemek
Manyetik Karıştırıcı (Biosan)	Çözelti hazırlanması
Vortex (Biosan V-1 plus)	Çözelti hazırlanması
Santrifüj (Minispın plus)	Örneklerin ve kullanılan kimyasalların çöktürülmesi
Manuel Hassas Terazî Dijital Hassas Terazî	Tampon çözeltilerin hazırlanması aşamasında sarf malzemelerinin tartılması
PCR Cihazı	Çalışılan gen bölgesinin çoğaltılması
Jel Elektroforez Takımları (Wealtec-Elit 300 Plus, Clever NanoPAC-300)	PCR ürünlerinin, restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant modellerinin belirlenmesi
Güç Kaynakları (Wealtec, Clever)	Elektroforez sistemine elektrik ortamının sağlanması

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan araçlar ve gereçler (devamı)

Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Quantum)	Elektroforez sonucu elde edilen bantların görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Mikro Dalga Fırını (Beko)	Elektroforez için agaroz jellerin hazırlanması
Derin Dondurucu (Vestel)	Örneklerin ve çeşitli sarf malzemelerin saklanması
Çeker Ocak 22 (TEZ-SAN Uzay Serisi)	Çeşitli zararlı tampon çözeltilerin hazırlanması
Otoklav (Hirayama)	Kullanılan tüm malzemelerin sterilizasyon aşaması

2.1.3 Tampon çözeltiler

Çalışmada yapılan PCR-RFLP analizleri sonrasında elde edilen ürünlerin kontrolünü sağlamak amacıyla yapılan elektroforez işlemleri ve agaroz jelin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltiler Çizelge 2.3' te ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 2.3. Elektroforez işlemlerinin ve agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltilerin bileşimleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
10X TBE	108.0 g	Tris
Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi	55.0 g 40.0 ml 1 litreye tamamlanır.	Borik Asit 0.5 M EDTA (pH 8,0) Deiyonize bdH2O
1X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi	100 ml 1 litreye tamamlanır.	10 X TBE Deiyonize bdH2O

2.2 Metod

2.2.1 Genomik DNA örneklerinin seçimi

Genomik DNA izolasyonu, daha önce Tübitak 3001 Projesi (TOVAG-114O883) numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. DNA miktar ve kaliteleri %1'lik agaroz jellerinde kontrol edilmiştir. DNA miktar ve kalitesi iyi olan örnekler seçilmiş ve bu tez çalışmasında materyal olarak kullanılmıştır.

2.2.2 PCR optimizasyonu

DNA örneklerinin saflıkları agaroz jelde kontrol edildikten sonra hedeflenen mitokondriyel bölgelerin çoğaltılması için PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA molekülleri tekrar PCR işlemi yapılincaya kadar +4 °C' de muhafaza edilmiştir. Uzun süreli beklemelelerde derin dondurucuda saklamak daha güvenilirdir.

2.2.2.1 PCR Protokolü Seçimi

COI ve ND5 genini çoğaltmak amacıyla iki farklı içerikte PCR protokolü denenmiştir. Farklı dNTP konsantrasyonlarında iki farklı denemeden ikinci protokolün uygun olduğuna karar verilmiştir. Daha sonraki PCR işlemlerinde ikinci protokol ile devam edilmiştir.

Çalışmada yapılan analizler Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi/Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. COI-ND5 PCR Optimizasyonu

PCR Reaksiyonu	Mix 1	Mix 2
DNA	1,0 µL	1,0 µL
10X PCR Buffer (MgCl ₂)	1,0 µL	1,0 µL
DNTPler	2,0 mM	0,2 mM
İleri Primer (F)	0,5 mM	0,5 mM
Geri Primer (R)	0,5 mM	0,5 mM
Taq polimeraz	0,1 µL	0,1 µL
dH ₂ O	4,9 µL	6,7 µL
Toplam	10 µL	10 µL

Gen bölgesini çoğaltmak amacıyla PCR karışımı, termal cyclus cihazına (ABI, Applied Biosystems, Thermo Fisher) yerleştirilmiştir. PCR için gerekli sıcaklık döngüleri Çizelge 2.8' de verilmiştir.

2.2.3 Çalışılan mitokondriyel DNA PCR-RFLP gen bölgeleri

PCR protokolü seçimini takiben hedeflenen mitokondriyel DNA COI (2095-3123 nükleotid dizisi arasında) ve ND5 (7381-8161 nükleotid dizisi arasında) bölgelerinin çoğaltılması amacıyla PCR işlemi yapılmıştır. Şekil 3.3’de nükleotid dizisi verilen COI; *NcoI*, *SspI*, *StyI* ve Şekil 3.4’ te nükleotid dizisi verilen ND5; *AluI*, *FokI*, *HincII* spesifik primerler ile PCR cihazında çoğaltılarak restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. mtDNA, PCR-RFLP analizi sırasında kullanılan primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynaklar Çizelge 2.5’ da verilmiştir.

Çizelge 2.5. PCR-RFLP sırasında kullanılan primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynak

Mitokondriyel DNA Bölgesi	Primerler (5'→3')	Enzimler	Kaynaklar
COI (1028 bç)		<i>NcoI</i>	Bouga vd., 2005
COI-*F	GATTACTTCCTCCCTCATTA	<i>SspI</i>	Stevanoviç vd., 2010
COI-*R	AATCTGGATAGTCTGAATAA	<i>SytI</i>	Meixner vd., 2013
ND5 (822bç)		<i>AluI</i>	Bouga vd., 2005
ND5-*F	TCGAAATGAATAGGATACAG	<i>FokI-BtsCI</i>	Ivanova vd., 2020
ND5-*R	GGTTGAGATGGTTTAGGATT	<i>HincII</i>	Meixner vd., 2013

*F, ileri primer; *R, geri primer

Çalışmaya başlamadan önce literatür araştırması yapılırken çoğaltılacak gen bölgesine özgü primerlerin Nielsen vd. (1994; 1999) tarafından dizayn edildiği yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür. Primerlerin nükleotit dizilimi Çizelge 2.5’ da ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Çalışılan primerler ticari olarak bir firmadan sipariş edilerek PCR analizi için kullanılabilir hale getirilmiştir.

Bu gen bölgeleri kendilerine özgü primerler yardımı ile PCR cihazında çoğaltılmıştır ve aşağıda belirtilmiş olan restriksiyon enzimleri ile kesilerek analize devam edilmiştir (Çizelge 2.6).

Forward Primer

GATTACTTCCTCCCTCATTATTTATACTTTTATTAAGAAATTTATTTTATCCAAGACCAGGAAGCTG
GATGAACAGTATATCCACCATTATCAGCATATTTATATCATTCTTCACCTTCAGTAGATTTTGCA
ATTTTTCTCTTCATATATCAGGAATTTCTCAATTATAGGATCATTAACTTAATAGTTACAATT
ATAATAATAAAAAATTTTTCTATAAATTATGACCAAATTCATTATTTCCATGATCAGTTTTTATT
ACAGCAATTTTATTAATTATATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCAATTACTATACTATTATTTGAT
CGAAATTTTAATACATCATTTTTTCGATCCTATAGGAGGTGGAGATCCAATTCTTTATCAACATTT
ATTTTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCTGGATTGGATTAATCTCTCA
TATTGTAATAAATGAAAGAGGAAAAAAGAAATTTTTGGTAATTTAAGAATAATTTATGCAATA
TTAGGAATTGGATTTCTAGGTTTTATTGTTTGAGCACATCACATATTTACAGTCGGATTAGATGT
TGATACTCGAGCATATTTACTTCAGCAACAATAATCATTGCTGTACCAACAGGAATTAAGTTT
TTAGATGATTAGCAACTTATCATGGTTCAAAATTAATAATTTCAATTTTATGATCACTA
GGTTTTATTATACTATTTACTATTGGTGGATTAACAGGAATTATATTATCAAATTTCTTCTATTGAT
ATTATTCTTCATGATACATATTACGTTGTTGGACATTTTCATTATGTTCTTTCAATAGGTGCAGTA
TTTGCAATTTTCAAGATTTATTCATTGATATCCATTAATTACTGGATTATTATTAATATTTAAA
TGATTAATAAATCAATTTATTATAATTTTATTGGAGTAAATCTAACTTTCTTTCCTCAACATTTT
TTAGGACTAATATCTATACCACGACGTTATTCAGACTATCCAGATT

Reverse Primer

Şekil 2.3. mtDNA COI gen bölgesi nükleotid dizisi

Forward Primer

TCGAAATGAATAGGATACAGTAAAAATTGTACCAATAATTAATTAATTATTGAAAAATAATTA
TTTTTCTAAAAAAAATATTTCAATAATTAATCTTTTGAATAATAACCAACTAAAAAAGAAAA
CCACATAATCTTAAAATTGAAAAATTAATAATTTCTTTTTATTGGATAAATATAAATATACCA
TAATATATTCGAATATCTTGATTACTATATATATAATGTATATACCTACCAACAATATAAACATT
AATGATTTAAATATTGCATGAATAAATAAATGTAAAAATACTAATTCAGTTAACCAATTGATAA
TATTCTTATTATAAATCCTAATTGTCTTAAAGTAGAATAAGCAACAACCTTTTTAAATCTAATTCA
AAATTTGCAACTAAACCAGCAAATAATATTGTTAATCTAGCAATCATATAATATAATTTTTATAA
TTAAAATCTAATAAATTTACATATCGAATTAATAAATAAATTCAGCAGTAACTAAAGTTGATGA
ATGAACTAAAGATGAAACAGGAGTTGGAGCTATTATTGCTTTGGTAATCAAGTTGAAAAAGAAT
TTGTGCTCTTTTAGTAAAAGCTATCAATAAAATATAAACATTATAAATTCATTTATTTTATAAAA
ACTTAAATTCATCTTCATAATATGTTATTAATCCATAATTAATAATAAACCAATATCTCCTAAT
CGATTTAATAAAATAGTAACTATACCTGAAGAATGATTTTATTTTTATATAATAAATTACAAGAC
AATAAGAAATTAAATCCTAAACCATCTCACC

Reverse Primer

Şekil 2.4. mtDNA ND5 gen bölgesi nükleotid dizisi

Mitokondriyel DNA, PCR-RFLP çalışmasında kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve bu enzimlerin saflaştırıldıkları organizmalar ve kendilerine özgü tanıma dizileri Çizelge 2.6' da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Kullanılan restriksiyon enzimleri, saflaştırıldıkları organizmalar ve kesim yaptıkları özgün tanıma dizileri

Enzim	Saflaştırıldığı organizma	Özgün tanıma dizisi (5' → 3')
NcoI	<i>Nocardia corallina</i>	5'...C ↓CATGG...3' 3'...GGTAC ↑C...5'
SspI	<i>Sphaerotilus species</i>	5'...AAT ↓ATT...3' 3'...TTA ↑TAA...5'
StyI	<i>Salmonella typhi</i>	5'...C ↓CWGG...3' 3'...GGWC ↑C...5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'...AG ↓CT...3' 3'...TC↑GA...5'
BtsCI-FokI	<i>Bacillus thermosphaericus</i>	5'...GGATGNN ↓...3' 3'...CCTAC ↑NN...5'
HincII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...A ↓AGCTT...3' 3'...TTCGA ↑A...5'

2.2.4 Mitokondriyel DNA COI ve ND5 bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

İstenilen mitokondriyel DNA, COI ve ND5 bölgelerinin çoğaltılması için öncelikle PCR işlemi ile yapılmıştır. COI ve ND5 gen bölgesini çoğaltacak olan primerler, NCBI GenBankası veritabanında bulunan bal arısı tüm genom referans dizisi (Erişim No: NC-001566) kaynak alınarak tasarlanmıştır. Bu gen bölgeleri kendilerine özgü primerler yardımıyla PCR cihazında çoğaltıldı ve son aşamada restriksiyon enzimleri ile kesilerek analiz edilmiştir (Çizelge 2.6).

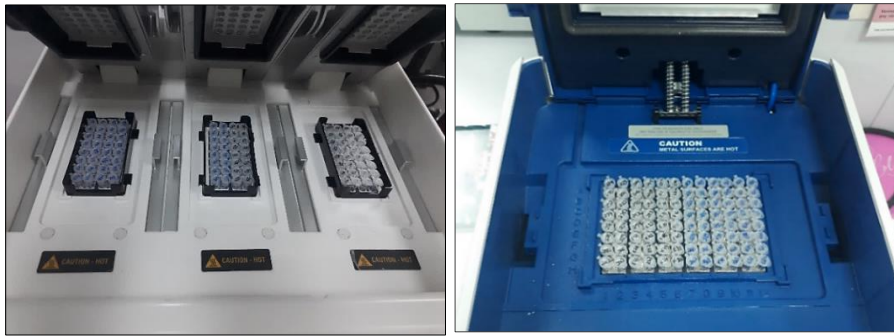
mtDNA COI ve ND5 lokuslarının çoğaltılması sırasında kullanılan PCR reaksiyonu ve son konsantrasyonlar ve kullanılan miktarlar Çizelge 2.7' de, sıcaklık ve döngüleride Çizelge 2.8'de verilmiştir. Gen bölgelerine ait ileri ve geri primerler ile dizi üzerinde gösterilmiştir (Şekil 2.3) (Şekil 2.4).

Çizelge 2.7. PCR reaksiyonu, konsantrasyonları ve kullanılan miktarlar

PCR Reaksiyonu	Son konsantrasyon	Kullanılan miktar (μL)	
		COI	ND5
DNA	20 ng	4 μL	4 μL
10X PCR Buffer	1X	4 μL	4 μL
dNTPler (10 Mm)	2 mM	0,8 μL	0,8 μL
İleriPrimer(10mM)	0,5 mM	2 μL	2 μL
GeriPrimer(10mM)	0,5 mM	2 μL	2 μL
Taq polimeraz	2 U	0,4 μL	0,4 μL
dH ₂ O	-	26,8 μL	26,8 μL

PCR reaksiyonu toplam hacim 40 μL olacak şekilde laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir.

Çalışılan reaksiyonun bileşenleri ve kullanılmış olan miktarlar, kalıp DNA her örnek için aynı olduğundan iki gen bölgesi aynı çizelgede verilmiştir (Çizelge 2.7). Öncelikle örnek sayımız kadar tüplere H₂O, 10X Tampon Buffer, dNTP, Primerler ve Taq-polimeraz içeren bir reaksiyon karışımı 40 örnek için öncelikle hesaplanarak hazırlanmıştır. Bu reaksiyon karışımı endorf tüpü içerisinde karıştırıldıktan sonra hazırlanan mix PCR tüplerine eşit olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonraki aşamada her örneğin kendi DNA'larından da eklenerek toplam hacim 40 mikrolitre olacak şekilde tamamlanmıştır. Buharlaştırma payı düşünülerek reaksiyon bileşenlerinin miktarları hesaplanırken miktarlar fazlaca hesaplanmıştır. PCR tüpleri, kapakları kapatıldıktan sonra Çizelge 2.8 'deki PCR şartlarına göre otomatik olarak ayarlanmış olan PCR cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 2.5).



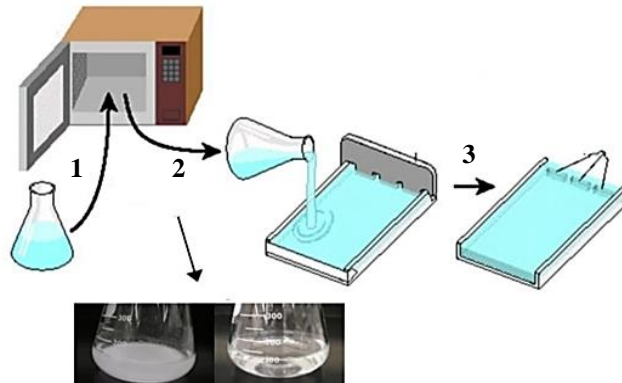
Şekil 2.5. Örneklerin PCR cihazında görüntüleri

Çizelge 2.8. PCR sıcaklık ve döngüler

PCR programları	COI geni		ND5 geni	
Ön denatürasyon	94 °C → 5 dk		94 °C → 5 dk	
Denatürasyon	94 °C → 1 dk		94 °C → 1 dk	
Bağlanma	55 °C → 1,5 dk	35 döngü	55 °C → 1,5 dk	35 döngü
Uzama	72 °C → 2 dk		72 °C → 2 dk	
Son uzama	72 °C → 15 dk		72 °C → 15 dk	

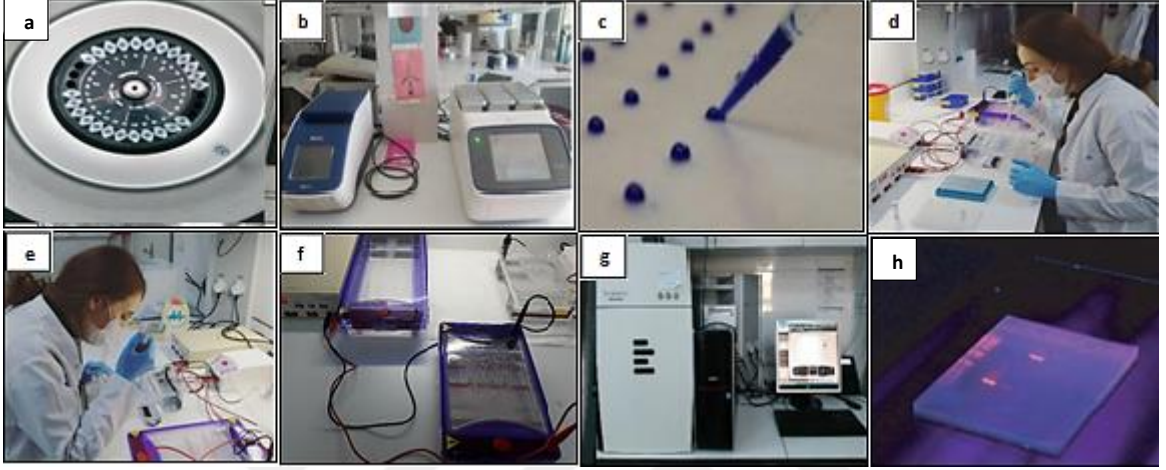
2.2.5 Sonuçların agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi

PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Çizelge 2.3'te agaroz jel hazırlamak için gerekli olan çözelti bileşimleri verilmiştir. % 2'lik agaroz jel hazırlamak için; hassas terazide erlen içerisinde 2 g agaroz tartılıp daha sonra 100 mL 1X TBE tampon çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmış (1), 3-5 dk mikrodalga fırında çözelti homojen görünüm alana kadar ısı uygulanmıştır. Ardından hafifçe çalkalanarak 50-60 °C'ye kadar soğutulan çözelti içerisinde 2.5 µL RedSafe boya çözeltisi (Nucleic Acid Staining Solution) ilave edilmiştir. Bu çözelti taraklı jel tablasına yavaşça dökülmüş (2), jel yatağına uygun tarak takılıp jelin donması beklenmiştir. Tabladan tarak çıkartılarak jel, 1X TBE jel tampon çözeltisi ile bulunan yatay elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir (3)(Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Agaroz jel elektroforezinin uygulama aşamaları

PCR ürünleri parafilm üzerinde yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılmış ve kuyulara yüklenip yaklaşık 100V' da 1.0-1.5 saat beklenerek elektroforez işlemleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra UV görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat Quantum) örneklerin genotipleri belirlenerek fotoğrafları çekilmiştir. PCR işlemi 3 saat sürmüştür ve süre sonunda PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntülendikten sonra istenildiği zaman kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.7. Analizlere ait görseller

a) Santrifüj cihazının görünüşü b) PCR cihazlarında DNA amplifikasyonları c) Örneklerin parafilm üzerinde yükleme boyası ile karıştırılması d) Örneklerin yükleme hazırlığı e) Örneklerin jele yüklenmesi f) Elektroforez g) Kullanılan görüntüleme cihazı h) Jelin görüntüleme cihazındaki görüntüsü

2.2.6 Mitokondriyel DNA COI bölgesinin *NcoI*, *SspI*, *StyI* ve ND5 bölgesinin *AluI*, *FokI*, *HincII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

COI gen bölgesinin mitokondriyel genomda 1028 baz çifti uzunluğunda olduğu ve ND5 gen bölgesinin 822 baz çifti uzunluğunda olduğu bilinmektedir. Bu gen bölgelerinde polimorfizm tespit etmek amacıyla *NcoI*, *SspI*, *StyI*, *AluI*, *FokI*, *HincII* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Bu gen bölgeleri kendilerine özgü primerler yardımıyla öncelikle PCR cihazında çoğaltılmıştır ve Çizelge 2.9’da verilen bileşenler kullanılarak restriksiyon enzimleri ile daha önceden hazırlanmış protokole uygun şekilde PCR ürünlerinin analizi yapılmıştır. Kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve parça büyüklükleri Çizelge 2.11.’de verilmiştir.

Çizelge 2.9. COI ve ND5 bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu

PCR Ürünü	10 µL	37°C de 1-16 saat inkübe edilmiş ve ardından 65 °C de
Enzim	0,5 µL	20 dakika inaktive edilmiştir.
Buffer	2 µL	
dH2O	18 µL	BtsCI 55 °C de 16 saat inkübe edilmiş ve ardından 80 °C de 20 dakika inaktive edilmiştir.

DNA üzerinde kesim enzimlerinin etkinliğini gösterebilmesi için sıcaklık, pH, reaksiyon tamponu gibi bazı uygun koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu koşullar farklı restriksiyon enzimlerinde değişkenlik göstermektedir.

Uygun reaksiyon koşulları sağlandığında 1µg DNA’nın tamamen kesilmesini gerçekleştiren miktar “bir ünite” olarak tanımlanır (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.10. Restriksiyon enzimlerinin konsantrasyonları (U/ml)

Restriksiyon enzimleri	Stok konsantrasyonları (U/ml)
<i>NcoI</i> , <i>SspI</i> , <i>FokI</i> , <i>HincII</i>	500
<i>StyI</i>	2500
<i>AluI</i>	600

Bu çalışmada PCR ile çoğaltılmış DNA parçalarında COI geni 3 farklı enzimle (*NcoI*, *SspI*, *StyI*); ND5 geni 3 farklı enzimle (*HincII*, *AluI*, *FokI*) kesilmiştir.

Çizelge 2.11. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve fragment büyüklükleri

Enzim	COI lokusunda kesim sonucu elde edilen fragmentler (bç)	ND5 lokusunda kesim sonucu elde edilen fragmentler (bç)
<i>NcoI</i>	246, 782,1028	-
<i>SspI</i>	523, 213, 175, 85, 32	-
<i>StyI</i>	400, 628, 1028	-
<i>AluI</i>	-	554, 211, 57
<i>BtsCI-FokI</i>	-	1028
<i>HincII</i>	-	1028

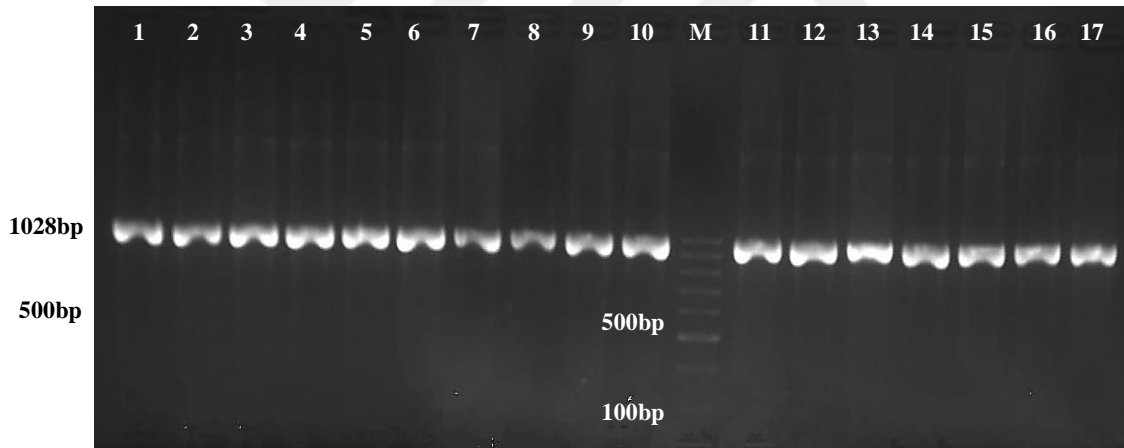
Kesim sonrasında elde edilen ürünler % 2.5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel yukarıda 2.2.5' de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir ve 110 V' da 1,5 saat yürütülmüştür. Kesim ürünlerinin agaroz jelde yürümesi sonucu sonra jeller UV görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Quantum) görüntülenmiştir. Çalışılan örneklere ait kesim profilleri ve elde edilen bant büyüklükleri tespit edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu araştırmada COI ve ND5 genlerinde olası mtDNA varyasyonları tespit edilmeye ve genetik markerler belirlenmeye çalışılmıştır. COI geninde *NcoI*, *SspI* ve *StyI* kesim enzimleri ile ND5 geninde ise *AluI*, *FokI* ve *HincII* kesim enzimleri ile çalışılmış ve olası kesim noktaları aşağıda verilmiştir.

3.1 COI Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması

İleri 5' GATTACTTCCTCCCTCATTA 3' ve Geri 5' AATCTGGATAGTCTGAATAA 3' primerler kullanılarak (Şekil 2.3) COI bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır ve 1028 bp' lik PCR ürünü elde edilmiştir (Sekil 3. 1) . Elde edilen bu PCR ürünleri % 1' lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. PCR analizi sonucunda bütün örneklerde 1028 bp uzunluğunda tek bir bant meydana gelmiştir. COI gen bölgesinin PCR işleminde kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri Çizelge 2.5 ve 2.6'da verilmiştir.

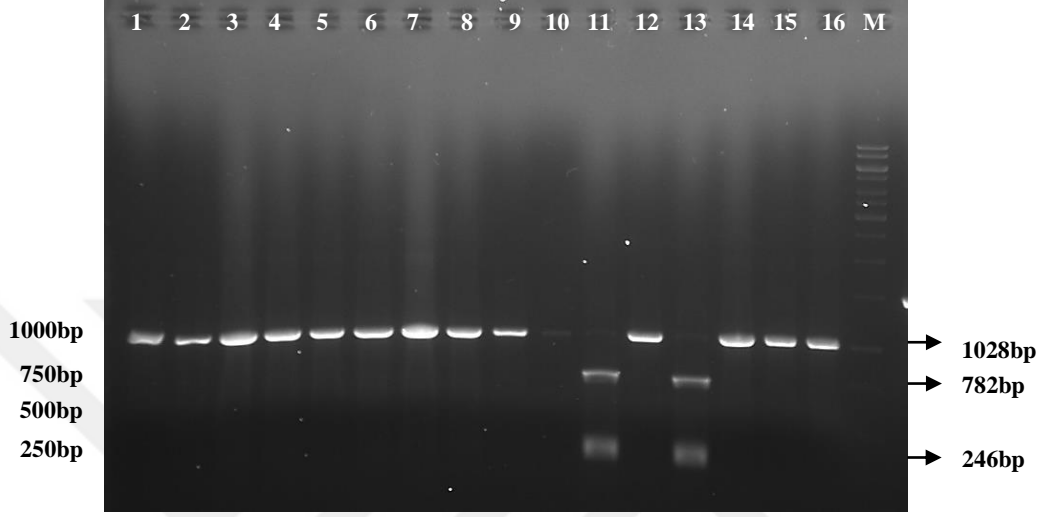


Şekil 3.1. COI gen bölgesi PCR ürünleri, 1-17 örnekler (1028 bp), M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

3.1.1 COI gen bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesilmesi

COI gen bölgesinde kesim amacıyla *NcoI* (ER0571 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Çalışılan bal arısı popülasyonlarında COI gen bölgesinin 1028 bp'lik bölümü PCR' da çoğaltılmıştır ve ardından *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. *NcoI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda 2345. pozisyonda meydana gelen mutasyon sonucu (G→A transizyonu) yeni bir kesim noktası oluşturmuştur ve CCATGG şeklinde olan DNA dizisi CCATGA olarak yeni bir *NcoI* kesim noktası olduğu bulunmuştur.

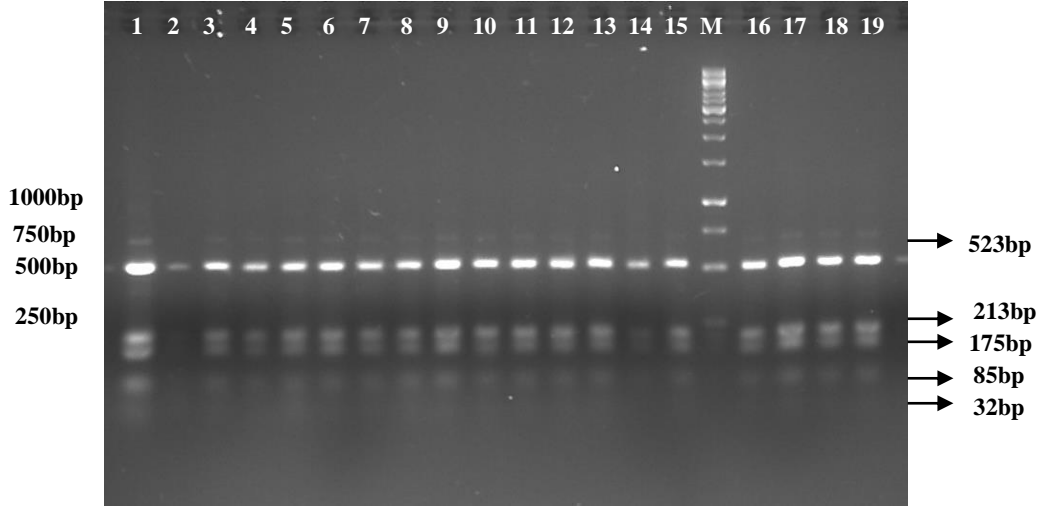
İlk defa bulunan bu kesim sonucu jelde 246 ve 782 bç' lik 2 banttan oluşan kesim profili elde edilmiştir. Bu profil literatürde bildirilen haplotiplere ilave olarak C haplotipi olarak belirlenmiştir. Çalışılan örneklerin 2' sinde Tekirdağ yöresine ait 12 tanesinde ise Kırklareli popülasyonuna ait bu şekilde kesim tespit edilmiştir. Diğer örneklerin tamamında kesim olmamıştır ve 1028 bç'lik B haplotipi bulunmuştur.



Şekil 3.2. COI gen bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesimi, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, PCR ürünü: B tip (1028 bp), 11. ve 13. örnekler: C tip (246 bp-782 bp), M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

3.1.2 COI gen bölgesinin *SspI* enzimi ile kesilmesi

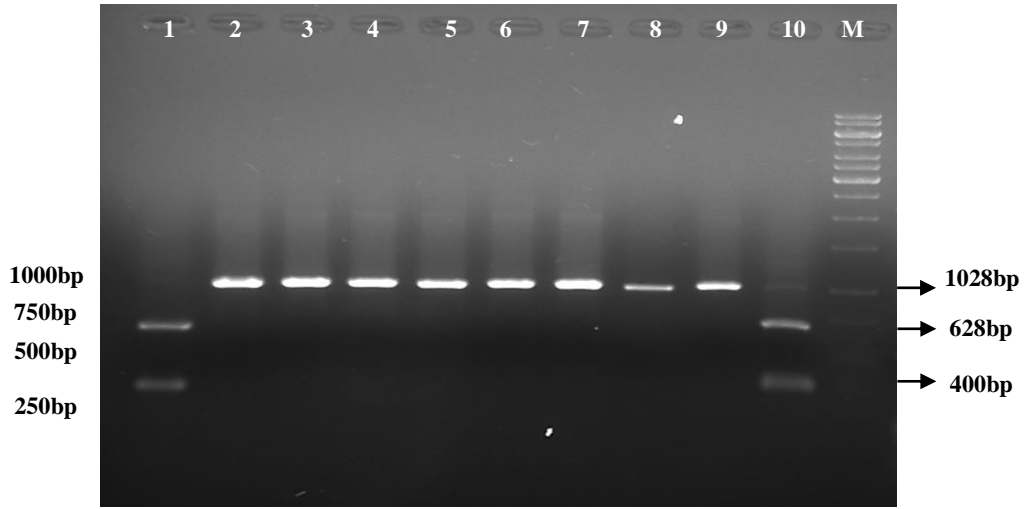
COI gen bölgesinde kesim amacıyla *SspI* (ER0771 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır ve bal arısı popülasyonlarında COI gen bölgesinin 1028 bç'lik bölümü öncelikle PCR ile çoğaltılmıştır ve ardından *SspI* enzimi ile kesimi sonucunda incelenen tüm örneklerde 523, 213, 175, 85, 32 bç uzunluğunda kesim profili elde edilmiştir ve C haplotipi bulunmuştur. Aşağıdaki resimde görüldüğü gibi bazı örnekler daha parlak bazıları ise daha zayıf bant görülmektedir. Bunun sebebinin DNA miktarları ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ancak 32 bç uzunluğunda olan bant muhtemelen küçük olduğundan dolayı jelde silik bir görüntü oluşturmuştur.



Şekil 3.3. COI gen bölgesinin *SspI* enzimi ile kesimi, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, 1 ve 19 örnekler: C tip (523 bp, 213 bp, 175 bp, 85 bp ve 35 bp), M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

3.1.3 COI gen bölgesinin *StyI* enzimi ile kesilmesi

COI gen bölgesinde kesim amacıyla *StyI* (ER0411 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. COI lokusunun 1028 bç'lik bölümü öncelikle PCR ile çoğaltılmıştır ve ardından *StyI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. *StyI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda 2150. pozisyonda (G→A transizyonu) mutasyonu sonucu CCWWGG şeklinde olan DNA dizisinin CCWWGA olarak değişebileceği görülmüştür ve daha önce literatürde bildirilen kesim noktası tespit edilmiştir. Bu noktada tek kesim sonucu jelde 626 ve 402 bç'lik kesim profili elde edilmiş ve bu profil B haplotipi olarak ifade edilmiştir. Çalışılan Kırklareli örneklerinin 52'sinde bu kesim modeli tespit edilmiştir. Geri kalan Kırklareli örnekleri ve Tekirdağ örnekleri kesim olmamıştır ve A haplotipinde bulunmuştur.



Şekil 3.4. COI gen bölgesinin *StyI* enzimi ile kesimi, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, PCR ürünü: A tip (1028 bp), 1. ve 10. örnekler: B tip (400 bp-628 bp), M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

```

2041 taatactagg atcacctgat atagcattcc cccgaataaa taatattaga ttttgattac
2101 ttctctcctc attattttata cttttattaa gaaattttatt ttatccaaga ccaggaactg
2161 gatgaacagt atatccacca ttatcagcat atttatatca ttcttcacct tcagtagatt
2221 ttgcaatttt ttctcttcat atatcaggaa tttctcfaat tataggatca ttaaacttaa
2281 tagttacaat tataataata aaaaattttt ctataaatta tgaccaaatt tcattatttc
2341 catgattcagt ttttattaca gcaattttat taattatata attacctgta ttagctggag
2401 caattactat actattatatt gatcgaaatt ttaatacatc atttttcgat cctataggag
2461 gtggagatcc aattctttat caacatttat tttgattttt tggatcatcca gaagtttata
2521 ttttaatttt acctggattt ggattaatct ctcatattgt aataaatgaa agaggaaaaa
2581 aagaaatttt tggtaattta agaataattt atgcaatatt aggaattgga tttctaggtt
2641 ttattgtttg agcacatcac atattttacag tcggattaga tgttgatact cgagcatatt
2701 ttacttcagc aacaataatc attgctgtac caacaggaat taaagttttt agatgattag
2761 caacttatca tggttcaaaa ttaaaattaa atatttcaat tttatgatca ctaggtttta
2821 ttatactatt tactattggg ggattaacag gaattatatt atcaaattct tctattgata
2881 ttattcttca tgatacatat tacgttggtg gacattttca ttatgttctt tcaatagggtg
2941 cagtatttgc aattattttca agattttatc attgatatoc attaatctact ggattattat
3001 taatatttaa atgattaaaa attcaattta ttataatatt tattggagta aatctaactt
3061 tctttcctca acatttttta ggactaatat ctataccacg acgttattca gactatccag
3121 attcttatta ctgttgaaat tcaatttcat ctataggatc aataatttca ttaaatagaa

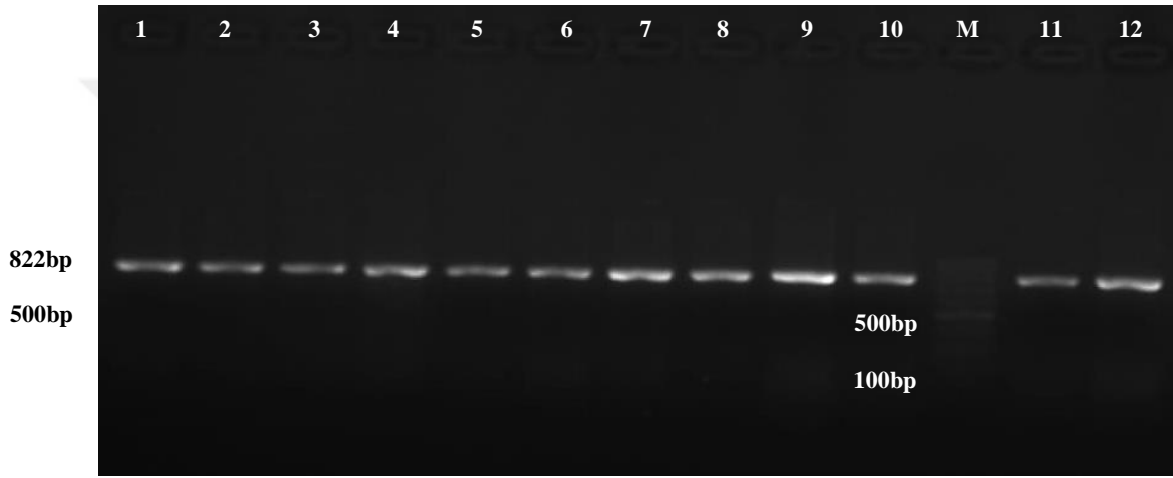
```

Şekil 3.5. COI bölgesinde bulunan restriksiyon enzimi kesim noktaları

3.2 ND5 Gen Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması

İleri 5'TCGAAATGAATAGGATACAG 3' ve Geri 5' GGTTGAGATGGTTTAGGATT 3' primerler kullanılarak (Şekil 2.4) ND5 gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır ve bunun sonucunda 822 bç' lik PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 3.6). Bu PCR ürünleri % 1' lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

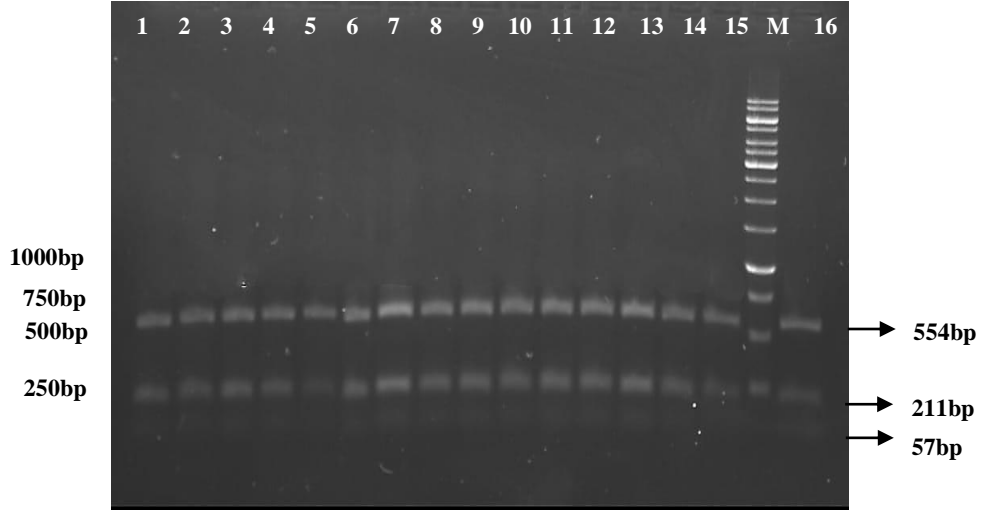
PCR ile çoğaltım sonucunda tüm örneklerde 822 bç uzunluğunda tek bant meydana geldiği görülmüştür. ND5 gen bölgesinin PCR işleminde kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri Çizlge 2.5 ve 2.6'de verilmiştir.



Şekil 3.6. ND5 gen bölgesi PCR ürünleri, 1-12 örnekler (822 bç), M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

3.2.1 ND5 gen bölgesinin *AluI* enzimi ile kesilmesi

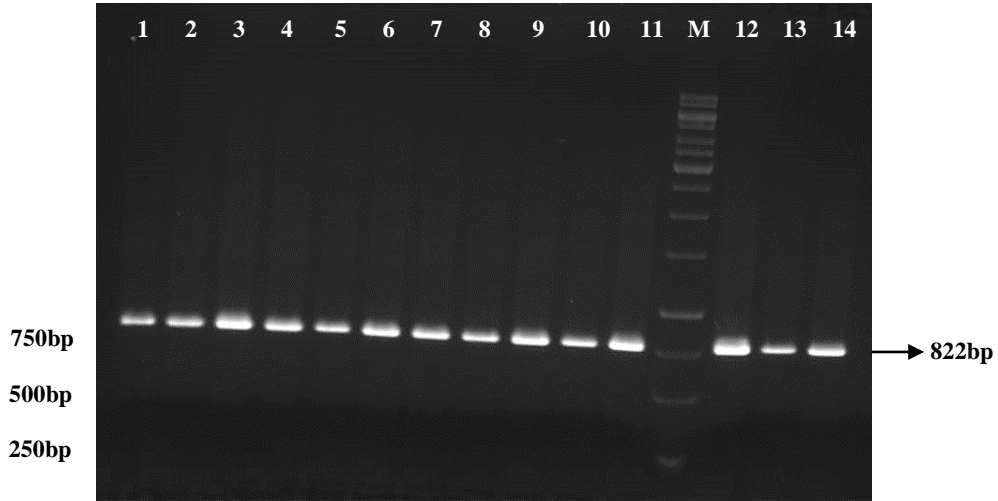
ND5 gen bölgesinde kesim amacıyla *AluI* (ER0011 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. ND5 lokusunun 822 bç'lik bölümü PCR ile çoğaltılmıştır ve ardından *AluI* restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Bu gen bölgesinde *AluI* restriksiyon enzimi ile inkübasyonu sonucu çalışılan tüm örneklerde 554, 211 ve 57 bç'lik 3 banttı oluşıan kesim profili elde edilmiştir ve C haplotipi belirlenmiştir. Bu örneklerde aşğıdaki resimde görüldüğü üzere bazı örneklerin daha parlak bazı örneklerin ise zayıf bant vermesi DNA miktarları ile ilgilidir. Ancak 57 bç uzunluğında olan bant muhtemelen küçük olduğundan dolayı jelde silik bir görüntü oluşturmuştur.



Şekil 3.7. ND5 gen bölgesinin *AluI* enzimi ile kesimi, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, 1. ve 16. örnekler: C tip (554 bp, 211 bp ve 57 bp), M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

3.2.2 ND5 gen bölgesinin *FokI* enzimi ile kesilmesi

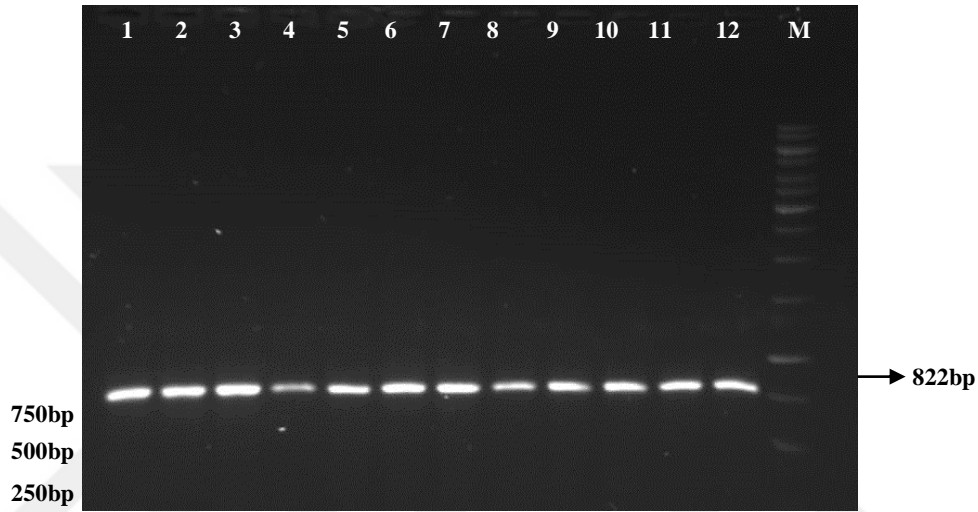
ND5 gen bölgesinde kesim amacıyla *FokI* (ER0871 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Bu kesimde *FokI* enzimi yerine onun izoşizomeri olan *BtsCI* enzimi kullanılmıştır. *FokI* enzimi ile ND5 geninin kesilmesi sonucu incelenen bütün populasyonlarda 822 bp uzunluğunda jelde tüm örneklerde tek bir bant profili oluşmuştur ve bunun B haplotipi olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan bal arılarının mtDNA genomunun ND5 geninde bu enzimin tanıma bölgesinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.8. ND5 gen bölgesinin *FokI-BtsCI* enzimi kesim sonucu, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, 1-14 örnekler: B tip (822 bp) M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

3.2.3 ND5 gen bölgesinin *HincII* enzimi ile kesilmesi

ND5 gen bölgesinde kesim amacıyla *HincII* (ER0491 Thermo Fisher Scientific) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. *HincII* enzimleri ile ND5 genin kesimi sonucu incelenen tüm popülasyonların 822 bp uzunluğunda tek bant profili oluşturduğu ve bunun B haplotipi olduğu görülmüştür. Çalışılan bal arısı popülasyonlarının mtDNA genomunun ND5 geninde bu enzimin tanıma bölgesinin olmadığı görülmüştür. Jel görüntüleri çalışılan bütün örneklerde aynı şekilde bant vermiştir.



Şekil 3.9. ND5 gen bölgesinin *HincII* enzimi kesim sonucu, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri, 1-12 örnekler: A tip (822 bp (kesim bulunamamıştır)), M: Fermentas GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

7381	taaaactaaa	attattcgaa	atgaatagga	tacagtaaaa	attgtaccaa	taattaaatt
7441	aattattgaa	aaataaatta	tttttctaaa	aaaaaatatt	tcaataatta	aatcttttga
7501	ataataacca	actaaaaaag	gaaaaccaca	taatcttaaa	attgaaaaaa	ttaaaattat
7561	tcttttttatt	ggataaatat	aatatatacc	ataatatatt	cgaatatctt	gattactata
7621	tatataatgt	atatacctac	caacacatat	aacattaat	gatttaaata	ttgcatgaat
7681	aaataaatgt	aaaaatacta	atcagttgga	accaattgat	aatattctta	ttataaatcc
7741	taattgtcct	aaagtagaat	agcaacaac	tttttttaa	tctaattcaa	aatttgcaac
7801	taaaccagca	aataatattg	ttaatctagc	aatcaatata	atataatfff	tataattaaa
7861	atctaataaa	ttacatatc	gaattaataa	ataaattcca	gcagtaacta	aagttgatga
7921	atgaactaaa	gatgaaacag	gagttggagc	tattattgct	attggtaatc	aagttgaaaa
7981	aggaatttgt	gctcttttag	taaaagctat	caataaaata	taaatcatta	taaattcatt
8041	tattttataa	aaacttaaat	ttcatcttcc	ataatatggt	attaatccca	taattaataa
8101	taaaccaata	tctcctaata	gatttaataa	aatagtaact	atacctgaag	taaatgattt
8161	tatttttata	taataaatta	caagacaata	agaaattaat	cctaaacct	ctcaacctaa

Şekil 3.10. ND5 restriksiyon enzimi kesim noktaları

Çalışılan bal arılarının mtDNA genomunda yapılan bu çalışmada COI geni için 117 örnekte 3 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi (*NcoI*, *SspI*, *StyI*) kullanılarak PCR-RFLP analiziyle genetik varyasyon tanımlanmıştır. Populasyonlardaki örneklerde her bir enzim için A, B ve C tipinde kesim profili oluşmuştur. Çalışılan arı örneklerinde yapılan analiz sonucu COI/*NcoI* geninde 246 ve 782 bç'lik yeni bir kesim profili Kırklareli ve Tekirdağ örneklerinde bulunmuştur. Bu profil C haplotipi olarak belirlenmiştir. COI/*SspI* geninde daha önce literatürde de bildirilen 523, 213, 175, 85 ve 32 bç'lik için 5 farklı kesim örüntüsü çalışılan tüm örneklerde bulunmuştur ve bu profil C haplotipi olarak belirlenmiştir. COI/*StyI* geninde 400 ve 628 bç'lik 2 farklı kesim profili belirlemiştir ve bu profilin B haplotipinde profil oluşturan örnekler olduğu görülmüştür. Aşağıdaki çizelgede çalışılan bütün enzimler ile kesim sonucu populasyonlarda meydana gelen kesim örüntüsü verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan populasyonlarda mtDNA COI bölgesine uygulanan enzimler sonucu oluşan bant profilleri, parça uzunlukları ve haplotipleri

<i>NcoI</i>		<i>SspI</i>		<i>StyI</i>			
bç	B	C	bç	C	bç	A	B
1028	-		523	-	1028	-	
782		-	213	-	628		-
246		-	175	-	400		-
			85	-			
			32	-			

ND5 geni için 132 farklı populasyonun herbirinden 3 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi (*FokI*, *AluI*, *HincII*) kullanılarak PCR-RFLP analiziyle genetik varyasyon tanımlanmıştır. Çalışılan arı örneklerinde yapılan analiz sonucu ND5/*AluI* geninde daha önce literatürde bildirilen 554, 211 ve 57 bç'lik 3 farklı kesim profili Tekirdağ ve Kırklareli örneklerinde bulunmuştur ve C haplotipi olduğu belirlenmiştir. ND5 geni *FokI* enzimi ile ND5 geni *HincII* enzimi kesim sonucu incelenen bütün populasyonlarda kesim tespit edilmemiş ve 822 bç uzunluğunda tek bir bant ve B haplotipi belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışılan populasyonlarda mtDNA ND5 bölgesine uygulanan enzimler sonucu oluşan bant profilleri, parça uzunlukları ve haplotipleri

<i>AluI</i>		<i>FokI-BtsCI</i>		<i>HincII</i>	
bç	C	bç	B	bç	B
554	-	822	-	822	-
211	-				
57	-				

Yapılan bu tez çalışmasında çalışılan yörelere ait bal arılarının gen bölgelerine uygulanan kesim enzimleri ile ortaya çıkan farklı mtDNA haplotip grubu olduğu bilinmektedir ve kesim bölgeleri bulunan enzimlere göre aşağıdaki çizelgede oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3. Gen bölgesindeki populasyonların haplotip çeşitliliği

Gen bölgesi	COI			ND5		
	<i>NcoI</i>	<i>SspI</i>	<i>StyI</i>	<i>AluI</i>	<i>FokI</i>	<i>HincII</i>
Tip 1	B	C	A	C	B	B
Tip 2	B	C	B	C	B	B
Tip 3	C	C	A	C	B	B
Tip 4	C	C	B	C	B	B

Yapılan çalışmalar sonucunda COI ve ND5 lokuslarında elde edilen modellere bağlı olarak çalışılan yörelere ait bal arısı popülasyonlarının ait olduğu genetik soya karar vermek için aşağıda özet bir çizelge oluşturulmuştur.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri ile gen bölgeleri bakımından *Apis mellifera* türlerinin karşılaştırılması

GenBölgesi/Enzim	<i>NcoI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfyI</i>	<i>AclI</i>	<i>HincII</i>	<i>FokI</i>
<i>A.m.anatoliaca</i>	-	+	-			
						COI
						ND5
<i>A.m.macedonica</i>	+	+	+			
						COI
					+	ND5
<i>A.m.adami</i>	-	-	-			
						COI
						ND5
<i>A.m.cecropia</i>	-	-	-	-		
						COI
						ND5
<i>A.m.cyprica</i>	-	-	-			
						COI
						ND5
Greek		+			+	+
						COI
					+	+
						ND5
Bulgarian		-				
						COI
					-	-
						ND5

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye’ de bulunan mevcut bal arısı ırk ve ekotiplerinin gen kaynağı olarak korunmasında farklı ıslah stratejilerinin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışmada, Türkiye’nin Kırklareli ve farklı yörelerine ait bal arılarında mtDNA molekülü bakımından olası yeni haplotiplerin belirlenmesi ve populasyonlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amacıyla COI Ve ND5 gen bölgeleri *NcoI*, *SspI*, *StyI*, *AluI*, *FokI*, *HincII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir ve olası kesim noktaları belirlenmiştir. 117 farklı örneğin mtDNA açısından farklılıklarını değerlendirmek için COI ve ND5 gen bölgeleri incelenmiştir.

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim ve sonucunda elde edilen nükleotid değişiklikleri temelinde ırklar, ekotipler ve hatta populasyonların arasındaki benzerlik ve farklılıklar araştırılabilmektedir. Bu sayede de tüm türlerde genetik yakınlık ve uzaklıklar ortaya konulabilmektedir. Burada yapılan tez çalışmasında iki farklı mtDNA bölgesi (COI ve ND5) araştırılmış ve Kırklareli bal arısı populasyonlarındaki genetik benzerlik yada farklılıklar ortaya konulmuştur. Yapılan analizler sonucu farklı enzimler ile muamele sonucu populasyonları ayırt etmede kullanılacak *NcoI* ve *StyI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu farklı varyasyonlar bulunmuştur.

COI/*NcoI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda bir ilk olarak 2345. pozisyonda meydana gelen mutasyon sonucu (G→A transizyonu) yeni bir kesim bölgesi oluşturmuştur ve CCATGG şeklinde DNA dizisi CCATGA olarak yeni bir *NcoI* kesim noktası oluşturmuştur ve bu haplotip C haplotipi olarak belirlenmiştir. Bu haplotip Kırklareli ve Tekirdağ örneklerinde bulunmuştur. Kesim bulunan örneklerin *A.m.macedonica* kökenli olabileceği tespit edilmiştir.

COI/*SspI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda C haplotipi belirlenmiştir. Çalışılan Kırklareli örnekleri ve Tekirdağ örneklerinde bu şekilde kesim bulunmuştur. Kesim bulunan örnekler *A.m.anatoliaca*, *A.m.macedonica* kökenli olabileceği tespit edilmiştir.

COI/*StyI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda 2150. pozisyonda meydana gelen mutasyon sonucu (G→A transizyonu) kesim noktası oluşturmuş ve CCWWGG şeklinde DNA dizisinin CCWWGA olarak değiştiği görülmüştür. Bu kesim sonucu bu profil B haplotipi olarak belirlenmiştir. Kesim bulunan örneklerin *A.m.macedonica* kökenli olabileceği tespit edilmiştir.

ND5/*AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu C haplotipi elde edilmiştir. Çalışılan Kırklareli ve Tekirdağ örneklerinde bu şekilde kesim bulunmuştur. Kesim bulunan örneklerin *A.m.macedonica* kökenli olabileceği tespit edilmiştir.

ND5/*FokI* enzimleriyle incelenmiş tüm populasyonların 822 bç uzunluğunda tek bir bant profili oluşturduğu ve B haplotipi oluşturduğu görülmüştür.

ND5/*HincII* enzimleriyle incelenmiş tüm populasyonların 822 bç uzunluğunda tek bir bant profili oluşturduğu ve B haplotipi oluşturduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, COI ve ND5 gen bölgelerinde farklı restriksiyon enzimleriyle kesim sonucunda Kırklareli bal arısı populasyonlarında elde edilen haplotipler ortaya konulmuştur. Daha önce literatürde bildirilen kesimlere ilave olarak sadece COI/*NcoI* enzimi ile kesim sonucunda farklı varyasyon ve mutasyon noktaları tespit edilmiştir. Bu bildirilen kesim dışındaki gen enzim kombinasyonlarında daha önce literatürde bildirilen sonuçlar bulunmuştur. COI bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesimi sonucunda Tekirdağ populasyonuna ait 2 örnekte ve Kırklareli'ye ait 12 örnekte mutasyon tespit edilmiş ve bu açıdan değerlendirildiğinde her iki populasyon da polimorfik bulunmuştur. COI gen bölgesinin *StyI* enzimi ile kesimi sonucunda Kırklareli populasyonlarının % 48.5'u B haplotipinde, % 51.5'i A haplotipinde bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında incelen Kırklareli örneklerinin bir kısmında literatürde bildirilen *A. m. macedonica* örneklerinde tespit edilen haplotiplere benzer haplotipler tespit edilirken bir kısmının oldukça farklı bant profilleri gösterdiği görülmektedir. Bu durumun sebebinin hem incelenen örnek sayısının az olması ve hem de bölgede yoğun bir Karniyol ana arı kullanımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kırklareli populasyonu ve tüm Trakya boyunca farklı gen kombinasyonları ile çalışmalar yapılarak bölge içi ırk ve ekotipler ortaya konmalı, bu hipotezler doğrulanmalı veya test edilmelidir.

Bal arısı ırklarının fizyolojik veya davranışsal özelliklerinin belirlenerek detaylı bir şekilde tanımlanması veya korunması bir zorunluluktur. Bunun yapılabilmesi için genetik çeşitliliğin belirlenmesi gerekmektedir. Bundan sonra yapılacak olan benzer çalışmalarda ve ayrıca veri tabanı oluşturulmasında bu tez çalışmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam, Br. (1954). Bee breeding. *Bee World* 35: 4-13, 21-29, 44-49.
- Adam, Br. (1983). In search of the best strains of bees. Dadant Sons, Hamilton, Illinois.
- Adams, D. C., Rohlf, F.J., Slice, D.E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 71(1), 5-16.
- Akyol, E., (1998). *Kafkas ve Muğla arılarının (Apis mellifera L.) saf ve karşılıklı melezlerinin morfolojik fizyolojik ve davranışsal özelliklerinin belirlenmesi*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Zootečni Ana Bilim Dalı. Kod No:452 Adana. 153 S.
- Akyol, E., Şahinler, N. ve Özkök, D. (2006). Honeybee (*Apis mellifera*) Races, Eco Tips and Their General Characteristics in Turkey, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(9), 771-774.
- Alpatov V. V. (1927). On the variability of the hamuli on the hind wings of the honeybee. *Ptschelowodnoje Djelo*. 1-7. (In Russian).
- Alpatov, W. W. (1929). Biometrical studies on variation and races of the honeybee *Apis mellifera* Rev. Biol. 4:1-58.
- Alpatov, W. W. (1948). The races of honeybees and their use in agriculture. (In Russian) *Sredi prirodi* 4, 1-65.
- Ambrose, J., Atkins, E., Avitabile, A., Ayers, G., Blum, M., Buchmann, S.L., Caron, D.M., Crane, E., Dadant, C.C., Dietz, A. (1992). The Hive and the honey bee: a new book on beekeeping which continues the tradition of "Langstroth on the hive and the honeybee" (Cilt 3). Hamilton: Dadant & Sons.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G. (1981). Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature*, 290:457.
- Anderson, S., De Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F., Young, I. G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683-717.
- Anonim, (2006). The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931-949.
- Arias, M. C. ve Sheppard, W. S. (2005). Phylogenetic Relationships of Honey Bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) Inferred from Nuclear and Mitochondrial DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 25-35.
- Arias, M. C., Sheppard, W. S. (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3): 557-566.
- Avise, J.C. (2004). Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2nd Ed., Chapman and Hall, 684 s, New York.

- Awetisjan, G. A. (1978). Apiculture, Apimondia Publishing house, Bucharest in: Awetisjan, G.A., Gubin, W.A., Davydenko, I.K. (1969). Selection of Carpathian bees. *Proc. Int. Beekeep. Cong.* 22:366-371.
- Baldensperger, P. J. (1924). North African bees. *Bee World* 5:175-176.
- Bilash, G. D., Makarov, H., Sedich, A. W. (1976). Geographic classification of honeybee races in the USSR. *Apimondia Symp Genetics Selection Reproduction*, 140-150.
- Birand, H. (2001). *Alıç Ağacı ile Sohbetler*. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları 35, 7.Basım, 339. Ankara.
- Bodenheimer, F.S. (1941). *Studies on The Honeybee (Apis mellifera L.) and Beekeeping in Turkey*, Merkez Ziraat Mücadele Enstitüsü, Ankara.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., ve Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Bouga, M., Harizanis, P., Kılıas, G., Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera :Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments, *Apidologie* 36: 335-344.
- Brown, W.M. (1985). The Mitochondrial Genome of Animals, *Plenum*, p:95-130 New York.
- Budak, M.E. (1992). *Ülkemizde Çeşitli Kurumlarca Yetiştirilen Ana Arılar ile Oluşturulan Kolonilerin Fizyolojik, Morfolojik ve Davranışsal Farklılıklarının Araştırılması*. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Butler, C. G., Callow, R.K., Koster, C.G., Simpson, J. (1973). Perception of the queen by workers in the honeybee colony. *J. Apic. Res.* 12: 159-166.
- Buttel-Reepen, H. (1906). *Apistica*. Beitrage zur Systematic, Biologie, sowie zur geschichtlichen und Geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifera* L), ihrer Varietaten und der übrigen Apis-Arten. *Veroff Zool Mus Berlin* 118-120.
- Calderone, N. (1998). Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. . *Apidologie*, 29: 127–158.
- Chan, M. Y. M. (2009). *Development And Application Of Honey Bee In Vitro Systems*. Yüksek Lisans, The University of British Columbia.
- Cockerell, T. D. A. (1906b). New Rocky Mountain bees, and other notes. *Canadian Entomologist* 38: 160-166.
- Collins, A. (2004). Variation in Time of Egg Hatch by the Honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(1): 140- 146.
- Cornuet, J., Fresnaye, J. (1989). Biometrical study of honey bee populations from Spain and Portugal. *Apidologie* 20:93-101.

- Cornuet, J. M., Garnery, L. (1991). Mitochondrial DNA Variability in Honeybees and It's Phylogeographic Implications. *Apidologie*, 22: 627- 642.
- Cornuet, J. M., Garnery, L., Solignac, M. (1991). Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. *Mitochondrial DNA Genetics*, 1128:393-403.
- Crozier, R. H., Crozier, Y.C. (1992). The Cytochrome-b and ATPase genes of honeybee mitochondrial DNA. *Mol. Biol.Evol.* 9(3): 474-482.
- Crozier, R. H., Crozier, Y.C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization, *Genetics* 133:97-117.
- Crozier, Y. C., Koulianos, S., Crozier, R.H. (1991). An improwed test for Africanized honey bee mitochondrial DNA. *Experientia* 47: 968-969.
- Çakmak, İ., Fuchs, S., Çakmak, S. S., Koca, A. Ö., Nentchev, P., Kandemir, İ. (2014). Morphometric analysis of honeybees ditributed in northern Turkey along the black sea coast. – *Uludağ Arıcılık Dergisi* 14(2): 59-68.
- Çınar, M. (2006). *Muğla yöresi bal arısı popülasyonlarında morfometrik varyasyonların belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı, İzmir.
- Dadant, C. C. (1984). The Hive and The Honey Bee. Dadant and Sons, Hamilton, *Illionis*. 1-740.
- Daly, H.V., Danka, R.G., Hoelmer, K., Rinderer, T.E., Bucu, S.M. (1995). Honey bee morphometrics: linearity of variables with respect to body size and classification tested with European worker bees reared by varying number of nurse bees. *J. Apic. Res.* 34: 129-145.
- Daly, H.V., Hoelmer, K., Gambino, P. (1991). Clinal geographic variation in feral honey bees in California, USA. *Apidologie* 22: 591-609.
- Darendelioğlu, Y., Kence, A. (1992). Morphometric study on population structure on honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). *Türkiye 2. Entomoloji Kongresi Bildirileri*, 387-396.
- De la Rúa, P. R., Jaffé, R., Dall'Olio, I., Muñoz, J. ve Serrano. (2009). Biodiversity, Conservation and Current Threats to European Honeybees. *Apidologie*, 40(3):263-284.
- De La Rúa, P., Galián, J., Serrano, J., ve Moritz, R.F.A. (2001). Genetic Structure and Distinctness of *Apis mellifera* L. Populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, 10: 1733-1742.
- Doğaroğlu, M. (1981). *Türkiye'de Yetiştirilen Önemli Arı Irk ve Tiplerinin "Çukurova Bölgesi" Koşullarında Performanslarının Karşılaştırılması*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Doğaroğlu, M. (2007). *Çiçekten Sofraya Balın Öyküsü*. Yapı Kredi Yayınları. Yayın No: 2593, 270 s, İstanbul.

- Doğaroğlu, M., Özdemir, M., ve Polat, C. (1992). Türkiye'deki Önemli Balarısı (*Apis mellifera* L.) Irk ve Ekotiplerinin Trakya Koşullarında Performanslarının Karşılaştırılması, *Doğal-Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 16:403-414, Ankara.
- DuPraw, E. (1965). Non-Linear taxonomy and the systematics of honey bees. *Syst. Zool.* 14:1-24.
- Engel, M. S. (1999). The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *Journal of Hymenoptera Research, Volume 8(2)*:165-196.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1995a). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140: 679-695.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (1995c). Microsatellite variation in honeybee identification. *Rev. Brazil. Genetic*, 11, 287-297.
- Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.M., Solignac, M. (1995b). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol. Biol. Evol.* 12: 1074-1084.
- Eva, B., Giagia-Athanasopoulou, Michail, T., H., Rovatsos, George P., Mitsimas, Stefanos Martimianakis, Petros Lymberakis, Lida-Xenia D. Angelou, Juan Alberto Marchal, Antonio Sánchez. (2011). New Data On The Evolution Of The Cretan Spiny Mouse, *Acomys Minous* (Rodentia: Murinae), Shed Light On The Phylogenetic Relationships In The Cahirinus Group, *Biological Journal Of The Linnean Society, Volume 102, Issue 3, March 2011, Pages 498–509.*
- Fabricius, J. C. (1787). *Mantissa Insectorum Sistemum eorum Species nuper Detectas adiectis Characteribus Genericis, Differentiis Specificis, Emendationibus, Observationibus, vol.1.* Proft, Hafnie (Copenhagen), Denmark, 348 pp.
- Fabricius, J. C. (1793). *Entomologia Systematica Emendata et Aucta. Secundum Classes, Ordines, Genera, Species adiectis Synonymis, Locis, Observationibus, Descriptionibus, vol.2.* Proft, Hafnie (Copenhagen), Denmark, 519 pp.
- Fıratlı, Ç. (1988). Arılarda (*Apis mellifera* L.) Genetik İslah. Türkiye'de Hayvancılık, Genetik, İstatistik Sempozyumu. 13-14 Ekim 1988, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toplantı Salonu, Ankara.
- Fleig, R. (1995). Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 24(4): 427-433.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. ve Cornuet, J. M. (2001). Genetic Diversity of the Honeybee in Africa: Microsatellite and Mitochondrial data. *Heredity*, 86: 420-430.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. ve Cornuet, J. M. (1998). The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insight from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52:1119-1134.

- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J. M. (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*, 31:167-180.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (2000a). Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from the near east. *Apidologie*. 31: 167–80.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. (2000b). Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from Near East. *Apidologie*. 31: 167–80.
- Fries, I. (1993). Nosema Apis-A Parasite in the Honeybee Colony. *Bee World*, 75: 5-19.
- Frisch, K. V. (1965). Die tänze der Bienen. In *Tanzsprache und Orientierung der Bienen* (pp. 3-330). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Garnery, L, Cornuet, J.M., ve Solignac, M. (1992). Evolutionary History of the Honey Bee Apis mellifera Inferred from Mitochondrial DNA Analysis. *Molecular Ecology*, 1: 145- 154.
- Garnery, L, Vautrin, D, Cornuet, JM ve Solignac, M. (1991). Phylogenetic Relationships in the Genus Apis Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Data. *Apidologie*, 22: 87-92.
- Garnery, L., Mosshine, E.H., Oldroyd, B.P., ve Cornuet, J.M. (1995). Mitochondrial DNA Variation in Moroccan and Spanish Honey Bee Populations. *Molecular Ecology*, 4: 465-471.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., ve Cornuet, J.M. (1993). A Simple Test Using Restricted PCR Amplified Mitochondrial DNA to Study the Genetic Structure of *A. mellifera* L.. *Experientia*, 49:1016-1021.
- Garnery, L., Vautrin, O., Cornuet, J. M. ve Solignac, M. (1991). Mitokondriyal DNA dizisi verilerinden çıkarılan Apis cinsindeki filogenetik ilişkiler. *Apidologie*, 87-92. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19910111>.
- Gençer, H.V., Fıratlı, Ç., (1999). Orta Anadolu ekotipleri (*Apis m. anatoliaca*) ve Kafkas ırkı (*Apis mellifera caucasica*) bal arılarının morfolojik özellikleri. *Turk J. Vet Anim Sci* 23:107-103.
- Giray, T., Cakmak, I, Aydın, L., Kandemir, I, Inci, A., Oskay, D., Doke, M.A., Kence, M., Kence, A. (2007). “Preliminary survey results on 2006-2007 colony losses in Turkey”, *Uludağ Arıcılık Dergisi*,7, 101-107.
- Goetze, G. K. L. (1964). Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese, Teil 1: Systematik, Zeugung und Vererbung. *Monographien zur angewandte Entomologie* 19: 1-120.
- Gorbachev, A. N. (1916a). The gray mountain Caucasian bee (*Apis mellifera caucasica*) and its place among other bees. Tiflis 1916: 1-40. (In Russian with English summary).
- Gösterit, A., Güler, F. (2005). Bombus Terrestris (Hymenoptera: Apidae) Arılarının Yayılmasının Ekosistem Üzerine Etkileri . *Uludağ Arıcılık Dergisi* , 05 (3) , 115-121 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/uluaricilik/issue/53637/162510>.

- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., ve Gelbart, W. M. (1996). An Introduction to Genetic Analysis. 6th Ed., W.H. *Freeman and Company*, New York, 916.
- Guizeit, H., Zissler, D., Fleig, R. (1993). Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. *Development genes and evolution*, 202(3): 181-191.
- Gupta, I.,(2014) Alternative polyadenylation diversifies post-transcriptional regulation by selective RNA-protein interactions. *Mol Syst Biol* 10:719.
- Güler, A. (1995). *Türkiye'deki önemli balarısı (Apis mellifera L.) ırk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri ve göçer arıcılık şartlarında performanslarının belirlenmesi üzerine araştırmalar*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, 158, Adana.
- Güler, A. (2002). Forewing angles of honey bee (*Apis mellifera*) samples from different regions of Turkey. *Journal of Apicultural Research* 40: 43-49.
- Güler, A. (2006). Bal Arısı (*Apis mellifera* L.). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No:55, Samsun.
- Güler, A., Bek, Y. ve Guven, H. (2010). The importance of morphometrics geometry on discrimination of Carniolan (*A. m. carnica*) and Caucasian (*A. m. caucasica*) honey bee subspecies and in determining their relationship to Thrace region bee genotype. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 83(2), 154-162.
- Güler, A., Bıyık, S., Güler, M. (2013). Batı Karadeniz Bölgesi Balarılarının (*Apis mellifera* L.) morfolojik karakterizasyonu. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 1, 39-46.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O. (1999c). Türkiye'deki önemli bal arısı (*Apis mellifera* L.) ırk ve ekotiplerinin morfolojik karakterler açısından ilişkilerinin diskriminant analiz yöntemiyle saptanması. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 23:565-575.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O., (1999a). Türkiye'deki önemli bal arısı ırk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri-I. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 23:Supply. 3:565-575.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O., (1999b). Türkiye'deki önemli bal arısı ırk ve ekotiplerinin morfolojik özellikleri-II. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.* 23:Supply. 3:571-575.
- Güler, A., Toy, H. (2008). Sinop İli Türkeli yöresi balarıları (*Apis mellifera*)'nın morfolojik özellikleri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 23(3): 190–197.
- Güler, A., Kaftanoğlu, O. (1998). Türkiye'deki önemli bal arısı ve ekotiplerinin göçer arıcılık koşullarında performanslarının karşılaştırılması. II. *Ulusal Zootekni Bilim Kongresi* 22-25 Eylül 1998. Bursa.
- Gür, İ., Yavuz, S., Su, Y. ve Yan, X. (2018). DialSQL: Dialogue Based Structured Query Generation. In *Proceedings of the 56th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics* (Volume 1: Long Papers), pages 1339–1349, Melbourne, Australia.

- Güven, H. (2003). *Kuzeydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi 'ndeki bazı arı (Apis mellifera L.) genotiplerinin morfolojik özellikleri ve performanslarının belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Samsun.
- Hall, H.G., (1998). PCR Amplification of a Locus with RFLP Alleles Specific to African Honeybees. *Biochemical Genetics*, 36: 351-361.
- Hall, H.G., Smith, D.R. (1991). Distinguishing African and European Honeybee Matrilines Using Amplified Mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 4548-4552.
- Han, F., Wallberg, A., & Webster, M. T. (2012). From where did the Western honey bee (*Apis mellifera*) originate?. *Ecology and evolution*, 2(8), 1949-1957.
- Hewitt, G.M., (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247-276.
- Işık, R. , Özdil, F. ve Güder, A. (2017). Trakya Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera* L.) mtDNA 16S rDNA ve ND5 Genleri Analizi . *Hayvansal Üretim* , 58 (2) , 7-14 . DOI: 10.29185/hayuretim.342734.
- Ivanova, E. (2010) Investigation on genetic variability in honey bee populations from Bulgaria, Greece and Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24(2): 385-389.
- Kaftanoğlu, O., Kumova, U. ve Bek, Y. (1993). Gap Bölgesinde Çeşitli Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Irklarının Performanslarının Saptanması ve Bölgedeki Mevcut Arı Irklarının Islahı Olanakları, Ç.Ü.Z.F. Gap Yayınları, No:74, Adana.
- Kandemir, İ., (1999). *Genetic and morphometric variation in honeybee populations (Apis mellifera L.) in Turkey*, Ph.D. Thesis, METU, Ankara.
- Kandemir, İ., Kence, M., Kence, A. (2000). Genetic and Morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera*) population of Turkey. *Apidology*, 31, 343-356.
- Kandemir, İ., Kence, M., Sheppard, W. S. ve Kence, A. (2006). Mitochondrial DNA Variation in Honey bee (*Apis mellifera* L.) Populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 45(1), 33-38.
- Kandemir, K., Kence, M., Kence, A. (2005) .Morphometric and electrophoretic variation in different honeybee (*Apis mellifera* L) populations. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29 (3), 885-890.
- Karabağ, K., İvgin Tunca, R., Tüten, E. ve Doğaroğlu, T. (2020). Current genetic status of honey bees in Anatolia in terms of thirty polymorphic microsatellite markers . *Turkish Journal of Entomology* , 44 (3) , 333-346 . DOI: 10.16970/entoted.678808.
- Karacaoğlu, M., (1989). *Orta Anadolu, Karadeniz Geçit ve Ardahan İzole Bölgeleri Arılarının Bazı Morfolojik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma*. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karacaoğlu, M., Fıratlı, Ç., (1998). Bazı Anadolu bal arısı ekotipleri (*Apis m. anatoliaca*) ve melezlerinin özellikleri I, morfolojik özellikleri. *Turk J. Vet Anim Sci* 22:17-21.

- Karakaş, M. (2013). "Türkiye'nin Kimlikler Siyaseti ve Sosyolojisi". Akademik İncelemeler Dergisi 8 / 2 (Temmuz 2014): 1-44.
- Kauhausen-Keller, D., Ruttner, F., ve Keller, R. (1997). Morphometric Studies on the Microtaxonomy of the Species *Apis mellifera* L. *Apidologie*, (28), 295-307.
- Kekeçoğlu, M., Bouga, M., Soysal, M. I., Harizanis, P. (2009). Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships of Honey Bee Populations From Turkey Using Pcr-Rflp's Analysis of Two mtDNA Segments. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (6), 589-597.
- Kekeçoğlu, M., Bouga, M.İ., Soysal İ., Harizanis, P. (2007). Morphometrics as a tool for the study of genetic variability of honey bees. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 4(1): 7-15.
- Kekeçoğlu, M., Soysal, M. I. (2010). Genetic Diversity of Bee EcoTypes in Turkey and Evidence for Geographical Differences. *Romanian Biotechnological Letter* 15(5):5646- 5653.
- Kennedy, E.P., Albert, L. (1949). Oxidation of Fatty Acids and Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates by Isolated Rat Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 179: 957-972.
- Kiesenwetter, E. A. H. (1860). Ueber die Bienen des Hymettus. *Berliner Entomologische Zeitschrift* : 315-317.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. (2002). *Genetik Kavramlar*, 6. basım. Palmer yayıncılık.
- Korde, L. A., Somerfield, M. R., Carey, L. A., Crews, J. R., Denduluri, N., Hwang, E. S., Khan, S. A., Loibl, S., Morris, E. A., Perez, A., Regan, M. M., Spears, P. A., Sudheendra, P. K., Symmans, W. F., Yung, R. L., Harvey, B. E., & Hershman, D. L. (2021). Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(13), 1485-1505. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03399>.
- Latrielle, O. (1804) Subspecies of *Apis mellifera* in Nigeria. [www.wikipedia.org/subspecies of Apis mellifera](http://www.wikipedia.org/subspecies_of_Apis_mellifera). Accessed 20/1/08.
- Leonard, J.V., Schapira, H.V. (2000). Mitochondrial Respiratory Chain Disorders I: Mitochondrial DNA Defects. *The Lancet*, 355-389.
- Linksvayer, T. A., Fewell, J. H., Gadau, J. ve Laubichler, M. D. (2012). Developmental Evolution in Social Insects: Regulatory Networks from Genes to societies. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 318, 159-169.
- Linnaeus, C. (1758). Systema Naturae. 10th edn. Holmiae Laur Salvii, in Ruttner F (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees Springer Verlag*, Berlin
- Louveaux, J., (1969). Ecotypes in honeybees. *International Apicultural Congress (Apimondia)* 22:499-501.
- Maa, T. C. (1953). An inquiry into the systematics of the Tribus Apidini or honeybees (Hymenoptera). *Treubia* 21: 525-640.

- Macpherson, E., Robainas-Barcia, A. (2015). Species of the genus *Galathea* Fabricius, 1793 (Crustacea, Decapoda, Galatheidæ) from the Indian and Pacific Oceans, with descriptions of 92 new species. *Zootaxa*, 3913(1), 1-335.
- Marr, B., Adams, C. (2004), "The balanced scorecard and intangible assets: similar ideas, unaligned concepts", *Measuring Business Excellence*, Vol. 8 No. 3, pp. 18-27.
- Martimianakis, S., Klossa-Kilia, E., Bouga, M., & Kiliyas, G. (2011). Phylogenetic relationships of Greek *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mtDNA segments (COI and ND5). *Journal of Apicultural Research*, 50(1), 42-50.
- Mayr, E., P. Ashlock, (1991). Principles of Systematic Zoology. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, USA, p. 428.
- Meixner, M. D., Pinto, A. M., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. and Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*, *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-27.
- Mestriner, M. A. (1969). Biochemical polymorphisms in bees (*Apis mellifica ligustica*). *Nature* 223: 188-189.
- Mestriner, M. A., Contel, E.P.B. (1972). The P-3 and Est loci in the honeybee, *Apis mellifera*. *Genetics* 72: 733-738.
- Michener, C. (1974). *The social behavior of the bees*. Cambridge: Harvard University Press.
- Milne, C., Phillips, J., Krell, P. (1988). A photomicrographic study of worker honeybee embryogenesis. *Journal of Apicultural Research*, 27(2): 69-83.
- Milner, A. (1996). Introduction to Understanding Honeybees, Their Origins, evolution and diversity. <http://www.bibba.com/bibborig.html>. pdf (Erişim tarihi, 23.05.2017)
- Montagano, J. (1911). Relation sur l'*Apis sicula*. *Proceedings of the International Beekeeping Congress* 5: 26-29.
- Moritz, C., Dawling, T.E., ve Brown, W. M. (1994). Evolution of Animal mtDNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology*, 18, 269-292.
- Moritz, R., Southwick, E. (1992). Bees as Superorganisms. Springer. New York: 395
- Moritz, R.F. (1994). Molecular Biology of the Honeybee. *Advances in Insect Physiology*, 25: 105-149.
- Moritz, R.F., Hawkins, C.F., Crozier, R.H., ve Mackinley, A.G. (1986). A Mitochondrial DNA Polymorphism in Honeybees. *Eperientia*, 42: 322-324.
- Muñoz, I., De la Rúa, P. (2021). Wide genetic diversity in Old World honey bees threaten by introgression. *Apidologie* 52, 200–217. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00810-0>.
- Nelson, D. L., Cox, M.M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü Kılıç N, Palme Yayıncılık, Ankara, 172s.

- Nielsen, D., Ebert, P.R., Hunt, J.G., Guzman-Novoa, E., Kinnee, S.A., Page, R.E.Jr., (1999). Identification of Africanized Honeybees (Hymenoptera: Apidae) Incorporating Morphometrics and an Improved Polymerase Chain Reaction Mitotyping Procedure, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 167-175.
- Nielsen, D., Page, R. E. Jr, Crosland, M. W. J., (1994). Clinical variation and selection of MDH alloenzymes in honey bee populations, *Experientia* 50: 867-871.
- Nielsen, D.I., Ebert, P.R., Page, R.E., Hunt, G.J., Guzman-Novoa, E. (2000). Improved polimerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the Africanized honey bee (Hymenoptera:Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93: 1-6.
- Otis, G.W. (1906). Distribution of recently recognized species of honeybees (Hymenopetra: Apidae: Apis) in Asia. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 69, 311-333.
- Özbakır, G.Ö. (2011). *Türkiye'nin güneydoğu sınırboyu bal arısı populasyonlarının (Apis mellifera L.) morfolojik özellikleri*, A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi.
- Özbilgin, N., Alatas, İ., Balkan, C., Öztürk, A., Karaca, Ü. (1999). Ege Bölgesi Arıcılık Faaliyetlerinin Teknik ve Ekonomik Başlıca Karakteristiklerinin Belirlenmesi. *Anadolu, J AARI*, 9, 149-170.
- Özdemir Özsoy, G. (2017). *Kırklareli İli İzole Bölgesinde Yetiştirilen Bal Arısı Kolonilerinde Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Özdemir Özsoy, G. (2017). *Kırklareli İli İzole Bölgesinde Yetiştirilen Bal Arısı Kolonilerinde Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi.
- Özgül, F., Aytekin, İ., İlhan, F., Boztepe, S. (2012). Genetic variation in Turkish honeybees *Apis mellifera anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda* (Hymenoptera: Apidae) inferred from RFLP analysis of three mtDNA regions (16S rDNA-COI-ND5). *European Journal of Entomology* 109 (2): 161-167.
- Özgül, F. (2007). *Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye'nin Farklı Yörelere Ait Bal Arılarının Tanımlanması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özgül, F., Fakhri, B., Meydan, H., Yıldız, M. A., Hall, H. G. (2009b): Mitochondrial DNA variation in the CoxI-CoxII intergenic region among Turkish and Iranian honey bees (*Apis mellifera* L.). – *Biochem Genet* 47: 717-721.
- Özgül, F., Meydan H, Gedik, Y. ve Yıldız, M. A. (2007). mtDNA'da PCR-RFLP ve DNA Dizi Analizi Verileri Temelinde Türkiye Bal Arılarının Tanımlanması. *5.Ulusal Zootekni Bilim Kongresi*.
- Özgül, F., Yıldız, M.,A. (2008). Mitokondriyal DNA sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) bakımından Türkiye bal arısı populasyonlarının tanımlanması, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(45), 46-51.

- Özgül, F., Yıldız, M.A. ve Hall, H.G. (2009). Molecular Characterization of Turkish Honey Bee Populations (*Apis mellifera*) Inferred from Mitochondrial DNA RFLP and Sequence Results. *Apidologie*, 40: 570–576.
- Özgül, F., Yıldız, M. A., Hall, H. G. (2009a): Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. – *Apidologie* 40: 570-576.
- Özkan, A., Çakmak, İ., Nentchev, P., Çakmak, S. S. ve Kandemir, İ. (2010). Bulgaristan, Trakya ve Yunanistan’da Yayılış Gösteren Bal Arısı Popülasyonlarında Landmark ve Fourier Şekil Analizi. *IV. Marmara Arıcılık Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı*, 2-4 Aralık 2010 Çanakkale.
- Öztürk, A.Y., (1990). *Morphometric Analysis of some Turkish Honeybees (Apis mellifera L.)* Master of Philosophy University of Wales College of Cardiff, UK.
- Page, R.Jr., Peng, C. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36(4-6) 695-711.
- Palmer, M. R., Smith, D.R. ve Kaftanoğlu, O. (2000). Turkish Honeybees: Genetic Variation and Evidence for a Fourth Lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *The Journal of Heredity*, 91 (1), 42-46.
- Pollman, A. (1879). *Werth der verschiedenen Bienenracen und deren Varietaten, bestimmt durch Urthe namhafter Bienenzüchter*, Voigt, Leipzig, Germany, 69 pp.
- Pollmann, A. (1889). Wert der verschiedenen Bienenrassen und deren Varietaten. 2nd edn Voigt, Berlin Leipzig (1st edn with description of *A. m. carnica* 1879).
- Puškadija, Z., Kovačić, M., Raguž, N., Lukić, B., Prešern, J., & Tofilski, A. (2020). Morphological diversity of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*) in Croatia and Slovenia. *Journal of Apicultural Research*, 60(2), 326-336.
- Ricklefs, R. E., ve Miles, D. B. (1994). Ecological and evolutionary inferences from morphology: an ecological perspective. pp. 13–41 in P. C. Wainwright and S. M. Reilly, eds. *Ecological Morphology*. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Robinson, G. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol.*, 37: 637–665.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E. ve Antonis. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(8), 411-417.
- Rothenbuhler, W. C., ve Kerr, W. E. (1968). Bee genetics’ Ann. Rew. *Genet*, 2, 413-438.
- Ruttner, F. (1975). Die kretische Biene, *Apis mellifera adami*. *Allgemeine deutsche Imkerzeitung* 9: 271-272.
- Ruttner, F. (1988). *Biogeography and Taxonomy of Honey Bees* Springer Verlag. 193 p, Berlin.
- Ruttner, F. (1988a). *Biogeography and taxonomy of honeybees* Springer Verlag, Berlin.

- Ruttner, F. (1988b). Breeding Tecnique and selection for Breeding of Honey bee. G.bread and Sons. Led. Brighton U.K.
- Ruttner, F. (1992). Naturgeschichte der Honigbienen. . Munich: Ehrenwirth.
- Ruttner, F. Tassencourt, L., ve Louveaux, J. (1978). Biometrical Statistical Analysis of the Geographic Variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 363-381.
- Ruttner, F.(1980). *Apis mellifera adami*, *Apidologie*, 11, 385-400.
- Ruttner, F., (1965). Versuch einer Charakterisierung der Carnica-Biene nach ihrem Flügelgeader. *Ustav Vedeckotech Inf MZLVH*, 165-172. Praha.
- Ruttner, F., (1987). *Breeding techniques and selection for breeding of honeybee*. Northern bee Boks. Mytholmroyd, UK.
- Seeley, T. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*, 11: 287–293.
- Seeley, T. (1995). The wisdom of the hive. Cambridge: Harvard University Press.
- Settar, A., (1983). *Ege Bölgesi arı tipleri ve gezginci arıcılık üzerine araştırmalar*. Doktora tezi. Ege Ziraai Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir.
- Sheppard, W. S. ve Meixner, M. D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*. 34: 367-375.
- Sheppard, W. S., Arias, M. C., Grech, A., Meixner, M. D., (1997). *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie* 28:287-293.
- Sheppard, W.S., Berlocher, S.H., (1984). Enzyme polymorphism in *A. m. mellifera* from Norway. *J. Apic. Res.*, 23: 64-69.
- Sheppard, W. S., Molinderer, T. E., Mazzolli, J. A., Stellzer, J. A., Shimanuki, H., (1991b). Gene flow between African and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature*, 349: 782-784.
- Sheppard, W.S., Smith, D.R. (2000). Identification of African-Derived Bees in The America: A Survey of Methods. *Ann. Entomol. Soc. Am* 93(2): 159-176.
- Sheppard, W. S., Soares, A. E., Dejong, D., Shimanuki, H., (1991a). Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie*, 22: 263- 652.
- Skorikov, A. S. (1929b). Eine neue Basis für eine Reision der Gattung *Apis* L. *Reports on Applied Entomology, Leningrad* 4: 249-270. (In Russian with German summary).
- Skorikov, A. S., (1929). Eine neue Basis für eine Revision der Gattung *Apis* L. *Rep Appl Entomology*, 4: 249-264.
- Smith, D. R. (1988). mtDNA Polymorphisms in Five Old World Subspecies of Honeybees (*Apis mellifera* L.) and in New World Hybrids, p:303-312, Horwood, Chichester, England.

- Smith, D. R. (1991). mtDNA and Honeybee (*Apis mellifera* L.) Biogeography, Diversity in the Genus *Apis*, Boulder CO, USA.
- Smith, D. R. ve Brown, W.M. (1988). Polymorphism in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*, 44; 257-260.
- Smith, D. R., (2002). Genetic Diversity in Turkish Honey Bees. *Uludağ Bee Journal*, 3(2):10-17.
- Smith, D. R., Slaymaker, A., Palmer, M., Kaftanoğlu, O., (1997). Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, 28, 269-274.
- Smith, D. R., ve Brown, W.M. (1990). Restriction Endonuclease Cleavage Site and Length Polymorphisms in Mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(1): 81- 88.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F.J. (1973) In introduction to biostatistics, W H & Co., San Francisco.
- Soysal, M. İ. (2004). *Autochthonous Breeds of Domestic Animals in Türkiye (Türkiye yerli hayvan genetik kaynaklarımız)*, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Zootečni Bölümü Tekirdağ, (misoysal@ttnet.net.tr).
- Spinola, M. (1806). Insectorum Liguriaee Species Novae aut Rariores, Quas in Agro Ligustico nuper Detexit, Descripsit, et Iconibus Illustravit Maximilianus Spinola, adjecto Catalogo Specierum Auctoribus jam Enumeratarum, Quae in Eadem Regione Passim Occurrunt, vol. 1. Gravier, *Genuae*, Italy, 159 pp.
- Stevanovic, J.; Stanimirovic, Z.; Radakovic, M.; Kovacevic, S. R. (2010) Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russian Journal of Genetics* 46(5): 603–609.
- Taanman, J.W. (1999). The Human Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410, 103.
- Terzioğlu, E., (1994). *Ülkemizin Biyolojik Çeşitliliği. Çevre ve İnsan*, Çevre Bakanlığı Yayın Organı, Yıl:5, Sayı: 18: 12-14, Ankara.
- Trumbo, S., Huang, Z., Robinson, G.E. (1997). Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*, 41: 151– 163.
- Turan, H. (2011). *Trakya bölgesi balarısında (Apis mellifera L) geometrik morfometrik çalışmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Ünal, G., Özdil, F. (2018). Genetic characterization of Thrace honey bee populations of Turkey: restriction and sequencing of inter cytochrome C oxidase I-II (*CoxI-CoxII*) genes, *Journal of Apicultural Research*, 57:2, 213-218, DOI: 10.1080/00218839.2018.1426347.
- Vries, H.; Biesmeijer, J. (1998). Modelling collective foraging by means of individual behaviour rules in honey-bees. *Behav Ecol Sociobiol*, 44: 109–124.

- 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. ve Tsutsui, N. D. (2006). Thrice out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*, *Science*, 314, 642–645.
- Wilson, E., Holldobler, B. (2005). Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(38): 13367-13371.
- Wilson, E.O. (1971), The insect societies. Belknap Press, Harvard.
- Wilson, E.O., Brown, W.L., (1953). The subspecies concept and its taxonomic application. *Syst. Zool.*, 2: 97-111.
- Wilson, K. G. (2001). Some notes on theoretical constructs: Types and validation from a contextual-behavioral perspective. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 1, 205-215.
- Winston, M. (1987). The biology of the honey bee. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- Wolstenholme, D.R., MacFarlane, J.L., Okimoto, R., Clary, D.O., Wahleithner, J.A. (1987). Bizarre tRNA inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1324-1328.
- Yılmaz, Y., Tüysüz, O., Yiğitbaş, E., Ş., Genç, C., Şengor, A. M. C. (1997). "Pontidlerin Jeolojisi ve Tektonik Evrimi", Karadeniz ve Çevresinin bölgesel ve Petrol Jeolojisi, AG Robinson.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: a primer . *Elsevier Academic*; New York, USA.