



**TRAKYA BÖLGESİNDEKİ BAL
ARILARINDA (*Apis Mellifera* L.) mtDNA
SİTOKROM C OKSİDAZ ALTBİRİM I
(COI) GENİ ANALİZİ**

Gülşah ÜNAL

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: : Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRAKYA BÖLGESİNDEKİ BAL ARILARINDA (*Apis Mellifera* L.)
mtDNA SİTOKROM C OKSİDAZ ALTBİRİM I (COI) GENİ ANALİZİ**

Gülşah ÜNAL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman: Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

TEKİRDAĞ-2016

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Fulya  ZD L danışmanlığında, Gülşah ÜNAL tarafından hazırlanan ‘‘Trakya Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis Mellifera* L.) MtDNA Sitokrom C Oksidaz Altbirim I (COI) Geni Analizi’’ isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Bařkanı: Prof. Dr. Sezen ARAT

 mza:

 ye: Doç. Dr. Fulya  ZD L

 mza:

Yrd. Doç. Dr. Serdar GENÇ

 mza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNDEKİ BAL ARILARINDA (*APIS MELLIFERA* L.) mtDNA SİTOKROM C OKSİDAZ ALT BİRİM I (COI) GENİ ANALİZİ

Gülşah ÜNAL

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

Bu çalışmada, PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemlerinden yararlanılarak Türkiye'nin Trakya bölgesindeki il ve ilçelerinde yetiştirilen bal arısı popülasyonları arasındaki genetik varyasyonun mitokondriyal DNA (mtDNA) Sitokrom C Oksidaz I ile Sitokrom C Oksidaz II geni (COI-COII arası) arasındaki bölgede *XbaI* enzimi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Trakya bölgesinde bulunan 4 il (Tekirdağ, Kırklareli, Edirne ve Çanakkale) ile Gökçeada'nın farklı yörelerini temsil eden 5 lokasyonda toplam 322 adet işçi arı örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında incelenen örneklerde mtDNA COI-COII genleri arasındaki bölgenin *XbaI* enzimi kullanılarak kesilmesi sonucunda üç farklı haplotip elde edilmiştir. Tip 1 olarak adlandırılan I. Haplotipte, 857 bp. lik gen bölgesinin 195. pozisyonunda tek bir *XbaI* kesimi sonucu 662 ve 195 bp. lik kesim profili elde edilmiştir. Tip 2 haplotipinde 115. pozisyonunda meydana gelen ilave bir nokta mutasyonu sonucu (T→C transizyonu) 2. bir kesim noktası daha oluşmuştur ve 662, 115 ve 80 bp. lik kesim profili elde edilmiştir. En nadir görülen Tip 3 haplotipinde ise 199. pozisyonunda meydana gelen G→A transizyonu sebebiyle 195. pozisyonunda görülen *XbaI* kesimi yok olmuş, sadece 115. bp. de meydana gelen tek nokta mutasyonu sonucu tek kesim ve 2 bant (742 ve 115 bp.) elde edilmiştir. Elde edilen haplotipler ve referans olarak temin edilen Kafkas (*A. m. caucasica*), Karniyol (*A. m. carnica*), Makedonya (*A. m. macedonica*) ve Avrupa Esmer arısı (*A. m. mellifera*) örnekleri ile yapılan DNA dizi analizi sonucu elde edilen Komşu Birleştirme Ağacında (Neighbour Joining Dendogram) Tip1 haplotipi, Kafkas arısı ile aynı kümede bulunurken, Tip 2 ve Tip 3 haplotipleri Makedonya ve Karniyol arısı ile aynı kümede yer almıştır. Analiz edilen tüm Trakya örneklerinde Tip1 haplotipi yaygın bulunan haplotip iken (% 58), sadece Kırklareli ve Edirne illerinde Tip 2 haplotipi yaygın haplotip olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ile Türkiye'nin Trakya Bölgesinde Karniyol yada Makedonya arısı veya bunların ekotiplerinin var olduğu gösterilmektedir.

Anahtar kelimeler: Bal arısı, *Apis mellifera* L., mtDNA, COI-COII arası, *XbaI*, PCR-RFLP

2016, 64 sayfa

ABSTRACT

Master Thesis

ANALYSIS OF mtDNA CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT I (COI) GENE IN THRACEN HONEY BEES (*APIS MELLIFERA* L.)

Gülşah ÜNAL

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

In this study, the genetic variation of Thracen honey bees were identified between mitochondrial DNA (mtDNA) Cytochrome C Oxidase I and Cytochrome C Oxidase II genes by using PCR-RFLP (*Xba*I digestion) and DNA sequencing. A total of 322 worker honey bees were collected from 5 different localities; 4 provinces (Tekirdağ, Kırklareli, Edirne and Çanakkale) and Gökçeada island near Thrace. Three different haplotypes were identified using *Xba*I restriction in inter COI-COII genes. In most of the samples there is only one restriction site in position 195 of the 857 bp PCR product which gives 662 and 195 bp band profile. We called this haplotype as Type 1. In Type 2 haplotype, there is an additional restriction site at position 115 which is a result of T→C transition and this haplotype gives 662, 115 and 80 bp bands on the agarose gel. The rarely seen third haplotype is found only in two samples. G→A transition at position 199, lacks *Xba*I digesion in position 195 because of that only one restriction site is found at position 115 which gives 742 and 115 bp restriction profile in Type 3 haplotype. DNA sequencing of three different haplotypes and the Caucasian (*A. m. caucasica*), Carniolan (*A. m. carnica*), Macedonian (*A. m. macedonica*) and European dark bee (*A. m. mellifera*) reference samples in inter COI-COII genes were revealed. According to Neighbour Joining Dendogram which were constructed on the basis of allele sharing distances, Type 1 haplotype was clustered in the same branch with Caucasian (*A. m. caucasica*) honey bees whereas Type 2 and Type 3 haplotypes were found in the same branch with Macedonian (*A. m. macedonica*) and Carniolan (*A. m. carnica*) honey bees. Type 1 haplotype was found as common haplotype (58%) in all the samples that were analyzed from Thrace. But on the other hand Type 2 haplotype was widely seen in Kırklareli and Edirne provinces. This results may indicate that Carniolan or Macedonian honey bee subspecies or their ecotypes can be found in Thrace region of Turkey.

Keywords: Honey Bee, *Apis mellifera* L., mtDNA, inter COI-COII, *Xba*I, PCR-RFLP

2016, 64 pages

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bana araştırma olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, bilgileriyle yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Fulya ÖZDİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Labaratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Selen Yatkın'na teşekkür ederim.

Trakya bölgesinden bal arısı örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Devrim OSKAY ile Trakya Arıcılar Birlikleri ve Birlik Başkanlarına ve ayrıca arılıklarını bizlere açarak materyal sağlayan tüm arıcılara teşekkür ederim.

Referans olarak ele alınan bal arısı örneklerinin temin edilmesinde Sırbistan'dan Doç. Dr. Ljubiša Ž. STANISAVLJEVIĆ'e, Yunanistan'dan Dr. Leonidas CHARISTOS'a ve Polonya'dan Doç. Dr. Andrzej OLEKSA'ya ve Prof. Dr. Ahmet GÜREL'e teşekkür ederim.

Son olarak eğitimimin her aşamasına maddi ve manevi destekleriyle benim yanımda olan ve hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili babam, annem ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2016

Gülşah ÜNAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	ii
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1 Bal Arısının Sistematikteki Yeri ve Coğrafi Irklar.....	5
2.2 Mitokondri ve Mitokondriyal DNA (mtDNA) Molekülü	15
2.4 Bal Arısı Mitokondriyel DNA Molekülü	18
2.5 Bal Arılarında Çalışılan Mitokondriyel (mtDNA) Lokuslar	20
2.6 Bal Arılarında Mitokondriyel Genomda Yapılan Genetik Çalışmalar	20
2. 6. 1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	21
2.6.2 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi	23
2.7 Kaynak Özetleri.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1 Materyal.....	37
3.1.1 Materyal ve örnekleme	37
3.1.2 Araç ve gereçler.....	38
3.1.3 Tampon çözeltiler	39
3.2 Yöntem	39
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu	39
3.2.2 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin PCR ile çoğaltılması	40
3.2.3 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin <i>XbaI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi	41
3.2.4 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin DNA dizi analizi.....	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	44
4.1 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin PCR Çoğaltımı	44
4.2 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin <i>XbaI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	45

4.3 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin DNA Dizi Analizi Sonucu	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
6. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	61
Ek 1. DNA Dizi Analizi Sonucu	62



ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Bal arılarının sınıflandırılması	5
Çizelge 2.2 Coğrafi bal arısı alttürlerinin listesi.....	8
Çizelge 2.3 Türkiye’de bulunan 5 farklı <i>Apis mellifera</i> L. alttürü	36
Çizelge 3.1 Örneklerin toplandığı yöreler ve örnek genişliği.....	37
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi.....	38
Çizelge 3.3 Elektroforez ve agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri.....	39
Çizelge 3.4 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusu, primerler, restriksiyon enzimi ve kaynaklar.....	40
Çizelge 3.5 PCR reaksiyonu toplam hacmi 25 µL olacak şekilde laboratuvar koşullarına optimize edilmiştir.....	41
Çizelge 3.6 PCR şartları.....	41
Çizelge 3.7 <i>Xba</i> I reaksiyonu.....	42
Çizelge 5. 1 Örneklerin tiplere göre dağılımı.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Batı bal arısının (<i>Apis mellifera</i> L.) coğrafi dağılımı	9
Şekil 2.2 Türkiye Bal Arısı Alttürlerinin ve Ekotiplerinin Dağılımları	12
Şekil 2. 3 <i>Apis mellifera</i> L.'nin orijini ve evrimi.....	13
Şekil 2.4 Mitokondrinin yapısı	15
Şekil 2.5 Mitokondriyal DNA'nın yapısı	17
Şekil 2. 6 Batı bal arısı (<i>Apis mellifera</i> L.) mtDNA genom haritası	19
Şekil 2.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü	22
Şekil 2.8 PCR döngüsü kullanılarak hedeflenen DNA bölgesinin üssel çoğaltımı.....	22
Şekil 2.9 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları.....	25
Şekil 2.10 <i>Apis mellifera</i> L. mtDNA genomunun restriksiyon haritası.....	28
Şekil 2.11 Üç coğrafi soydaki tRNA ^{leu} ve COII geni arasında yer alan P/P0 ve Q tekrarlarının durumu	29
Şekil 2.12 Substitüsyon (baz değişimi) nükleotitleri küçük harflerle gösterilen COI-COII mitotiplerinin P bölgesi.....	32
Şekil 2.13 Allozim çeşitliliğine dayanarak elde edilen soy ağacı	34
Şekil 2.14 Mikrosatellit verilerine dayanarak elde edilen soy ağacı.	34
Şekil 3.1 Bal arısı örneklerinin alındığı iller	42
Şekil 3.2 <i>Xba</i> I restriksiyon enzimi, restriksiyon yaptığı özgün tanıma dizisi	42
Şekil 4.1 COI-COII intergenik bölgenin PCR ürünleri	44
Şekil 4.2 COI-COII arası <i>Xba</i> I restriksiyon enzimi kesim sonucu.....	46
Şekil 4.3 Tip 1 195.bç'de tek kesim sonucu 195bç ve 632 bç (2 bant).....	47
Şekil 4.4 Tip 2 114.bç'de ve 195.bç'de iki kesim sonucu 114bç, 81bç ve 632bç (3 bant)	47
Şekil 4.5 Tip 3 114 bç'de tek kesim sonucu 114bç ve 713 bç (2 bant).....	48
Şekil 5. 1 Örneklerin Tip 1, Tip 2, Tip 3 olarak Trakya bölgesinde % olarak dağılımı.....	51

SİMGELER DİZİNİ

A	: Adenin Nükleotidi
ADP	: Adenozin Difosfat
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz Çifti
C	: Sitozin Nükleotidi
COI	: Sitokrom C oksidaz I
COII	: Sitokrom C oksidaz II
CO ₂	: Karbondioksit
<i>Cytb</i>	: Sitokrom b Geni
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
ETZ	: Elektron Transport Zinciri
G	: Guanin Nükleotidi
H ₂ O	: Dihydrogen Monoksit
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mtDNA	: Mitokondriyel DNA
nDNA	: Çekirdek DNA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
P	: Fosfor
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SNPs	: Tek Nükleotid Polimorfizmleri
SSR	: Basit Dizilim Tekrarları
STR	: Ardışık Basit Tekrarlar
T	: TiminNükleotid

1.GİRİŞ

Bal arısı dünyanın hemen her yerinde yayılış gösteren ve bal, bal mumu, polen, arı sütü, arı zehri, propolis gibi çeşitli doğal ürünler sağlayarak küresel ekonomiye katkıda bulunan en önemli böceklerden biridir. Bal arılarından elde edilen bu ürünler dışında tüm çiçekli bitkilerin ve aynı zamanda tarımsal ürünlerin de tozlaşmasına katkı sağlamaları ekosistem açısından oldukça önemlidir. Bal arıları tozlaşmaya olan katkıları yönünden ele alındığında, dünyada yetiştiriciliği yapılan en değerli hayvanlar olup tarımsal üretime sağladıkları katkı, bal ve yan ürünleriyle sağladıkları katkıdan çok daha fazladır. Çiçekli bitkilerin yaklaşık 3/4'ü böcekler tarafından, büyük çoğunluğu da bal arıları tarafından döllenenmektedir (Fries 1993, Kaftanoğlu ve Kumova 1989, Özbilgin ve ark. 1999).

Dünyada yetiştiriciliği yapılan çoğu ırkın çeşitli sebeplerden dolayı yok olma riski altında olduğu ve bu durumun dünya tarımsal üretimini gelecekte olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. Anadolu'nun ilk ve en eski tarımsal üretimin yapıldığı alanlardan biri olduğu düşünüldüğünde, bu coğrafyada yerli gen kaynakları bakımından kayıpların olduğu bilinmektedir. Bu süreç günümüzde gün geçtikçe artan bir ivme ile devam etmekte, farklı türlerden çeşitli genotiplerde hızlı bir azalma meydana gelmektedir. Ekonomik verimleri yeterli seviyelerde olmamasına rağmen, yetiştirildikleri coğrafi bölgelere özgü koşullara son derece iyi uyum sağlamış olan yerli ırklar, bazı hastalıklara karşı dirençli olmakta, en kötü çevre şartlarında bile ürün verebilmekte ve üreme yeteneklerini en kötü koşullarda bile devam ettirebilmektedirler. Yerli gen kaynaklarının taşıdıkları bu niteliklere ne zaman gereksinim duyulabileceğini şimdiden tahmin etmek güç olmakla beraber imkansız da değildir. Bu gen kaynaklarının varlıklarını sürdürebilmeleri için sahip oldukları üstün niteliklerinin ortaya çıkarılması ve bu özelliklerden yararlanılması ancak bu hayvanların güncel yöntemlerle tanımlanmasıyla mümkün olabilecektir (Ertuğrul ve ark. 2000).

74-146 milyon sene önce çiçekli bitkilerin ortaya çıkmasıyla birlikte 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. Böcekler sınıfının *Hymenoptera* takımına ait olan arılar ise Kretase döneminde günümüzden yaklaşık 100 milyon yıl önce çiçekli bitkilerle aynı zamanda ortaya çıkmışlardır. Böcekler dünyasındaki en önemli gelişmelerden biri de, gerçek sosyal arıların ortaya çıkmasıdır. Çiçekli bitkilerin tozlaşması (polinasyon) için arılara, arıların da

beslenmesi için çiçekli bitkilere gereksinimleri vardır. Arkeolojik bulgularda bu iki canlı grubunun aynı zamanda evrimleştiği gösterilmektedir. Arıların yaklaşık 120 milyon yıl önce evrimleştiği düşünülmektedir (Milner 1996).

Bilinen en eski fosil arı, iğnesiz arı *Trigona prisca*, ABD'nin New Jersey eyaletinde bulunmuştur (Milner 1996). Dünyanın en yaşlı ilkel bal arısı fosili, 50 milyon yıldan daha uzun zamandır Baltık kehribarında korunarak bu güne kadar gelmiştir. Bugünkü Hindistan'ın iklim koşullarına benzer özellik gösteren Avrupa'da Almanya'nın Güney Batısı'nda bulunan *Apis* cinsi bal arısı, fosil kalıntılarının erken Miyosen bölümüne ait olduğu bildirilmiştir (Adam 1987). Günümüzde *Apis* cinsi içinde yaygın olarak bilinen 4 tür bulunmaktadır. *Apis mellifera* türü hariç diğerleri Doğu arıları olarak tanınmakta ve Asya'da yaşamaktadırlar. *Apis dorsata* ve *Apis florea* belirli özellikler bakımından ilkel yapıdadırlar. Diğer iki bal arısı türü olan *Apis mellifera* ve *Apis cerana* arıları, birbirlerine yakın özellikler göstermelerine rağmen, *Apis mellifera*'nın *Apis cerana*'dan Tersiyer zamanının son döneminde fiziksel olarak tamamen farklı iki türe ayrıldığı bildirilmektedir (Milner 1996).

Türlerin yayılma alanlarını belirleyen faktörlerin başında iklim gelmektedir. Avrupa'da yaşanan son buzul çağı İngiltere'den Rusya'ya ve oradan da daha doğuya ilerlemiştir. Bal arıları buzul çağıdan etkilenmeyen İber, İtalya ve Balkan Yarımadaı'nda yaşamlarını sürdürebilmişler. Buzul çağı sona erdikten sonra, Balkan Yarımadaı'ndaki arılar kuzeye, Alp'lerin doğusuna ve Rusya'nın Kuzeydoğu sınırına doğru yayılım göstermişler. İtalyan arısı *Apis mellifera ligustica*, bariyer görevi gören Alp dağlarından geçememiş ve kuzeye doğru gidememiştir. Kuzey Afrika'nın bal arısı ırkı olan *Apis mellifera intermissa* son buzul çağında İber Yarımadaı'nda yaşamını sürdürebilmiştir. Buzul çağı bittikten sonra bu arı ırkı Batı Avrupa'ya doğru yayılarak bu bölgedeki bal arılarının kökenini oluşturmuştur (Adam 1987).

Avrupa'nın son buzul çağında soğuktan göç eden bitki ve hayvan türlerinin, Balkanlar ve Kafkasya üzerinden Anadolu'ya geldikleri, kuzeyden gelen bu göçlerle beraber güneyden ve doğudan da bazı türlerin Anadolu'ya geldiği düşünülmektedir. Avrupa bal arılarının da bu dönemde Avrupa'dan Anadolu'ya gelme olasılığı oldukça yüksektir (Smith 2002). Ülkemizde yapılan mtDNA çalışmalarının sonucuna göre Anadolu ve Kafkas arılarının, Doğu Avrupa grubunda bulunduğu ve Smith ve ark. (1997), Özdi (2007), Özdi ve ark. (2007) Türkiye bal arısı popülasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir.

Bal arısı, binlerce yıl önce insanoğlunun dikkatini çekmiş, bal avcılığıyla başlayan ilk girişimden sonra, arıların sepet veya kütük benzeri yuvalara alınmasıyla ilk arıcılık faaliyetleri başlamıştır. Bal arısı 17. yüzyıla kadar sadece Avrupa, Afrika ve Yakın Doğu'da yayılarak gelişme göstermiş 17. yüzyıldan itibaren insanlar vasıtasıyla Kuzey Amerika (1622) ve Avustralya'ya (1822) doğru yayılmıştır. 19. Yüzyılın ortalarından sonra arı biyolojisinin bilinmesiyle, bal arılarının çiftleşme davranışının diğer çiftlik hayvanlarından olan farkı ortaya konmuştur. Diğer çiftlik hayvanları binlerce yıldır insan denetiminde üredikleri ve ıslah edildikleri halde, bal arısı 19. yüzyılın sonlarına kadar bu gelişmelerin dışında kalmıştır (Fıratlı 1988).

Yerli gen kaynaklarının korunması ve ekonomik üretimlerinin devam ettirilebilmesindeki ilk ve en önemli aşama bu ırkların, morfolojik, biyokimyasal ve genetik yapılarının çeşitli boyutlarda tanımlanmasıdır. Gen kaynaklarının korunması kapsamında koruma altına alınacak gen kaynaklarının tamamının süresiz olarak elde tutulmasındaki bazı zorluklar koruma altına almada öncelik verilecek ırkların genetik yapılarının ve ırklar arasındaki genetik ilişkilerin ortaya konulmasını zorunlu hale getirmektedir. Herhangi bir ırkın tanımlanmasında morfolojik özellikler, kan grupları ve biyokimyasal genetik polimorfizmleri gibi klasik yöntemlere ek olarak, son yıllarda çekirdek (nükleer) DNA (nDNA) ve mitokondriyel DNA (mtDNA) moleküllerindeki farklılıkları doğrudan hedef alan güncel yöntemler de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Whitfield ve ark. 2006, Özdil 2007, De la Rua ve ark. 2009).

PCR teknolojisinin geliştirilmesiyle, RAPD, RFLP, AFLP, mikrosatellit ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar bal arısı populasyonlarının tanımlanması, orijinlerinin belirlenmesi ve filogenetik ilişkilerin ortaya konması gibi birçok konuda oldukça yararlı ipuçlarının elde edilmesini sağlamıştır. Bu tip markerler ile yapılan araştırmalar morfometri çalışmalarıyla da desteklenerek daha doğru sonuçların ortaya çıkmasını sağlamış ve günümüzde farklı bal arısı alttürlerine özgü çok sayıda DNA markeri tespit edilmiştir (Moritz ve ark. 1986, Crozier ve Garnery 1991, Hall ve Smith 1991, Garnery ve ark. 1991, 1992, 1995, Arias ve Sheppard 1996, Smith ve ark. 1997, Franck ve ark. 1998, 2000a, 2000b, Palmer ve ark. 2000, De La Rua ve ark. 2001, Özdil ve ark. 2009).

Bal arısı genomunun detaylı bir şekilde ortaya konulmasına yönelik olarak 2003 yılında "Honeybee Genome" başlıklı bir proje başlatılmıştır. "The Honeybee Genome

Sequencing Consortium” tarafından yürütülen projede diğer türlerde olduğu gibi bal arısına ait tüm genom ortaya konmuş genbankası kayıtlarına eklenmiştir (Whitfield ve ark. 2006).

Bu tez çalışmasında, Trakya bölgesindeki bal arısı populasyonlarında, mtDNA sitokrom C oksidaz altbirim I (COI) geninde mtDNA varyasyonları araştırılarak, Trakya arısına özgü mtDNA lokusları belirlenmiş, DNA barkodlamada yaygın olarak kullanılan COI geninde Trakya arısına özgü olası genetik profil tespit edilmeye çalışılmıştır. Populasyonlar içi ve populasyonlar arası genetik benzerlik ve farklılıklar tespit edilerek olası genetik ilişkiler ortaya konulmaya çalışılmıştır. Son olarak referans olarak ele alınan saf Karniyol arısı (*A. m. carnica*) ve Kafkas (*A. m. caucasica*) alttürleri ile olan genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bal Arısının Sistematikteki Yeri ve Coğrafi Irklar

Yeryüzündeki bütün türler taksonomik bir sistem içinde sınıflandırılırlar. Taksonomi, hiyerarşi ile en üst kategoriden en alt kategoriye doğru ilerler. Bu kategoriler; alem, şube, sınıf, takım, familya, cins ve türdür. Arkeler, ökaryotlar ve bakteriler üç-ana sisteminin (three domain system) temel gruplarıdır. Arılar da dahil olmak üzere tüm hayvanlar ökaryotlar içinde sınıflandırılır. Bal arılarının kökeni 70 milyon yıl öncesine dayanmaktadır (Linksvayer ve ark. 2012). Tüm bal arısı türleri, Hymenoptera takımı, Apidae familyası içindeki *Apis* cinsinde yer almaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Bal arılarının sınıflandırılması (Engel 1999)

Alem	Animalia
Filum	Arthropoda
Sınıf	Insecta
Takım	Hymenoptera
Familya	Apidae
Cins	<i>Apis</i>
Türler	<i>Apis andreniformis</i>
	<i>Apis binghami</i>
	<i>Apis cerana</i>
	<i>Apis dorsata</i>
	<i>Apis florea</i>
	<i>Apis koshevnikovi</i>
	<i>Apis laboriosa</i>
	<i>Apis mellifera</i>
	<i>Apis nigrocincta</i>
	<i>Apis nuluensis</i>

Bu güne kadar *Apis* cinsine ait 10 tür tanımlanmıştır (Engel 1999, Arias ve Sheppard 2005). İki farklı genomik bölge (ND2 mitokondriyal geni ve EF1- α intron) üzerinde yapılan

moleküler bir çalışmada *Apis* içerisindeki filogenetik ilişkiler ortaya konmuştur. Filogenetik analizler, bal arılarını üç büyük kümede gruplayan morfometrik analiz sonuçlarını güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bu gruplar;

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

Ruttner ve ark. (1978) 'e göre dünyada yaygın bulunan bal arısı türleri 4 türde incelenmektedir;

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

Batı bal arısının haricindeki üç bal arısı türü Asya kıtasında yer almaktadır. Türkiye'de bulunan bal arıları, Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) türü içinde sınıflandırılmıştır. Batı bal arısı Afrika, Avrupa ve Orta Doğu'yu da kapsayan çok geniş bir coğrafyada yayılım göstermektedir (Ruttner ve ark. 1978, Ruttner 1988).

İlk yapılan çalışmalarda *Apis mellifera* bal arısının morfometrik karakterlere dayanarak tanımlanmış 24 alttürü (son olarak 26) ; ilk olarak 3 (Ruttner ve ark. 1978) ve daha sonra 4 (Ruttner 1988) farklı evrimleşmiş soy hattı içerisinde gruplandırılmıştır. Afrika alttürleri (*A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. adansonii*, *A. m. capensis*, *A. m. unicolor*) A soyu; Batı Avrupa ve Kuzey Afrika alttürleri (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. saharensis*) M soyu; Doğu Avrupa, Kuzey Akdeniz ve Orta Doğu alttürleri (*A. m. sicula*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. cecropia*, *A. m. macedonica*, *A. m. anatolica*, *A. m. adami*, *A. m. cypria*, *A. m. syrica*, *A. m. meda*, *A. m. caucasia*, *A. m. armeniaca*) C soyu şeklinde gruplandırılmıştır. Morfolojik analizlere dayanarak Orta Doğu alttürleri (*A. m. anatolica*, *A. m. adami*, *A. m. cypria*, *A. m. syriaca*, *A. m. meda*, *A. m. caucasica*, *A. m. armeniaca*) O soyu olarak adlandırılmış ve 4. soy hattı içinde tanımlanmıştır. Ancak mitokondriyel analizler sonucu, *A. m. anatoliaca*, *A. m. adami*, *A. m. cypria*, *A. m. meda*, *A. m. caucasica* ve *A. m. armeniaca*'nın C soyu içerisinde

değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Smith ve ark. 1997, Adl ve ark. 2007, Özdi1 2007, Güler 2007)

Ruttner (1988) farklı coğrafyalarda bulunan batı bal arısı alttürleri (Çizelge 2.2) çizelgesine sonradan yapılan çalışmaların katkısıyla *A. m. ruttneri* ve *A. m. pomonella* olmak üzere iki yeni alttür daha ilave edilmiştir (Sheppard ve ark. 1997, Sheppard ve Meixner 2003). Malta adasının endemik bal arıları, morfolojik özellikleri bakımından yapılan diskriminant analizi sonuçlarına göre ayrı bir coğrafi ırk olarak belirlenmiş ve *Apis mellifera ruttneri* olarak adlandırılmıştır. Davranışsal özellikleri ve mtDNA analizi, Sicilya'nın endemik bal arısı *A. m. sicula* alttürüne benzer şekilde bulunmuş ancak, *Apis mellifera ruttneri*'nin Avrupa alttürlerinden çok Kuzey Afrika'nın *A. m. intermissa* alttürü ile daha yakın ilişkide olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, Orta Akdeniz bölgesindeki adalarda bal arısı popülasyonları arasında paylaşılan bir evrimsel tarih olduğu fikrini desteklemektedir (Sheppard ve ark. 1997). Orta Asya'nın Tien Shan Dağlarındaki endemik bal arıları morfometrik analizlere dayanarak yeni bir alttür olarak, *Apis mellifera pomonella* tanımlanmıştır. Ölçülen morfometrik özelliklerin, temel bileşenler ve diskriminant analizi sonucu bu bal arıları açık bir şekilde evrimsel doğu soy grubu içerisinde yer almıştır. Ancak bu grup içerisindeki diğer alttürlerden de ayrılmışlardır. Yeni tanımlanan bu bal arısı alttürünün ortaya çıkışı, endemik *Apis mellifera*'nın dağılım alanını önceden tahmin edilenden 2000 km daha doğuya doğru genişletmektedir. *Apis mellifera pomonella*'nın mtDNA dizi analizi sonuçları, bu alttürün C mitokondriyal soyu (O ve C morfolojik soylarının her ikisini de içeren bir grup) içerisinde değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Shepard ve Meixner 2003).

Çizelge 2.2 Coğrafi bal arısı alttürlerinin listesi (Ruttner 1988)

- I. Yakın Doğu (O)
 1. *Apis mellifera anatoliaca* Maa (1953)
 2. *Apis mellifera adami* Ruttner (1975)
 3. *Apis mellifera cypria* Pollmann (1879)
 4. *Apis mellifera syriaca* Buttel-Reepen (1906)
 5. *Apis mellifera meda* Skorikov (1929)
 6. *Apis mellifera caucasica* Gorbachev (1916)
 7. *Apis mellifera armeniaca* Skorikov (1929)
- II. Tropik Afrika (A)
 8. *Apis mellifera lamarckii* Cockerell (1906)
 9. *Apis mellifera yemenitica* Ruttner (1975)
 10. *Apis mellifera litorea* Smith (1961)
 11. *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (1836)
 12. *Apis mellifera adansonii* Latreille (1804)
 13. *Apis mellifera monticola* Smith (1961)
 14. *Apis mellifera capensis* Escholtz (1821)
 15. *Apis mellifera unicolor* Latreille (1804)
- III. Akdeniz
 1. Batı Akdeniz (M)
 - a) Kuzey Afrika
 16. *Apis mellifera ruttneri* Sheppard (1997)
 17. *Apis mellifera sahariensis* Baldensperger (1924)
 18. *Apis mellifera intermissa* Buttel-Reepen (1906)
 - b) Batı Akdeniz ve Kuzey Avrupa
 19. *Apis mellifera iberica* Goetze (1964)
 20. *Apis mellifera mellifera* Linnaeus (1758)
 2. Orta Akdeniz ve Güneydoğu Avrupa (C)
 21. *Apis mellifera sicula* Montagano (1911)
 22. *Apis mellifera ligustica* Spinola (1806)
 23. *Apis mellifera cecropia* Kiesenwetter (1860)
 24. *Apis mellifera macedonica* Ruttner (1987)
 25. *Apis mellifera carnica* Pollmann (1879)
 26. *Apis mellifera pomonella* (2003)

Yemen bal arısı (*A. m. yemenitica*), Kauhausen-Keller (1997) tarafından A soyu içerisinde sınıflandırılmıştır. Ancak daha sonra Franck ve ark. (2001) çalışmalarında Etiyopya'dan temin ettikleri Yemen bal arısını, moleküler yöntemler sonucu Yemenitica (Y) soyu olarak ifade edilen beşinci bir genetik soy içerisinde değerlendirmenin daha uygun olacağını bildirmektedirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Batı bal arısının (*Apis mellifera* L.) coğrafi dağılımı (Ruttner 1988 ve Franck ve ark. 2001)

Batı bal arısı, *Apis mellifera* L. ekonomik, tarımsal ve çevresel önemi olan türler arasındadır. Morfoloji ve genetik özellikleri açısından farklılık gösteren *Apis mellifera*'nın dünyadaki doğal yayılışı genel olarak Afrika, Avrupa ve Orta Doğu'yu kapsamaktadır (Smith 2002). *Apis mellifera* bu yayılma alanlarında farklı alttür ve ırklara sahip olabildiği gibi çoğu yörelerde doğal seleksiyon sonucu oluşan farklı ekotiplere de sahip bulunmaktadır. Ekotipler, çevresel koşullara ve o bölgede uygulanan arıcılık yöntemlerine adapte olduklarından dolayı uygun genotiplerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilecek olan ıslah çalışmalarının temelini oluşturmaktadırlar (Doğaroğlu 2013). Dünyadaki tüm bal arıları genellikle *Apis mellifera*, *Apis dorsata*, *Apis florea* ve *Apis cerana* olmak üzere Apidae familyasına bağlı dört tür

altında incelenmektedir. Coğrafi dağılımları esas alındığında bal arıları genel olarak Doğu bal arıları, Afrika bal arıları ve Batı bal arıları olmak üzere üç bölüm altında incelenirler. Ekonomik değeri en yüksek ırklar olarak gösterilen Batı arıları Esmer arı (*A. m. mellifera*), İtalyan arısı (*A. m. ligustica*), Karniyol arısı (*A. m. carnica*) ve Kafkas arısı (*A. m. caucasica*) ile temsil edilmektedir (Doğaroğlu 2013).

Siyah renkli esmer bal arıları (*A. m. mellifera*) genel olarak kuzey ve batı Alpler ile Rusya’ da dağılım göstermektedirler. Yavru üretimindeki düşük performansları ve hırçın olmaları sebebiyle çok fazla tercih edilmezler. Diğer ırklar ile melezleşmeleri durumunda başarılı sonuçlar alınabilmekle birlikte hırçınlık sorunu ile karşılaşılabilceği belirtilmiştir Buna karşılık çok güçlü üreme eğilimi ve iyi huylu oluşuyla beraber Akdeniz iklimi ve benzer iklimlerde çok iyi performans gösteren İtalyan arısının dünyadaki en gözde ırklardan biri olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Doğaroğlu 2013). İlkbaharda çok iyi gelişim gösterebilen ve kuluçka üretiminde yüksek performans gösteren Karniyol arıları (*A. m. carnica*) sakin karakterdedirler ve kışlama özellikleri oldukça gelişmiştir. Bu özellikleri en çok tercih edilen ırklardan biri olmalarını ve melezleme çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Orta Kafkaslar’dan köken alan Kafkas arısının (*A. m. caucasica*) sessiz ve sakin bir ırk olarak arı ıslahı açısından çok değerli özelliklere sahip bir ırk olduğu belirtilmiştir Bütün bu ırkların yanı sıra zorlu çevre koşullarında bal tüketimini en aza indirmesi ve bu sayede bal biriktirebilme potansiyelindeki avantajı sayesinde Anadolu koşullarına iyi adapte olmuş ekotipleri bulunan Anadolu arısının (*A. m. anatolica*) İngiltere’ye götürülerek, dünyadaki en değerli ırklardan biri olan Buckfast arısının meydana getirildiği belirtilmiştir (Doğaroğlu 2013).

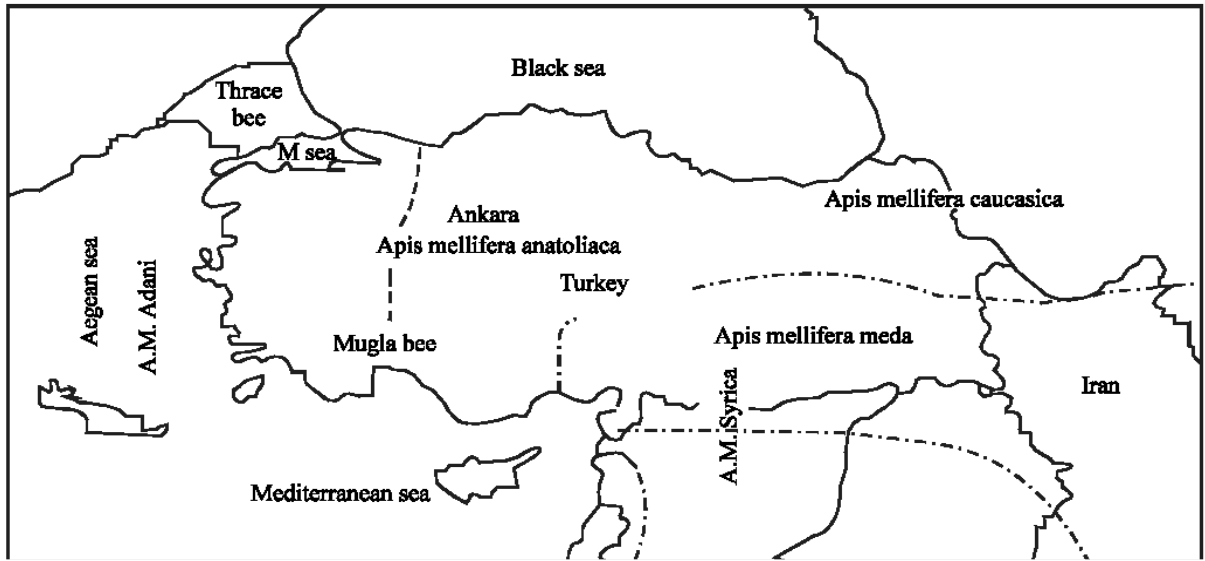
Farklı bölgelerde yayılış gösteren bal arılarının boy, renk, kanat, kanat damarlanması, hastalıklara direnç, oğul eğilimi ve savunma gibi morfolojik, fizyolojik ve davranışsal özellikler bakımından farklılıklar gösterebileceği bilinmektedir (Smith 2002). Morfometrik çeşitliliğin genetik çeşitliliği tam anlamıyla yansıtmadığı bilinmekle birlikte (Kence 2006), morfometrik analizler sonucunda A (Afrika), M (Batı Avrupa), C (Doğu ve Güney Doğu Avrupa) ve O (Orta Doğu) olmak üzere bal arılarına ait dört ana soy hattı belirlenmiştir (Ruttner 1988).

Farklı coğrafi bölgelerden bal arısı örnekleri toplanan bir çalışmada 34 morfolojik özellik ele alınarak temel bileşenler analizi (PCA) uygulanmıştır. Tropik Afrika’dan alınan örnekler ‘A’, Güneydoğu Avrupa ve Orta Akdeniz’den alınan örnekler ‘C’, Batı Akdeniz ve

Kuzey Afrika'dan alınan örnekler 'M' ve Kafkasya ve Yakın Doğudan alınan örnekler 'O' olmak üzere 4 ana soya ayrılmıştır. Bu çalışmada Anadolu bal arısı (*A. m. anatoliaca*); *A. m. caucasica*, *A. m. meda*, *A. m. syriaca*, *A. m. cypria* ve *A. m. adami* arıları ile birlikte Yakın Doğu 'O' soyunda yer aldığı bildirilmiştir (Kauhausen-Keller 1997).

Ülkemizdeki bal arısı populasyonlarının morfolojik, biyokimyasal ve genetik yöntemler ile karakterizasyonu üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (Karacaoğlu ve Fıratlı 1997, Güler ve ark. 1999, Kandemir ve Kence 1995, Kandemir ve ark. 2000, Özdil ve ark. 2009). Morfometrik çeşitlilik, allozim, mitokondriyel DNA ve mikrosatellit çalışmaları bal arılarının sınıflandırılmasına açıklık getirmiştir. Bu alanda çalışan birçok araştırmacının ortak görüşü Anadolu'da çeşitli arı ırk ve ekotipleri olduğu yönündedir (Kandemir ve ark. 2000).

Türkiye'deki bal arılarının çeşitliliğinin araştırılması ve bal arılarının sınıflandırılması çalışmaları ilk olarak Bodenheimer (1941) tarafından morfometrik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bodenheimer, Türkiye'de sekiz grup bal arısı alttürü olduğunu bildirmiştir. Daha sonra Maa (1953), morfometrik yöntemle Anadolu arılarının diğer bölge arılarından farklı olduğunu göstermiş ve bu bölgedeki arıları Anadolu arısı (*A. m. anatoliaca*) olarak isimlendirmiştir. Adam (1987), morfometrik ve davranışsal özelliklerine göre kolonileri sınıflandırmış ve Bodenheimer'e benzer sonuçlar bildirmiştir. Ruttner (1988), morfometrik yöntemle incelediği Türkiye bal arısı populasyonunu, Orta Anadolu'da Anadolu arısı (*A. m. anatoliaca*), Kuzeydoğu Anadolu'da Kafkas arısı (*A. m. caucasica*), Güneydoğu Anadolu'da İran arısı (*A. m. meda*) olmak üzere üç grupta sınıflandırmıştır (Şekil 2.2). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan bal arısı populasyonlarının morfometrik yönden ırk ve ekotip düzeyinde tanımlanması çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Öztürk 1990, Doğaroğlu ve ark. 1992, Öztürk ve ark. 1992, Budak 1992, Kaftanoğlu ve ark. 1993, Genç ve Fıratlı 1999, Eryümlü 1999, Kandemir ve ark. 2000, Güler ve ark. 2002, Çınar 2006, Akyol ve ark. 2006).



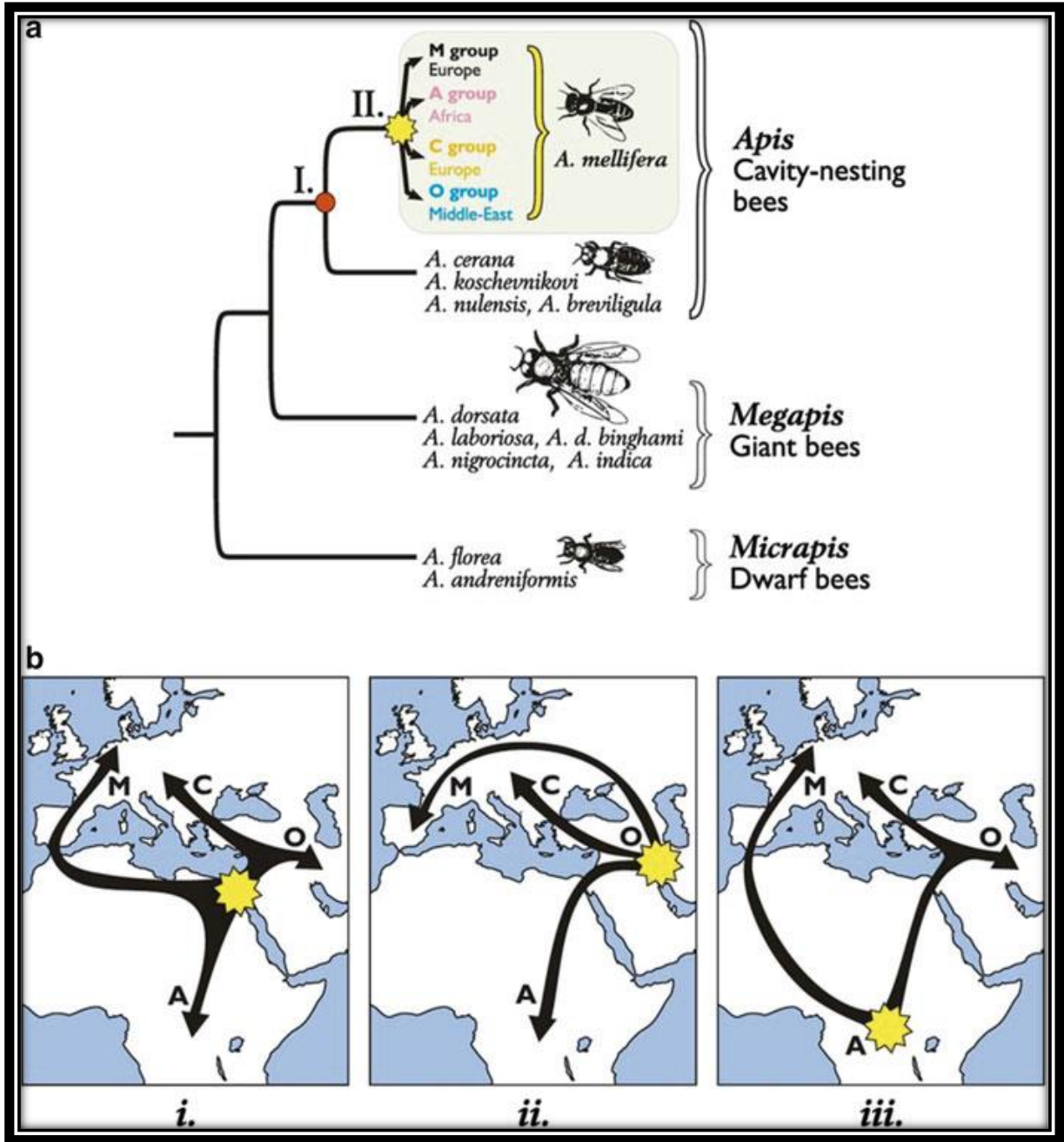
Şekil 2.2 Türkiye Bal Arısı Alttürlerinin ve Ekotiplerinin Dağılımları (Akyol ve ark. 2006)

Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) orijini, evrimi ve coğrafi yayılışı üzerine farklı hipotezler söz konusudur.

i. Batı bal arısı popülasyonlarının Yakın Doğu'dan orijin alarak üç farklı yol ile Avrupa ve Afrika kıtalarına yayılım göstermektedir (Şekil 2.3) (Ruttner 1988).

ii. Mevcut *Apis mellifera* popülasyonlarının evrimi ve orijini, filogenetik ağaçtaki pozisyonları ve mtDNA'larının coğrafi orijinleri arasındaki ilişki vasıtasıyla desteklenmektedir (Garnery 1992). Bu hipotez Orta Doğu'dan başlayarak Avrupa'ya dağılımını da kapsayan Doğu ve Batı güzergahı yolu ile yayıldığı belirtilmiştir (Şekil 2.3).

iii. Wilson (1971) tarafından önerilen ve Whitfield ve ark. (2006) tarafından da desteklenen yeni bir moleküler belirleyici (SNPs) ile yapılan bir çalışmada ise; *A. mellifera*'nın Afrika'dan orijin aldığı ve Avrasya'ya en az iki farklı yoldan yayıldığı belirtilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 *Apis mellifera* L.'nin orijini ve evrimi (Gupta 2014)

Bal arısı populasyonlarında gözlenen varyasyonların, populasyonların yaşadıkları yerleşim içerisindeki adaptasyonları ve tarihsel süreç olmak üzere iki ana faktörden köken aldığı belirtilmiştir (Smith 2002). Küçük izole grupların, yeni genetik mutasyonların ortaya çıkması ve populasyon içerisinde hızla yayılmasından dolayı kolaylıkla farklılaşabileceği, bu farklılaşmada mutasyonun beraberinde getirdiği avantaj ve dezavantajların çok büyük önemi olduğu bildirilmiştir (Smith 2002). Bal arısı populasyonları arasında ortaya çıkan bu genetik farklılıkların araştırılması ve aydınlatılması ekonomik açıdan çok önemlidir.

Bal arılarının genetik farklılıklarının ortaya konulmasında enzim ve mtDNA farklılıkları üzerine gerçekleştirilen çalışmalar oldukça başarılı sonuçlar vermektedir (Smith 2002). Ülkemizde gerçekleştirilen mtDNA araştırmalarının sonuçlarına göre Anadolu ve Kafkas arısının Doğu Avrupa'ya ait olduğu belirtilmiştir (Smith ve ark 1997, Smith 2002). nDNA'dan daha hızlı evrimleştiği için tür ve alttür düzeyindeki ayrımlarda daha avantajlı olan mtDNA (Kence 2006) sonuçlarına göre Türkiye'ye ait örneklerin Doğu Akdeniz soy hattına (Güney ve Doğu Avrupa) ait olduğu bildirilmiştir (Smith ve ark. 1997).

Yapılan araştırmalar sonucunda Trakya'dan toplanan Anadolu arısı örneklerinin büyük çoğunluğunun Karniyol arısıyla benzer genetik karakter gösterdiği, Erzurum, Muş, Bitlis ve Van illerine ait örneklerin büyük bir bölümünün Kafkas ırkına ait olduğu, Hatay ili örneklerinin yarısından daha fazlasının Suriye arısını temsil ettiği bildirilmiştir (Smith 2002). Anadolu, Kafkas, İran ve Suriye olmak üzere Türkiye' de 4 ırktan söz edilirken, Anadolu ve Kafkas alttürleri morfometrik verilere bakılarak Orta Doğu soy hattına dahil edilmiştir (Ruttner 1998). Ancak bu alandaki genetik çalışmalar sonucunda, Anadolu ve Kafkas arısının Doğu Avrupa soyuna (C soyu) dahil edilmesi gerektiği ve Karniyol ve İtalyan arıları ile birlikte ele alınmasının daha doğru olacağı bildirilmiştir (Smith 2002).

Anadolu arısının yayılış gösterdiği coğrafyanın çok farklı koşullara sahip olması farklı özelliklere sahip ekotiplerin ortaya çıkmasını da sağlamıştır. Doğaroğlu (1981) Kuzeybatı arılarının Trakya ekotipi ve Güneybatı arılarının Muğla ekotipi olarak sınıflandırılması gerektiğini bildirmiştir.

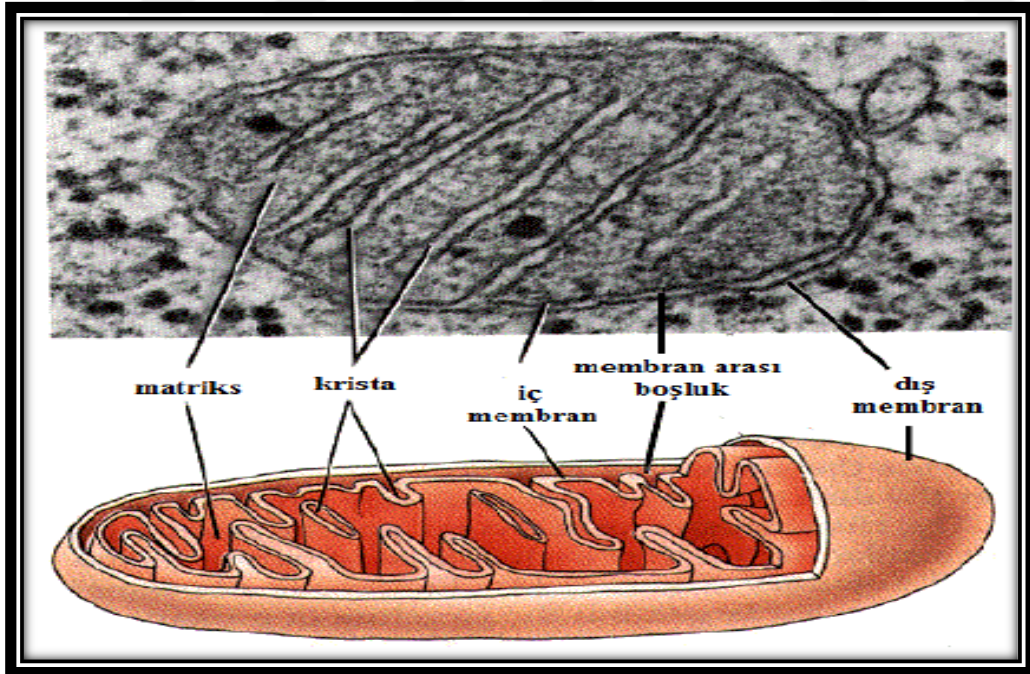
Başka bir ekotip olarak Muğla ili ve civarında Muğla arısı ele alınabilir. Yaşadığı çevre koşullarına adaptasyon yeteneğinin bir göstergesi olarak Muğla arısı asıl nektar akımının sonbahara uzandığı dönemde bal üretimine programlanmış ve çam balı üretim periyodunu esas almıştır (Doğaroğlu ve ark. 1992, Doğaroğlu ve Yücel 2005, Doğaroğlu 2007). Bu bölgede yetiştirilen Muğla arısının Eylül-Ekim aylarında basura salgısına adapte olduğu, ergin arı sayısının artırıldığı ve hırçınlık gösterdiği bildirilmiştir (Yücel ve Kösoğlu 2011).

Trakya bölgesindeki bal arılarının Anadolu'daki bal arılarından daha farklı olduğu, Trakya bölgesindeki bazı arıların Avusturya, Slovenya ve Hırvatistan'da yayılım alanı bulan *A.m. carnica* arıları ile benzer morfolojik ve genetik özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Bu duruma göre Trakya, Balkan ve Avusturya arıları arasında bir melezleme olabileceği ve bu

yüzden Trakya arılarının Balkan ve Anadolu arıları arasında bir köprü konumunda olabileceği bildirilmiştir (Smith 2002).

2.2 Mitokondri ve Mitokondriyal DNA (mtDNA) Molekülü

Mitokondri, tüm ökaryotik canlılarda bulunan bir organeldir (Şekil 2.1) Solak (2000)’e göre mitokondri organeli hakkındaki ilk bilgiler şu şekilde özetlenebilir. Mitokondri, 1850’de Kolliker tarafından ilk kez görüntülenmiş, ancak sistematik olarak tanımlanması ilk kez 1894’de Altman tarafından yapılmıştır. Hücre içerisinde granüler ve ipliksi yapılar şeklinde görülen bu organel 1897’de Benda tarafından “ipliksi granül” anlamına gelen *mitokondrion*, “çoğul: *mitochondria* ” olarak ifade edilmiştir. Mitokondri (*mitochondrion*) kelimesi yunanca iplik (*mitos*) ve granül (*chondrion*) kelimelerinden türetilmiştir. Mitokondri organeli ilk defa Bensley ve Hoerr (1934) tarafından karaciğer hücrelerinden izole edilmiştir. Mitokondrinin oksidatif fosforilasyonun merkezi olduğu 1948’de Eugene Kennedy ve Albert Lehinger tarafından ortaya konulmuştur (Kennedy ve Lehinger 1948). Nass ve ark. (1963) mitokondri organelinin DNA molekülü içerdiğini ilk defa tespit etmişler ve böylece DNA molekülünün sadece çekirdek içinde bulunabileceği düşüncesi yıkılmıştır.



Şekil 2.4 Mitokondrinin yapısı

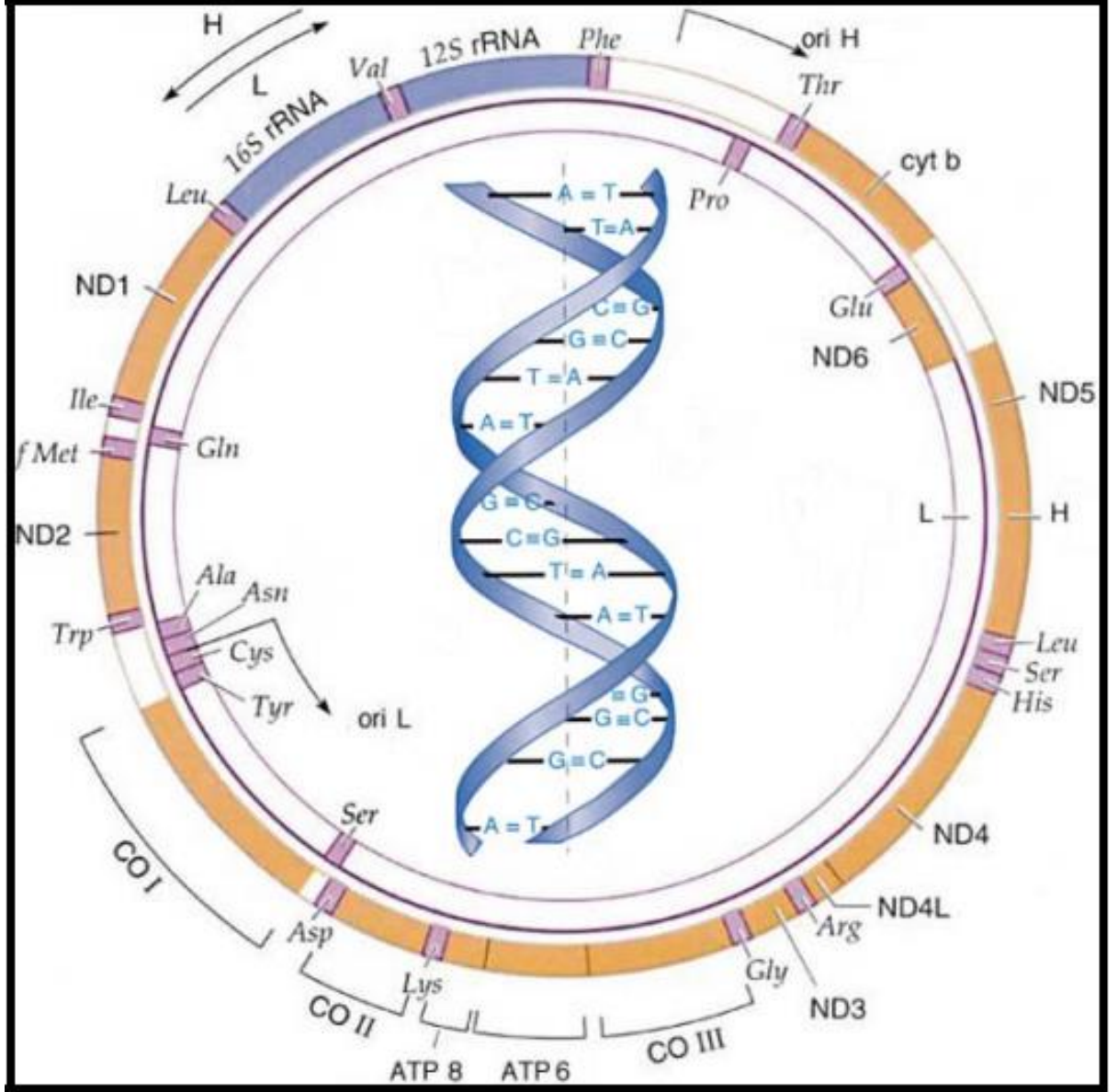
Mitokondri, biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli enerjinin temin edildiği hücrenin en önemli organellerinden birisidir. Bir hücredeki mitokondri sayısı, hücrenin tipine, fonksiyonuna ve enerji ihtiyacına bağlı olarak birkaç adetten binlerceye kadar değişebilir. Karaciğer ve kas gibi yüksek enerji ihtiyacı olan doku hücrelerinde mitokondri sayısı oldukça yüksektir. Mitokondrinin esas görevi hücrede oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleştirilmesidir. Oksidatif fosforilasyon, oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların oksijene aktarılırken açığa çıkan enerji ile ADP'den adenosin tri fosfat (ATP) sentezlenmesi olayıdır. Oksidatif fosforilasyon mitokondrinin iç membranında gerçekleşmektedir. Bunun dışında mitokondri; primidinlerin, aminoasitlerin, fosfolipitlerin, nükleotidlerin, folat enzimlerinin, üre ve diğer birçok metabolitin biyosentezine de katkıda bulunur (Nelson ve Cox 2005).

Mitokondriler bakterilerin çoğalarak bölünmesinde olduğu gibi daha önce var olan mitokondrilerin bölünmesiyle çoğalmaktadır. Hücre bölüneceği zaman mitokondri bölünmektedir. Mitokondri DNA'sı bölünme öncesi ve bölünme esnasında kopyalanır ve kardeş DNA molekülleri kardeş mitokondrilere geçmektedir (Kılıç ve ark. 1999).

Sekansı 1981'de tamamlanan mtDNA, 16.569 baz çiftinen oluşan çift-sarmallı moleküldür (Anderson ve ark. 1981) (Şekil 2.5). Mitokondriyel genom, protein sentezi için 2 ribozomal RNA, 22 transfer RNA ve 13 polipeptid kodlamaktadır. Nükleer genomdan farklı olarak mtDNA'nın kod sekansları intron içermemektedir. Her mitokondri birçok mtDNA kopyasına sahiptir ve bir hücrede yüzlerce mtDNA kopyası vardır (poliplasmi). mtDNA, yapısındaki enzimlerin replikasyonu, transkripsiyonu, translasyonu ve onarımı için nükleer genlere bağımlıdır. Mitokondri bu organelde meydana gelen metabolik yolda rol alan tüm diğer proteinler için nükleer genoma bağımlıdır (Taanman 1999, Leonard ve ark. 2000).

Çekirdek DNA molekülünden bağımsız olarak çoğalan mtDNA molekülünün bu özelliği nedeniyle hücre bölünmesi sırasında heteroplazmik (*heteroplasmy*) bir açılma meydana gelebilmektedir. Heteroplazmi (*heteroplasmy*), bir hücrede iki ya da daha fazla kökene ait (normal ve mutant) farklı mtDNA molekülünün aynı anda bulunması olarak ifade edilmektedir. Bunun dışında; nükleotid eksilmesi (*deletion*), nükleotid ilave edilmesi (*insertion*), nükleotid dönüşümleri (*substitution*), belirli gen bölgelerinde DNA parçalarının farklı uzunluklarda olması ve herhangi bir lokustaki nükleotid dizilimlerinde gözlenen çeşitli değişimler mtDNA molekülünde meydana gelen genetik varyasyonun temel kaynaklarını oluşturmaktadır (Moritz ve ark. 1986, Solignac 1991). mtDNA mutasyonlar, nokta

mutasyonları ve yeniden düzenlenmeleri (delesyon ve duplikasyon) içermektedir. Nokta mutasyonları genellikle maternal geçişlidir; delesyon ve duplikasyonlar ise seyrek görülür (Rokas ve ark. 2003).



Şekil 2.5 Mitokondriyal DNA'nın yapısı

Mitokondriyel genomda anaya ait kalıtım gözlenmektedir (Maternal kalıtım). Sperm, yumurtayı dölleyeceği zaman yumurtanın hücre zarına tutunur ve enzimler vasıtasıyla hücre zarını eritir. Yumurta hücresinin içine sadece kendi DNA'sını bırakır; bu yüzden spermin organelleri ovumun içine girmez. Bu sebeple sperm ya zigota mitokondri vermez ya da verilen mitokondri replikasyon sırasında seçilmektedir, yani memelilerde tüm mitokondri dölle anneden geçmektedir (Passarge 2000).

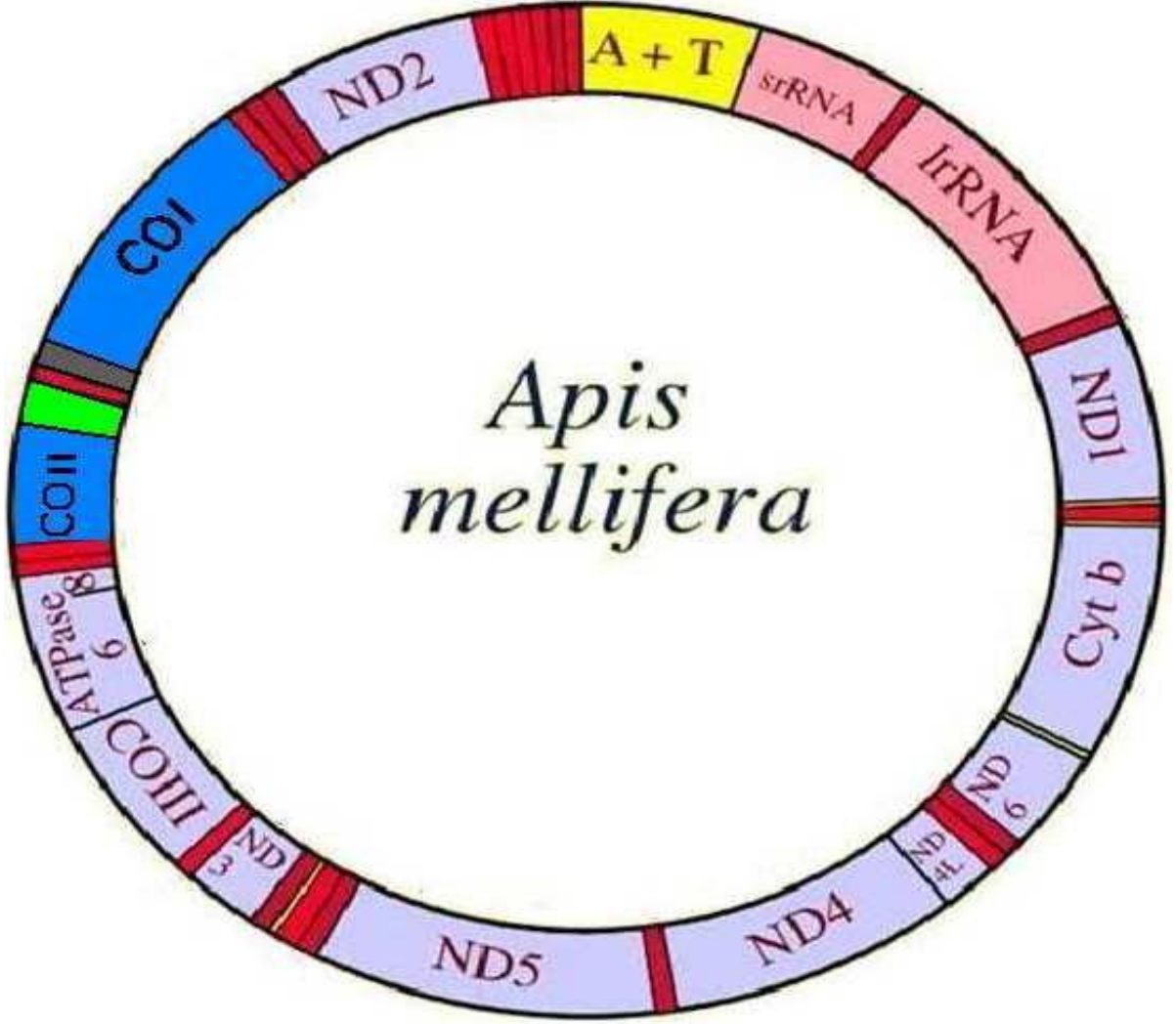
Embriyo gelişimi sırasında, mitokondri dışındaki organeller ortak genlerden yararlanır. Mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber mitokondri nükleer faktörlerin kontrolü altında gelişme esnasında bölünür ve proliferer olur. mtDNA serilerindeki değişiklikler kalıtlılabilir ya da somatik olabilir (doğuştan). İnsan mtDNA'sı muhtemelen mtDNA'nın polimerazlar tarafından doğru okunmasındaki bozukluğa bağlı olarak, nükleer DNA'nın 10-20 katı mutasyon oranına sahiptir. mtDNA'nın maternal kalıtımı populasyonların tanımlanmasında, köken analizlerinde ve adli tıpta kullanılmaktadır (Passarge 2000).

mtDNA, canlıların orjinleri, göç haritalarının çıkarılması, adli tıp, dejeneratif hastalıkların sebebinin araştırılmasında ve kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. mtDNA, genetik olarak klonlanan canlıların kalıtımının tespit edilmesinde yaygın kullanılmaktadır (Rokas ve ark. 2003). mtDNA'nın kodlanan bölgesindeki varyasyonun iyi anlaşılması populasyonların genetik yapısının (filogenetik geçmişinin) belirlenmesinde kullanılmaktadır (Finnilä ve ark. 2001).

2.4 Bal Arısı Mitokondriyel DNA Molekülü

Genel olarak, memeli mtDNA molekülü dairesel bir yapıya sahiptir. Replikasyon orijini yakınındaki kısa bir bölge haricinde, memeli mtDNA'sı sadece herhangi bir gen ürününün sentezinden sorumlu olan gen bölgelerinden (exon) oluşmaktadır. Bu gen bölgeleri fonksiyonel olmayan (intron) bölgeleri içermemektedirler. Avise ve ark. (1987)'a göre mtDNA, çekirdek DNA'sına göre daha hızlı evrimleştiği için türler ve alttürlerin filogenetik çalışmalarında çok değerli bir araç olarak kabul edilmiştir. mtDNA molekülünün iki önemli özelliği bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, mitokondriyel genetik materyal daire şeklinde ve ikili sarmal tek bir DNA molekülünden oluştuğu için çekirdek DNA molekülünde homolog kromozomlar arasında gerçekleşen parça değişimi (crossing-over) meydana gelmez. Buna bağlı olarak da rekombinant döller oluşmaz. İkinci önemli özelliği ise, çoğu türde anaya ait (maternal) kalıtım modeline sahip olmasıdır. mtDNA'nın anaya ait kalıtım modeline sahip olması, mtDNA'nın bal arıları genetik çalışmasında iki nedenden dolayı çok önemlidir. Bunlardan birincisi koloninin tüm bireyleri ana arının döller olduğu için özdeş mtDNA'lar taşırlar ve koloni analizlerde bir birey olarak ele alınır (Garnery ve ark. 1992). İkincisi mtDNA molekülü generasyonlar boyunca büyük ölçüde korunarak dölden döle aktarıldığı için evrim sürecinde anaya ait kalıtım modellerinin belirlenmesinde ve takip edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Özdil 2007).

Bal arısı mtDNA molekülü 16.300–17.000 bp uzunluğunda olup, mitokondri organelinin içerisinde yer alan daire şeklinde iki eksenden oluşan ve toplam 37 gen içeren bir moleküldür. mtDNA, 13 (bazen 12) protein, 22 tRNA, 2 ribozomal RNA kodlayan genlerin alt üniteleri ve kodlama yapmayan (replikasyon kontrol bölgesi) bölgeyi içermektedir (Şekil 2.6) (Moritz ve ark. 1987, Crozier ve Crozier 1993, Moritz 1994).



Şekil 2. 6 Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) mtDNA genom haritası (Crozier ve Crozier 1993)

Sitokrom C oksidaz I, II ve III alt birimlerini kodlayan protein genleri COI, COII ve COIII olarak; sitokrom b geni için cytb, NADH dehidrogenaz (1-6) alt birimleri için ND1-ND6 şeklinde gösterilmiştir. A+T olarak gösterilen bölgenin replikasyon orijini olduğu bildirilmektedir. (Crozier ve Crozier 1993)

2.5 Bal Arılarında Çalışılan Mitokondriyel (mtDNA) Lokuslar

Batı bal arısı alttürlerinin (*Apis mellifera L.*) de içinde yer aldığı tüm bal arısı türlerinde mitokondriyel genomda yapılan genetik çalışmalar ilk kez Smith ve Brown tarafından 1990 yılında başlatılmıştır. Söz konusu çalışmada COI-COII arası bölgede *BclI* restriksiyon enzimi kesimlerinden faydalanılarak 20-100 bp arasında değişen çeşitli uzunluk farklılıklarının varolduğu bildirilmiştir. Daha sonra Cornuet ve Garnery (1991) tespit edilen bu uzunluk farklılıklarına kabul edilebilir açıklamalar getirmişlerdir.

Bal arısı tür ve alttürlerinin tanımlanmasında ve aralarındaki farklılık/benzerliklerin ortaya konmasında kullanılan en önemli mtDNA lokuslarının başında COI-COII intergenik bölgenin çalışılması yer almaktadır. COI-COII intergenik bölge tRNA^{Leu} geni ile COII genleri arasında yer almakta olup, mtDNA molekülünde en çok genetik varyasyonun bulunduğu bölgedir.

2.6 Bal Arılarında Mitokondriyel Genomda Yapılan Genetik Çalışmalar

Populasyonlar ya da bireyler arasında bulunan genetik benzerliklerin/farklılıkların tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda morfolojik, fizyolojik ve genotipik farklılıklar dikkate alınmaktadır. İncelenen hemen her populasyonda bireyler arasındaki farklılıklar hemen göze çarpmaktadır. Doğada birbirinin tamamen aynı olan iki birey elde etmek hemen hemen imkansızdır. Aynı genotipe sahip canlılar arasında bile (tek yumurta ikizleri, vejetatif çoğalan canlılar, klonla çoğaltılan canlılar vs.) bazı fenotipik farklılıklar bulunabilmektedir (Fakhri 2008).

Canlıların evrimi içerisinde populasyonlar içi ve populasyonlar arasındaki farklılıkların/benzerliklerin DNA molekülü seviyesinde belirlenmesi amacıyla daha duyarlı yeni yöntemlerin geliştirilmesine başlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında DNA-DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Basit Dizilim Tekrarları (SSR), Ardışık Basit Tekrarlar (STR), mikrosatellit ler ve DNA dizi analizi (*DNA sequencing*) gibi yöntemler yer almaktadır (Özdil 2007, Fakhri 2008).

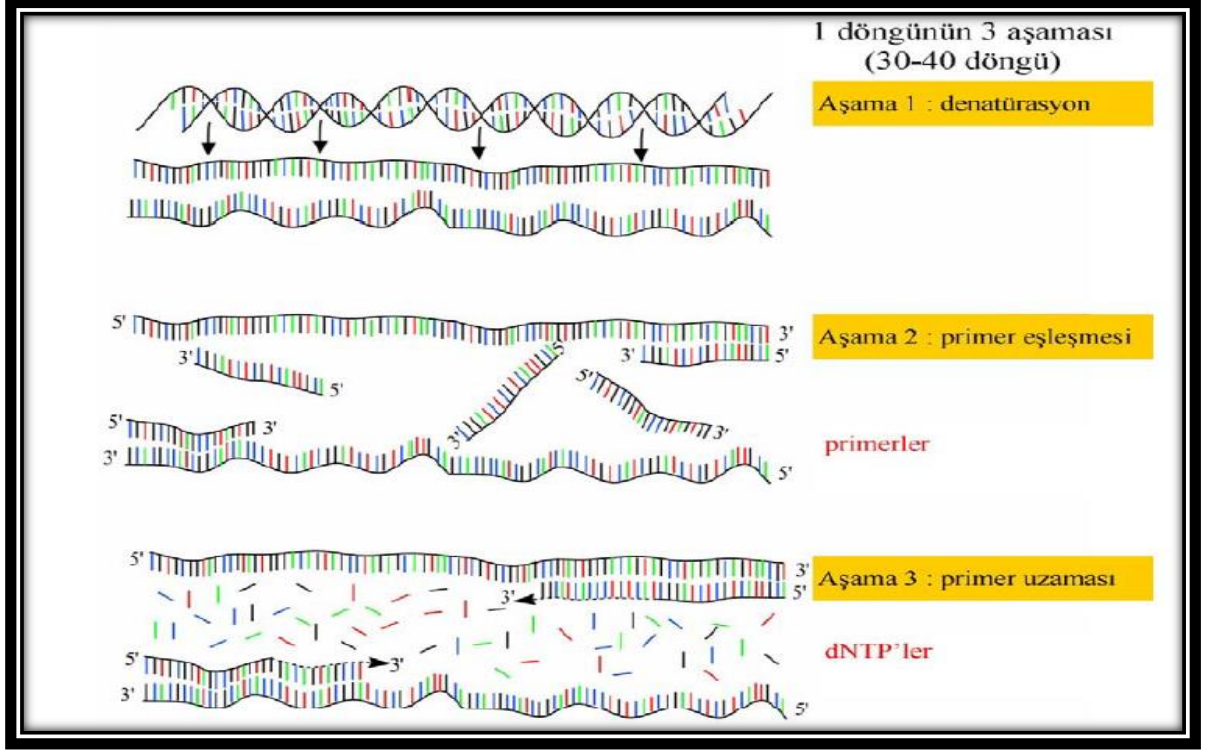
2. 6. 1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970'lerin başında geliştirilmiş ve takip eden yıllarda genetikçilerin ve moleküler biyologların araştırmalarında bir devrim yaratarak, biyoteknoloji endüstrisinde patlamaya neden olmuştur. Daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) adı verilen teknik geliştirilmiş ve biyolojik araştırmalarda hızlı bir şekilde yerini almıştır. PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur. PCR analizi, moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim, adli vakalar ve sistematik çalışmalar gibi pek çok alanda uygulama olanağı bulmuştur (Saiki ve ark. 1985, Mullis ve ark. 1986, Mullis ve Faloona 1987, Mullis 1990).

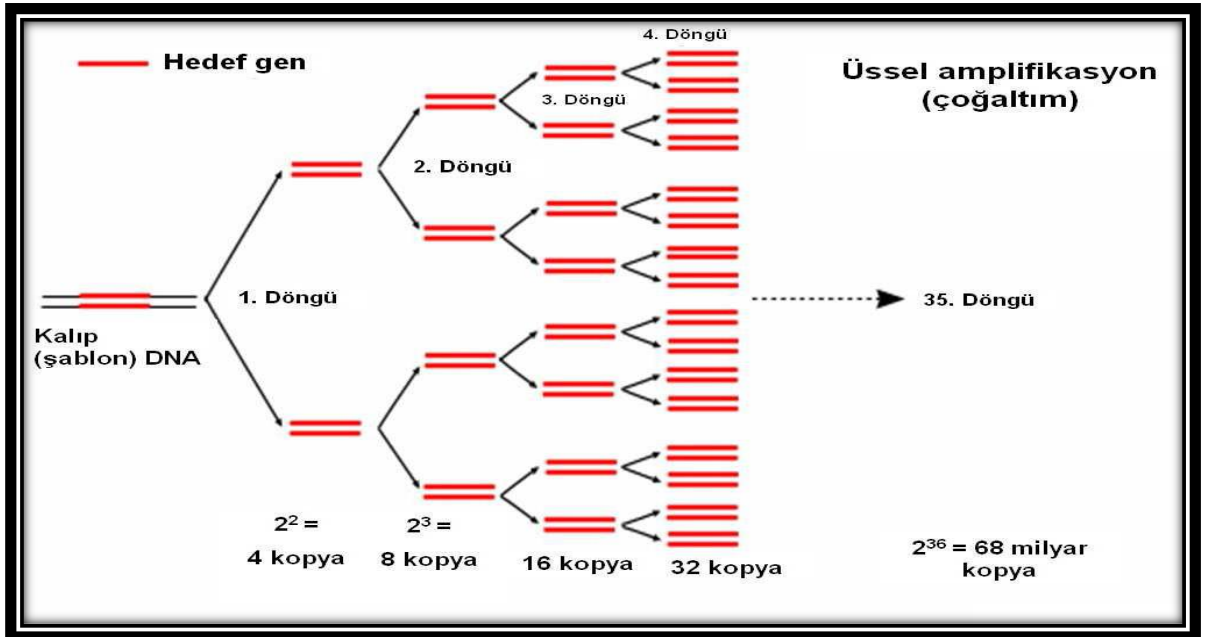
PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin direk çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin kullanılabilmesi için, yok denecek kadar çok az miktarda DNA yeterlidir. PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli maddeler; kalıp DNA, primerler, dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz enzimi, Mg^{+2} ve PCR tampon çözeltisidir. PCR ile belli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Belirli derecede ki ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi sayesinde, çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezi sağlanır (Avisé 2004).

PCR reaksiyonunda gerçekleşen olaylar kısaca şu şekilde gerçekleşir. İlk adımda çoğaltılacak olan DNA 95 °C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilerek tek zincir haline getirilir. Daha sonra sıcaklık 50 °C ile 70 °C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar. PCR reaksiyonuna Taq DNA polimeraz ilave edilir ve DNA sentezi 70 °C ile 75 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi nükleotidleri 5'ucundan 3'ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Belli basamaklardan oluşan PCR reaksiyonunda; kalıp DNA çift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), primerlerin komplementer dizilere bağlanması (annealing) ve polimeraz enzim aktivasyonu ile zincirin uzaması (extension) şeklinde meydana gelen olayların tümüne

“döngü” adı verilir. Bu üç aşamalı PCR döngüsü 30-40 kez tekrarlanarak istenilen kopyada DNA bölgesi çoğaltılmış olmaktadır. Her döngüde DNA molekülü, iki katına çıkarılarak hedeflenen DNA parçacığı üssel bir artışla çoğaltılmaktadır. PCR reaksiyonları “thermocycler” adı verilen PCR cihazlarında, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.7, Şekil 2.8).



Şekil 2.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü



Şekil 2.8 PCR döngüsü kullanılarak hedeflenen DNA bölgesinin üssel çoğaltımı

PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için jel elektroforezi yöntemi kullanılır. Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının boyutlarına göre ayrılmasına ve görüntülenmesine olanak tanıyan bir teknik olması sebebiyle, PCR ürünlerinin görüntülenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Deniz yosunundan elde edilen agaroz, bir tampon çözeltide eritilerek plastik bir tablaya dökülür. Agaroz soğuduğunda DNA parçacıklarının küçük kuyucuklarda hareket edebileceği yatay yarı katı bir jel haline gelir. DNA parçacıklarının farklı boyutlarda görünür hale gelmesi, kullanılan agarozun yüzdesi ile belirlenir. Birçok uygulamada bu oran % 0,5 ile % 2 arasında değişir. Yüksek yüzdede agaroz içeren bir jel (% 2) küçük DNA parçacıklarının ayrılması için daha uygundur. Çünkü küçük parçacıklar yoğun jel ortamında büyük parçacıklara göre daha hızlı ilerler. Düşük agaroz yüzdeli jeller de büyük DNA parçacıklarının ayrılmasına daha uygundur. (Thieman ve Palladino 2013).

Agaroz jel elektrik akımı verilen bir tampon sıvısının içerisine konularak yürütülür. DNA örnekleri kuyucuk olarak isimlendirilen gözlere yüklenir ve elektrotlar yardımıyla jelin karşıt uçlarına elektrik akımı uygulanır. DNA'nın jeldeki boyutu (baz çifti sayısı) ve elektrik yüküyle orantılı bir şekilde göç etmesi gerçeğine dayanır. Şeker-fosfat yapısı DNA'ya negatif yük verir; bu nedenle DNA elektriksiz bir alanda katottan (negatif kutup) uzaklaşarak anoda (pozitif kutup) doğru hareket eder. Tüm DNA'ların, uzunluğu ve boyutuna bakılmaksızın, negatif yüklü olması nedeniyle, hareket hızı ve agaroz jelde ayrılmaları DNA molekülünün boyutuna bağlıdır. Hareket mesafesi DNA boyutu ile ters orantılıdır, yani büyük DNA parçacıkları yavaş, küçük DNA parçacıkları daha hızlı hareket ederler. Elektroforez sırasında DNA'nın hareketini izlemek için izleme boyaları eklenir. Elektroforez uygulaması, izleme boyaları jelin sonuna yaklaştığında sonlandırılır. Jel etidyum bromid gibi DNA baz çiftleri arasına bağlanabilen boyalarla boyanır. Bu boyalarla boyanmış DNA parçacıkları ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında floresan ışığı yayarlar ve bu sayede jelin fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınması sağlanır (Thieman ve Palladino 2013).

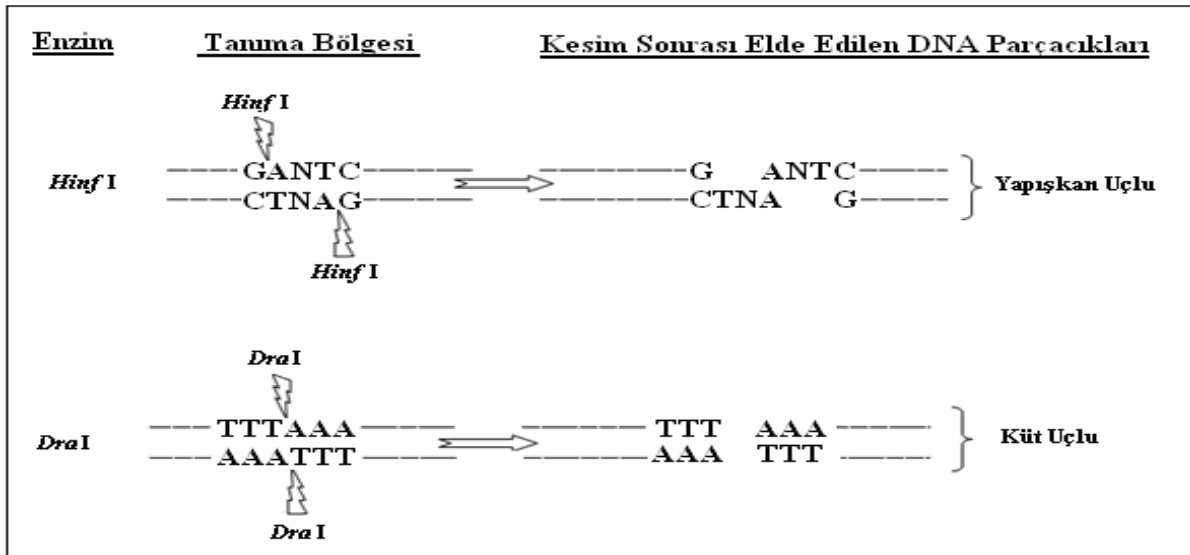
2.6.2 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi

PCR yönteminin geliştirilmesiyle, mtDNA molekülünün PCR ile çoğaltılmış hedef kısmının RFLP analizi, populasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. DNA molekülünde meydana gelebilecek en basit polimorfizm tek nükleotid (SNPs) değişimleridir. PCR-RFLP ya da lokusa özgü RFLP tekniği özgün bir lokusta genetik varyasyonu belirlemek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart PCR işlemi

ile üzerinde çalışılan lokus çoğaltılmakta, uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmekte ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) elde edilmektedir. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modellerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre bireyler arasındaki benzerlik/farklılıklar tespit edilmektedir. Bu yöntemde bireyler arasında ortaya çıkan polimorfizm, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eksilmesi, bir nükleotidin eklenmesi veya bir nükleotidin değişmesi şeklinde ortaya çıkan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, enzimin iki tanıma bölgesi arasında meydana gelen parça ilavesi veya çıkmasıyla oluşan uzunluk farklılıkları da yine RFLP olarak tanımlanmaktadır. PCR-RFLP yöntemi kodominant kalıtım modeline uygun markerler vermektedir. Bu yöntemde rutin PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotid primerler kullanıldığı için güvenilir bir çoğaltım yapılmaktadır (Botstein ve ark. 1980, Hall 1998, Özdi1 2007).

RFLP yönteminde kullanılan restiriksiyon endonükleaz enzimleri bakteriyel kökenli olup, çift sarmal DNA molekülünü 4-8 baz çiftlik DNA sıralarından tanıyarak bu bölgelerden özgün kesim yapan enzimlerdir. Bazı enzimler DNA'yı kestiklerin de yapışkan uçlu (*sticky or cohesive ends*) tek iplikçikli serbest uçlar oluşturur; bazıları ise küt uçlu (*blunt ends*) çift iplikçikli uçlar oluştururlar (Şekil 2.9). Böylece her bir restriksiyon endonükleaz enzimi kendine özgün nükleotid dizilerini içeren DNA parçacıklarını oluşturmaktadır. Evrim ve populasyon genetiği çalışmalarında restriksiyon enzimlerinden yararlanılarak çok önemli genetik farklılıklar tespit edilmiştir. RFLP analizleri hem çekirdek ve hem de mitokondriyel genomda oldukça faydalı bilgiler ortaya koymaktadır (Griffiths ve ark. 1996).

RFLP markerlerin en önemli avantajı özgün dizi bilgisine ihtiyaç bulunmamasıdır. RFLP yöntemi, türler, cinsler hatta büyük populasyonların analizinde kullanılabilir. Polimorfizm oranı çok yüksek olmasından dolayı aile ağacı ve haritalama analizlerinde tercih edilen marker sistemi olmuştur. RFLP marker sisteminin dezavantajları ise; analizin yapılabilmesi için yeterli miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması ile birlikte teknolojik olarak pahalı, uzun ve yorucu bir yöntem olmasıdır (Botstein ve ark. 1980).



Şekil 2.9 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları

2.7 Kaynak Özetleri

Buttel Reepen (1906) tarafından Türkiye bal arısı popülasyonları ilk defa tanımlanmıştır. Ege ve Marmara bölgelerindeki bal arıları üzerinde yürütülen bu ilk çalışmada sonra Bodenheimer (1941), Anadolu bal arılarını morfolojik karakterlerine göre tanımlayarak Anadolu'yu farklı ekotiplerin bulunduğu 7 farklı coğrafi bölgeye ayırmıştır. Kuzeydoğudaki bal arısı popülasyonlar (*A. m. caucasica*) Gorb ve Sarı Trans Kafkas arısı olarak tanımlarken, Orta Anadolu'daki arıların tipik Anadolu arısı olduğunu bildirmiştir. Bodenheimer (1941) Elazığ yöresindeki arıları ise genel bir tanımlama ile *A. m. remipes* olarak belirtilmiştir. Türkiye'nin batısındaki (İstanbul-Bursa hattının batısı) arıların diğerlerinden farklı özellikler gösterdiği, diğer üç tipin ara formları olduğu belirtilmiştir.

Maa (1953)'da Anadolu arılarını morfometrik yapılarına göre karakterize ederek Anadolu arısını alttür olarak *A.m.anatoliaca* sistematik adıyla ilk kez isimlendiren araştırmacı olmuştur. Maa' nın çalışmalarından 30 yıl sonra, Adam (1987) ülkemizdeki bal arılarını genel görünüm ve davranışlarına göre inceleyerek Bodenheimer'in bulgularına benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Adam'a göre Türkiye'nin batısı, kuzeydoğusu, güneydoğusu ve Anadolu'nun merkezinde olmak üzere 4 belirgin bal arısı ırkı ve birçok alt ekotip bulunmaktadır. Bu bulgulara ışığında Anadolu'nun bal arısı ırklarının yuvası olduğu hatta topoğrafik yapısı nedeniyle Anadolu'da kapalı ceplerde oluşmuş özgün bal arısı ekotiplerinin var olduğu bildirilmiştir. Günümüzde moleküler tekniklere morfometri ve enzim

polimorfizmine dayanılarak Balıkesir, Kırklareli, Eskişehir, Muğla ve Düzce ekotiplerinin belirlenmesi bu görüşü destekler niteliktedir (Kandemir ve ark. 2005, 2006, Yücel ve Köseoğlu 2011).

Apis mellifera'nın coğrafi dağılımına ilişkin bilimsel olarak kabul görmüş olan ilk çalışmalar Ruttner (1988) tarafından yapılmıştır. Ruttner (1988) Türkiye'de doğal olarak yayılmış *Apis mellifera* alttürünün olduğunu belirtmiştir. Ruttner (1988)'a göre Türkiye'nin kuzeydoğusundan Samsun'a kadar olan kesimde *A. m. caucasica* ekotipi, Güneydoğu'da *A. m. meda*, Güney'de Türkiye-Suriye sınırına yakın çok küçük bir alanda *A. m. syriaca*, Trakya'da dahil olmak üzere Türkiye'nin geri kalan kısımlarında ise *A. m. anatoliaca* bulunmaktadır. Anadolu arıları, Balkan arıları ve diğer komşu ülke arılarıyla karşılaştırılarak incelenmiştir. Anadolu arıları oldukça sıkı bir grup oluştururken Bursa-İstanbul-Eskişehir-Isparta hattının batısında kalan grup Anadolu grubundan ayrı bir grup oluşturmuştur. Buradan alınan örnekler ayrı bir grup oluşturmakla birlikte bu örneklerle ayrı bir ırk tanımlaması yapılmamıştır. Buradaki arı populasyonunun Doğu ve Ege adalarının etkisinde kaldığı vurgulanmıştır. *A. m. anatoliaca*'nın batıdaki ekotipi olarak tanımlamıştır. Birçok araştırmacı tarafından Türkiye'de bulunan arı ırkları morfometrik karakterleri ve alloenzim varyasyonu bakımından araştırılmış ve Ruttner (1988)'ın bulgularına yakın sonuçlar bulunmuştur (Darendelioğlu ve Kence 1992, Kandemir ve Kence 1995, Güler ve Kaftanoğlu 1999, Kandemir ve ark. 1995, 2000, 2005, Güler ve ark. 2002, Kekeçoğlu ve ark. 2010).

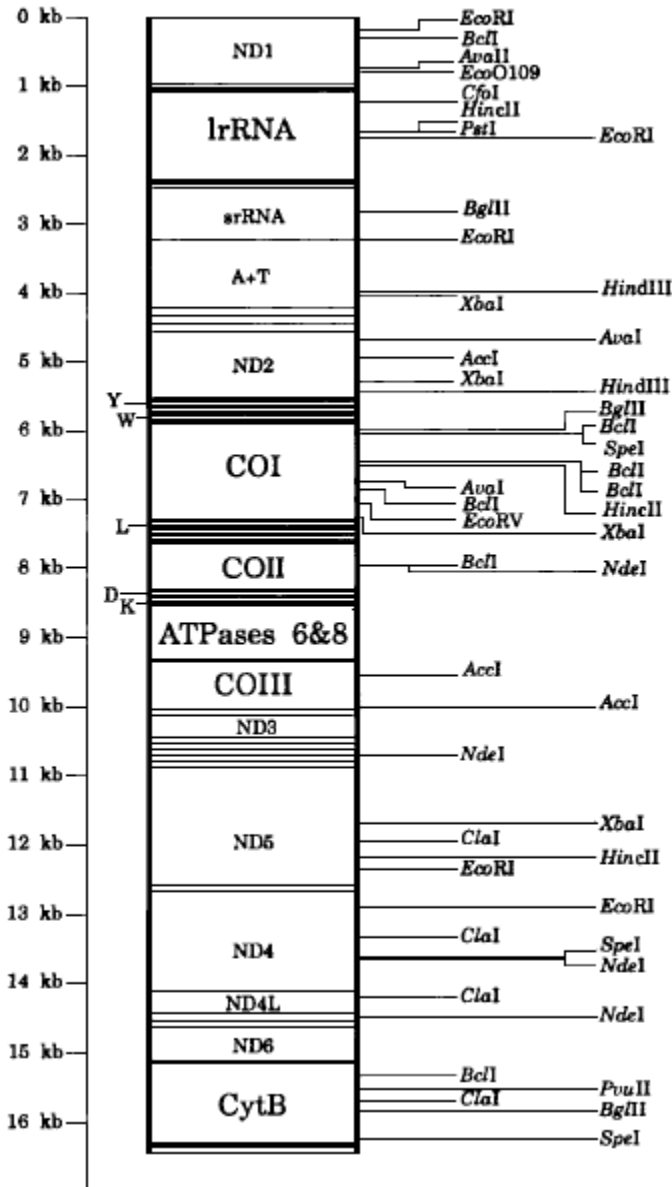
Mitokondriyal genomu en iyi bilenen böcek türü meyve sineğidir (*Drosophila*). Meyve sineğinin ardından arılarda da mitokondriyal genom çalışmaları başlamış ve Hymenoptera takımında çalışılan ikinci en önemli organizmayı oluşturmuştur. mtDNA, özellikle bal arısı biyolojisi çalışmalarında uygulanabilir birkaç öneme sahiptir. İlk olarak, bal arılarında oldukça düşük seviyede allozim değişkenliği gözlenmesine rağmen, mtDNA'da değişkenlik seviyesi çok iyi bulunmuştur (Avisé ve ark. 1983). İkinci olarak, allozim içinde belirli bir fark olmamasına rağmen, bal arısı alttürleri arasında bir fark bulunmuştur. Avrupa ve Afrika bal arısı alttürlerinde mtDNA'lar üzerine ilk çalışmalar yapılmıştır. mtDNA'lar anneden çocuklarına geçmekte ve kolonide bulunan işçi arılar ana arı ile aynı mtDNA'yı taşımaktadırlar (Smith 1988). Mitokondriyal DNA; 13 protein, 2 ribosomal RNA, 22 tRNA kodlayan ve kontrollü kod bölgesine sahiptir (Crozier ve ark. 1989). Hymenoptera mtDNA'ları Adenin (A) + Timince (T) çok zengindir (Moritz ve ark. 1987).

A. m. ligustica, *carnica* ve *caucasica* alttürlerinin tüm mtDNA molekülü temelinde incelediği bir çalışmada 7 farklı restriksiyon enzimi (*EcoRI*, *Hind III*, *Pst I*, *Bam HI*, *Acc I*, *Kpm I* ve *Bgl II*) ile çalışılmıştır. Çalışılan enzimler bakımından *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* alttürleri aynı kesim modelini gösterirken, *A. m. caucasica*'nın sadece *Bgl II* enzim kesimi sonucunda diğer iki türden farklı bir modele sahip olduğu tespit edilmiştir (Moritz ve ark. 1986).

Morfometrik veriler gibi mtDNA çeşitliliğini belirleme çalışmalarında *Apis mellifera*'nın 4 soy hattı belirlenmiştir. Bunlar; Batı Grubu (M): Batı ve Kuzey Avrupa toplulukları (*A. m. mellifera* ve bazı *A. m. iberiensis* alttürleri); Doğu Grubu (C): Güneydoğu Avrupa, Kuzey ve Batı Akdeniz toplulukları (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica* ve *A. m. anatoliaca*; Afrika Grubu (A): Sahara'nın kuzey ve güneyinde *A. m. capensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. litorea*, *A. m. monticola*, *A. m. sahariensis* ve *A. m. scutellata* dahil ve son zamanlarda keşfedilen Orta Doğu Grubu (O): *A. m. syrica* ve bazı alttürleri kapsamaktadır (Smith ve Brown 1988, 1990, Smith ve ark. 1989, Cornuet ve Garnery 1991, Smith ve ark. 1991, Moritz 1994, Sheppard ve ark. 1996, Palmer ve ark. 2000).

Hayvanlarda, mitokondriyal DNA (mtDNA) örnek biçimde anneden miras kalmaktadır (Brown 1985, Smith ve ark. 1990, Smith 1991). Bal arılarında (*Apis mellifera* L.) mitokondriyal genom 16,500 ile 17,000 bp arasında değişirken bitkilerde mitokondriyal genom büyüklüğü 2500 kb'a kadar olabilmektedir (Snyder ve ark. 1987, Cornuet ve ark. 1991).

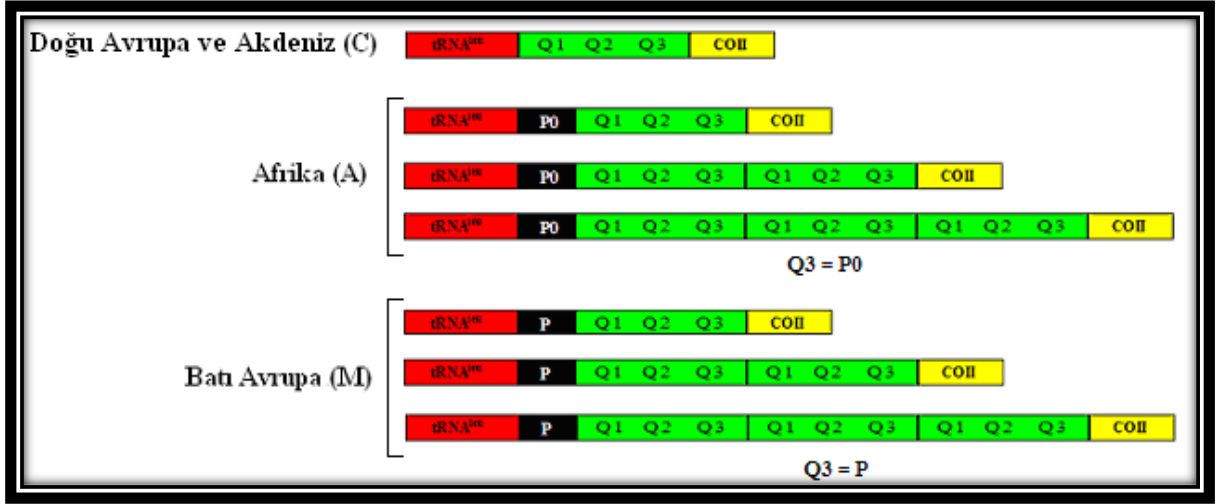
Cornuet ve Garnery (1991) *A. mellifera* L. mtDNA'sını 17 farklı restriksiyon enzimi ile muamele ederek restriksiyon haritasını oluşturmuşlardır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 *Apis mellifera* L. mtDNA genomunun restriksiyon haritası (Cournet ve Garney 1991)

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

Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyunda (C) sadece bir Q dizisi bulunmuştur. Batı Avrupa (M) ve Afrika soylarında 1-3 arası Q dizisinin tekrarları P dizisini takip etmektedir (PQ, PQQ, PQQQ), fakat Afrika soyunda (A) P parçasının yerine P0 bulunmaktadır (P0Q, P0QQ, P0QQQ) (Şekil 2.11) (Cournet ve Garnery 1991).



Şekil 2.11 Üç coğrafi soydaki tRNA^{leu} ve COII geni arasında yer alan P/P0 ve Q tekrarlarının durumu (Cournet ve Garnery 1991)

Garnery ve ark. (1992) 10 farklı alttüre ait 68 koloniden toplanan örneklerin mitokondriyel genomları 16 farklı restriksiyon enzimi (*AccI*, *AvaI*, *AvaII*, *BclI*, *Bgl* II, *CfoI*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *NdeI*, *PstI*, *PvuII*, *SpeI* ve *XbaI*) ile muamele ederek 19 farklı mitotip elde etmişler ve bu mitotipler üç ana soy içerisinde kümeleşmiştir. Bu üç ana soy farklı coğrafi dağılımlara sahip Afrika alttürleri A, Kuzey Akdeniz alttürleri C ve Batı Avrupa alttürleri M olarak adlandırılmıştır. Bu sonuçlar daha önceki morfometrik ve allozimi araştırmaları desteklemiştir. Esas farklılık Kuzey Afrika populasyonlarının A soyu yerine M soyu içerisinde bulunmasıdır. Ayrıca başka türlerin coğrafi alanına bağlı olarak türlerin dağılım merkezinin Orta Doğu olduğu ve 3 hattın evrimsel olarak ayrılmasının yaklaşık 1 milyon yıl önce başladığını ileri sürmüşlerdir.

Garnery ve ark. (1993) 12 farklı alttüre ait 302 koloniden toplanan örneklerin mtDNA'sını *DraI* restriksiyon enzimi ile muamele ederek 21 farklı haplotip bulmuşlardır. C soyunun tüm kolonileri aynı bant modelini göstermişler ve C1 olarak adlandırılmışlardır. A ve M soylarının her birinden yaklaşık 10 farklı haplotip elde edilmiştir.

Crozier ve Crozier (1993) tarafından *A. mellifera*'nın tüm sekansı ilk defa analiz edilmiş ve *D. yakuba* ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu mtDNA'da bulunan genetik kod her iki türde de aynı bulunmuş sadece iki tRNA antikodonu bakımından farklılık saptanmıştır. Ayrıca 22 tRNA kodlayan gen hariç tüm genler ve bölgeler aynı pozisyonda bulunmaktadır. Baz kompozisyonu her iki türde de yüksek seviyede A+T'den oluşmaktadır (% 84.9 *A. mellifera*'da ve % 78.6 *D. yakuba*'da).

Moritz ve ark. (1994) Güney Afrika'nın 29 farklı bölgesinden elde edilmiş 102 bal arısı kolonisinde çalışmışlardır. COI-COII intergenik bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve *DraI* enzim kesim sonucunda 4 farklı uzunluk ve 9 farklı mitotip elde etmişlerdir. P0QQ tipi % 76 frekansta en yaygın tip olarak Cournet ve ark. (1991) klasik P ve Q parça tekrarı modeli ile aynı olmayan farklı bir tip de (% 2 frekansta) bulunmuştur.

Kafkas arısının anavatanı Kafkas dağları, Kafkasların güney vadileri, küçük Kafkas dağlarının yükseklikleri, Gürcistan ve komşu ülkelerdir. Anadolu ve Kafkas arısının mtDNA üzerine yapılan araştırmalar sonucunda ikisi arasında DNA sıra düzenlerinde farklılıklar görülmüştür. Kafkas arısının mtDNA'sı, Gürcistan sınırına yakın yerlerdeki koloni örnekleriyle %77, Erzurum ve civarındaki kolonilerle %29 ve Van Gölü çevresindeki kolonilerle %25 benzerlik göstermiştir. Bu yayılma gen taşınması veya insanlar tarafından Kafkas arısının taşınmasıyla olabilmektedir. Hatay'daki bal arılarının da Suriye arısı ile aynı olduğu gözlenmiştir. Suriye arısının Akdeniz'in güneyindeki Negov çölünde, İsrail'de, Ürdün'de ve Lübnan'da olduğu belirlenmiştir (Smith ve ark. 1997).

Morfolojik özellikler çevresel seleksiyon etkisine duyarlı olduğundan dolayı filogenetik çalışmalarda çok uygun değildir. mtDNA daha iyi bir marker olarak ele alınmaktadır. İlk mtDNA varyasyon araştırmaları Ruttner'in coğrafi ırklar hipotezi ile uyumuştur. Bu araştırmalarda üç mtDNA soyunun (A, M ve C) var olduğu ve evrimsel soylarla uyduğu tespit edilmiştir. 7 alttüre ait 9 popülasyonun mikrosatellit analizi bu üç evrimsel soyu desteklemektedir. mtDNA ile yapılan çalışmalarda moleküler markerlerle ortaya çıkan en önemli farklılık, Kuzey Afrika bölgesinin alttürlerinin (*A. m. intermissa* ve *A. m. sahariensis*), Doğu Avrupa (M) soyunun yerine Afrika (A) soyuna dahil olmasıdır. *A. mellifera*'nın birçok alttürden elde edilen mtDNA haplotiplerinin genel bir filogenetik ağacında Mısır bal arısının temel kolda yer alması dördüncü soyun varlığını gösteren ilk ipucu olmuştur. Ruttner'in sınıflandırmasında Mısır coğrafi ırkının (*A. m. lamarckii*) M soyu değil A soyunda yer almıştır. Arias ve Sheppard (1996) 14 farklı bal arısı alttüründe mtDNA'nın NADH dehidrojenaz 2 bölgesinde yer alan yaklaşık 700 bp uzunluğunda bir dizinin sekans analizini yapmışlardır. Birisi Mısır'dan alınan iki *A. m. lamarckii* kolonisine ait diğeri ise Suriye Akdeniz sahilinden alınan tek *A. m. meda* kolonisine ait iki dizi, diğer dizilerden ayrılarak birlikte kümeleşip dördüncü soyun var olduğu hipotezini desteklemiştir. Ayrıca ikinci *A. m. meda* kolonisinin dizisi (önceki koloniden bir kaç 100 kilometre doğu yönünde yerleşen) dikkate alındığında açıkça C soyuna ait olduğu görülmektedir. Ruttner tarafından O soyunun bir üyesi sayılan *A. m. anatoliaca*, Türkiye güney doğu bölgesinde *A. m. meda* ile

temas içerisinde. Türkiye kolonilerinin incelenmesi sonucu, bölgenin mtDNA haplotiplerinin C soyuna ait olduğunu ortaya çıkmıştır. Benzer sonuç daha önce *A. m. caucasica* alttürüne ait örneklerden de elde edilmiştir (Franck ve ark. 2000a).

Türkiye’de 16 lokasyon ve 84 koloniden örneklenen bal arılarında COI-COII arası intergenik bölgede kısmi DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi ve kesim sonucu elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesiyle yeni bir 4. Haplotipin Türkiye’de var olduğu bildirilmektedir. Bu haplotipin Suriye sınırına yakın Hatay yöresinden alınan örneklerde tespit edildiği ve bu soyun daha önce bildirilen diğer mtDNA soylarından farklı 4. bir mtDNA soyunu temsil edebileceği ifade edilmektedir. *A. m. anatoliaca* ve *A. m. caucasica*’nın mtDNA’ları dikkatli incelendiğinde iki tür arasında COI-COII gen bölgesinin nükleotid dizilimi bakımından çok büyük bir fark bulunmamıştır. Genel olarak Anadolu arıları bu gen bölgesinin nükleotid dizilimi bakımından *A. m. caucasica*’ya çok yakın olarak bulunmuştur (Palmer ve ark. 2000). Moleküler teknikler ile yapılan ilk çalışmalarda tüm mtDNA genomunun birçok farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu mtDNA genom haritası oluşturulmuş ve *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* ve *A. m. carnica*’nın hemen hemen aynı kesim örüntüsünü oluşturduğu belirlenmişti (Smith 1991). Bu araştırma sonuçları *A. m. anatolica*’nın *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* ve *A. m. carnica* ile aynı mtDNA haplotip grubunda olduğunu gösteriyor.

Frank ve ark. 2000a Lübnan’da 75 koloniden toplanan bal arılarında mtDNA, COI-COII intergenik bölgesi RFLP ile karakterize edilmiştir. Bal arısı örneklerinin nükleotid dizilimi M, C ve A haplotip grupları ile karşılaştırıldığında *A. m. syriaca*’nın nükleotid diziliminin bu gruplardan farklı olduğu ve Suriye arısının O grubu içerisinde olduğu bildirilmiştir.

Franck ve ark. (2000b) İtalya’dan *A. m. Ligustica* ve Sicilya’dan *A. m. Sicula* popülasyonlarında mtDNA’nın COI-COII intergenik bölgesinin *DraI* restriksiyon enzimi analizi sonucu bölgenin *A. m. ligustica* popülasyonlarının M ve C mtDNA soylarının birleşiminden oluştuğunu belirtmişlerdir. A soyuna ait mitotipler sadece *A. m. Sicula* örneklerinde görülmektedir. Bu iki alttürün hibrit olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar bu çalışmada daha önce bildirilmemiş (M22, M7, M27) üç yeni mitotip bulmuşlardır.

Franck ve ark. (2001) tüm Afrika kıtasının 64 farklı bölgesinden elde edilen 738 koloniye ait örneklerin COI-COII intergenik bölgesini RFLP yöntemini kullanarak ve *DraI* restriksiyon enziminden yararlanarak analiz etmişlerdir. Bu çalışmada, Kuzey Doğu Afrika

bölgesinin örnekleri hariç tüm örneklerin önceden rapor edilen Afrika (A) soyunun haplotiplerine ait olduğu sonucuna varılmıştır. Kuzey Doğu bölgesinden alınan örnekler, yeni tanımlanan O ve Y soyları içerisinde yer almıştır. Bu araştırmada 738 Afrika kolonisine ek olarak Avrupa, Yakın Doğu ve Amerika'nın farklı bölgelerinden elde edilmiş 622 koloniye ait örnekler karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Toplam 1359 koloniye ait örneklerin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda 20 alttüre ait 5 farklı soyda (A, M, C, O ve Y) sınıflandırılan 42 farklı COI-COII mitotipi elde edilmiştir. Şekil 2.12'de söz konusu mitotiplerin P parçasının dizisi ve soylarını birbirinden ayırt eden farklılıklar gösterilmiştir. Hiçbir delesyon içermeyen P0 dizisi A ve O soylarına ait mitotipleri tanımlamaktadır. d delesyonunu içeren P dizisi M soyuna ait mitotipleri, d1 delesyonu içeren P1 Atlantik sahiline ait A soyunu ve d2 delesyonu içeren P2 Etiyopya'dan alınan *A. m. yemenitica* örneklerinden yeni ortaya çıkan Y soyunu tanımlamaktadır. Ayrıca tüm mitotiplerin *DraI* enzimi ile kesim haritaları ve kesim sonucu elde edilen kesim parçacık büyüklükleri ve COI-COII bölgesinde bulunan tüm delesyon/insersiyonlar gösterilmektedir.

M6,	mellifera .	(Fransa)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
M4,	mellifera	(Fransa)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
M3,	iberiensis	(İspanya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----d-----	AtgaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
M7,	iberiensis	(İspanya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtgaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
M8,	iberiensis	(İspanya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A1,	adansonii	(Zambiya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A4,	Scutellata	(Güney Afrika)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A4',	adansonii	(Nijeriya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A8,	intermissa	(Fas)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A9,	intermissa	(Cezayir)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A11,	iberiensis	(Portekiz)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A14,	adansonii	(Namibya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A15,	iberiensis	(Kanari)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A21,	iberiensis	(Portekiz)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A12,	iberiensis	(Portekiz)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A25,	adansonii	(Namibya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A27,	litorea	(Somali)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A19,	adansonii	(Gine)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
A26,	adansonii	(Yunanistan)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
C1,	ligustica	(İtalya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
C2,	macedonica	(Yunanistan)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
O1,	litorea	(Somali)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
O2,	syriaca	(Lübnan)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
O3,	syriaca	(Lübnan)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
Y1,	jemenitica	(Etiyopya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA
Y2,	jemenitica	(Etiyopya)	TTAATAAAATTAATATAAAAT	-----	AtaaAtTATATTTATtAAAA - fTTAATTATTtAAAA

Şekil 2.12 Substitüsyon (baz değişimi) nükleotitleri küçük harflerle gösterilen COI-COII mitotiplerinin P bölgesi

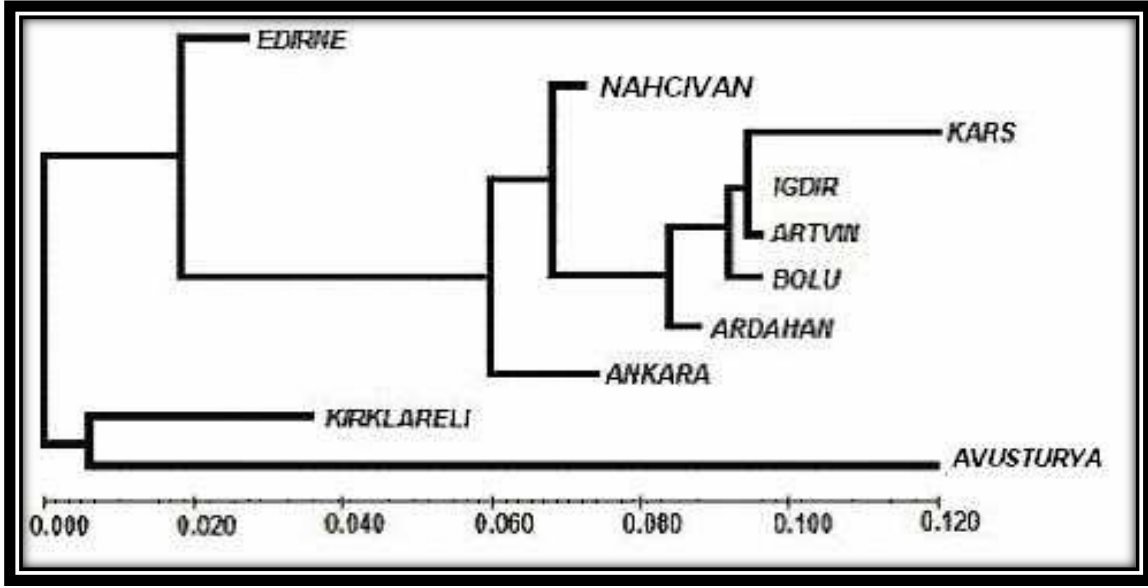
Hiçbir delesyon içermeyen P0 dizisi (A) ve (O) soylarına ait mitotipleri tanımlamaktadır, d delesyonunu içeren P dizisi (M) soyuna ait mitotipleri, d1 delesyonu

içeren P1 Atlantik sahiline ait A soyunu ve d2 delesyonu içeren P2 yeni ortaya çıkan Y soyunu tanımlamaktadır (Franck ve ark. 2001)

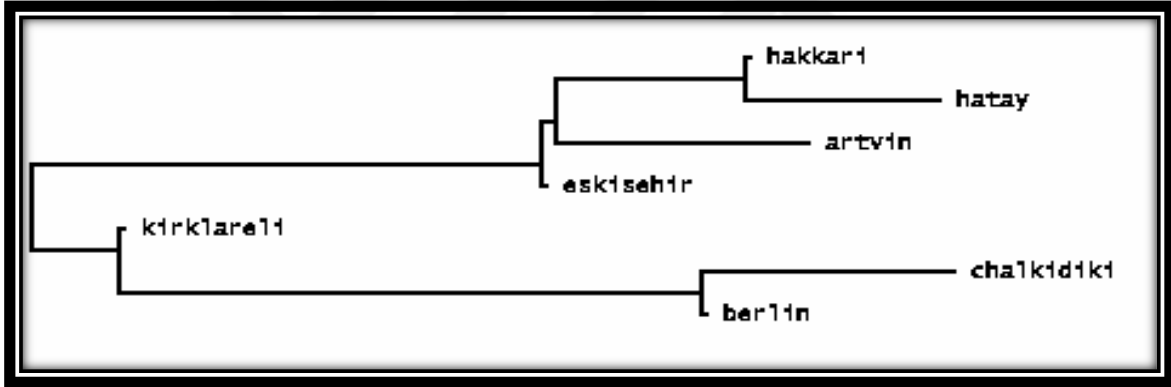
Haritalar *DraI* enzimi kesim modeli ve COI-COII intergenik bölgenin dizi analizi sonucu ortaya çıkmıştır. Kesim bölgeleri 1'den 10'a numaralandırılmıştır. Delesyon ve insersiyonlar sırasıyla d ve i harfleri ile numaralandırılmıştır. Üst numaralar eşit boyutlu kesim parçacıklarına işaret etmektedir (Franck ve ark. 2001)

Sušnik ve ark. (2004) Slovenya'nın 10 farklı bölgesinden alınan 269 *A. m. carnica* bal arısı örneğini *DraI* restiriksiyon enzimi ile COI-COII intergenik bölgesini analiz etmişlerdir. Tüm örnekler C mtDNA soyunun yeni bir haplotipi olarak değerlendirilmiş ve C2c olarak adlandırılmıştır.

Türkiye balarılarında mtDNA analizi yapılan bir çalışmada (Kandemir ve ark. 2006), Türkiye'nin 36 farklı yöresinden, 334 balarısı kovanından yapılan mtDNA analizi sonucunda Smith ve ark. (1997) ve Palmer ve ark. (2000) Türkiye'deki balarısı alttürlerinin C soy hattına ait olduğuna dair yargılarını destekler veriler elde etmişlerdir. Yine Hatay'da, Palmer ve ark. (2000) sonuçları gibi farklı bir mtDNA profili gözlenmiştir. Kandemir ve ark. (2000), morfometri, allozim ve mikrosatellit verilerine göre Trakya ve Anadolu arılarının ayrılmasına dayanarak Ruttner (1988)'in yaptığı sınıflandırmanın daha doğru olduğu sonucuna varmışlardır. Şekil 2.13 ve 2.14'te allozim ve mikrosatellit çeşitliliğine dayanarak elde edilen iki soyağacı görülmektedir. Soyağaçlarının ortak noktası Avrupa ve Anadolu arılarının ayrı gruplanmalarıdır. Morfometri, allozim, mitokondri DNA'da gözlenen çeşitlilik Anadolu'nun balarılarının evrimleştiği bölgeye yakın olduğu sonucuna işaret etmektedir.



Şekil 2.13 Allozim çeşitliliğine dayanarak elde edilen soy ağacı (Kandemir ve ark. 2005'den uyarlanmıştır)



Şekil 2.14 Mikrosatellit verilerine dayanarak elde edilen soy ağacı (Bodur 2000'den uyarlanmıştır).

Özdil ve ark. (2007), Türkiye'nin 19 farklı yöresinden toplam 244 adet işçi arı örneğini mtDNA'da bulunan büyük ribozom alt birimi (16S rRNA /EcoRI), sitokrom oksidaz b (cytochrome b /Bg/II) genlerinde PCR-RFLP analizine göre kesim noktası varyasyonu olup olmadığını araştırmışlardır. Ayrıca sitokrom oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII arası) *DraI* ve *HinfI* kesim enzimleri ile kesilerek RFLP analizi ve toplam 40 örnekte DNA dizi analizi yapılmıştır. Belirtilen lokuslardaki kesim bölgelerinin varlığına/yokluğuna bağlı olarak Türkiye bal arısı popülasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir.

Türkiye bal arısı popülasyonlarında COI-COII intergenik bölgesinin *HinfI* enzimi ile muamele edilmesi sonucunda 2 farklı haplotip ya da enzim kesim modeli tespit edilmiştir. Bu farklı haplotipler COI-II/*HinfI*-C1 (292, 260 ve 26 bp'lik 3 farklı bant modeli) ve COI-II/*HinfI*-C2 (292, 240, 26 ve 20 bp'lik 4 farklı bant modeli) olarak ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada Bolu/Yığılca'dan alınan bir örnekte farklı bir kesim modeli tespit edilmiş olup bu haplotip COI-II/*HinfI*-C1 ile gösterilmiştir. Diğer örneklerin tamamının COI-II/*HinfI*-C2 haplotipinde olduğu bildirilmiştir (Fakhri 2008).

Alburaki (2009), Suriye bal arılarının genetik profilini belirlemek amacıyla topladığı bal arısı örneklerinde mtDNA'nın COI-COII bölgesini çalışmıştır. A (Afrika) ve C (Kuzey Akdeniz) genetik soyuna ait örneklerin ülkenin geneline yayıldığı görülmektedir. Şam'da A soyu % 86; C soyu % 14, Souweida'da A soyu % 87; C soyu % 13, İdlib'te A soyu % 32; C soyu % 68, Lazkiye'de A soyu % 87; C soyu % 14, Kounitera'da A soyu % 86; C soyu % 10 olarak belirlenmiştir. Araştırmacı, bal arısı örneklerinde mitokondriyal belirteçler ile haplotip analizi sonucunda Suriye arılarını Z haplotipi olarak isimlendirmiştir. Özellikle Şam ile güneyindeki bölgeler, Lazkiye, İdlib, Rakka ve Hama illerinde Suriye arılarının bulunduğu bunun yanı sıra Hama'da İtalyan arısı, Rakka'da hem İtalyan hem de Buckfast arısı haplotipi tespit edilmiştir.

Alattal ve ark. (2014), Suudi Arabistan'daki arı alttürlerini karakterize etmek için 179 örnekte morfometrik ve genetik belirteçler kullanılmıştır. 24 özellik kullanılarak yapılan morfometrik analiz sonucunda çoğu Suudi bal arısı örnekleri *Apis mellifera jemenitica* referans grubu ile kümelenmiş, diğerleri ise *Apis mellifera litorea* olduğu bildirilmiştir. mtDNA COI-COII bölgenin dizi analizinde 18 yeni haplotip elde edilmiş. Çoğu haplotipin O soyundan olduğu, sadece 2 haplotipin C soyundan olduğu gözlenmiştir.

Rahimi (2015)'de, Güney İran'daki bal arısı popülasyonlarında mtDNA COI-COII intergenik bölge çalışılmıştır. 6 ilden (Sistan ve Beluçistan, Kerman, Fars, Hormozgan, Buşehr ve Huzistan) 60 örnek toplanmıştır. COI-COII intergenik bölgesinin *DraI* enzimi ile kesimi sonucunda Güney İran bal arısı popülasyonlarının C soyuna ait olduğunu bildirilmiştir. Toplanan örnekler arasında genetik çeşitliliğin düşük olduğu bildirilmiştir.

Gerek alloenzim gerekse morfometrik yöntemler ile yapılan araştırma sonuçlarına göre Türkiye'de 5 farklı bal arısı (*Apis mellifera* L.) alttürünün olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Türkiye’de bulunan 5 farklı *Apis mellifera* L. alttürü

<i>A. m. anatoliaca</i>	Ruttner 1988; Smith ve ark. 1997; Palmer ve ark. 2000; Kandemir ve ark. 2006
<i>A. m. caucasica</i>	Ruttner 1988; Smith ve ark. 1997; Palmer ve ark. 2000; Kandemir ve ark. 2006
<i>A. m. carnica</i>	Bodenheimer 1941; Smith ve ark. 1997; Palmer ve ark. 2000; Kandemir ve ark. 2006
<i>A. m. syriaca</i>	Ruttner 1988; Palmer ve ark. 2000; Kandemir ve ark. 2006
<i>A. m. meda</i>	Ruttner 1988

3. MATERYAL ve YÖNTEM

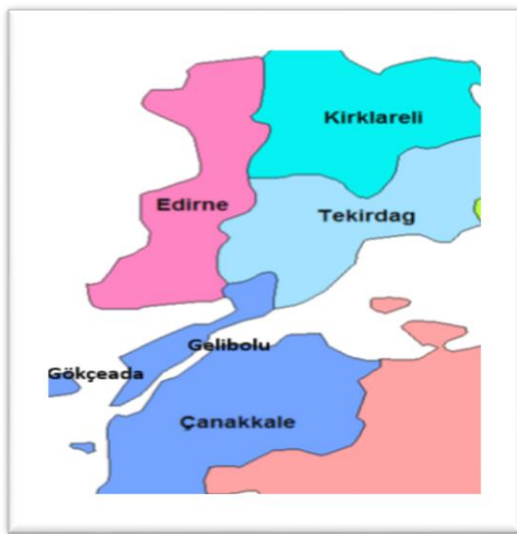
3.1 Materyal

3.1.1 Materyal ve örnekleme

Araştırmanın materyalini Trakya bölgesini temsil edebilecek bal arısı popülasyonlarından örneklenen işçi arılar oluşturmaktadır. Bu amaçla Tekirdağ, Kırklareli, Edirne, Çanakkale, Gökçeada'dan toplam 322 adet bal arısı örneği ile çalışılmıştır (Şekil 3.1, Çizelge 3.1). Her bir popülasyonda o bölgeyi istatistik olarak azami düzeyde temsil etme yeteneğine sahip örneklemenin yapılmasına özen gösterilmiştir. Her bir kovandan bir adet olacak şekilde işçi arı analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1 Örneklerin toplandığı yöreler ve örnek genişliği

Yöreler	Örnek Genişliği (n)
Tekirdağ	93
Kırklareli	39
Edirne	69
Çanakkale	73
Gökçeada	48
Toplam	322



Şekil 3.1 Bal arısı örneklerinin alındığı iller

3.1.2 Araç ve gereçler

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi

Bidestile Saf Su Cihazı – GFL 2104	DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonları için kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması
pH metre – Jenco (6173)	Tampon çözeltilerin hazırlanması için gerekli pH ’nın belirlenmesi
Nano Drop Spectrofotometre – Thermo Electron Corporation Biomate 5	İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık derecelerinin belirlenmesi
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı – Heidolph MR 3001	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Çalkalayıcı (Vortex) – Wisc (WiseStir MSH-20A)	Tampon çözeltilerin hazırlanması ve DNA izolasyonu
Santrifüj – Hettich (Universal 320)	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Manuel Hassas Terazî – Kern (FCB 3K0.1) Dijital Hassas Terazî – And (GF-600)	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerin tartılması
Gradient Thermal Cycler – Applied Biosystems® Veriti®	PCR ile lokusların çoğaltılması
Çalkalayıcı Isıtıcı	DNA izolasyonu
Agaroz Jel Elektrophorez Takımları – Thermo OWL Marka (B1, B2 ve A1)	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin tespit edilmesi, restriksiyon sonucu elde edilen bant modellerinin jelde belirlenmesi
Güç Kaynakları – Thermo EC (600 – 90)	Elektrophorez sistemlerinin elektrik ortamlarının sağlanması
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi – Vilber Lourmat	DNA izolasyonu, PCR ürünleri ile RFLP lokusların jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Termal Yazıcı – HP	DNA izolasyonu, PCR ürünleri ile mikrosatellit lokusların arşivlenmesi için baskı yapılması
Mikro Dalga Fırını – Arçelik	Agaroz jellerin hazırlanması
Derin Dondurucu (-80 °C) Derin Dondurucu (-25 °C) Derin Dondurucu Buzdolabı – Arçelik 401	Örnek ve çeşitli sarf malzemelerin saklanması
Çeker Ocak– TEZ-SAN Uzay Serisi	Çeşitli tampon çözeltilerin hazırlanması
Otoklav – ALP	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

3.1.3 Tampon çözeltiler

Çizelge 3.3 Elektroforez ve agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
TE Tampon Çözeltisi	10 mM 1mM	Tris EDTA
10 X TBE Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi	108.0 g 55.0 g 40.0 ml 1 litreye tamamlanır	Tris Borik Asit 0.5 M EDTA (pH 8,0) Deiyonize bdH ₂ O
1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi	100 ml 1 litreye tamamlanır	10 X TBE Deiyonize bdH ₂ O

3.2 Yöntem

3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

Ergin işçi arı örneği alınarak, % 95'lik etanol içeren 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içinde laboratuvara getirilmiş ve toplam genomik DNA'nın izolasyonu yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu, Hall (1986, 1990)' un tanımladığı fenol-kloroform ekstraksiyon metodu mevcut laboratuvar koşullarına göre koşullarına göre değiştirilerek yapılmıştır. DNA molekülleri aşağıda verilen işlem sıraları sonucunda izole edilmiştir.

1.gün

Etanol içinde tutulan örneklerin göğüs kısmı, bisturi ile küçük parçalara ayrılmış ve 1.5 mL'lik tüpler içine alınmıştır. Tüplere 500 µL TEN tamponu (1 M NaCl, 0.5 M EDTA, 1 M Tris (pH 8.0) ilave edilmiş ve örnekler homojenizatörde ezilmiştir. Daha sonra 25 µL SDS (% 20), 10 µL Proteinaz K (20 mg/mL) ilave edilerek tüpler +58 °C'de 5 saat bekletilmiştir.

Örnekler 13000 rpm (devir/dakika)'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar (tüplerin üstünde kalan sıvı kısım) yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µL fenol + 150 µL kloroform izoamil alkol (24:1) ilave edilerek karıştırıcıda 10 dakika vortekslenmiştir. Tüpler 13000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilip fazların ayrılması sağlandıktan sonra süpernatantlar yeni tüplere aktarılıp üzerlerine 300 µL kloroform izoamil alkol ilave edilerek 10 dakika vortekslenmiş ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni tüplere alındıktan sonra üzerlerine 800 µL -20 °C'de tutulan % 95'lik etanol ve 50 µL 3M sodyum asetat ilave edilmiştir. Örnekler -20 °C'de gece boyu bekletilmiştir.

2.gün

Derin dondurucudan alınan örnekler 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, % 70 'lik etanol ile iki kez yıkanmıştır. Bu işlemten sonra çeker ocakta tüplerin ağzı açık olarak 1 saat bekletilerek pelet kurutulmuştur. DNA peleti +37 °C'de 100 µL TE tamponu (10:1) ve 5 µL Rnaz (10 mg/mL) içinde çözündürülmüştür. Elde edilen DNA molekülleri PCR işlemi yapılincaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin PCR ile çoğaltılması

İstenilen nitelikte DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedeflenen mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin çoğaltılması PCR ile gerçekleştirilmiştir. Bu lokus özgün primerler yardımıyla PCR cihazında çoğaltılmış ve *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesilerek analiz edilmiştir. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP lokusunda kullanılan primer çiftleri, restriksiyon enzimi ve yararlanılan kaynak Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusu, primerler, restriksiyon enzimi ve kaynaklar

Mitokondriyel DNA lokusları	Primerler (5'→3')	Enzim	Kaynak
Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) COI-COII arası – F COI-COII arası – R	TCT ATA CCA CGA CGT TAT TC GAT CAA TAT CAT TGA TGA CC	<i>XbaI</i>	Hall ve Smith (1991)

Not: F, ileri primer; R, geri primer

Çizelge 3.5 PCR reaksiyonu toplam hacmi 25 µL olacak şekilde laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir

Ana Stok	Son konsantrasyon	Kullanılan miktar (µL)
DNA	20 ng	1,0 µL
10 x PCR Buffer	1 X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,8 mM	0,9 µL
dNTPler (1 mM)	0,2 mM	5,0 µL
İleri Primer (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
Ters Primer (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
Taq polimeraz (5U/ µL)	1 U	0,2 µL

Çizelge 3.6 PCR şartları

94 °C → 1 dak.		Ön denaturasyon (DNA eksenlerinin birbirlerinden ayrılması)
94 °C → 45 sn		Denaturasyon (DNA eksenlerinin birbirlerinden ayrılması)
48 °C → 45 sn	30 döngü	Bağlanma (Primerin komplementer kalıp DNA eksenine bağlanması)
62 °C → 2 dak.		Uzama (Üzerinde durulan DNA bölgesinin sentezinin yapılması)
62 °C → 20 dak.		Son uzama (Üzerinde durulan DNA bölgesinin sentezinin son kez yapılması)

3.2.3 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin *Xba*I restriksiyon enzimi ile kesilmesi

Mitokondriyel genomda çalışılan lokus COI-COII arası gen bölgesinin *Xba*I restriksiyon enzimi ile kesimidir. Bu lokus özgün primerler yardımıyla PCR cihazında çoğaltılmış ve yukarıda belirtilen restriksiyon enzimi ile kesilerek analiz edilmiştir. *Xba*I restriksiyon enzimi, *Xanthomonas badrii* organizmasından elde edilmektedir. *Xba*I restriksiyon enzimi, restriksiyon yaptığı özgün tanıma dizisi Şekil 3.2 verilmiştir.

<u>Enzim</u>	<u>Tanım Bölgesi</u>	<u>Kesim Sonrası Elde Edilen DNA Parçacıkları</u>
XBAI	-----T ↓ CTAGA-----	T CTAGA
	-----AGATC ↓ T-----	AGATC T

Şekil 3.2 *XbaI* restriksiyon enzimi, restriksiyon yaptığı özgün tanıma dizisi

PCR işleminden sonra elde edilen PCR ürünleri hızlı kesim yapan *XbaI* restriksiyon enzimi ile 37°C’de 15 dakika bekletilerek muamele edilip kesim işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7). *XbaI* ile muamele edilen örneklerin tamamına sırası ile % 2’lik agaroz jel elektroforez işlemi uygulanmıştır. Görüntü analizi sisteminden yararlanılarak farklı örneklerle ait kesim profilleri ve elde edilen bantların moleküler büyüklükleri tespit edilmiştir.

Çizelge 3.7 *XbaI* restriksiyon enzimi kesim reaksiyonu

PCR Ürünü	15 µL
<i>XbaI</i> restriksiyon enzimi (Invitrogen™ Anza™ Restriction Enzyme Cloning System)	1,0 µL
Red Buffer	2,0 µL
Deiyonize bdH2O	2,0 µL

3.2.4 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki bölgenin DNA dizi analizi

mtDNA COI-COII arası gen bölgesinde, nükleotid farklılıklarını ortaya koymak amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla farklı kesim profili veren üç haplotipten birer örnek ile referans olarak analiz edilen Sırbistan’dan iki adet Karniyol arısı (*A. m. carnica*), Yunanistan’dan iki adet Makedonya arısı (*A. m. macedonica*) ve Polonya’dan bir adet Avrupa esmer arısı (*A. m. mellifera*) örnekleri DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. İleri ve geri primerler ile iki yönlü okuma yapıldıktan sonra elde edilen dizi analizi sonuçları,

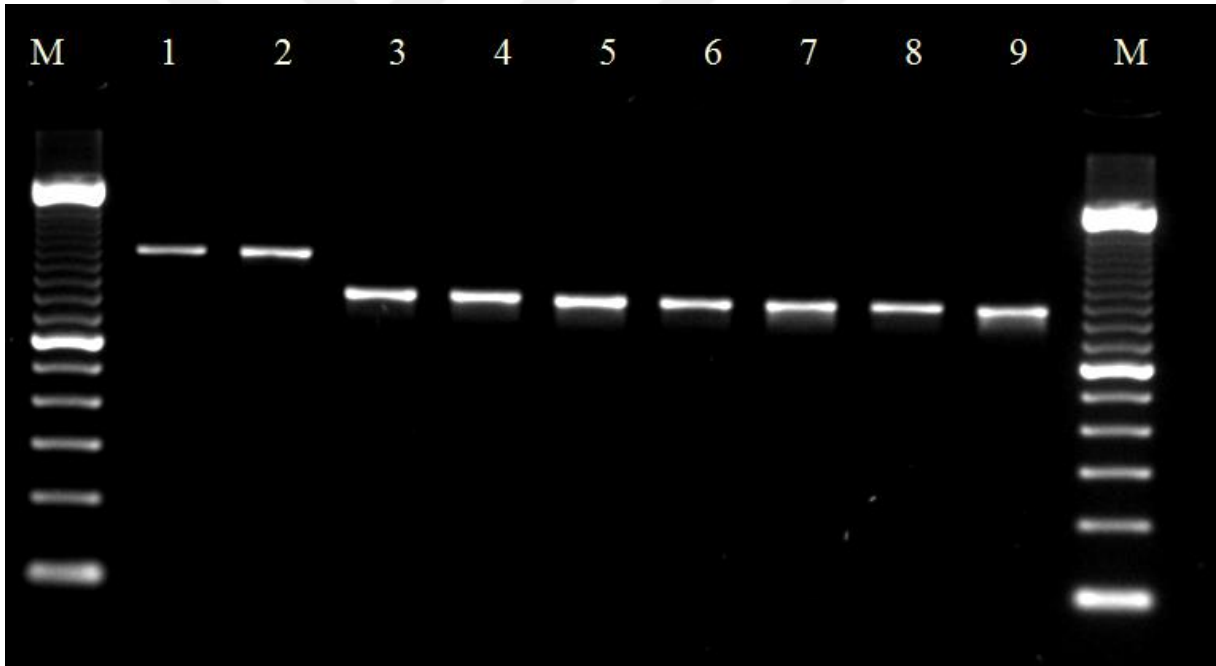
ChromasPro programı kullanılarak birleştirilmiş ve Bioedit programında (Hall 1997-2013) hizalanmıştır. DNA dizi analizi verileri kullanılarak Trakya Bölgesinde elde edilen farklı haplotiplere ait dizi analizi sonuçları ile referans olarak temin edilen Avrupa bal arıları arasındaki genetik farklılıkların (d) ortaya konulması amacıyla, MEGA 6 bilgisayar paket programından yararlanılmıştır (Tamura ve ark. 2013).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin PCR Çoğaltımı

İleri 5' TCT ATA CCA CGA CGT TAT TC 3' ve Geri 5' GAT CAA TAT CAT TGA TGA CC 3' primerler kullanılarak COI-COII arası gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı sonucunda 857 bç'lik bir bölge çoğaltılmıştır. PCR ürünleri, % 1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemiyle kontrol edilmiştir. PCR çoğaltımları sonucunda tüm Trakya ve Doğu Avrupa örneklerinde 857 bç lik tek bant elde edilirken, referans olarak jele yüklenen Avrupa esmer arısında (*A. m. mellifera*) 1100 bç lik bant elde edilmiştir (Sekil 4.1).



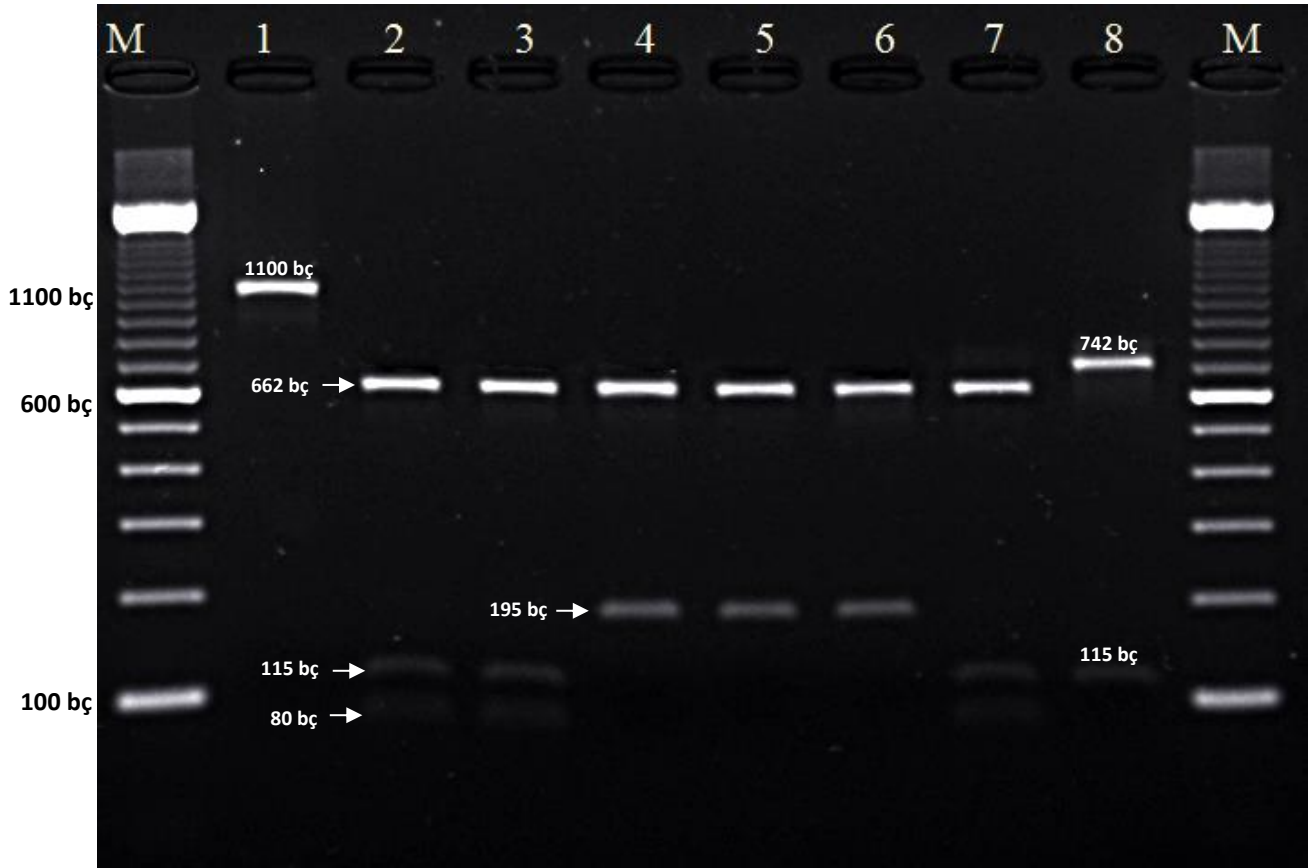
Şekil 4.1 COI-COII arası gen bölgesi PCR ürünleri

% 1'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen PCR ürünleri; 1-2: *A. m. mellifera* (1100 bç), 3-4: *A. m. carnica* (857 bç), 5: *A. m. caucasica* (857 bç), 6: *A. m. anatoliaca* (857 bç), 7: Tip 1 haplotipi (857 bç) , 8: Tip 2 haplotipi (857 bç), 9: Tip 3 haplotipi (857 bç), M: Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder.

4.2 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin *XbaI* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

COI ile COII genleri arasında yer alan bölgede genetik farklılığın fazla olduğu bildirilmektedir (Hall ve Smith 1991, Garnery ve ark. 1993). Türkiye genelinde incelenen bal arılarında mtDNA genomu COI gen bölgesi, tek bir *XbaI* kesim noktası içermektedir. 857 bp'lık COI-COII arası gen bölgesinde 195. pozisyonda bulunan tek bir *XbaI* restriksiyon enzimi kesimi sonucu 662 bp ve 195 bp'lık kesim profili elde edilmiştir. Buna karşılık Trakya'dan alınan bir kısım örneklerde aynı gen bölgesinde ikinci bir *XbaI* kesim bölgesi daha olduğu görülmüştür (Smith ve ark. 1997, Palmer ve ark. 2000). Daha önce yapılan araştırmalarda ikinci bir *XbaI* kesim bölgesine Avusturya ve Balkanlar'da *A. m. carnica* alttürünü temsil eden örneklerde rastlanmıştır (Smith ve Brown 1990, Meixner ve ark. 1993). COI/*XbaI* bakımından farklılık gösteren bu iki grup arasında yalnızca tek bir nokta mutasyonu olduğu görülmüştür. 857 bp büyüklüğünde COI-COII arası gen bölgesinin 115. pozisyonda meydana gelen nokta mutasyonu sonucu (T→C transizyonu) 2. bir kesim noktası daha oluşmuştur ve **TT**TAGA şeklinde olan DNA dizisi, **T****C**TAGA olarak yeni bir *XbaI* kesim noktası oluşturmuştur. Bu ilave kesim sonucu jelde 662-115-80 bp'lık 3 banttıan oluşan kesim profili elde edilmiştir (Şekil 4.2). Çalışılan örneklerin sadece ikisinde yeni bir kesim profili daha gözlenmiştir. Sadece 115. pozisyonda tespit edilen *XbaI* kesim noktası temelinde 742-115 bp'lık iki banttıan oluşan kesim profili de elde edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında çalışılan tüm örneklerde COI-COII arası bölgede *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu üç farklı haplotip elde edilmiştir. Tip 1 haplotipinde 662 ve 195 bp'lık 2 bant, Tip 2 haplotipinde 662, 115 ve 80 bp'lık 3 bant ve Tip 3 haplotipinde 742 ve 115 bp'lık 2 banttıan oluşan kesim profili tespit edilmiş ve bu sonuçlar % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 COI-COII arası *Xba*I restriksiyon enzimi kesim sonucu

% 2'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen kesim ürünleri 1: *A. m. mellifera* (1100 bç-kesim yok), 2-3: *A. m. carnica* (3 bant; 662-115-80 bç), 4: *A. m. caucasica* (2 bant; 662-195 bç), 5: *A. m. anatoliaca* (2 bant; 662-195 bç), 6: Tip 1 haplotipi (2 bant; 662-195 bç), 7: Tip 2 haplotipi (3 bant; 662-115-80 bç), 8: Tip 3 haplotipi (2 bant; 742-195 bç), M: Invitrogen™100 bp DNA Ladder.

4.3 Mitokondriyel DNA Sitokrom C Oksidaz I ile II (COI-COII arası) arasındaki gen bölgesinin DNA Dizi Analizi Sonucu

Bu tez çalışmasında araştırılan COI-COII arası gen bölgesi 857 bç'lik bir bölgedir. Trakya bal arısı örneklerinde bu gen bölgesinde PCR-RFLP yöntemi ile tespit edilen üç farklı haplotipin nükleotid dizisi, Sırbistan'dan Dr. Ljubiša Ž. STANISAVLJEVIĆ'den temin edilen iki adet Karniyol arısı (*A. m. carnica*), Yunanistan'dan Dr. Leonidas CHARISTOS'tan temin edilen iki adet Makedonya arısı (*A. m. macedonica*), Polonya'dan Dr. Andrzej OLEKSA'dan temin edilen bir adet Avrupa esmer arısı (*A.m. mellifera*) ve ayrıca Türkiye'den Dr. Ahmet Gürel'den alınan Kafkas arısı (*A. m. caucasica*) örnekleri ile birlikte DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. DNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid farklılıkları Ek1'de verilmiştir.

Tip 1 haplotipinde 195. pozisyonda tek bir *XbaI* kesimi sonucu 662 bç ve 195 bç lik kesim profili elde edilmiştir. Tip 2 haplotipinde 115. pozisyonda meydana gelen tek nokta mutasyonu sonucu (T→C transizyonu) 2. bir kesim noktası daha oluşmuştur ve 662, 115 ve 80 bç lik kesim profili elde edilmiştir. En nadir görülen Tip 3 haplotipinde ise 199. pozisyonda meydana gelen G→A transizyonu sebebiyle 195. pozisyonda görülen *XbaI* kesimi yok olmuş, sadece 115. pozisyonda meydana gelen tek nokta mutasyonu sonucu (T→C) tek kesim ve 2 bant (742 ve 115 bç) elde edilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Type 1

TCTATACCACGACGTTATTCAGACTATCCAGATTCTTATTACTGTTGAAATTCAATTTCA
TCTATAGGATCAATAATTTTCATTAAATAGAATAATTTTTTAATTTTTATTATTTTAGAA
AGATTAATTTCTAAACGAATATTATTATTTAAATTCAACCAATCATCACTTGAATGATT
AAATTTTTTACCACCTCTAGATCATTACATTTAGAAATTCCATTATTAATTAATAATTT
AAATTTAAATCAATTTTAATTAATTTTAATATGGCAGAATAAGTGCATTGAACCTAA
GATTCAAATATAAAGTATTTTTAACTTTTATTAATAATAATAATTAATTTTATTTTATATTG
TTAAAAATAAATTAATAACAATTTTTAATAAAAAATAATAATTTTATTTTATATTG
AATTTTAAATTCATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAA
ATAAACAAAAATATAACAGAATATATTTATTAAAAATTTAATTTATTAAAAATTTCCACAT
GATTCATATTTATATTTCAAGAATCAAATTCATATTATGCTGATAATTTAATTTCAATTC
ATAATATAGTTATAATAATTATTATTATAATTTCAACATTAACCTGTATATATTATTTTAG
ATTTATTTATAAACAAATTTTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTA
TTTGAACAATTATTCCAATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAATAATTTT
ATATTTAATTGATGAAATTGTAAATCCTTTTTTTCAATTAAATCAATT

Şekil 4.3 Tip 1 haplotipinde 195. bç'de tek kesim sonucu 662 ve 195 bç lik 2 bant elde edilmiştir.

Type 2

TCTATACCACGACGTTATTCAGACTATCCAGATTCTTATTACTGTTGAAATTCAATTTCA
TCTATAGGATCAATAATTTTCATTAAATAGAATAATTTTTTAATTTTTATTATTCTAGAA
AGATTAATTTCTAAACGAATATTATTATTTAAATTCAACCAATCATCACTTGAATGATT
AAATTTTTTACCACCTCTAGATCATTACATTTAGAAATTCCATTATTAATTAATAATTT
AAATTTAAATCAATTTTAATTAATTTTAATATGGCAGAATAAGTGCATTGAACCTAA
GATTCAAATATAAAGTATTTTTAACTTTTATTAATAATAATAAATTAATTTTATTTTATATTG
AATTTTAAATTCATCTTAAAGATTTATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAA
TAAACAAAAATATAACAGAATATATTTATTAAAAATTTAATTTATTAAAAATTTCCACATG
ATTCATATTTATATTTCAAGAATCAAATTCATATTATGCTGATAATTTAATTTCAATTC
TAATATAGTTATAATAATTATTATTATAATTTCAACATTAACCTGTATATATTATTTTAGA
TTTATTTATAAACAAATTTTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTAT
TTGAACAATTATTCCAATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAATAATTTTA
TATTTAATTGATGAAATTGTAAATCCTTTTTTTCAATTAAATCAATT

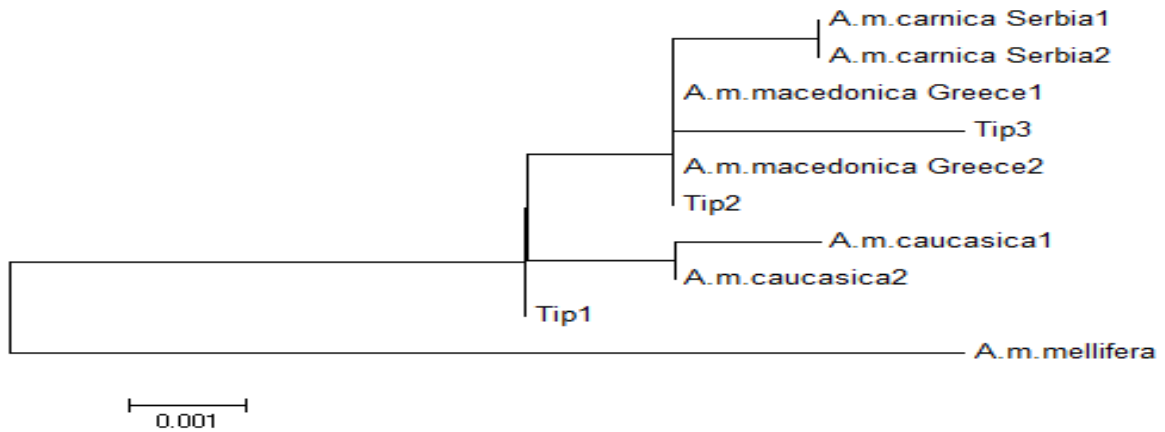
Şekil 4.4 Tip 2 haplotipinde 115 ve 195 bç'de iki kesim sonucu 662, 115 ve 80 bç lik 3 bant elde edilmiştir.

Type 3

TCTATACCACGACGTTATTCAGACTATCCAGATTCTTATTACTGTTGAAATTCAATTTCA
TCTATAGGATCAATAATTTTCATTAAATAGAATAATTTTTTAATTTTTATTAT TCTAGAA
AGATTAATTTCTAAACGAATATTATTATTTAAATTCAACCAATCATCACTTGAATGATT
AAATTTTTTACCACCTCTAAATCATTACATTTAGAAATTCCATTATTAATTAATAATTT
AAATTTAAATCAATTTTAATTAATTTTAATATGGCAGAATAAGTGCATTGAACTTAA
GATTCAAATATAAAGTATTTTTAAACTTTTTATTAAAATTTCCCACTTAATTCATATTAAT
TAAAAATAAATTAATAACAATTTTTAATAAAATAAATAATTAATTTTATTTTTATATTG
AATTTTAAATTCAATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAATTAATAAATTAATATAAA
ATAAAACAAAATATAACAGAATATATTTATTAAAATTTAATTTATTAAAATTTCCACAT
GATTCATATTTTATTTCAAGAATCAAATTCATATTATGCTGATAATTTAATTTCAATTT
ATAATATAGTTATAATAATTATTATTATAATTTCAACATTAAGTGTATATATTATTTAG
ATTTATTTATAAATAAATTTTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTA
TTTGAACAATTATTCCAATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAAAAATTTT
ATATTTAATTGATGAAATTGTAAATCCTTTTTTTTTCAATTAATCAATT

Şekil 4.5 Tip 3 haplotipinde sadece 115 bç.'de tek kesim sonucu 742 ve 115 bç lik 2 bant elde edilmiştir.

Trakya bal arısı örneklerinde COI-COII arası gen bölgesinde PCR-RFLP yöntemi ile tespit edilen üç farklı haplotip ile referans olarak temin edilen Kafkas (*A. m. caucasica*), Karniyol (*A. m. carnica*), Makedonya (*A. m. macedonica*) ve Avrupa Esmer arısı (*A. m. mellifera*) örnekleri ile yapılan DNA dizi analizi sonucu elde edilen Komşu Birleştime Ağacında (Neighbour Joining Dendogram) Tip 1 haplotipi, Kafkas arısı ile aynı kümede bulunurken, Tip 2 ve Tip 3 haplotipleri Makedonya ve Karniyol arısı ile aynı kümede yer almıştır (Şekil 4.6). Analiz edilen tüm Trakya örneklerinde Tip1 haplotipi yaygın bulunan haplotiptir (% 58). Kırklareli ve Edirne'de Tip 2 haplotipi yaygın haplotip olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 6 DNA dizi analizi sonucu elde edilen Komşu Birleştime Ağacı (Neighbour Joining Dendogram)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, Türkiye'nin Trakya bölgesinin 5 farklı yöresine ait bal arılarında mitokondriyel DNA molekülü bakımından genetik yapının tanımlanması, olası yeni haplotiplerin belirlenmesi ve farklı bölgelerde yetiştirilen populasyonlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amacıyla sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölgede (COI-COII arası) *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesim (PCR-RFLP) ve DNA dizi analizi yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında çalışılan tüm Trakya bal arısı örneklerinde COI-COII arası bölgede *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu üç farklı haplotip elde edilmiştir. Tip 1 haplotipinde 662 ve 195 bp'lik 2 bant, Tip 2 haplotipinde 662, 115 ve 80 bp'lik 3 bant ve Tip 3 haplotipinde 742 ve 115 bp'lik 2 banttan oluşan kesim profili tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

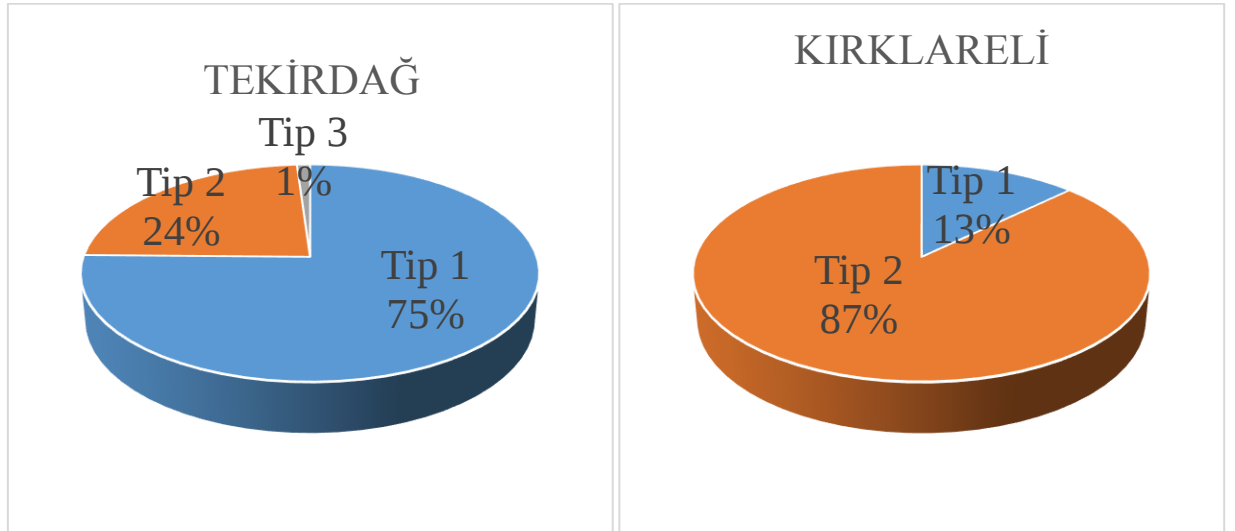
Daha önceki araştırmalarda tek kesim sonucu elde edilen ve bu çalışmada Tip 1 olarak adlandırılan haplotipin tüm Türkiye'den alınan örneklerde görüldüğü ve bu haplotipin Anadolu ve Kafkas arılarında görülen haplotip olduğu bildirilmiştir (Smith ve ark. 1997, Özgül 2007, Özgül ve ark. 2009). Buna karşılık Trakya'dan alınan bir kısım örneklerde aynı gen bölgesinde ikinci bir *XbaI* kesim bölgesi daha olduğu görülmüştür ve bu ilave kesim noktası daha önceki araştırmalarda da belirtilmiştir (Smith ve ark. 1997, Palmer ve ark. 2000). Daha önce yapılan araştırmalarda ikinci bir *XbaI* kesim bölgesine Avusturya ve Balkanlar'da *A. m. carnica* alttürünü temsil eden Karniyol örneklerinde rastlanmıştır (Smith ve Brown 1990, Meixner ve ark. 1993). Bu çalışmada Tip 2 haplotipi olarak adlandırılan, iki adet *XbaI* kesimi barındıran ve daha önce Karniyol arısına ait örneklerde tespit edilen bu haplotip de belirlenmiştir. Ayrıca ilk kez bu çalışmada sadece Tekirdağ ve Gökçeada'dan alınan birer örnekte Tip 3 olarak adlandırılan ve yeni bir kesim profili veren bir haplotip de ortaya konmuştur. Nadir görülen bu haplotipin selektif bir avantajının var olup olmadığının belirlenmesi ve popülasyonda yayılıp yayılmayacağının tespit edilebilmesi için ileriki yıllarda yapılacak çalışmalar ile takip edilmesi yerinde olacaktır.

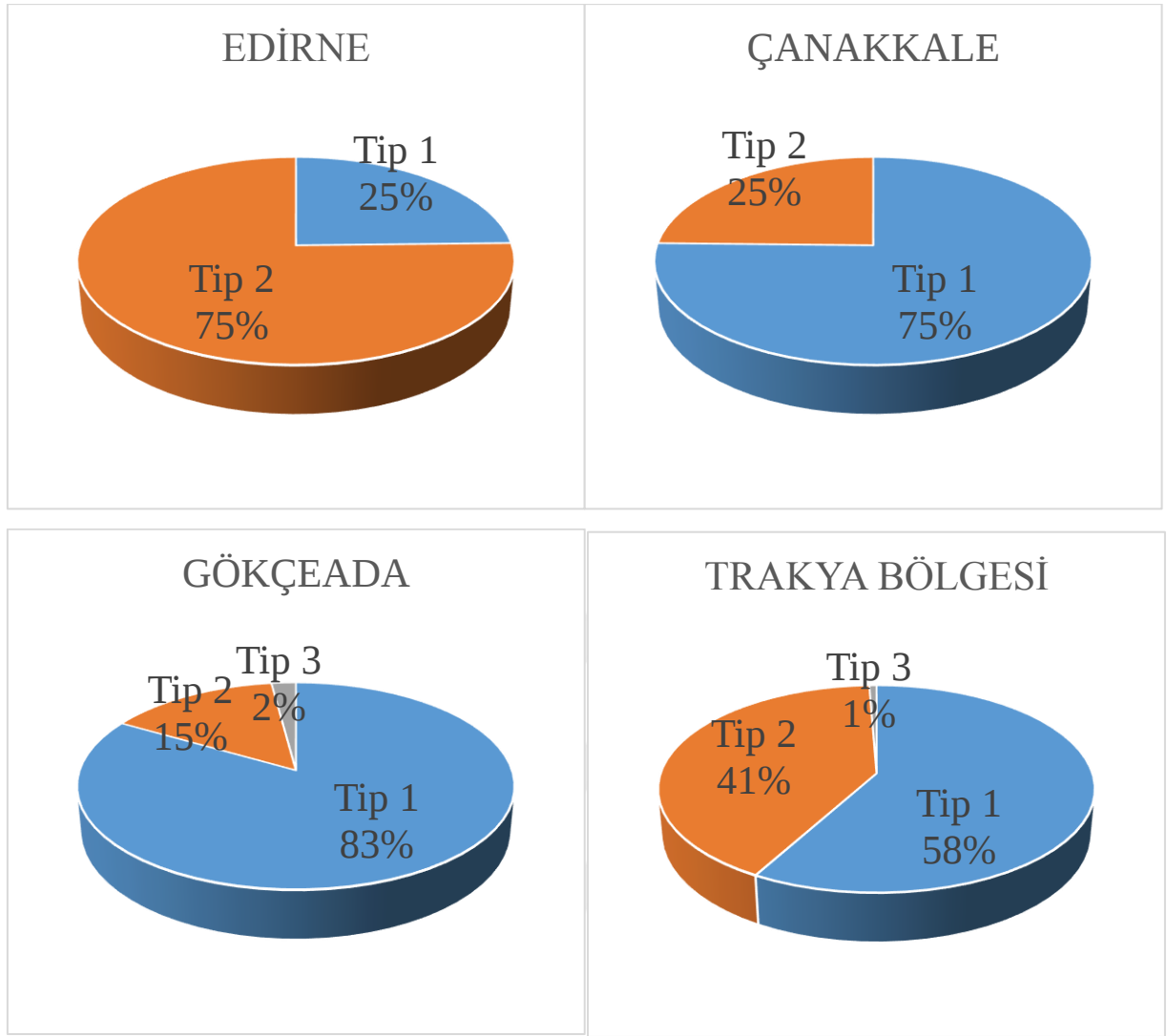
Çizelge 5.1'de haplotiplerin illere göre dağılımı verilmiştir.

Çizelge 5.1 Örneklerin alındığı yerler ve haplotiplerin illere göre dağılımı

Örnek Alınan Yerler	Tip 1 Haplotipi	Tip 2 Haplotipi	Tip 3 Haplotipi
Tekirdağ	70	22	1
Kırklareli	5	34	-
Edirne	17	52	-
Çanakkale	55	18	-
Gökçeada	40	7	1
Toplam	187	133	2

Yürütülen bu çalışma sonucunda Tekirdağ'dan toplanan toplam 93 adet bal arısı örneklerinin %75'i Tip 1, % 24'ü Tip 2, % 1'i Tip 3 haplotipinde bulunmuştur. Kırklareli'den toplanan toplam 39 adet bal arısı örneklerinin ise % 13'ü Tip 1, % 87'si Tip 2 haplotipinde bulunurken, Tip 3 haplotipi hiç gözlenmemiştir. Edirne'den toplanan toplam 69 adet bal arısı örneklerinin % 25'i Tip 1 ve % 75'i Tip 2 haplotipinde bulunurken, Tip 3 gözlenmemiştir. Çanakkale'den toplanan toplam 73 adet örnekte % 75 Tip 1, % 25 Tip 2 haplotipi elde edilmiş ve Tip 3 haplotipi hiç gözlenmemiştir. Gökçeada'dan alınan toplam 48 adet bal arısı örneklerinin % 83'ü Tip 1, % 15'i Tip 2 ve % 2'si Tip 3 haplotipine dahil bulunmuştur. Tüm Trakya bölgesi birlikte ele alındığında toplanan toplam 322 adet bal arısı örneklerinin % 58'inin Tip 1, % 41'inin Tip 2 ve % 1'inin Tip 3 haplotipinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.1).





Şekil 5.1 Bal arısı örneklerinin Tip 1, Tip 2, Tip 3 haplotipi olarak Tekirdağ, Kırklareli, Edirne, Çanakkale ve tüm Trakya bölgesinde % olarak dağılımı

Tüm Trakya bölgesinden toplanan bal arısı örneklerinin haplotiplere göre dağılımı incelendiğinde tüm Türkiye’de yaygın bulunan ve Kafkas ile Anadolu arısına ait olan Tip 1 haplotipinin % 58 oranında Trakya bölgesinde yaygın bulunan haplotip olduğu görülmektedir. Ancak iller bazında dağılımlar ele alındığında özellikle Kırklareli ve Edirne illerinde Tip 2 haplotipinin sırasıyla % 87 ve % 75 oranı ile yaygın bulunan haplotipler olduğu görülmektedir. DNA dizi analizi sonucu özellikle Tip 2 haplotipinin Makedonya ve Karniyol arısı ile aynı kümede yer aldığı düşünüldüğünde Kırklareli ve Edirne illerindeki bal arılarının Makedonya ve Karniyol arısı ile benzer orijinden gelmiş olabileceği fikri akla gelmektedir. Son yıllarda Trakya bölgesinde tüm Türkiye’deki bal arısı alttürlerinden farklı bir alttürün var olduğuna dair hipotezler bu çalışma ile desteklenmiş olmaktadır. Özellikle Kırklareli ilindeki yerli arı gen kaynaklarının korunması amacıyla T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

tarafından 23.06.2005 sayılı 09518 yazılarına istinaden 29-30 Haziran 2005 tarihinde bir heyet görevlendirerek yerli gen kaynaklarının korunması hususunda rapor hazırlanmıştır. 09.06.2010 tarih ve 11442 sayılı bakanlık kararları doğrultusunda Trakya arısının korunması için Kırklareli ili sınırları içerisinde 10.000 koloninin bulunduğu, yaklaşık 30 km çapındaki alan göçer arıcılığa kapatılarak izole bölge oluşturulmuştur. Bu bölgeye arı giriş çıkışları kapatıldığı için Trakya bal arısı kendi içinde yetiştirilmiş ve başka ırklar ile melezleme söz konusu olmamıştır. Trakya bal arısının korunması ve tescil edilmesinin gündeme gelmesi durumunda öncelikle Kırklareli ve ardından Edirne'deki bal arısı popülasyonlarının değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Tekirdağ, Çanakkale ve Gökçeada'da ise Tip 1 haplotipinin yaygın bulunması bu yörelerdeki bal arılarının daha çok Kafkas ve Anadolu arısına benzer olduğunu veya bu ırklar ile melezlemenin olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile uzun yıllardan beri süre gelen Trakya bölgesinde 5. bir alttürün var olup olmadığına dair tartışmalara ışık tutabilecek sonuçlar elde edilmiştir. Halen tüm Trakya bölgesinde yoğun bir melezleme ve karışmanın olduğu görülmekle birlikte aynı zamanda Karniyol ve Makedonya bal arısına benzeyen bir alt türün ya da ekotipin var olduğu da görülmektedir. Bu konuda çalışmalar ırk ve yerli gen kaynaklarının tanımlanması, korunması ve tescil edilmesi kapsamında daha geniş çaplı örnekleme ile morfometri ve genetik çalışmalar birlikte ele alınarak yürütülmeli ve tanımlamalar yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Adam B (1987). Breeding the Honeybee. Northern Bee Books, 118 s UK.
- Adl MBF, Gençer HV, Fıratlı Ç ve Bahreini R (2007). Morphometric Characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatolica*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) Honey Bee Populations, J. of Apic. Res. And Bee World, 46(4):225-231.
- 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.
- Alattal Y, Alsharhi M, Alghamdi A, Alfaify S, Mig-Dadi H ve Ansari M (2014). Characterization of the Native Honey Bee Subspecies in Saudi Arabia Using the mtDNA COI-COII Intergenic Region and Morphometric Characteristics. Bulletin of Insectology, 67(1):31-37.
- Alburaki M (2009). Genetic Analyses of Syrian Honeybee diversity *Apis mellifera syriaca*. Apimondia, Montpellier, France.
- Anderson S, Bankier AT ve Barrell BG (1981). Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. Nature, 290:457.
- Arias MC, Sheppard WS (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution, 5(3):557-566.
- Arias MC, Sheppard WS (2005). Phylogenetic Relationships of Honey Bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) Inferred from Nuclear and Mitochondrial DNA Sequence Data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37:25-35.
- Avise JC, Shapira JF, Daniel SW, Aquadro CF ve Lansman RA (1983). Mitochondrial DNA Differentiation During the Speciation Process in Peromyscus. Molecular Biology and Evolution, 1:147-164.
- Avise JC, Arnold J ve Ball RM (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 489-522.
- Avise JC (2004). Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2nd Ed., Chapman and Hall, 684 s, New York.
- Bensley, RR, Hoerr N (1934). Studies on Cell Structure by Freeze-Drying Method; Preparation and Properties of Mitochondria. Anat Rec. 60, 449-455.
- Bodenheimer, FS (1941). Studies on The Honeybee (*Apis mellifera* L.) and Beekeeping in Turkey, Merkez Ziraat Mücadele Enstitüsü, Ankara.
- Botstein D, White RL, Skolnick M ve Davis RW (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. The American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.

- Brown WM (1985). The Mitochondrial Genome of Animals, Plenum, p:95-130 New York.
- Budak ME (1992). Ülkemizde Çeşitli Kurumlarca Yetiştirilen Ana Arılar ile Oluşturulan Kolonilerin Fizyolojik, Morfolojik ve Davranışsal Farklılıklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 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, 118-120, Berlin.
- Chromas Pro version 1.7.6. (2014). Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD. http://technelysium.com.au/?page_id=27 Erişim Tarihi: 01. 07. 2014
- Cornuet JM, Garnery L (1991). Mitochondrial DNA Variability in Honeybees and It's Phylogeographic Implications. Apidologie, 22: 627- 642.
- Crozier RH, Crozier YC, Mackinlay AG (1989). The COI and COII Region of Honeybee (*Apis mellifera* L.) mtDNA: Evidence for Variation in Insect Mitochondrial Evolutionary Rates, Molecular Biology and Evolution, 6(4):399-411, The University Of Chicago.
- Crozier RH, Crozier YC (1991). The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. Genetics, 133: 97-117.
- Crozier RH, Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics, 133: 97-117.
- Çınar MU (2006). Muğla Yöresi Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Populasyonlarında Morfometrik Varyasyonun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- 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, Galián J, Serrano J ve Moritz RFA (2001). Genetic Structure and Distinctness of *Apis mellifera* L. Populations from the Canary Islands. Molecular Ecology, 10: 1733-1742.
- De la Rúa PR, Jaffé R, Dall' Olio I, Muñoz J ve Serrano (2009). Biodiversity, Conservation and Current Threats to European Honeybees. Apidologie, 40(3):263-284
- 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, Özdemir M ve Polat C (1992). Türkiye'deki Önemli Balarısı (*Apis mellifera* L.) Irk ve Ekotiplerinin Trakya Koşullarında Performanslarının Karşılaştırılması, Doğa- Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 16:403-414, Ankara.
- Doğaroğlu M, Yücel B (2005). Comparison of the Performances of Important Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Races and EcoTypes in Different Regions of Turkey. Apimondia Beekeeping Congress. 21-25. August. 2005. Dublin, Ireland.
- Doğaroğlu M (2007). Çiçekten Sofraya Balın Öyküsü. Yapı Kredi Yayınları. Yayın No: 2593, 270 s, İstanbul.

- Doğaroğlu M (2013). Modern Arıcılık Teknikleri. Anadolu Matbaa, 320 s, İstanbul.
- Engel MS (1999). The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). Journal of Hymenoptera Research, Volume 8(2):165-196.
- Ertuğrul M, Akman N, Dellal G, Goncagül T (2000). Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması ve Türkiye Hayvan gen Kaynakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Volume 1, 285-300, Ankara.
- Eryümlü A (1999). Determination of Morphometric and Electrophoretic Variation in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Populations of Aegean Region of Turkey, M.S.C. Thesis, METU, Ankara.
- Fakhri B (2008). Farklı İran Bal Arısı (*A. mellifera meda*) Populasyonlarında COI-COII Mitokondriyel DNA Lokusları Arasında Yer Alan Bölgedeki Genetik Varyasyonun PCR- RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 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.
- Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K (2001). Phylogenetic Network for European mtDNA. American Journal of Human Genetics. 68: 1475–1484.
- Franck P, Garnery L, Solignac M ve Cornuet JM (1998). The Origin of West European Subspecies of Honey Bees (*Apis mellifera*): New Insights from Microsatellite and Mitochondrial Data, 52 (4):1119-1134.
- Franck P, Garnery L, Solignac M ve Cornuet JM (2000a). Molecular Confirmation of a Fourth Lineage in Honey Bees from the Near East. Apidologie, 31: 167-180.
- Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M ve Cornuet JM (2000b). Hybrid Origins of Honey Bees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A.m. sicula*). Molecular Ecology, 9: 907-921.
- Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M ve Cornuet JM (2001). Genetic Diversity of the Honeybee in Africa: Microsatellite and Mitochondrial data. Heredity, (86): 420-430.
- Fries I (1993). Nosema *Apis*-A Parasite in the Honeybee Colony. Bee World, 75: 5-19.
- 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, Cornuet JM ve Solignac M (1992). Evolutionary History of the Honey Bee *Apis mellifera* Inferred from Mitochondrial DNA Analysis. Molecular Ecology, 1: 145-154.
- Garnery L, Solignac M, Celebrano G ve Cornuet JM (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, Mosshine EH, Oldroyd BP ve Cornuet JM (1995). Mitochondrial DNA Variation in Moroccan and Spanish Honey Bee Populations. Molecular Ecology, 4: 465-471.

- Gençer HV, Fıratlı Ç (1999). Orta Anadolu (*A.m.anatoliaca*) ve Kafkas (*A.m.caucasica*) Arılarının Morfolojik Özellikleri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23(1):107-113.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC ve Gelbart WM (1996). An Introduction to Genetic Analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, 916, New York.
- Gupta RK (2014). Taxonomy and Distribution of Different Honeybee Species. In Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security, Springer Netherlands, 63-103.
- Güler A, Kaftanoğlu O ve Yeninar N (1999). Türkiye'deki Önemli Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Irk ve Ekotiplerinin Morfolojik Karakterler Açısından İlişkilerinin Diskriminant Analiz Yöntemi ile Saptanması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, Ek Sayı 23:337-343.
- Güler A, Akyol E, Gökçe M ve Kaftanoğlu O (2002). Artvin ve Ardahan Yöresi Bal Arılarının (*Apis mellifera* L.) Bazı Morfolojik Özellikleri Yönünden İlişkilerinin Belirlenmesi, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26:596-603.
- Güler A, (2007). Geometrik Morfometrinin Anadolu'daki Bazı Bölge Bal Arılarının (*Apis mellifera* L.) Morfolojik Ayrımındaki Önemi, III. Marmara Arıcılık Kongresi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Bursa.
- Hall HG (1986). DNA Differences Found Between Africanized and European Honeybees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(13):4874-4877.
- Hall HG (1990). Parental Analysis of Introgressive Hybridization Between African and European Honeybees Using Nuclear DNA RFLPs. Genetics, 125:611-621.
- Hall HG, Smith DR (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.
- Hall HG (1998). PCR Amplification of a Locus with RFLP Alleles Specific to African Honeybees. Biochemical Genetics, 36: 351-361.
- Hall T. (1997-2013). BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT /2K/XP/7. Ibis Biosciences, Carlsbad, CA 92008. Erişim Tarihi: 13/08/2015. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Kaftanoğlu O, Kumova U (1989). Çukurova Bölgesi Koşullarında Ana Arı (*Apis mellifera* L.) Yetiştirme Mevsiminin, Ana Arıların Kalitesine Olan Etkileri Üzerine Bir Araştırma Proje resmi sonuç raporu, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veteriner ve Hayvancılık Grubu. Proje no: VHAG-688 Ankara.
- 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 I, Kence A (1995). Allozyme Variation in Central Anatolian Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Populations. Apidologie, 26: 503-510.
- Kandemir I, Kence M ve Kence A (2000). Genetic and Morphometric Variation in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Populations of Turkey. Apidologie, 31: 343-356.

- Kandemir İ, Kence M, Kence A (2005). Morphometric and Electrophoretic Variation in Different Honeybees (*Apis mellifera*) Population. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 885-890.
- Kandemir İ, Kence M, Sheppard WS 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.
- Karacaoğlu M, Fıratlı Ç (1997). Bazı Anadolu Bal Arısı Ekotipleri (*Apis mellifera anatoliaca*) ve Melezlerinin Özellikleri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 22: 17-21.
- 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, Soysal MI (2010). Genetic Diversity of Bee EcoTypes in Turkey and Evidence for Geographical Differences. Romanian Biotechnological Letter 15(5):5646-5653.
- Kence A (2006). Türkiye Bal Arılarında Genetik Çeşitlilik ve Korunmasının Önemi. Uludağ Arıcılık Dergisi, 6(1): 25-32.
- Kennedy EP, Albert L (1949). Oxidation of Fatty Acids and Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates by Isolated Rat Liver Mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 179: 957-972.
- Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (1999) Temel Kimya Cilt 1, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Leonard JV, Schapira HV (2000) Mitochondrial Respiratory Chain Disorders I: Mitochondrial DNA Defects. The Lancet, 355-389.
- Linksvayer TA, Fewell JH, Gadau J ve Laubichler MD (2012). Developmental Evolution in Social Insects: Regulatory Networks from Genes to societies. J Exp Zool (Mol Dev Evol), 318:159-169
- Maa TC (1953). An Inquiry Into The Systematics of The Tribus Apidini or Honeybees (Hymenoptera). Treubia, 21: 525-640.
- Meixner MD, Sheppard WS ve Poklucar J (1993). Asymmetrical Distribution of a Mitochondrial DNA Polymorphism Between 2 Introgressing Honeybee Subspecies. Apidologie, 24: 147-153.
- Milner A (1996). Introduction to Understanding Honeybees, Their Origins, evolution and diversity. <http://www.bibba.com/bibborig.html.pdf> (erişim tarihi, 23.05.2016)
- Moritz RF, Hawkins CF, Crozier RH ve Mackinley AG (1986). A Mitochondrial DNA Polymorphism in Honeybees. Eperientia, 42: 322-324.
- Moritz C, Dawling TE ve Brown WM (1987). Evolution of Animal mtDNA: Relevance for Population Biology and Systematics. Annual Review of Ecology, 18:269-292.
- Moritz RF (1994). Molecular Biology of the Honeybee. Advances in Insect Physiology, 25: 105-149.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G ve Erlich H (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: the Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology, 51: 263-73.

- Mullis K, Faloona F (1987). Specific Synthesis of DNA In Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Mullis K (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262 (4): 56-61.
- Nass S, Nass MMK (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol*, 19:613-29.
- Nelson DL, Cox MM (2005) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü Kılıç N, Palme Yayıncılık, 172s, Ankara.
- Özbilgin N, Alatas İ, Balkan C, Öztürk A ve Karaca Ü (1999). Ege Bölgesi Arıcılık Faaliyetlerinin Teknik ve Ekonomik Başlıca Karakteristiklerinin Belirlenmesi. *Anadolu, J AARI*, 9: 149-170.
- Özdil F (2007). Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye'nin Farklı Yörelerine Ait Bal Arılarının Tanımlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özdil 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.
- Özdil F, Yıldız MA ve Hall HG (2009). Molecular Characterization of Turkish Honey Bee Populations (*Apis mellifera*) Inferred from Mitochondrial DNA RFLP and Sequence Results. *Apidologie*, 40: 570–576.
- Öztürk Aİ (1990). Morphometric Analysis of Some Turkish Honeybees (*Apis mellifera* L.), Master of Philosophy University of Wales College of Cardiff, U.K..
- Öztürk Aİ, Alataş İ, Settari A, Boduroğlu Y, Uyguner B ve Bozkurt M (1992). Ege Bölgesi Arı popülasyonlarında Bazı Morfolojik Özelliklerin Saptanması, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Palmer MR, Smith DR 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.
- Passarge E (2000). Renkli Genetik Atlası. Nobel Tıp Kitapevi, 486 s, Almanya.
- Rahimi, Ataollah (2015). Study of the Genetic Diversity of Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) Populations Using the mtDNA COI-COII Intergenic Region. *Biologija*, 61, 54.
- Rokas A, Ladoukakis E ve Zouros E (2003). Animal Mitochondrial DNA Recombination Revisited. *Trends Ecol Evol.*, 18(8): 411-417.
- 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 (1988). *Biogeography and Taxonomy of Honey Bees* Springer Verlag. 193 p, Berlin.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G ve Erlich H (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230: 1350-54.

- Sheppard WS, Rinderer TE, Meixner MD, Yoo HR, Stelzer JA, Schiff NM, Kamel SM ve Knell R (1996). *HinfI* Variation in mtDNA of Old World Honeybee (*Apis mellifera* L.) Subspecies, J.of Heredity, 87: 35-40.
- Sheppard WS, Arias MC, Grech A ve Meixner MD (1997). *Apis mellifera ruttneri*, a New Honey Bee Subspecies from Malta. Apidologie, 28 (5): 287-293.
- Sheppard WS ve Meixner MD (2003). *Apis mellifera pomonella*, a New Honey Bee Subspecies from Central Asia. Apidologie, 34 (4): 367-375.
- Smith FG (1961). The races of honeybees in Africa. Bee World, 42(10): 255-260.
- Smith DR (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 DR, Taylor OR, Brown WM (1989). Neotropical Africanized Honey Bees (*Apis mellifera* L.) have African mtDNA. Reprinted from Nature, 339(6221):213-215.
- Smith DR ve Brown WM (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.
- Smith DR, (1991). mtDNA and Honeybee (*Apis mellifera* L.) Biogeography, Diversity in the Genus *Apis*, Boulder CO, USA.
- Smith DR, Slaymaker A, Palmer M. ve Kaftanoğlu O (1997). Turkish Honeybees Belong to the East Mediterranean Mitochondrial Lineage. Apidologie, 28 (5): 269-274.
- Smith DR (2002). Genetic Diversity in Turkish Honey Bees. Uludağ Bee Journal, 3(2):10-17.
- Solak M, Bağcı H, Şengil AZ ve Öztaş S (2000). Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel Bilgiler). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı, Yayın No:5, Afyon.
- Solignac M. (1991). Preparation and Visualization of Animal Mitochondrial DNA for RFLP Analysis. NATO ASI series, Vol. H57. Molecular Techniques in Taxonomy (Edited by G.M. Hewitt et al.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sušnik S, Kozmus P, Poklukar J ve Meglic V (2004). Molecular Characterization of Indigenous *Apis mellifera carstica* in Slovenia. Apidologie, 35: 623-636.
- Snyder M, Fraser AR, Laroche J, Gartner-Kepkoy KE ve Zouros E (1987). A Typical mtDNA from The Deep-sea *Scallop placopecter magellanicus*, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 84:7597-7599.
- Taanman JW (1999). The Human Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication. Biochim Biophys Acta, 1410:103.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Thieman WJ ve MA Palladino (2013). Introduction to Biotechnology. Palme Yayıncılık, 340, USA.
- Wilson EO (1971). The insect societies. Belknap Press, Harvard.

- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D ve Tsutsui ND (2006). Thrice out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*, Science, 314: 642-645
- Yücel B, Kösoğlu M (2011). Ege Bölgesi'nde Muğla Ekotipi ve İtalyan Melezi Bal Arılarının Kimi Performans Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 17(6): 1025-1029.



ÖZGEÇMİŞ

Gülşah Ünal, 1988 yılında Tekirdağ'da doğmuştur. İlköğrenimini Süleymanpaşa İlköğretim okulunda, orta öğrenimini 50. Yıl İlköğretim okulunda ve lise öğrenimini Tuğlacılar Lisesinde tamamlamıştır. Namık Kemal Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulunda Gıda Teknolojisi Bölümü'nü 2010 yılında tamamlamıştır. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden 2014 yılında mezun olmuştur.



Ek 1. DNA Dizi Analizi Sonucu

```
#MEGA
!Title fasta file;
!Format
  DataType=Nucleotide
  NSeqs=10 NSites=1062
  Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data;
#A.m.caucasica1      AGACTATCCA GATTCTTATT ACTGTTGAAA TTCAATTTCa TCTATAGGAT CAATAATTTT ATTAAATAGA ATAATTTTTT TAATTTTAT TATTTTAGAA AGATTAATTT CTAAACGAAT
#A.m.caucasica2      .....C
#A.m.mellifera       .....G .G.....T... .....C
#A.m.carnica_Serbia1 .....A.....C
#A.m.macedonica_Greece1 .....C
#A.m.macedonica_Greece2 .....C
#A.m.carnica_Serbia2 .....A.....C
#Tip1                .....C
#Tip3                .....C
#Tip2                .....C
#A.m.caucasica1      ATTATTATTT AAATTCAACC AATCATCACT TGAATGATTA AATTTTTTAC CACCTCTAGA TCATTACAT TTAGAAATTC CATTATTAAT TAAAAATTTA AATTTAAAAAT CAATTTTAAT
#A.m.caucasica2      .....C.....T...
#A.m.mellifera       .....C.....T...
#A.m.carnica_Serbia1 .....C.....T...
#A.m.macedonica_Greece1 .....C.....T...
#A.m.macedonica_Greece2 .....C.....T...
#A.m.carnica_Serbia2 .....C.....T...
#Tip1                .....C.....T...
#Tip3                .....A...
#Tip2                .....A...
#A.m.caucasica1      TAAATTTTAA TATGGCAGAA TAAGTGCATT GAACTTAAGA TTCAAATATA AAGTATTTTT AAACTTTAT TAAATTT---
#A.m.caucasica2      .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#A.m.mellifera       .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#A.m.carnica_Serbia1 .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#A.m.macedonica_Greece1 .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#A.m.macedonica_Greece2 .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#A.m.carnica_Serbia2 .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#Tip1                .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#Tip3                .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
#Tip2                .....T.....AAT AAATTAATAT AAAATATGAA TTATATTAT TAAATTTTAA
```

#A.m.caucasica1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.caucasica2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.mellifera	TTTATTAAAA	TTTTCCACTT	AATTCATTTT	AATTTAAAAA	TATAATTAAA	TAACAATTTT	TAATAAAATA	AATAATTAAT	TTTATTTTTA	TATTGAATTT	TAAATTCAAT	CTTAAAGATT
#A.m.carnica_Serbia1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.macedonica_Greece1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.macedonica_Greece2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.carnica_Serbia2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Tip1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Tip3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Tip2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#A.m.caucasica1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----T	CCCACTTAAT	TCATATTAAT	TTAAAAATAA
#A.m.caucasica2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#A.m.mellifera	TAATCTTTTT	ATTAAAAATTA	ATAAATTAAT	ATAAAAAATA	AAACAAAATA	TAACAAAATA	TATTTATTAA	AATTTAATTT	ATTAAAAATT		T.....	
#A.m.carnica_Serbia1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#A.m.macedonica_Greece1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#A.m.macedonica_Greece2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#A.m.carnica_Serbia2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#Tip1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#Tip3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#Tip2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
#A.m.caucasica1	ATTAA-TAAC	AATTTTAAAT	AAAATAAATA	ATTAATTTTA	TTTTTATATT	GAATTTTAAA	TTCAATCTTA	AAGATTTAAT	CTTTTATATA	AAATTAATAA	ATTAATATAT	AA--TAAAAC
#A.m.caucasica2												..--.....
#A.m.mellifera	A.....										A	..AA.....
#A.m.carnica_Serbia1	-.....										A	..--.....
#A.m.macedonica_Greece1	-.....										A	..--.....
#A.m.macedonica_Greece2	-.....										A	..--.....
#A.m.carnica_Serbia2	-.....										A	..--.....
#Tip1	-.....										A	..--.....
#Tip3	-.....										A	..--.....
#Tip2	-.....							-			A	..--.....
#A.m.caucasica1	AAAATATAAC	AGAATATATT	TATTTAAATT	TAATTTATTA	AAATTTCCAC	ATGATTCATA	TTTATATTTT	AAGAATCAAA	TTCATATTAT	GCTGATAATT	TAATTTTCATT	TCATAATATA
#A.m.caucasica2												
#A.m.mellifera		.A.....										
#A.m.carnica_Serbia1												
#A.m.macedonica_Greece1												
#A.m.macedonica_Greece2												
#A.m.carnica_Serbia2												
#Tip1												
#Tip3												
#Tip2												
#A.m.caucasica1	GTTATAATAA	TTATTATTAT	AATTTCAACA	TTAACTGTAT	ATATTATTTT	AGATTTATTT	ATAAACAAAT	TTTCAAATTT	ATTTTATATA	AAAAATCATA	ATATTGAAAT	TATTTGAACA
#A.m.caucasica2												
#A.m.mellifera		.C.....										
#A.m.carnica_Serbia1												
#A.m.macedonica_Greece1												

