

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**MİTOKONDRIYEL DNA PCR-RFLP (RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK  
POLİMORFİZMİ) MARKERLERİ KULLANILARAK  
TÜRKİYE’NİN FARKLI YÖRELERİNE AİT  
BAL ARILARININ TANIMLANMASI**

**Fulya ÖZDİL**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2007**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ Danışmanlığında, Fulya ÖZDİL tarafından hazırlanan “Mitokondriyal DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye 'nin Farklı Bölgelerine Ait Bal Arılarının Tanımlanması” adlı tez çalışması 17/ 12 / 2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Başkan:** Prof. Dr. A. Çetin FIRATLI

(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı)




**Üye:** Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ

(Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı)



**Üye:** Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ

(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı)



**Üye:** Doç. Dr. Fehmi GÜREL

(Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı)



**Üye:** Doç. Dr. H. Vasfi GENÇER

(Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı)



**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

### MİTOKONDRİYEL DNA PCR-RFLP (RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) MARKERLERİ KULLANILARAK TÜRKİYE 'NİN FARKLI YÖRELERİNE AİT BAL ARILARININ TANIMLANMASI

Fulya ÖZDİL

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ

Bu araştırmada, Türkiye bal arısı popülasyonları 18 farklı mitokondriyel DNA (mtDNA) markeri bakımından tanımlanmıştır. Türkiye'nin 20 farklı yöresinden toplam 244 işçi arı örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bal arısı popülasyonlarının tanımlanmasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizi yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Mitokondriyel genomda anonim, sitokrom b (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (1rRNA), sitokrom C oksidaz I ile sitokrom C oksidaz II arasındaki bölge (COI-COII arası) ve sitokrom C oksidaz I ile sitokrom C oksidaz II intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) dikkate alınmıştır. Çalışmada anonim lokus PCR ile çoğaltılmıştır. Cyt b lokusu *Bgl*II enzimi, COI lokusu *Hinc*II ve *Hinf*I enzimleri, 1rRNA lokusu *Eco*RI enzimi, COI-COII arasındaki bölge *Xba*I enzimi ve COI-COII intergenik bölge *Dra*I enzimleriyle muamele sonucu oluşan 6 adet RFLP markeri ile anonim lokus ve COI-COII intergenik bölgenin dizi analizi sonucunda tespit edilen 11 adet nükleotid farklılığı olmak üzere toplam 18 farklı mtDNA markeri üzerinde durulmuştur.

Türkiye bal arısı popülasyonları 6 farklı RFLP markeri ve anonim lokus bakımından Doğu Avrupa ve Akdeniz (C) genetik soyu içerisinde değerlendirilmiştir. Ayrıca COI-COII intergenik bölgenin DNA dizi analizi sonucunda C1a, C1b, C1c, C1d, C1e, C1f, C1g ile C2a, C2e, C2f ve C2g olmak üzere toplam 11 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotiplerden C1b, C1c, C1d, C1e, C1f, C1g ve C2f ile ifade edilen toplam 7 haplotip ilk defa bu araştırma sonucunda tespit edilmiştir.

**2007, 125 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Apis mellifera* L., mtDNA, PCR-RFLP, DNA dizi analizi, haplotip

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### THE IDENTIFICATION OF HONEY BEES FROM DIFFERENT LOCATIONS OF TURKEY BY USING MITOCHONDRIAL DNA PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) MARKERS

Fulya ÖZDİL

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Animal Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Ali YILDIZ

In this research, the identification of Turkish honeybee populations was investigated using 18 different mitochondrial DNA markers. A total of 244 worker bees from 20 different locations in Turkey were used. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA sequence data were utilized to identify the honeybee populations.

The mitochondrial regions including anonymous locus, cytochrome b (cyt b) gene, cytochrome C oxidase subunit I (COI), large subunit ribosomal RNA (lrRNA), inter cytochrome C oxidase subunit I and cytochrome C oxidase subunit II region (inter COI-COII) and cytochrome C oxidase subunit I and cytochrome C oxidase subunit II intergenic region (COI-COII intergenic region) were analysed in this study.

*Bgl*III restriction profile of the cyt b gene, *Hinc*II and *Hinf*I restriction profile of COI subunit, *Eco*RI restriction profile of lrRNA, *Xba*I restriction profile of inter COI-COII region and *Dra*I restriction profile of the COI-COII intergenic region revealed 6 RFLP markers. Also the nucleotide sequence of the COI-COII intergenic region gave rise to 11 nucleotide sequence variation (haplotype). As a result, anonymous locus, 6 RFLP markers and 11 nucleotide sequence variation in the COI-COII intergenic region revealed a total of 18 different mtDNA markers.

According to the anonymous locus and 6 RFLP markers, Turkish honeybees belong to the East European and Mediterranean (C) lineage. Also, the nucleotide variation in the COI-COII intergenic region revealed 11 different haplotypes designated as C1a, C1b, C1c, C1d, C1e, C1f and C1g in C1 haplotype group and C2a, C2e, C2f and C2g in C2 haplotype group. The C1b, C1c, C1d, C1e, C1f and C1g haplotypes in C1 haplotype group and C2f haplotype in C2 haplotype group were firstly reported in this study.

**2007, 125 pages**

**Key Words:** *Apis mellifera* L., mtDNA, PCR-RFLP, DNA sequence analysis, haplotype

## TEŞEKKÜR

Esas olarak Devlet Planlama Teşkilatı (DPT-2003K12019015-5) kısmi olarak da TÜBİTAK (TOVAG-103V070/VHAG-2046) tarafından desteklenen bu araştırmada; Türkiye'nin 20 farklı yöresinden toplam 244 işçi arı örneği materyal olarak kullanılarak, Türkiye bal arısı populasyonları 18 farklı mitokondriyel DNA markeri bakımından tanımlanmıştır. Projeye ekonomik destek sağlayan DPT ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, çalışmalarımı yönlendiren, her konuda bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yazım aşamasındaki sonsuz sabır ve özverilerinden dolayı danışman hocam sayın Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ 'a, araştırma materyalinin temin edilmesi ile literatür temini noktasında özel kütüphanesindeki temel kaynaklara ulaşma olanağı sağlayan sayın Doç. Dr. H. Vasfi GENÇER 'e, yapıcı ve yönlendirici eleştirilerinden dolayı TİK üyesi sayın Prof. Dr. Çetin FIRATLI ile Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ 'a (A. Ü. Vet. Fak.), Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinden materyal temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Yar. Doç.Dr. Cengiz ERKAN'a (Y.Y.Ü./Van) ve laboratuvar çalışmaları sırasında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Araş. Gör. Hasan MEYDAN, Yasemin GEDİK, Muhammet KAYA'ya da teşekkür ederim.

Laboratuvarında bana çalışma fırsatı vererek moleküler teknikler konusunda önemli bilgiler ve deneyim edindiğim University of Florida, College of Agricultural and Life Sciences, Department of Entomology and Nematology bölümünden Doç. Dr. H. Glenn Hall ve laboratuvar asistanı Raquel McTiernan'a çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımı ABD'de gerçekleştirdiğim sürece desteklerini esirgemeyerek bana yüreğini ve evini açan ve akademik hayatımda örnek aldığım hocam, dayım Doç. Dr. Süleyman TÜFEKÇİ'ye de bir kez daha bu vesile ile teşekkür ederim.

Son olarak, bu güne kadar hemen her konuda olduğu gibi doktora yapmam konusunda da beni yüreklendiren ve bugünlere gelmemde önemli payları olan canım annem, babam ve kardeşim Oya TÜZÜMET'e de teşekkür etmek istiyorum. Ayrıca bu tez çalışmam sırasında sürekli yanımda olan ve birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen eşim İlker ÖZDİL'e ve hayatımın en değerli varlığı canım oğlum Doruk Alp'e de en derin duygularım ile teşekkür ediyorum. Sizlerin desteği ile bu çalışmayı gerçekleştirdim...

Fulya ÖZDİL  
Konya, Aralık 2007

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ .....	8
2.1 Bal Arısının Sistemattikteki Yeri ve Coğrafi Irklar .....	8
2.2 Moleküler Genetik Çalışmalarında Varyasyon Belirleme Yöntemleri .....	14
2.2.1 DNA-DNA hibridizasyonu yöntemi .....	16
2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi .....	17
2.2.3 Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi .....	20
2.2.4 Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) yöntemi .....	21
2.2.5 Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) yöntemi .....	22
2.2.6 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi .....	23
2.2.6.1 Southern emdirim ( <i>blotting</i> ) temelli RFLP yöntemi .....	24
2.2.6.2 PCR temelli RFLP yöntemi .....	26
2.2.7 Basit dizilim tekrarları (SSR), ardışık basit tekrarlar (STR) ya da mikrosatelit yöntemi .....	28
2.2.8 DNA dizi analizi yöntemi .....	29
2.2.9 Moleküler genetik yöntemlerin karşılaştırılması .....	33
2.3 Hayvansal Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı .....	34
2.3.1 Mitokondriyel DNA molekülünde yeni kombinasyonlar oluşmamaktadır ...	35
2.3.2 Mitokondriyel DNA molekülü anaya ait kalıtım modeline sahiptir .....	36
2.3.3 Hayvan mitokondriyel DNA molekülünün içeriği .....	38
2.4 Bal Arılarında Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı .....	41
2.5 Bal arılarında Çalışılan Mitokondriyel (mtDNA) Lokuslar .....	45
2.6 Kaynak Özetleri .....	56
2.6.1 Southern emdirim ( <i>blotting</i> ) temelli araştırmalar .....	56

2.6.2 PCR temelli araştırmalar .....	58
2.6.2.1 Anonim lokus .....	60
2.6.2.2 Sitokrom b (cyt b) lokusu .....	60
2.6.2.3 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu .....	61
2.6.2.4 Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu .....	62
2.6.2.5 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası).....	63
2.6.2.6 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) .....	64
2.6.2.7 ATP sentaz 6 ve 8 (ATPaz 6 ve ATPaz 8) lokusları .....	68
2.6.2.8 NADH dehidrogenaz 2 (ND2) lokusu .....	68
2.6.2.9 NADH dehidrogenaz 5 (ND5) lokusu .....	69
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	70
3.1 Materyal .....	70
3.1.1 Canlı materyal ve örnekleme .....	70
3.1.2 Araç ve gereçler .....	71
3.1.3 Tampon çözeltiler .....	72
3.2 Yöntem .....	73
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu .....	73
3.2.2 Çalışılan mitokondriyel DNA PCR-RFLP lokusları.....	74
3.2.3 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII intergenik bölge) DNA dizi analizi .....	80
3.2.4 Populasyonlar arasındaki nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarına ait genetik uzaklıklar ve dendogram .....	80
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	83
4.1 Anonim Lokus .....	83
4.2 Mitokondriyel DNA PCR-RFLP Lokusları.....	84
4.2.1 Sitokrom b (cyt b) lokusu <i>Bgl</i> III restriksiyon enzimi kombinasyonu .....	84
4.2.2 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu <i>Hinc</i> II restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	85
4.2.3 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu <i>Hinf</i> I restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	86
4.2.4 Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu <i>Eco</i> RI restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	87
4.2.5 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) <i>Xba</i> I restriksiyon enzimi kombinasyonu .....	88

4.2.6 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) <i>DraI</i> restriksiyon enzimi kombinasyonu .....	90
4.3 Sitokrom C Oksidaz I İle II Arasındaki İntergenik Bölge (COI-COII İntergenik Bölge) DNA Dizi Analizi .....	91
4.3.1 C1a haplotipi .....	94
4.3.2 C1b haplotipi .....	95
4.3.3 C1c haplotipi.....	95
4.3.4 C1d haplotipi .....	96
4.3.5 C1e haplotipi.....	96
4.3.6 C1f haplotipi .....	96
4.3.7 C1g haplotipi .....	97
4.3.8 C2a haplotipi .....	97
4.3.9 C2e haplotipi.....	97
4.3.10 C2f haplotipi .....	98
4.3.11 C2g haplotipi .....	98
4.4 Populasyonlar Arasındaki Nükleotid Dönüşümlerinin Beklenen Miktarlarına Ait Genetik Uzaklıklar ve Dendogram .....	102
5. SONUÇ.....	107
KAYNAKLAR .....	111
EK 1 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII intergenik bölge) kısmi nükleotid dizi analizi .....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	126



## SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin nükleotidi
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
ATP	Adenozin trifosfat
AÜZF	Ankara Üni. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Arıcılık Ünitesi
bç	Baz çifti
bdH <sub>2</sub> O	Bidestile su
C	Sitozin nükleotidi
cDNA	Komplementer DNA
COI	Sitokrom C oksidaz I
COII	Sitokrom C oksidaz II
cpDNA	Kloroplast DNA
cyt b	Sitokrom b geni
<i>d</i>	Nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarı
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
G	Guanin nükleotidi
HCl	Hidro klorik asit
kb	Kilobaz
lrRNA	Ribozomun büyük alt birimi
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
M	Mol
mtDNA	Mitokondriyel DNA
mM	Milimol
µM	Mikromol
µL	Mikrolitre
NaCl	Sodyum klorür
nDNA	Çekirdek DNA
nM	Nanomol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pM	Pikomol
RAPD	Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNPs	Tek nükleotid polimorfizmleri
SSR	Basit dizilim tekrarları
STR	Ardışık basit tekrarlar
T	Timin nükleotidi
TKV	Türkiye Kalkınma Vakfı
U	Ünite
TBE	Tris-borik asit-EDTA tampon çözeltisi
TE	Tris-EDTA çözeltisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Morfometrik karakterler kullanılarak temel bileşenler analizi ile Batı bal arılarının üç genetik soya dağılımı (Ruttner <i>et al.</i> 1978).....	11
Şekil 2.2 Morfometrik karakterler kullanılarak temel bileşenler analizi ile Batı bal arılarının uzaysal konumlandırılması (Kauhausen-Keller <i>et al.</i> 1997).....	11
Şekil 2.3 SNPs markerleri kullanılarak Batı bal arılarının dört genetik soya dağılımı (Anonymous 2006, Whitfield <i>et al.</i> 2006).....	12
Şekil 2.4 Morfometrik karakterler kullanılarak Yakın Doğu (O: Oryantal) grubunda yer alan Batı bal arıları (Kauhausen-Keller <i>et al.</i> 1997).....	12
Şekil 2.5 Morfometrik karakterler kullanılarak Batı bal arısı ( <i>Apis mellifera</i> L.) genetik soylarının coğrafi dağılımı. Garnery <i>et al.</i> (1992)'den değiştirilmiştir .....	13
Şekil 2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü.....	18
Şekil 2.7 PCR döngüsü kullanılarak hedeflenen DNA bölgesinin üssel çoğaltımı.....	19
Şekil 2.8 Southern emdirim tekniği ile hibridizasyona dayalı RFLP analizi.....	27
Şekil 2.9 Genetik farklılıkların PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlenmesi .....	28
Şekil 2.10 DNA dizi analizi yöntemleri (Avisé 2004).....	31
Şekil 2.11 Otomatik DNA dizi analizi reaksiyonundan elde edilen veriler.....	32
Şekil 2.12 Endosimbiyotik teori.....	34
Şekil 2.13 Döllenen yumurta ve larvada erkek mtDNA oranının azalması (Moritz 1994). .....	38
Şekil 2.14 Herhangi bir restriksiyon enzimi bakımında haplotiplerin gösterimi .....	39
Şekil 2.15 Batı bal arısı ( <i>Apis mellifera</i> L.) mtDNA genom haritası (Crozier and Crozier 1993) .....	43
Şekil 2.16 <i>Apis mellifera</i> mtDNA genomunun restriksiyon haritası. Cornuet and Garnery (1991)'den değiştirilmiştir.....	44
Şekil 2.17 Mitokondriyel DNA COI-COII intergenik bölge bakımından <i>Apis</i> türlerinin karşılaştırılması. Cornuet and Garnery (1991) ve Moritz (1994) 'den değiştirilerek çizilmiştir.....	47
Şekil 2.18 Bal arılarında COI-COII intergenik bölgenin yapısı. Cornuet <i>et al.</i> (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir .....	49
Şekil 2.19 Po bölgesinde tespit edilen d, d1, d2, d4, d6 ve d7 nükleotid eksilmeleri. Franck <i>et al.</i> (2001)'den çizilmiştir.....	50
Şekil 2.20 tRNA <sup>Leu</sup> ve Q <sub>2</sub> bölgelerinin ikincil (secondary) yapılarının karşılaştırılması. Cornuet <i>et al.</i> (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir .....	52

Şekil 2.21 Batı bal arısı alttürlerinin COI-COII intergenik bölge bakımından sınıflandırılması .....	54
Şekil 2.22 COI-COII intergenik bölge haplotiplerinin restriksiyon haritası (solda) ile restriksiyon parça büyüklükleri (sağda) (Franck <i>et al.</i> 2001) .....	55
Şekil 4.1 Anonim lokus bakımından elde edilen modeller .....	83
Şekil 4.2 Cyt b lokusunda <i>Bgl</i> II restriksiyon enzimi kesim modelleri .....	84
Şekil 4.3 COI lokusunda <i>Hinc</i> II restriksiyon enzimi kesim modelleri .....	85
Şekil 4.4 COI lokusunda <i>Hinf</i> I restriksiyon enzimi kesim modelleri.....	86
Şekil 4.5 1rRNA lokusunda <i>Eco</i> RI restriksiyon enzimi kesim modelleri ve PCR ürünleri .....	87
Şekil 4.6 COI-COII arası <i>Xba</i> I restriksiyon enzimi kesim modelleri ve PCR ürünleri .....	88
Şekil 4.7 COI-COII intergenik bölge <i>Dra</i> I restriksiyon enzimi kesim modelleri.....	91
Şekil 4.8 COI-COII intergenik bölge bakımından Türkiye bal arısı populasyonları arasında nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarından ( <i>d</i> ) elde edilen dendogram .....	106

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bal arılarının taksonomik sınıflandırılması (Engel 1999, Anonymous 2006) .....	8
Çizelge 2.2 Batı bal arısı ( <i>Apis mellifera</i> L.) alttürlerinin coğrafi dağılımı ile morfometri, mtDNA ve SNPs verileri bakımından yer aldıkları genetik soylar .....	9
Çizelge 2.3 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları .....	24
Çizelge 2.4 Moleküler genetik yöntemlerin karşılaştırılması (Avisé 2004).....	33
Çizelge 2.5 <i>A. mellifera</i> mitokondriyel genomunda yapısal protein ve ribozomun büyük ve küçük alt birimlerini kodlayan genler ile bu genlerin A+T içerikleri, <i>D. yakuba</i> mitokondriyel genomu ile olan benzerliği ve her bir genin nükleotid sayısı (Crozier and Crozier 1993, Moritz 1994).....	42
Çizelge 2.6 <i>Apis mellifera</i> alttürleri ve haplotipler (Moritz 1994) .....	48
Çizelge 3.1 Bal arısı örneklerinin alındığı yöreler ve örnek genişlikleri (n) .....	70
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi.....	71
Çizelge 3.3 Elektroforez ve agaroz jellerinin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri .....	72
Çizelge 3.4 Elektroforez ve poliakrilamid jellerinin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri .....	72
Çizelge 3.5 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları, primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynaklar .....	76
Çizelge 3.6 Kullanılan restriksiyon enzimleri, saflaştırıldıkları organizmalar ve restriksiyon yaptıkları özgül tanıma dizileri.....	77
Çizelge 3.7 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları ve bu lokusların çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonları ile programları.....	78
Çizelge 3.8 Kimura'nın İki-Parametre Metodu modelinde nükleotid dönüşümleri .....	81
Çizelge 4.1 Batı bal arısı genetik soylarını belirlemek amacıyla çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları, restriksiyon enzimleri ve restriksiyon bölgelerine göre <i>Apis mellifera</i> mtDNA genetik soyları (Smith <i>et al.</i> 1997, Palmer <i>et al.</i> 2000) .....	89
Çizelge 4.2 <i>Apis mellifera</i> mtDNA C genetik soyu için bildirilen haplotipler ve nükleotid farklılıkları.....	92
Çizelge 4.3 <i>Apis mellifera</i> mtDNA C genetik soyu içinde tespit edilen COI-COII intergenik bölge haplotipleri, <i>DraI</i> restriksiyon uzunlukları ve filogenetik analizlerde kullanılan değişken nükleotid sıraları.....	99

Çizelge 4.4 Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölge bakımından tespit edilen haplotipler ve nükleotid farklılıkları .....	100
Çizelge 4.5 Türkiye bal arısı populasyonlarında tespit edilen haplotipler ve örnek sayıları (n) .....	101
Çizelge 4.6 COI-COII intergenik bölge bakımından Türkiye bal arısı populasyonları arasında nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarına ( <i>d</i> ) ait genetik uzaklıklar .....	105

## 1. GİRİŞ

Evrim ve doğal seleksiyonun bal arısı popülasyonlarının genetik yapılarında meydana getirebileceği genetik değişiklikleri açıklayabilmek için çeşitli özelliklerden yararlanılmaktadır. Bu özellikler esas olarak morfolojik, biyokimyasal ve DNA markerleri olarak sınıflandırılmaktadır. Genetik markerler, protein ya da DNA diziliminde var olan farklılıkları ortaya koymak için çeşitli yöntemler ile belirlenebilen özelliklerdir. Üzerinde durulan herhangi bir özellik bakımından genetik varyasyonun belirlenmesi ve bundan yararlanılarak bireylerin ve popülasyonların tanımlanması kullanılan genetik marker/markerlerin seçimindeki isabete son derece bağlıdır. Çalışılan herhangi bir özellik bakımından genetik markerin başarısı, popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki farklılıkları ortaya koyma gücü, heterozigot genotipteki bireyleri homozigot genotiplerden ayırmaya olanak sağlayan kodominant kalıtım modeli göstermesi, çevre faktörlerinden etkilenmemesi ve ayrıca kullanılan yöntemin kolay ve ucuz olması gibi faktörlere bağlı olarak artmaktadır.

Bal arısı kolonisindeki biyolojik kurallar Aristo'dan beri bilim insanlarını cezbetmiştir. Bal arısı kolonisinde binlerce işçi arının görünüşte rasgele olan ve tek bir hedefte son bulan koşuşturma halindeki faaliyetleri sanki koordine edilmiş bir sistem içinde yürütülmektedir. Bal arılarında keşmekeş halde yürütülen faaliyetlerin gizemi ve nasıl yürütüldüğüne ait modeller Aristo'dan sonra generasyonlar boyunca bilim insanlarının çalışma alanını oluşturmuştur. Bal arısı kolonisinde varolan bu büyük bulmacanın bazı bölümlerinin çözümlenmesi ve bireyler arasındaki iletişimin temellerinin anlaşılması çok uzun zaman almıştır. Moritz (1994)'e göre bal arısı biyolojisi alanındaki önemli sayılabilen öncü çalışmalar, işçi arıların dans dilinin anlaşılmasını (von Frisch 1965) ve ana arının koloni üzerindeki kontrolünün feromonlar (*pheromones*) yoluyla belirlenmesini (Buttler 1973) ortaya koyan araştırmalarla başlamıştır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısında yapılan bal arısı biyolojisi üzerine araştırmalar, davranış ekolojisi ve bireyler arasındaki iletişim üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak, davranış ekolojisi üzerine yoğunlaşan çalışmalar her zaman güçlü olmamış ve bal arıları modern araştırma alanına bir "Genetik Model Sistem" olarak girmiştir (Moritz 1994).

Bal arılarının “Genetik Model Sistem” olarak kullanılmaları 1800’lü yıllara kadar uzanmaktadır. Mendel arılarla denemeler yürütmüş ancak erkek arılarla ana arıları kafeste çiftleştiremediği için çalışmalarında başarısız olmuştur. Böylece Mendel bezelye denemelerine dayanan teorilerini bal arılarında doğrulamak için gerekli olan hiçbir F<sub>2</sub> dölü elde edememiştir. Bal arısı üzerine yapılan çalışmalardaki gerçek başarılar, 1845’te erkek arıların partenogenetik olarak meydana geldiklerinin ortaya konulmasıyla sağlanmıştır. Yirminci yüzyılın başlarında bal arısı, dölleme şeklinin ve kromozom çoğalmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılmıştır. Yirminci yüzyılın ilk çeyreğinde meyve sineği (*Drosophila*)’nin genetik çalışmalarda kullanılmasına başlanıncaya kadar bal arıları başlıca “Genetik Model Sistem”ler içerisinde yer almıştır. Bu tarihten sonra meyve sinekleri Genetik Kontrol Organizması olarak büyük kabul görmüş ve bal arısı genetiği çok özelleşmiş dar bir çalışma alanı haline gelmiştir. Yapay tohumlamanın uygulama alanına girmiş olması bile bal arısı genetiği üzerinde yapılan çalışmaların sayı olarak azalmasını durduramamıştır. Bal arısı bir Genetik Model Sistem olarak meyve sinekleriyle karşılaştırıldığında aşağıda özetlenen bazı olumsuzluklara sahip bulunmaktadır (Moritz 1994). Bu olumsuzluklar;

- a) elle temas etmenin ve herhangi bir uygulama yapmanın zor olması,
- b) embriyonik gelişmenin yavaş olması,
- c) kromozom sayısının (n = 16) fazla olması sonucunda yapılan bağlantı (*linkage*) çalışmalarının uzun zaman alması ve usandırıcı olması,
- d) kontrollü çiftleşmelerin ancak özel alet ve ekipman gerektiren yapay tohumlama ile gerçekleştirilebilmesi,
- e) generasyonlar arası sürenin uzun olması nedeniyle yüksek kalitede yayınların hızlı bir seride yapılamaması ve
- f) bakım ve koruma maliyetlerinin çok yüksek olması şeklinde özetlenebilir.

1960’lı yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarda Genetik Model Sistem olarak bal arıları bir kenara itilmiş ve hemen hemen tüm araştırmalarda meyve sineği kullanılmıştır. Meyve sineği üzerinde yapılan moleküler genetik çalışmalar hızla artarken arı genetiği çalışan bilim insanları daha çok uygulamalı ıslah çalışmalarına yönelmişlerdir. Onlarca yıl şaşırtıcı bir süre çekinceleri olan genetikçiler son yıllarda yavaş yavaş bal arısı araştırmalarına yeniden girmişlerdir. Çünkü yeni ve modern teknikler kullanılarak kimi çok önemli biyolojik sorunlar sadece bal arılarının

kullanılmasıyla çözülebilmektedir. Bal arısı, meyve sinekleri ile karşılaştırıldığında yukarıda özetlenen çeşitli olumsuzluklara sahip olmasına rağmen, bu tip araştırmalarda tamamen kullanılması elverişsiz bir hayvan modeli olarak değerlendirilmemelidir. Gerçekten de bal arılarını “Genetik Kontrol Organizması” olarak diğer organizmalardan daha çekici kılan önemli özellikler bulunmaktadır. Bal arılarını diğer organizmalardan üstün ve temel genetik çalışmalarında kullanılmasını yararlı kılan başlıca özellikler şu şekilde özetlenmiştir (Moritz 1994).

- a) Erkek arıların tek kromozom setine sahip olmaları, haploidlerde gen ürünlerinin çalışılmasına olanak sağlamaktadır.
- b) Zengin davranış çeşitliliği ve sosyal yapı bal arılarını davranış genetiği çalışmalarında başlıca sistem haline getirmektedir.
- c) Embriyonik gelişmenin yavaş olması erken gelişim evrelerinde gen organizasyonları ve ürünleri çalışmalarına birçok olanaklar sunmaktadır.

Bal arılarının ekonomik ve ekolojik önemi devam ettiği sürece, bal arılarında popülasyon genetiği ve ıslah çalışmaları da zorunlu olarak yapılacaktır. Bu noktada doğal ve yapay seleksiyon süreçlerinin ve bunların altında yatan genetik mekanizmaların anlaşılmasında moleküler teknikler araştırmacılara yardımcı olmaktadır. Bugün gelinen safha, meyve sineği kullanılarak elde edilen detaylı moleküler genetik bilgilerin bal arısı genetiği çalışmalarına hızlı bir ilerleme sağlayacak şekilde aktarılmasıdır.

Çeşitli moleküler DNA teknikleri kullanılarak bal arısı genomunun detaylı bir şekilde çalışılmasına yönelik olarak 2003 yılında “*Honeybee Genome*” başlıklı bir proje başlatılmıştır. Geniş katılımlı bir araştırma ekibi (*The Honeybee Genome Sequencing Consortium*) tarafından yürütülen projenin ilk yayınlanan araştırma sonuçlarına göre; bal arısı genomunun büyüklüğü ile nükleotid içeriğinin (A+T nükleotidlerinin yüksek miktarda olduğu) tahmin edilmesine, genomdaki genlerin (yaklaşık 10.000 gen) fonksiyonları ile organizasyonlarına, kromozomların karyotip analizlerine, bal arısı türleri/alttürleri arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesine ve evrim sürecinde bal arısı ile diğer bazı türler arasındaki genomik benzerliklerin ortaya konmasına yönelik çok detaylı veri elde edilmiştir (Anonymous 2006, Whitfield *et al.* 2006).



Çekirdek ve mitokondriyel DNA moleküllerinin kullanıldığı moleküler tekniklerden yararlanılarak bal arılarında gen haritalaması, genlerin organizasyonları ile çalışma esaslarının belirlenmesi, genlerin evriminin anlaşılması ve populasyon genetiği konularında araştırmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Böylece, bal arılarında yürütülen moleküler genetik çalışmalar hem temel genetik mekanizmaların anlaşılması konusundaki bilgilerimizin artmasını hem de bal arılarına özgü genetik problemler hakkındaki bilgi birikiminin daha da iyileştirilmesini sağlamaktadır (Moritz 1994).

Bal arısı türünde yapılan sistematik çalışmalar önceleri morfolojik, 70'ler sonrasında hem morfolojik ve hem de biyokimyasal markerler temelinde yapılmıştır. Ancak morfolojik özelliklerin hemen hemen tamamının kantitatif olmasından dolayı bunların çevre şartlarından etkilenmeleri, biyokimyasal markerlerin ise translasyon sonrası çeşitli değişimlere uğramaları gibi nedenlerden dolayı filogenetik ve evrim çalışmalarında bunların kullanımları giderek azalmaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirtilen eksiklikleri DNA düzeyinde yapılan çalışmalarla giderilmekte ve bu üstünlüklerinden dolayı DNA tabanlı markerlerin sistematik çalışmalardaki kullanımı gittikçe artmaktadır (Garnery et al. 1992).

Bal arısı morfolojilerine göre 4 türde incelenmektedir. Ruttner *et al.* (1978) 'e göre bal arısı türleri;

- a) batı bal arısı (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758)
- b) doğu bal arısı (*Apis cerana* Fabricius, 1793)
- c) dev arı (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ve
- d) cüce arı (*Apis florea* Fabricius, 1787) olarak sınıflandırılmıştır.

Batı bal arısının dışındaki üç bal arısı türü Asya kıtasında bulunmaktadır. Türkiye'de bulunan bal arıları, Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) türü içinde sınıflandırılmıştır. Batı bal arısı Afrika, Avrupa ve Yakın Doğu'yu içine alan çok geniş bir coğrafyada yayılmış bulunmaktadır (Ruttner *et al.* 1978, Ruttner 1988).

Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.)'nın yaklaşık 1 milyon yıl önce (1 Myr BP) 3 farklı genetik soya ayrıldığı bildirilmektedir (Garnery *et al.* 1992). Batı bal arısının evrimi

üzerine iki farklı hipotez bulunmaktadır. İlk hipoteze göre, Yakın Doğu (Hazar Denizi'nin güneyi), Batı bal arısının çıkış merkezidir ve bu bölgeden üç farklı yol izleyerek Avrupa ve Afrika'nın diğer bölgelerine yayılmıştır (Ruttner 1988, Garnery *et al.* 1992). İkinci hipoteze göre, Afrika Batı bal arısının merkezidir ve Cebelitarık Boğazından İber Yarımadasına ve Batı Avrupa'ya, Alp dağlarının güneyini izleyerek de Doğu Avrupa ve Asya'nın ortalarına kadar yayılmıştır. Bu ikinci hipotez, SNPs markerleri kullanılarak yapılan çalışma ile de desteklenmektedir (Whitfield *et al.* 2006).

Morfolojik özellikler kullanılarak yapılan kümeleme analizi (*cluster analysis*) ve temel bileşenler analizi (*principal components analysis*) sonucunda bal arısı alttürlerinin A (*Africa*), M (*Mellifera*) ve C (*Carnica*) olmak üzere üç ana genetik soy içerisinde sınıflandırılabilirliği ifade edilmektedir (Ruttner *et al.* 1978). Buna göre bazı Batı Avrupa ve Kuzey Afrika alttürleri *Mellifera* soyu (M), Orta ve Güney Afrika alttürleri Afrika soyu (A) ve Doğu Avrupa'dan İtalya'ya kadar olan coğrafyadaki *A. m. ligustica* ve *A. m. carnica* alttürleri ile *A. m. caucasica* alttürü Carnica soyu (C) içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu üç ana soya ilave olarak Yakın ve Orta Doğu alttürleri dördüncü bir genetik soy olan Oryantal soyu (O) içerisinde değerlendirilmiştir (Ruttner 1988, Kauhausen-Keller *et al.* 1997).

Son yıllarda mtDNA markerleri kullanılarak yeniden yapılan Batı bal arısı alttürlerinin sınıflandırılmasında, Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller *et al.* (1997) tarafından bildirilen 4 ana sınıflandırma ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, Ruttner (1988) tarafından O genetik soyu içerisinde değerlendirilen *A. m. anatoliaca*, *meda*, *cypria*, *caucasica*, *adami*, *armeniaca*'nın C genetik soyu içerisinde, Suriye (*A. m. syriaca*) arısının ise yine O genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği ifade edilmiştir. (Arias and Sheppard 1996, Franck *et al.* 2000a, Palmer *et al.* 2000). Benzer şekilde Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller *et al.* (1997) tarafından A genetik soyu içerisinde sınıflandırılan Yemen arısının (*A. m. yemenitica*), moleküler yöntemler sonucunda *Yemenitica* (Y) soyu olarak ifade edilen beşinci bir genetik soy içerisinde değerlendirilmesinin daha uygun olacağı bildirilmektedir (Franck *et al.* 2001).

SNPs markerleri kullanılarak yapılan Batı bal arısı alttürlerinin sınıflandırılmasında, Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller *et al.* (1997) tarafından bildirilen 4 ana sınıflandırma ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, Ruttner (1988) tarafından M genetik soyu içerisinde değerlendirilen *A. m. intermissa* alttürünün A genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği ifade edilmiştir (Whitfield *et al.* 2006).

Bal arılarının sınıflandırılması ve populasyondaki genetik varyasyonun tespit edilmesi amacıyla çekirdek (nDNA) ve mitokondriyel (mtDNA) genomda tespit edilebilen DNA markerlerinden yararlanılmaktadır. Çekirdek genomdaki varyasyonu ortaya koymak amacıyla Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs), mikrosatelit ya da Basit Dizilim Tekrarları (SSR) gibi çeşitli marker tekniklerinden yararlanılmaktadır. Çekirdek DNA (nDNA) markerlerinin parça değişimlerine maruz kalması ile hem anaya ve hem de babaya ait kalıtım modeli göstermeleri nedeniyle filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmamaktadır.

PCR, RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak elde edilen çok sayıdaki mtDNA markeriyle yapılan çalışmalar bal arısı populasyonlarının tanımlanması, orijinlerinin belirlenmesi ve filogenetik ilişkilerin ortaya konması gibi birçok konuda oldukça faydalı ipuçlarının tespit edilmesine yardımcı olmuştur. Bu tip markerler ile yapılan araştırmalar morfometri çalışmalarıyla da uyumlu olan daha duyarlı sonuçların ortaya çıkmasını sağlamış ve günümüzde farklı bal arısı alttürlerine özgü çok sayıda mtDNA markeri tespit edilmiştir (Moritz *et al.* 1986, Crozier *et al.* 1991, Hall and Smith 1991, Garnery *et al.* 1991, 1992, 1995, Arias and Sheppard 1996, Smith *et al.* 1997, Franck *et al.* 1998, 2000a, 2000b, Palmer *et al.* 2000, De La Rúa *et al.* 2001).

Batı bal arısı alttürlerinin (*Apis mellifera* L.) de dahil olduğu tüm bal arısı türlerinde mitokondriyel genomda çalışılan lokuslar; sitokrom b (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (18S rRNA), sitokrom C oksidaz I ile II arası bölge (COI-COII arası), COI-COII genleri arası herhangi bir gen ürünü olmayan intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge), ATPaz 6 ve 8, NADH dehidrogenaz 2 (ND2) ve NADH dehidrogenaz 5 (ND5) genleri olarak ifade edilmiştir (Hall and Smith 1991,

Cornuet *et al.* 1991, Crozier *et al.* 1991, Crozier and Crozier 1992, 1993, Arias and Sheppard 1996, Garnery *et al.* 1991, 1992, Moritz *et al.* 1994, Franck *et al.* 2000a, 2000b, 2001, Bouga *et al.* 2005).

Türkiye bal arısı popülasyonlarının sınıflandırılması, tanımlanması ve aralarındaki filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi amacıyla morfometrik (Gürel 1995; Gençer 1996) ve biyokimyasal genetik (Asal *et al.* 1995; Yıldız and Asal 1996; Kandemir and Kence 1995; Kandemir *et al.* 2000, Kılıç ve Bilgen 2006) çalışmaları yapılmıştır. Türkiye bal arısı popülasyonlarının DNA seviyesinde tanımlanmasına yönelik yurt dışında yürütülmüş bir doktora tez çalışmasına rastlanılmış olup, bu çalışma Türkiye bal arısı popülasyonlarını mtDNA seviyesinde tanımlayan ilk araştırma olarak değerlendirilmektedir (Palmer 2000). Daha sonra hem mtDNA ve hem de nDNA 'da yapılan çeşitli araştırmalar ile Türkiye bal arısı popülasyonlarının daha duyarlı olarak tanımlanmasına çalışılmıştır (Smith *et al.* 1997; Palmer *et al.* 2000, Yıldız *et al.* 2005a, 2005b, Kandemir *et al.* 2006a, Özdil *et al.* 2006, Yıldız *et al.* 2006, Özdil *et al.* 2007). Türkiye bal arısı popülasyonları ve ekotiplerinin sınıflandırılması hakkında belirtilen araştırmaların varlığına rağmen, bu konudaki tartışmalar da yoğun bir şekilde sürmektedir. Bu tartışmaların devam etmesinin altında esas olarak Türkiye bal arısı popülasyonları ve ekotiplerinin moleküler DNA markerleri kullanılarak daha detaylı bir şekilde tanımlanmamış olması yatmaktadır. Bu eksikliğe ilave olarak gezginci arıcılığın Türkiye bal arısı gen havuzuna nasıl bir katkı sağladığı da diğer bir tartışma konusunu oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arısı popülasyonlarının çeşitli mtDNA markerleri bakımından tanımlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla PCR, RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak anonim, sitokrom b, (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (1rRNA), sitokrom C oksidaz I ile sitokrom C oksidaz II arasındaki bölge (COI-COII arası) ve sitokrom C oksidaz I ile sitokrom C oksidaz II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) mtDNA lokuslarında, farklı enzim kombinasyonlarından ve COI-COII intergenik bölge'nin DNA dizi analiziyle tespit edilen genetik benzerlikten/farklılıktan yararlanılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Bal Arısının Sistemattikteki Yeri ve Coğrafi Irklar

Bal arısının yaklaşık 1 milyon yıl önce evrimleştiği ve kimi araştırmacılara göre Asya kıtasından kimi araştırmacılara göre ise Afrika kıtasından Avrupa kıtasına yayıldığı bildirilmektedir. İlk arı kalıntıları 40 milyon yıl öncesine dayanan fosil kalıntılarında bulunmuştur. Batı bal arısının (*Apis mellifera* L.) orijini Kuzey Doğu Afrika ve Yakın Doğu olup bu bölgelerden Avrupa ve Afrika'nın diğer bölgelerine yayıldığı öne sürülmektedir (Ruttner *et al.* 1978). Bal arısının taksonomik sınıflandırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Bal arılarının taksonomik sınıflandırılması (Engel 1999, Anonymous 2006)

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

Bal arısı alttürleri, buldukları coğrafyada hem yapay hem de doğal seleksiyonun ortak etkisi sonucu ortaya çıkmışlardır. Bu nedenle çiftlik hayvanlarındaki ırk kavramının karşılığı olarak bal arılarında coğrafi ırk kavramının kullanılması tercih edilmektedir. Bir coğrafi ırk içindeki özel ekolojik şartlara uyum sağlamış gruplara da ekotip (*ecotype*) denilmektedir (Ruttner 1988).

Dünyada en fazla yetiştiriciliği yapılan bal arısı türü Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.)'dir. Batı bal arısının morfometri ve moleküler çalışmalara dayanarak 24 coğrafi ırka ayrıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Batı bal arıları 4 farklı genetik soy içerisinde değerlendirilmekte olup bunların coğrafi dağılımları Çizelge 2.2'de verilmiştir (Ruttner 1988).

Çizelge 2.2 Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) alttürlerinin coğrafi dağılımı ile morfometri, mtDNA ve SNPs verileri bakımından yer aldıkları genetik soylar

Batı bal arısı alttürlerinin coğrafi dağılımı (Ruttner 1988)	Morfometri (Ruttner 1988, Kauhausen- Keller <i>et al.</i> 1997)	MtDNA (Franck <i>et al.</i> 2000a, 2000b, 2001)	SNPs (Whitfield <i>et al.</i> 2006)
<b>I. Yakın Doğu (Near East)</b>			
1. <i>A. m. anatoliaca</i> Maa (1953)	O	C	O
2. <i>A. m. adami</i> Ruttner (1975)	O	-	-
3. <i>A. m. cypria</i> Pollmann (1879)	O	C	-
4. <i>A. m. syriaca</i> Buttel-Reepen (1906)	O	O	O
5. <i>A. m. meda</i> Skorikov (1929)	O	C	-
6. <i>A. m. caucasica</i> Gorbachev (1916)	O	C	O
7. <i>A. m. armeniaca</i> Skorikov (1929)	O	C	-
<b>II. Tropik Afrika (Tropical Africa)</b>			
8. <i>A. m. lamarckii</i> Cockerell (1906)	A	A-O	A
9. <i>A. m. yemenitica</i> Ruttner (1975)	A	Y	-
10. <i>A. m. litorea</i> Smith (1961)	A	A	A
11. <i>A. m. scutellata</i> Lepeletier (1836)	A	A	A
12. <i>A. m. adansonii</i> Latreille (1804)	A	A	-
13. <i>A. m. monticola</i> Smith (1961)	A	A	-
14. <i>A. m. capensis</i> Escholtz (1821)	A	A	A
15. <i>A. m. unicolor</i> Latreille (1804)	A	-	A
<b>III. Akdeniz (Mediterranean)</b>			
<b>1. Batı Akdeniz (West Mediterranean)</b>			
<b>a) Kuzey Afrika (North Africa)</b>			
16. <i>A. m. sahariensis</i> Baldensperger (1924)	A	-	-
17. <i>A. m. intermissa</i> Buttel-Reepen (1906)	M	-	A
<b>b) Batı Akdeniz ve Kuzey Avrupa (West Mediterranean and North Europe)</b>			
18. <i>A. m. iberica</i> Goetze (1964)	M	M	M
19. <i>A. m. mellifera</i> Linnaeus (1758)	M	M	M
<b>2. Orta Akdeniz ve Güneydoğu Avrupa (Central Mediterranean and South East Europe)</b>			
20. <i>A. m. sicula</i> Montagano (1911)	C	A-C	-
21. <i>A. m. ligustica</i> Spinola (1806)	C	C	C
22. <i>A. m. cecropia</i> Kiesenwetter (1860)	C	C	-
23. <i>A. m. macedonica</i> Ruttner (1987)	C	C	-
24. <i>A. m. carnica</i> Pollmann (1879)	C	C	C

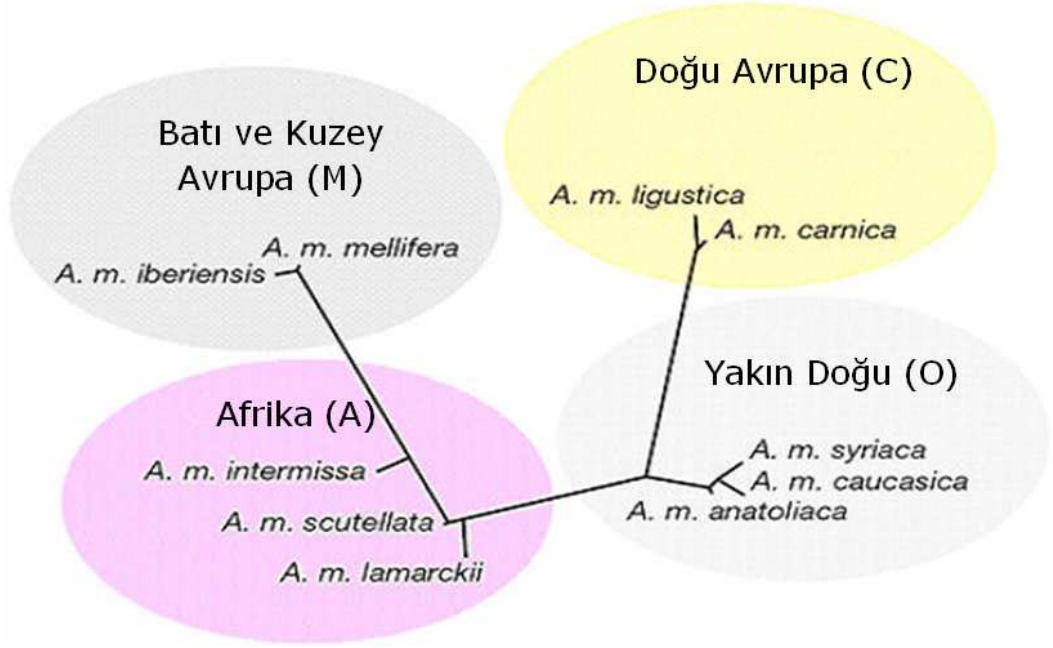
Şekil 2.1’de görülebileceği gibi, morfolojik özellikler kullanılarak yapılan kümeleme (*cluster analysis*) ve temel bileşenler analizi (*principal components analysis*) sonucunda Batı bal arısı alttürlerinin Mellifera (M), Afrika (A) ve Carnica (C) olmak üzere üç ana genetik soy içerisinde sınıflandırılabilceği ifade edilmektedir (Ruttner *et al.* 1978). Daha sonraları Şekil 2.2-2.4’de görülebileceği gibi, Yakın Doğu bal arısı alttürleri Oryantal (O) olarak adlandırılan dördüncü genetik soy içerisinde değerlendirilmiştir (Ruttner 1988, Kauhausen-Keller *et al.* 1997, Whitfield *et al.* 2006).

Batı Akdeniz ve Kuzey Avrupa alttürleri (*A. m. mellifera* ve *A. m. iberica*) M soyu, Orta ve Güney Afrika alttürleri A soyu, Doğu Avrupa’dan İtalya’ya kadar olan coğrafyadaki *A. m. carnica*, *cecropia* ve *ligustica* alttürleri C soyu (Ruttner *et al.* 1978) ve daha sonraları bu genetik soylara ilave bir soy eklenerek, Yakın Doğu alttürleri O soyu içerisinde değerlendirilmiştir (Ruttner 1988, Kauhausen-Keller *et al.* 1997). Moleküler DNA teknikleri temelinde yapılan çalışmalar sonucu Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller *et al.* (1997) tarafından O genetik soyu içerisinde değerlendirilen *A. m. anatoliaca*, *meda*, *cypria*, *caucasica*, *adami* ve *armeniaca*’yı içeren Yakın Doğu bal arısı alttürlerinin C genetik soyu içerisinde, Suriye (*A. m. syriaca*) arısının ise yine O genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği ifade edilmektedir (Arias and Sheppard 1996, Franck *et al.* 2000a, Palmer *et al.* 2000). Franck *et al.* (2001)’de Etiyopya’dan alınan *A. m. yemenitica* örneklerinin Y (*yemenitica*) olarak adlandırılan yeni bir Yemen genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği bildirilmektedir. Whitfield *et al.* (2006), SNPs markerlerinden yararlanarak, Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller *et al.* (1997) tarafından bildirilen 4 ana sınıflandırma ile paralel sonuçlar elde etmiş ancak Ruttner (1988) tarafından M genetik soyu içerisinde değerlendirilen *A. m. intermissa*’nın A genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Çizelge 2.2).

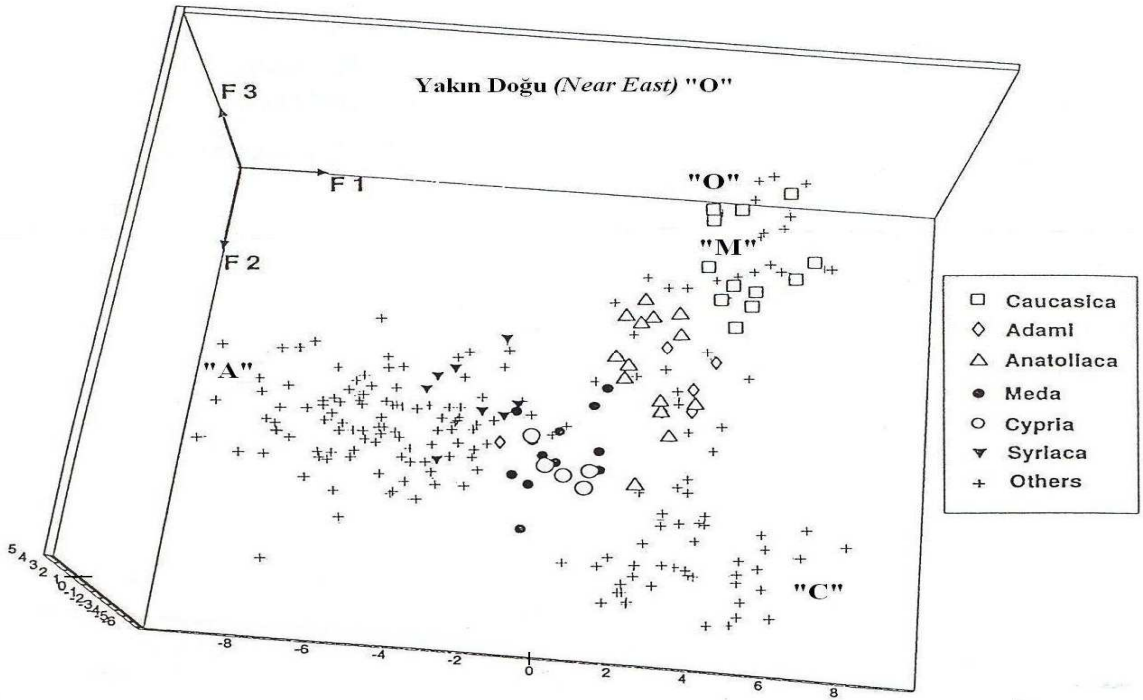
Belirtilen gruplandırmalara ilave olarak bazı bölgelerde iki soy arasında bir geçişin de görülebileceği tespit edilmiştir. Sicilya adasındaki bal arılarının (*A. m. sicula*) büyük bir kısmı A soyu içinde değerlendirilirken bir kısmı C soyuna dahil edilmiştir (Franck *et al.* 2000b). Yine İspanya’nın güneyinden kuzeyine doğru *A. m. iberica* ırkında A soyundan M soyuna doğru bir geçişin olduğu da bildirilmektedir (Smith *et al.* 1991, Garnery *et al.* 1995, Franck *et al.* 1998).



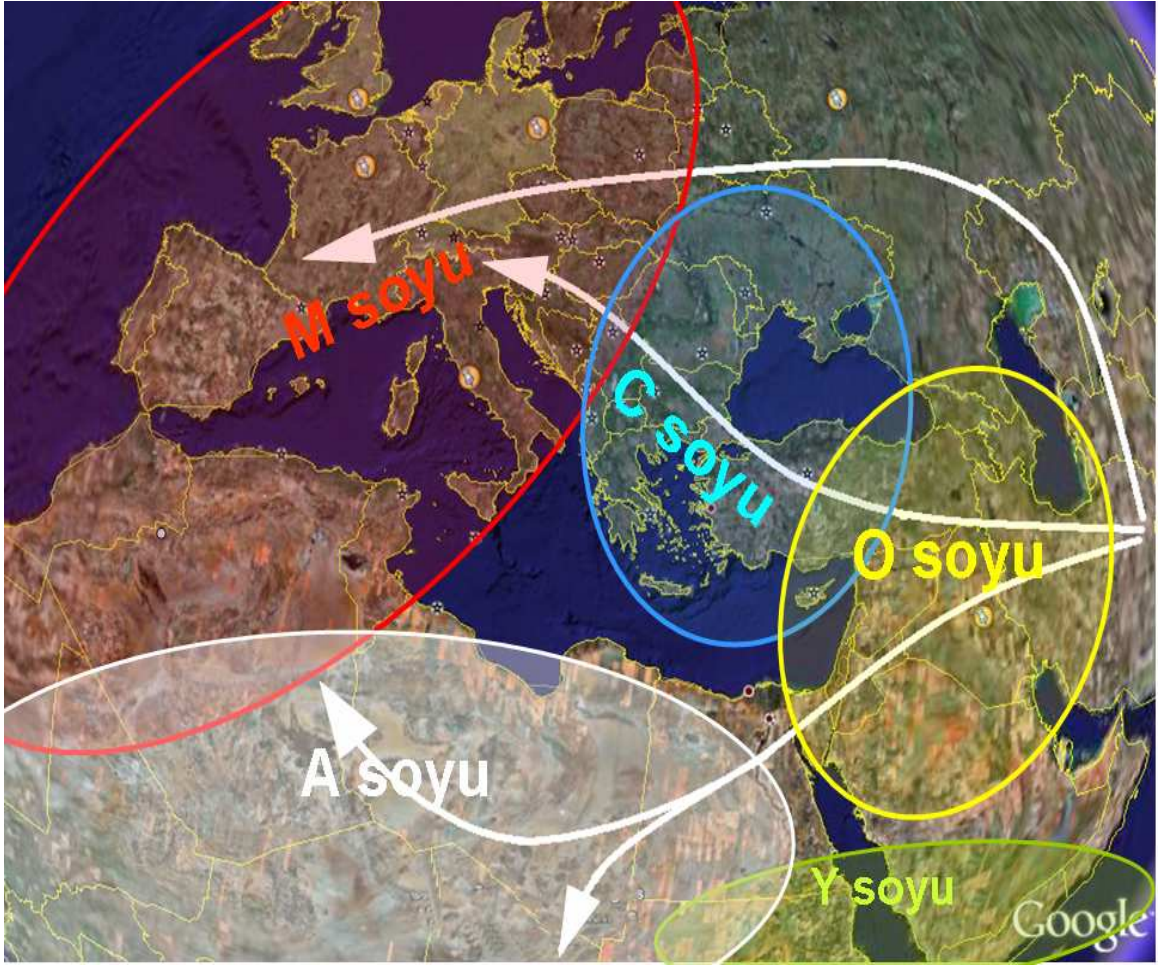




Şekil 2.3 SNPs markerleri kullanılarak Batı bal arılarının dört genetik soya dağılımı (Anonymous 2006, Whitfield *et al.* 2006)



Şekil 2.4 Morfometrik karakterler kullanılarak Yakın Doğu (O: Oryantal) grubunda yer alan Batı bal arıları (Kauhausen-Keller *et al.* 1997)



Şekil 2.5 Morfometrik karakterler kullanılarak Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) genetik soylarının coğrafi dağılımı. Garnery *et al.* (1992)'den değiştirilmiştir

Son yapılan çalışmalar ile Çizelge 2.2'de verilen coğrafi ırklara yenileri ilave edilmektedir. Örneğin, Malta adasındaki endemik bal arıları morfolojik, davranış ve mitokondriyel DNA dizi analizleri sonucunda ayrı bir coğrafi ırk olarak kabul edilmiş ve Prof. Friedrich Ruttner'in anısına bu arılara *A. m. ruttneri* denilmiştir. *A. m. ruttneri*'nin Avrupa arılarından çok Kuzey Afrika'daki *A. m. intermissa*'ya benzediği bildirilmiştir (Sheppard *et al.* 1997). Yine Orta Asya'da Tien Shan dağlarında endemik bir bal arısı olan *Apis mellifera pomonella* hem morfolojik karakterler (Sheppard *et al.* 1997) ve hem de SNPs markerleri (Whitfield *et al.* 2006) bakımından O, mitokondriyel DNA dizi analizleri (Sheppard *et al.* 1997) sonucunda ise C genetik soyu içerisinde değerlendirilmiştir. *A. m. pomonella* arısının morfolojik özellikler bakımından O genetik soyu içerisinde yer almasına rağmen bu genetik soy içerisinde bulunan diğer alttürlerden farklılık gösterdiği bildirilmektedir. Bu nedenle *A. m. pomonella*'nın

morfolojik özellikler bakımından hem O hem de C genetik soyu içinde değerlendirilebileceği ifade edilmektedir (Sheppard and Meixner 2003).

Dünya da ekonomik değeri yüksek olan ve kültürü yaygın olarak yapılan bal arısı ırkları, Esmer (*A. m. mellifera*), İtalyan (*A. m. ligustica*), Kafkas (*A. m. caucasica*) ve Karniyol (*A. m. carnica*) bal arılarıdır.

Türkiye'nin farklı iklim ve yerleşim şartlarına sahip birçok Asya, Avrupa ve Ortadoğu ülkelerinin geçiş yolları üzerinde yer alması ile iklim koşulları ve topografik yapının çok değişken olması mevcut bal arısı populasyonlarının birbirlerinden olan farklılıklarını artıran ana unsurlar olarak değerlendirilmektedir. Belirtilen bu faktörlerin bir sonucu olarak Türkiye bal arısı populasyonlarının morfolojik ve ekolojik veriler temelinde birbirlerinden oldukça farklılık gösterdiği ve Türkiye'nin kuzeydoğusunda Kafkas arısı (*A. m. caucasica*)'nın ve Güneydoğusunda İran arısı (*A. m. meda*)'nın bulunduğu, bunun dışındaki tüm bölgelerde Anadolu arısının (*A. m. anatoliaca*) ana populasyonu oluşturduğu bildirilmektedir (Ruttner 1988). Yapılan diğer çalışmalarda ise Hatay ilinde Suriye arısının (*A. m. syriaca*) bulunabileceği ifade edilmektedir (Palmer *et al.* 2000, Kandemir *et al.* 2006a).

## 2.2 Moleküler Genetik Çalışmalarında Varyasyon Belirleme Yöntemleri

Populasyonlar ya da bireyler arasında var olan 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 aynı olan iki birey elde etmek neredeyse imkansızdır. Aynı genotipe sahip canlılar arasında bile (tek yumurta ikizleri, vejetatif çoğalan canlılar, klonla çoğaltılan canlılar vs.) farklılıklar bulunabilmektedir.

Canlılarda ele alınan özellik/özellikler bakımından fenotipik varyasyonun çevre ve genotip olmak üzere başlıca iki kaynağı bulunmaktadır. Genetik varyasyon ise üzerinde durulan özellik/özellikler bakımından canlılar arasındaki genotipik yapıdan kaynaklanan

farklılıkları ifade etmektedir. Genetik varyasyonun esas kaynağını DNA molekülündeki dört farklı baz çiftinin sayısı ve bunların dizilimlerindeki farklılıklar oluşturmaktadır.

Genetik materyal çeşitli faktörlere bağlı olarak değişikliğe uğrayabilir. Bunun sonucunda da bireyler arasındaki genotipik farklılıklar meydana gelmektedir. Genetik materyalde meydana gelen farklılıkların temel kaynağı mutasyondur. Mutasyon (*mutation*) genetik materyalde meydana gelen ani ve kararlı değişiklikler olup, esas olarak nükleotid (nokta veya gen) ve kromozom seviyesinde meydana gelen mutasyonlar olarak iki sınıfta değerlendirilmektedirler. Belirtilen mutasyonlara ilave olarak homolog olmayan kromozomlar arasındaki parça değişimleri (*translocation*) ile eşeyli çoğalan canlılarda üreme hücrelerinin meydana gelmesi sürecinde homolog kromozomlar arasında meydana gelen parça değişimleri (*crossing-over*) de canlılar arasındaki genetik farklılıkların temel nedenleri arasında yer almaktadır. Mutasyona ilave olarak şans, seleksiyon ve göçün de birlikte etkisiyle populasyonların gen ve genotip frekansları değişikliğe uğrayarak uzun yıllar sonra genetik dengede olan bir populasyon, köken aldığı populasyonun genetik yapısından çok daha farklı bir yapıya sahip olabilmektedir.

Son 40 yıl içerisinde moleküler seviyede yapılan genetik varyasyonun biyokimyasal özellikler temelinde belirlenmesi çalışmaları sonucunda, biyolojik organizmaların genetik yapıları ve bunların evrimi hakkında faydalı ipuçları elde edilmiştir. Genetik varyasyonun biyokimyasal düzeyde tespit edilmesine yönelik ilk çalışmalar yirminci yüzyıl başlarında gerçekleştirilmiştir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar arasında yer alan ABO kan grubu sistemi bakımından insanların farklı genetik yapılarda olduğu tespit edilmiştir. Kan grubu sisteminde ortaya konan prensipler farklı insan grupları arasında yapılan ilk gruplandırma araştırmalarına da uygulanmıştır. Belirtilen bu nadir öncü çalışmalara rağmen, biyokimyasal genetik çalışmaları ve bunların evrim çalışmalarında kullanımı esas olarak 1960'lı yıllardan sonra hız kazanmıştır (MacHugh 1996).

İlk kez 1966 yılında uygulanan protein elektroforezi tekniği ile biyokimyasal düzeyde genotipik yapının belirlenmesine başlanmıştır. Aminoasitler, proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize olabilen gruplara sahiptirler. Bu

gruplar, solusyonlarda katyon (+) ya da anyon (-) olmak üzere yüklü moleküller halinde bulunabilirler. Benzer yüklü moleküller farklı molekül ağırlıklarına sahip olduklarında yük/kütle oranları da farklı olacağından, solusyondaki iyonlar elektrik akımı etkisine bırakılırlarsa molekül ağırlıkları temelinde farklı bant modelleri göstereceklerdir. Buradan yola çıkarak elektroforez işlemi bir elektrik alanı etkisine bırakılan biyolojik moleküllerin yüklerine, büyüklüklerine ve şekillerine bağlı olarak ayrılmaları şeklinde tanımlanmaktadır (Hames and Rickwood 1990). Evrim süreci içerisinde populasyonlar içi ve populasyonlar arasındaki farklılıkların/benzerliklerin tespit edilmesi amacıyla biyokimyasal genetik markerler (protein ve enzim), 1990'lı yıllara kadar standart protokoller halinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Biyokimyasal genetik çalışmaların doğasından kaynaklanan kimi zorlukları gidermek amacıyla DNA molekülü seviyesinde daha duyarlı yeni yöntemlerin geliştirilmesine başlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında DNA-DNA hibridizasyonu (*DNA-DNA hybridization*), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Basit Dizilim Tekrarları (SSR, *Simple Sequence Repeats*), Ardışık Basit Tekrarlar (STR, *Simple Tandem Repeats*), mikrosatelitler (*microsatellites*) ve DNA dizi analizi (*DNA sequencing*) gibi yöntemler yer almaktadır.

### **2.2.1 DNA-DNA hibridizasyonu yöntemi**

Çekirdek DNA düzeyinde farklılıkların tespit edilmesi amacıyla ilk olarak DNA-DNA hibridizasyon tekniği geliştirilmiştir. DNA-DNA hibridizasyon tekniği farklı türlere ait DNA eksenlerinden oluşan sarmal bir DNA molekülünün (hibrit) oluşturulması esasına dayanmaktadır. 1980'lerde çeşitli canlılarda filogenetik ilişkilerin açıklanmasında bu teknik kullanılmıştır. Ancak, teorik olarak genom hakkında bir ön bilgiye sahip olunmasının zorunluluğu ve uygulama aşamasındaki kimi zorluklar nedeniyle bu tekniğin yerini doğrudan DNA analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan PCR temelli yöntemler almıştır (MacHugh 1996, Avise 2004).

### 2.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi

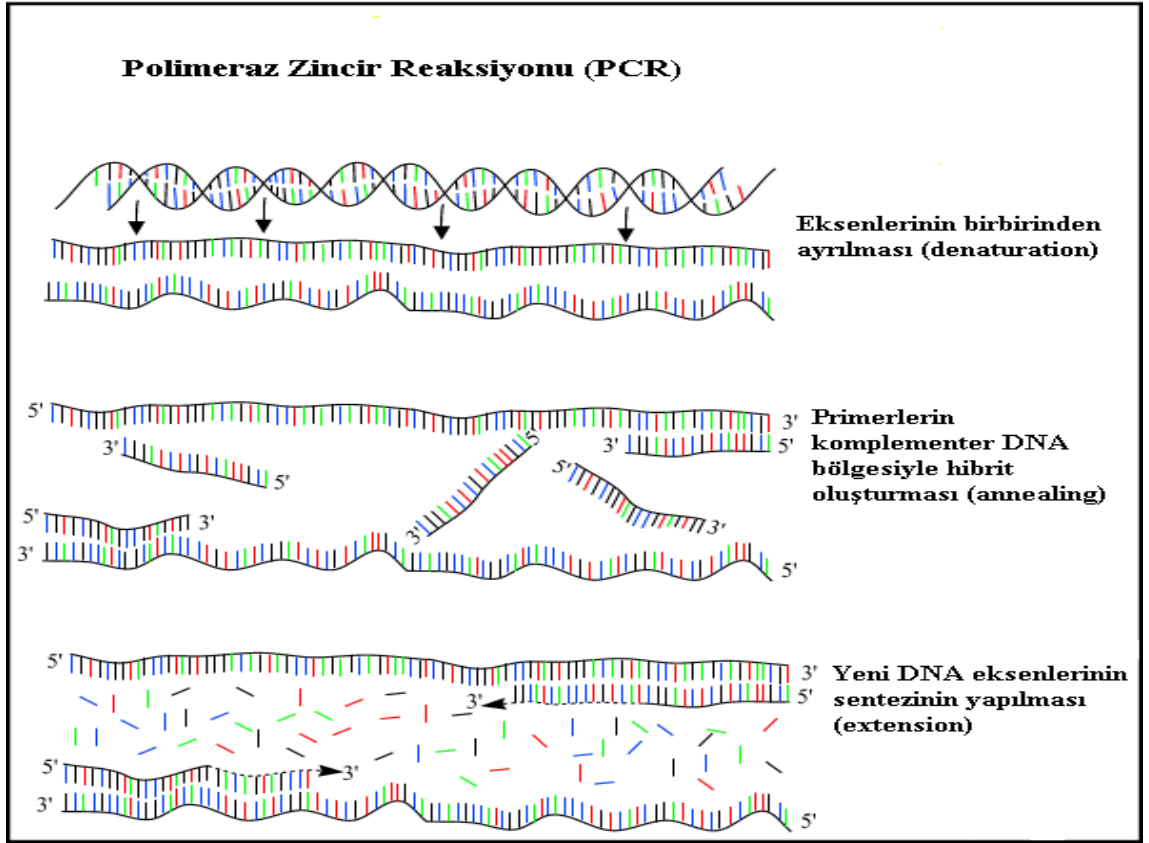
Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin geliştirilmesi moleküler biyoloji alanında çok önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir (Saiki *et al.* 1985, Saiki *et al.* 1988). Bu tekniğin geliştirilmesinden sonra birçok organizmada DNA varyasyonu tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda büyük bir artış olmuştur.

PCR doğal DNA replikasyon işleminin temel bileşenleri kullanılarak DNA'nın tüpler içinde çoğaltılması ya da kopyalanmasıdır. Hücrede pek çok proteinin ve enzimin rol aldığı karmaşık işlemler sonucunda bütün bir genom replike olmaktadır. Çok basit olarak DNA ikili sarmalı açılmakta, ebeveyn molekülün her bir eksen kalıp (şablon) olarak kullanılarak yeni iki tamamlayıcı (komplementer) eksen sentezlenmektedir. Yeni eksenlerin sentezlenmesi, Watson and Crick (1953) kurallarına göre A-T ve G-C arasında olacak şekilde baz çiftlerinin oluşması yeteneğine bağlıdır. Ayrıca DNA replikasyonunun başlayabilmesi için kalıp DNA ile tamamlayıcı olan RNA primerlerinin de sentezlenmesi gerekmektedir. DNA polimeraz enzimi, kısa oligonükleotidlerin (primer) 3' OH ucuna yeni nükleotidleri ekleyerek yeni oluşan DNA eksenini uzatabilmektedir. DNA'nın tüpler içinde çoğaltılması için; 6-30 nükleotid uzunluğunda primerlere, optimum pH seviyesine ve tuz konsantrasyonunu optimum yapan tampon çözeltiliye, DNA polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu magnezyum'a ve yeni sentezlenecek olan zincire eklenecek 4 tip nükleotide (dNTP) ihtiyaç duyulmaktadır (McPherson and Møller 2001).

PCR yöntemi genel olarak üç basamaklık bir döngünün defalarca tekrarlanmasına dayanan bir teknik olup üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar;

- a) DNA eksenlerinin birbirinden ayrılması (*denaturation*),
- b) Primerlerin komplementer DNA bölgesiyle hibrit oluşturması (*annealing*) ve
- c) Yeni eksenlerin sentezinin yapılması (*extension*) aşamalarıdır (Şekil 2.6).

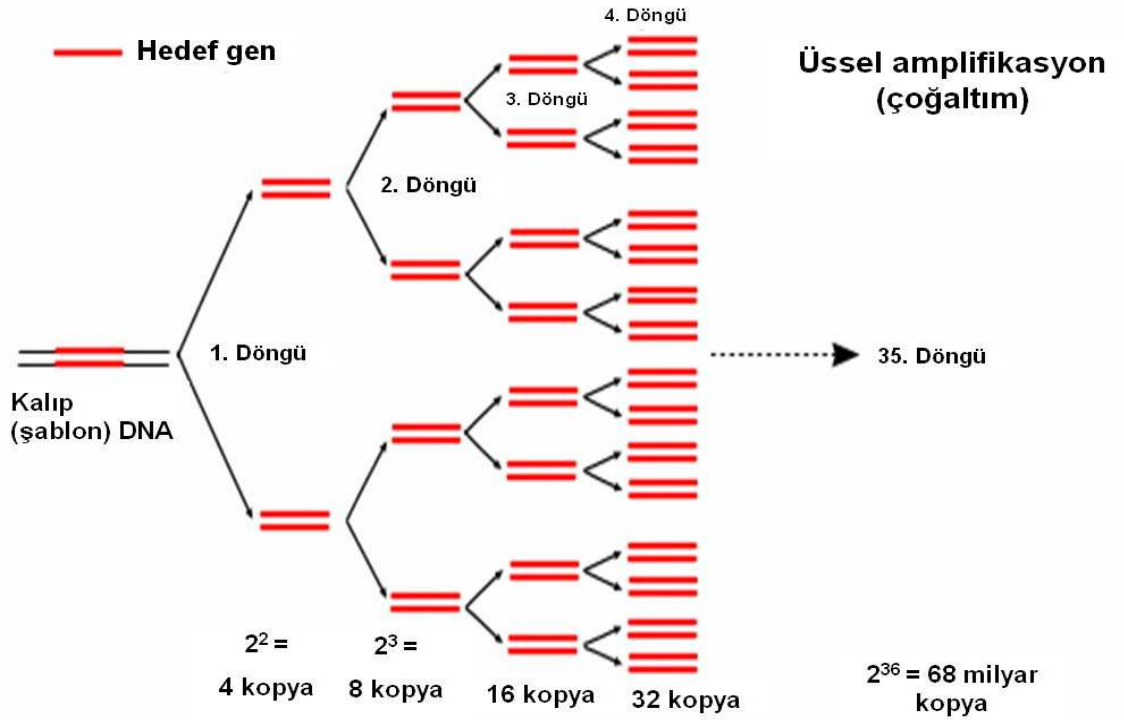




Şekil 2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü

Kalıp DNA'nın iki ekseni, yaklaşık 94-95 °C 'lık sıcaklık uygulamasıyla birbirinden ayrılmaktadır. PCR'ın ilk aşaması olan bu işlem DNA eksenlerinin birbirinden ayrılması olarak bilinmektedir. Eksenlerin ayrılması, 15 saniyeden birkaç dakikaya kadar olabilmektedir. İkinci aşama oligonükleotid primerlerinin (6-30 bazlık) kalıp DNA üzerindeki tamamlayıcı (*complementary*) sıralara eşlenmeleri ve hibritlenme olayının olmasıdır. Bunun için denatürasyon sıcaklığından daha düşük hibritlenme sıcaklığına reaksiyon soğutulmaktadır. Primerlerin doğru bir biçimde hibritlenmesi için sıcaklığın 40-72 °C (optimum 55 °C) arasında olması gerekmektedir. Reaksiyon bu sıcaklıklara soğutulduğunda primerlerin tamamlayıcı DNA ile hibritlenmesi sağlanmış olur. Primerlerin bağlanması için 55 °C'de 1-2 dk tutmak yeterlidir. En son aşama olarak optimum sentez sıcaklığında (72 °C), sıcaklığa dayanıklı özgün bir DNA polimeraz enzimi primerlerin 3'OH uçlarına deoksiribonükleotidleri ekleyerek yeni eksenleri kalıp sıraya komplementer olacak şekilde sentezlemektedir. Bu son aşama yeni DNA eksenlerinin sentezinin yapılması olarak bilinmektedir. Uzama aşamasının 1-3 dk kadar olması önerilmektedir (McPherson and Møller 2001).

Bir sonraki döngüde başlangıçta kullanılan DNA molekülü ile birlikte yeni sentezlenen DNA molekülü de birbirinden ayrılmaktadır. Her bir eksen (hem kalıp eksen ve hem de yeni sentezlenen eksen) primer bağlanma bölgesine sahiptir ve sonraki DNA sentezleri için kalıp görevi görmektedir. Bu üç aşamalı PCR döngüsü 20-40 kez tekrarlanarak istenilen kopyada DNA bölgesi çoğaltılmış olmaktadır. Her bir döngüde DNA molekülü, iki katına çıkarılarak hedeflenen DNA parçacığı üssel bir artışla çoğaltılmakta ve bu DNA parçacıkları agaroz gibi çeşitli destek ortamlarında tespit edilebilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 PCR döngüsü kullanılarak hedeflenen DNA bölgesinin üssel çoğaltımı

PCR cihazı kullanılarak günümüzde pek çok marker belirleme yöntemi geliştirilmiştir. PCR tabanlı yöntemlerin en önemli üstünlüğü, çok eski çağlarda yaşamış biyolojik organizmalardan elde edilen DNA molekülleri üzerinde bile çeşitli araştırmaların yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin bazı eksik yönleri de bulunmaktadır.



PCR tabanlı yöntemlerin eksiklikleri şu şekilde özetlenebilir (Avisé 2004).

- a) PCR çoğaltımının güvenilirliği tartışmalıdır. Hedef bölgenin çoğaltımında özellikle ilk döngülerde, primerlerin üzerinde durulmayan sıralara bağlanma ihtimali bulunmaktadır ve böylece hedef bölgeden farklı olan yanlış sıraların da çoğaltılması mümkün olabilmektedir.
- b) Özellikle poliploidlerde bir lokus çoğaltılırken PCR ürünleri arasında parça değişimi söz konusu olabilmektedir.
- c) Herhangi bir nedene bağlı olmaksızın hedef bölgesinin PCR çoğaltımının yapılamamasıdır. Bu durum özellikle mikrosatelit uygulamaları ile yapılan ebeveyn analizlerinde genotiplerin doğru tespit edilememesine neden olmaktadır.

PCR temelli olarak tespit edilen polimorfizmler;

- a) Kullanılan primer tipine,
- b) PCR koşullarının sıkılığına (*stringency*),
- c) DNA parçacıklarının ayırımına ve
- d) DNA parçacıklarının belirlenme yöntemlerine bağlı olarak, rasgele (RAPD) ya da özgün (AFLP, RFLP ve mikrosatelit gibi) olabilmektedir.

### **2.2.3 Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi**

RAPD yöntemi genellikle 9-10 bazlık kısa, tek bir primer kullanılarak genomdaki rasgele bölgelerin çoğaltıldığı PCR temelli bir yöntemdir. Bu yöntemde özgün hedef DNA bölgesi ya da hedef gen yoktur. Her bir primer rasgele DNA molekülünün farklı bölgelerine bağlanabilmekte ve bu bölgelerin çoğaltılmasını sağlamaktadır. Diğer moleküler genetik yöntemlerle karşılaştırıldığında RAPD yönteminin çeşitli üstünlükleri ve de eksiklikleri bulunmaktadır.

RAPD yönteminin üstün yönleri şu şekilde özetlenebilir.

- a) Çok sayıda lokus üzerinde aynı anda çalışılmasına olanak vermesi,
- b) laboratuvar uygulanmasının kolay olması,
- c) sonuçların nispeten daha kısa sürede elde edilmesi,

- d) çok az miktarda genomik DNA'ya gereksinim duyulması ve
- e) deneme başına maliyetinin az olmasıdır.

RAPD markerlerinin eksik yönleri de şu şekilde özetlenebilir.

- a) Dominant markerler olmaları nedeniyle heterozigot genotiplerin homozigot genotiplerden ayırt edilememesi,
- b) tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde kimi zorlukların bulunması,
- c) hedef DNA bölgesinin genomun neresinde olduğunun belirlenememesi ve
- d) laboratuvarlar arasında farklı sonuçların elde edilmesidir.

Belirtilen bu eksikliklerine rağmen günümüzde, farklı türler, alttürler ve populasyonlara ait nDNA molekülünde mevcut bulunan genetik varyasyon hakkında ön bilgilerin elde edilmesi ve populasyonların birbirleri ile karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda halen bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams *et al.* 1991, Black 1993).

#### **2.2.4 Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) yöntemi**

AFLP yönteminin kullanılmasındaki esas amaç, iki restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilerek kesilmiş çok sayıda genomik DNA parçacığının bulunduğu bir karışımda yer alan restriksiyon parçacıklarının özel bir alt grubunun çoğaltılmasıdır (Avisé 2004). AFLP tekniği ile polimorfizm elde etme olasılığı oldukça yüksektir ve genom hakkında herhangi bir ön bilgi olmadan bu teknik uygulanabilmektedir. Elde edilen her bir marker oldukça güvenilir ve bilgi sağlayıcıdır. AFLP tekniğinin en önemli eksikliği dominant markerler vermesidir. Ayrıca bu teknikte 50-100 gibi çok sayıda çoğaltılmış parçacık elde edildiği için bunların analizlerinin otomatik olarak bilgisayar kontrolünde yapılması gerekmektedir. Genetik haritalamada AFLP markerleri genellikle kromozomların sentromer ve telomer (uç bölgeleri) bölgelerinde toplanmaktadır. Bu durum kromozomların diğer bölgelerinin analizlerini güçleştirmektedir (Zabeau and Vos 1993, Vos *et al.* 1995).

### 2.2.5 Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) yöntemi

SNPs, bir purin (A ve G) nükleotidinin diğer bir purin nükleotidine veya bir pirimidin (C ve T) nükleotidinin diğer bir pirimidin nükleotidine değişimi (*transition*) şeklinde olabileceği gibi, bir purin nükleotidinin bir pirimidin nükleotidine veya bir pirimidin nükleotidinin bir purin nükleotidine değişimi (*transversion*) şeklinde de oluşmaktadır. Ayrıca bir ya da birkaç nükleotidin eklenmesi (*insertion*) veya eksilmesi (*deletion*) de yeni SNPs markerlerinin ortaya çıkmasına neden olan diğer faktörlerdir.

Sığır lökosit adhezyon yetersizliği (BLAD, *bovine leukocyte adhesion deficiency*) kalıtsal kusuru bakımından normal sığırlarda CD18 geninin 383. nükleotidi olarak Adenin (A) nükleotidi bulunmaktadır. Meydana gelen D128G mutasyonu sonucunda mutant BLAD allelini taşıyan sığırlarda 383. nükleotid Guanin (G)'e dönüşmektedir. Bu mutasyon tek nokta mutasyonu (A→G) sonucunda meydana gelmekte olup SNPs markeri olarak değerlendirilmektedir. Bu SNPs markeri bakımından sığırlar 3 farklı genotipte değerlendirilmektedir (Shuster *et al.* 1992).

---TCGA---	---TCGG---	---TCGG---
---AGCT---	---AGCT---	---AGCC---
Normal (BB)	Taşıyıcı (Bb)	Hasta (bb)

Genetik çalışmalarda SNPs markerleri kullanımının yaygınlaşmasının 4 önemli nedeni bulunmaktadır. Bu nedenler şu şekilde özetlenebilir (Beuzen *et al.* 2000).

- Üzerinde durulan hemen her lokusta diğer moleküler yöntemlere göre çok daha fazla marker elde edilmektedir. Örneğin insan çekirdek DNA'sında her 1000 baz başına bir SNPs oluşmaktadır.
- SNPs herhangi bir gen ürünü karşılığı bulunan bölgelerde bulunmakta ve bu nedenle doğrudan fenotipi etkilemektedirler. Örneğin, Siyah Alaca sığırlarında BLAD hastalığında olduğu gibi bu tip SNPs markerleri bireyler arasındaki genotipik farklılıkların doğrudan sorumlusu olabilmektedir.

- c) SNPs mikrosatelitlere oranla daha kararlı bir şekilde döllere aktarılmaktadır. Bu durum uzun vadede seleksiyon markeri olarak SNPs markerlerinin kullanımını daha uygun hale getirmektedir.
- d) DNA microarray teknolojisi kullanılarak daha fazla lokusun irdelendiği genetik çalışmalarında SNPs markerleri mikrosatelitlere oranla daha kullanışlı markerlerdir.

SNPs genel olarak popülasyonda sadece 2 allelin (*biallelic*) bulunduğu durumlarda tespit edilebilen genetik varyasyon kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Bir SNPs markeri bakımından bir popülasyondaki bireyler BLAD örneğinde olduğu gibi en fazla üç farklı genotipte (AT, GT ve GC) gruplandırılmaktadır. SNPs markerlerinin bu özelliğine bağlı olarak her bir SNPs markeri başına elde edilecek bilgi içeriği mikrosatelitlere (çoklu allelizm) oranla çok daha düşük olmaktadır. Bir popülasyonda 5 SNPs markerinden elde edilecek genetik bilgi toplamının ancak bir mikrosatelit markerinden elde edilecek genetik bilgiye eşit olabileceği ifade edilmektedir. Buradan hareketle 2000 SNPs markeri ile çalışılması durumunda ancak 10 cM'lık bir mikrosatelit lokusunun çalışılmasına eşdeğer bilginin elde edileceği tahmin edilmektedir. SNPs belirlenmesi amacıyla PCR, RFLP, jel elektroforezi ve dizi analizi gibi temel moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Polimorfik bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği SNPs markerlerinin bir eksikliği olarak ifade edilmektedir (Beuzen *et al.* 2000).

### **2.2.6 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi**

İkili sarmal DNA molekülünü belirli nükleotid sıralarından kesen bakteriyel kökenli restriksiyon enzimlerinin (*restriction endonuclease*) keşfedilmesi ile moleküler biyoloji alanında önemli gelişmeler yaşanmıştır. RFLP tekniği DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriler, bakteriyofajlara (bakterileri enfekte ederek çoğalan virüsler) karşı savunma mekanizması olarak çeşitli restriksiyon enzimleri oluşturmaktadırlar. Bu enzimler DNA molekülünü özgün tanıma sıralarından kesebilen enzimlerdir. Bir bakteri bakteriyofajlar tarafından enfekte edildiği zaman, konakçı bakterilerin endonükleaz enzimleri fajların

DNA'sını çeşitli noktalardan keserek o fajın konakçı bakteride çoğalmasını önlemiş olmaktadır (Griffiths *et al.* 1996).

Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü 4-8 baz çiftlik DNA sıralarından tanıyarak bu bölgelerden kesim yapmaktadırlar. Bazı enzimler ile kesim sonucu yapışkan uçlu (*cohesive* ya da *sticky ends*) parçacıklar ya da küt uçlu (*blunt ends*) parçacıklar elde edilmektedir (Çizelge 2.3). RFLP tekniği Southern emdirim (*blotting*) ve PCR tabanlı olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır.

Çizelge 2.3 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları

Enzim	Tanıma bölgesi	Kesim sonrası elde edilen DNA parçacıkları		
<i>EcoRI</i>	5'...G <sup>↓</sup> AATTC...3' 3'...CTTAA <sup>↑</sup> G...5'	5'...G	AATTC...3'	Yapışkan uçlu
		3'...CTTAA	G...5'	
<i>HaeIII</i>	5'...GG <sup>↓</sup> CC...3' 3'...CC <sup>↑</sup> GG...5'	5'...GG	CC...3'	Küt uçlu
		3'...CC	GG...5'	

Evrin ve populasyon genetiği çalışmalarında restriksiyon enzimlerinden yararlanılarak çok önemli farklılıklar tespit edilmiştir. RFLP analizleri hem çekirdek ve hem de mitokondriyel genomda oldukça faydalı bilgiler ortaya koymaktadır.

### 2.2.6.1 Southern emdirim (*blotting*) temelli RFLP yöntemi

Southern emdirim temelinde uygulanan RFLP yöntemi, DNA düzeyindeki varyasyonların tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan ilk yöntemlerden biridir. Bu teknikte belirli kesim enzimleri ile DNA molekülü muamele edildikten sonra elde edilen DNA parçacıklarının kesim modellerindeki farklılıklarından yararlanılarak DNA düzeyinde polimorfizmler tespit edilmektedir (Botstein *et al.* 1980). Oluşabilecek çeşitli mutasyonlar (çeşitli nokta mutasyonları, ters dönme (*inversion*) ve homolog olmayan kromozomlar arası parça değişimi (*translocation*) gibi) DNA molekülünü farklı şekillerde etkileyebilmekte ve sonuçta bireyler arasında farklı uzunluklara sahip DNA parçacıkları elde edilmektedir. DNA parçacıklarında meydana gelen uzunluk

farklılıkları jel elektroforezi, hibridizasyon ve görüntüleme işleminden sonra tespit edilebilmektedir (Southern 1975, Beckmann and Soller 1983).

RFLP tekniğinde öncelikle saflaştırılan DNA molekülü özgün kesim enzimleri ile kesilmektedir. Her bir kesim enzimi DNA molekülünde özgün sıraları tanıyarak o noktalardan kesim yapmaktadır ve sonuçta farklı uzunluklarda DNA parçacıkları (kesim parçacıkları) seti elde edilmektedir. Elde edilen çok sayıdaki kesim parçacıkları genellikle agaroz jel elektroforezi ile ayrılmaktadır. Bu ayırmadan sonra agaroz jel, etidyum bromür ile boyandığında jelde sürüklenme (*smear*) meydana geleceğinden sadece boyama polimorfizmin tespit edilmesi için yeterli değildir. Bu aşamada hedeflenen kesim parçacıklarının belirlenebilmesi için hibridizasyon yapılması gerekmektedir. Agaroz jel üzerinde çalışmanın güçlüklerinden dolayı hibridizasyon işleminin başka bir ortamda yapılması gerekmektedir. Bunun için agaroz jel üzerinde bulunan kesim parçacıkları daha stabil olan ve nitroselüloz ya da naylondan yapılmış başka bir destek ortamına aktarılmaktadır. Southern (1975) adlı araştırmacının ortaya koyduğu DNA transfer yöntemi Southern emdirim olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.8). Bu yöntemde öncelikle agaroz jel bir solusyon içinde denatüre edilerek tek eksenli kesim parçacıkları seti elde edilmektedir. Daha sonra jelin üzerine gözenekli yapıda naylon ya da nitroselüloz bir membran ve onun üzerine de ağırlık konulmaktadır. Bu sayede tampon solusyonun etkisiyle jeldeki bütün kesim parçacıkları tek eksenli olarak membrana aktarılmakta ve jeldeki bant modelleri membrana aktarılmış olmaktadır.

Bir sonraki aşama hedeflenen kesim parçacıklarını içeren membranın bir sonda (*probe*) ile muamele edilmesidir. Sonda, hedeflenen DNA parçacığı ile komplementer olan kısa, tek eksenli bir DNA molekülüdür. Sondalar çekirdek ya da komplementer DNA (cDNA) kütüphanelerinden hazırlanmaktadır. Bu DNA kütüphaneleri çeşitli türlere ait DNA molekülünün parçalanmış halini içeren vektörler (örn. plazmid) topluluğudur. Bu vektörler çeşitli bakterilere aktarılarak sahip oldukları DNA parçacıkları çok sayıda çoğaltılmaktadır. DNA sondaları ayrıca tek eksenli hale dönüştürülüp herhangi bir etiketleme yöntemi ile (örn. radyoizotop) etiketlenip hibridizasyondan sonra görüntüleme yapılabilir hale getirilmektedir. Sonda yapılırken DNA parçacıkları,

genellikle [<sup>32</sup>P] nükleozidleri ile uç etiketlenmesi işlemine tabi tutulmaktadır. DNA sondaları çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bu kaynaklar;

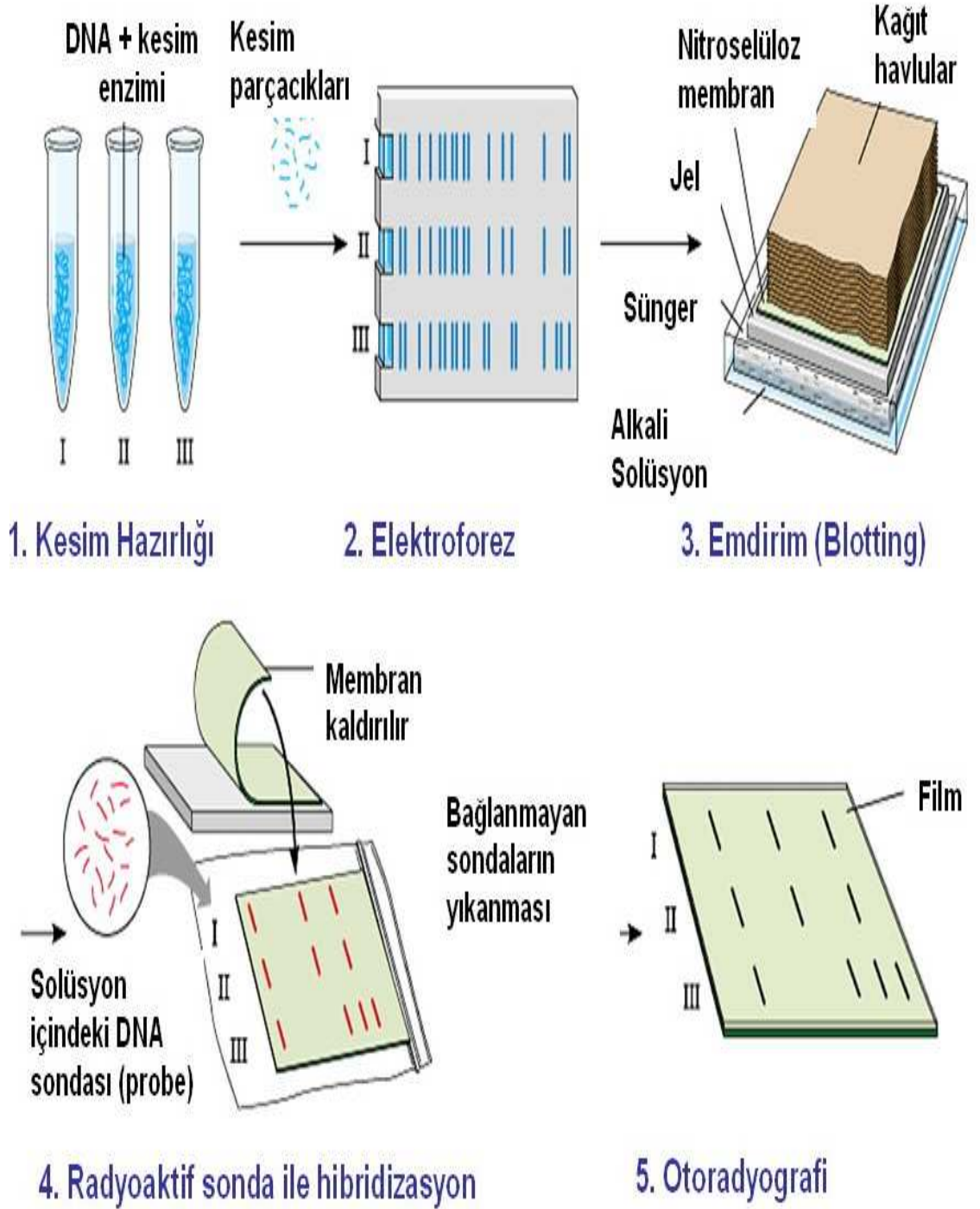
- a) Genomik kütüphaneler-genomik DNA kesim enzimleri ile kesilip, her bir DNA parçacığı bakteriyel ya da viral bir vektöre klonlanmaktadır. Bu anonim kütüphane içinden RFLP analizi için uygun sondalar seçilmektedir.
- b) Komplementer DNA (cDNA) kütüphaneleri-hücre içinden mRNA molekülü izole edilip ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenmektedir. Elde edilen cDNA molekülü çeşitli vektörlerde çoğaltılıp RFLP analizi için uygun sonda olarak kullanılmaktadır.
- c) Sitoplazmik DNA (mitokondriyel ve kloroplast) kütüphanelerinden uygun sondaların seçimi yapılabilmektedir.

Naylon ya da nitroselüloz destek ortamlarına aktarılmış olan membrandaki tek eksenli kesim parçacıkları, hazırlanan sondalar ile komplementer oldukları durumda hibritlenmekte ve radyoaktif etiketli çift eksenli DNA parçacıkları elde edilmektedir. Etiketli DNA parçacıkları görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmektedirler. (Southern 1975, Beckmann and Soller 1983, Vicente and Fulton 2004).

#### **2.2.6.2 PCR temelli RFLP yöntemi**

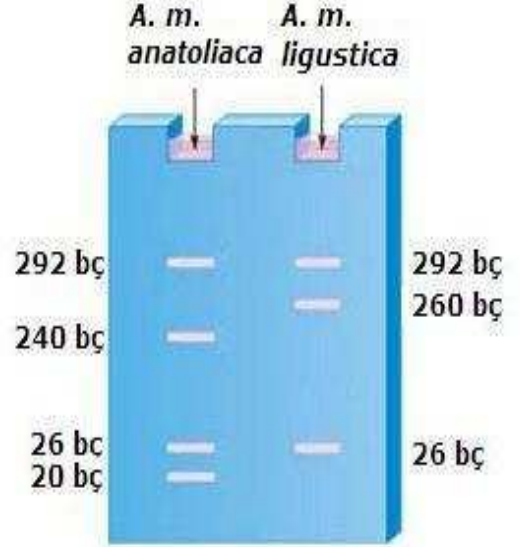
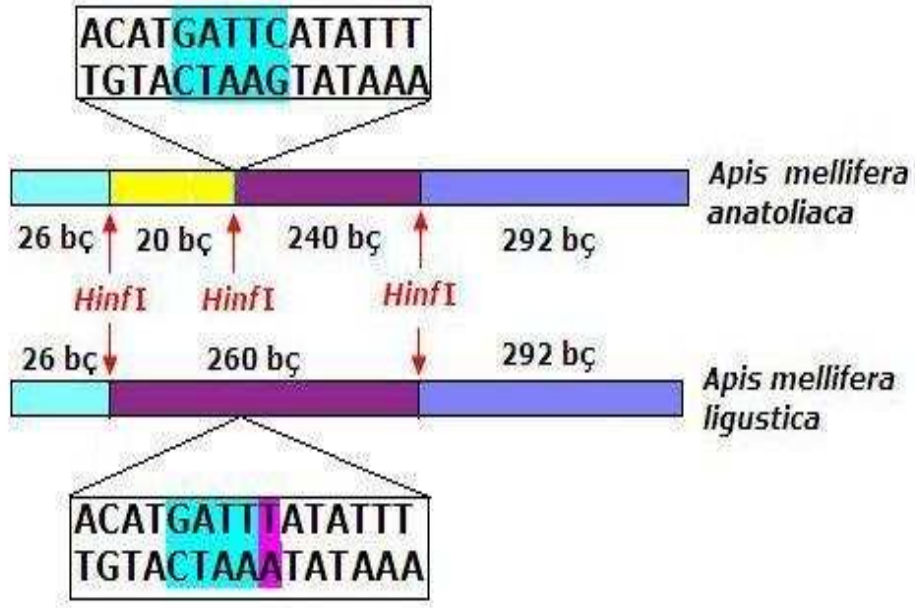
PCR-RFLP ya da lokusa özgü RFLP tekniği özgün bir lokusta polimorfizm tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart PCR işlemi ile üzerinde durulan lokus çoğaltılmakta ve çeşitli kesim enzimleri ile elde edilen PCR parçacığı kesilmektedir. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modellerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre bireyler arasındaki farklılıklar tespit edilmektedir (Şekil 2.9). Bu yöntemde bireyler arasında tespit edilebilen polimorfizm, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eklenmesi, bir nükleotidin eksilmesi veya bir nükleotidin değişmesi şeklinde ortaya çıkan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. PCR-RFLP yöntemi kodominant kalıtım modeline uygun markerler vermektedir. Bu yöntemde rutin PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotid primerler kullanıldığı için oldukça güvenilir bir çoğaltım yapılmaktadır. Çoğaltılan lokus ya da

gen hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği tekniğin bir eksikliği olarak ifade edilmektedir. Ayrıca çalışılacak lokuslar için özgün primerlerin hazırlanması zaman ve maliyet gerektiren bir süreçtir. Çalışmanın içeriğine bağlı olarak kullanılacak olan kesim enzimleri de maliyeti artıran diğer unsurlar olarak ele alınmalıdır (Botstein *et al.* 1980, Hall 1998, Vicente and Fulton 2004).



Şekil 2.8 Southern emdirim tekniği ile hibridizasyona dayalı RFLP analizi





Şekil 2.9 Genetik farklılıkların PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlenmesi

### 2.2.7 Basit dizilim tekrarları (SSR), ardışık basit tekrarlar (STR) ya da mikrosatelit yöntemi

Çekirdek DNA seviyesinde geliştirilen diğer bir genetik marker yöntemi SSR yöntemi olup, STR ya da mikrosatelitler olarak da ifade edilmektedir. Mikrosatelitler ökaryotik genom boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanan 2-5 bç'lik gruplardan oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (GT)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (ATA)<sub>n</sub> veya (CAGA)<sub>n</sub> şeklinde

olabilmektedir. Mikrosatelit lokuslardaki farklı alleller PCR ile çoğaltılan DNA parçacığındaki farklı nükleotid dizisi motiflerinin belirlenmesiyle ortaya konmaktadır. Her bir allelde tekrar eden birimlerin sayıları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Mikrosatelitler, lokus başına  $10^{-3}$  ile  $10^{-4}$  gibi yüksek mutasyon oranlarına sahiptirler ve buna bağlı olarak da bir lokusta allel sayısı oldukça fazla olabilmektedir. Bu üstünlüklerinden dolayı mikrosatelitler, populasyonların tanımlanması, genom haritalaması ve filogenetik ile evrim çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca mikrosatelitlerin kodominant markerler vermesi ve PCR ile kolaylıkla çalışılabilmesi kullanımını artıran diğer faktörler arasında yer almaktadır. Mikrosatelit varyasyonu oluşmasını sağlayan mutasyonlarının altında yatan fiziksel mekanizmanın replikasyon sırasında eksenlerin kayması ile meydana gelen yanlış eşleşmelerin (*slipped strand mispairing*) olduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede mikrosatelit lokuslarındaki basit dizi tekrarları ortaya çıkmaktadır (MacHugh 1996, Avise 2004).

### **2.2.8 DNA dizi analizi yöntemi**

Bireyler arasındaki genetik farklılıkların tespit edilmesinde kullanılan etkin yöntemlerin başında DNA dizi analizi yöntemi gelmektedir. Otomatik DNA dizi analizi cihazlarının geliştirilmesi ve elde edilebilirliklerinin kolaylaşması sonucunda moleküler biyoloji çalışmalarında DNA dizi analizinden yararlanılması gittikçe yaygınlaşmaktadır. DNA dizi analizinin genetik temeli 1970'li yıllarda ortaya konan iki farklı yöntemeye dayanmaktadır. Bunlardan ilki Maxam and Gilbert (1977) tarafından ortaya konan ve bazı nükleotidlere (A, T, C ya da G) özgü kimyasal kesim reaksiyonu temelinde geliştirilen yöntemdir. Maxam–Gilbert yöntemi olarak ifade edilen bu teknikte dizi analizi yapılacak hedef DNA bölgesinin uç kısımları radyoaktif madde ile etiketlenmekte ve bazlara özgün noktalardan kesim yapabilen çeşitli kimyasal maddeler ile DNA molekülü 4 ayrı reaksiyon alt grubunda incelenmektedir. Örneğin birinci alt grup, dimetil sülfat ve piperidin ile muamele edilerek sadece G nükleotid pozisyonundan kesim yapılmaktadır. Bu işlemin sonunda G nükleotidi ile son bulan farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilmektedir. Daha sonra poliakrilamid jel elektroforezi ile parçacıklar ayrılmakta ve otoradyografi ile görüntülenmektedir. Diğer

üç nükleotide özgü benzer reaksiyonlar da yapılarak elde edilen parçacıklar jel elektroforezi ile ayrılmaktadır. En son olarak otoradyografi sonucu görüntülenen bantlardan yararlanılarak DNA dizisi elde edilmektedir (Şekil 2.10).

Yine 1970'li yıllarda Sanger *et al.* (1977) tarafından ortaya konan ve Sanger yöntemi olarak bilinen diğer bir DNA dizi analizi yöntemi, günümüzde kullanılmakta olan otomatik DNA dizi analizi tekniklerinin öncüsü olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem laboratuvar ortamında (*in-vitro*) gerçekleştirilen DNA replikasyonu işleminin kontrollü bir şekilde yarıda kesilmesi temeline dayanmaktadır. İkili sarmal DNA tek eksenli hale getirilmekte ve hedef DNA bölgesinin bir bölümü ile komplementer olan kısa bir DNA parçacığı, bu bölge ile hibrit oluşturmaktadır. Bu primer/hedef DNA (*template*) karışımı DNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilen ve primere yeni nükleotidlerin ilave edilmesi temelinde 4 ayrı reaksiyon alt grubunda incelenmektedir. Her bir reaksiyonda 4 tip deoksiniükleotidlere (dA, dC, dG ve dT) ilave olarak deoksiniükleotidlerde var olan 3' OH grubunu taşımayan dideoksiniükleotidler (ddN) de bulunmaktadır. Yeni sentezlenen DNA molekülü, ya primerin uç kısmı etiketlenerek ya da sentez sırasında etiketli deoksiniükleotid ilave ederek radyoaktif etiketli hale getirilmektedir. Yeni DNA eksen sentezinin yapılması nükleotidlerin serbest 3' OH grubuna eklenmesi ile devam etmekte ve uzayan eksene ddNTP eklendiği zaman eksen uzaması devam edememektedir. Polimeraz reaksiyonu, ddNTP'lerin nadir ve rasgele ilave edildiği durumlarda yürütülmekte ve ayrıca farklı bazlarda sonlandırılan farklı uzunluklarda DNA molekülleri seti elde edilmektedir. Maxam-Gilbert yönteminde olduğu gibi, her bir reaksiyon grubuna ait parçacık seti, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmakta ve otoradyografi ile görüntülenerek doğrudan jelden okunmaktadır. PCR yöntemi bulunmadan önce, genler biyolojik vektörlere klonlanıp, dizi analizi için uygun hale getirilmekteydi. Ancak PCR ile bu zor ve zaman alıcı işlemler yapılmadan dizi analizi reaksiyonunda primerler ile çoğaltım yapılmakta ve jel elektroforezi ile doğrudan sonuca gidilebilmektedir (Avisé 2004).

DNA izole edilip,  
eksenler birbirinden  
ayrılır.

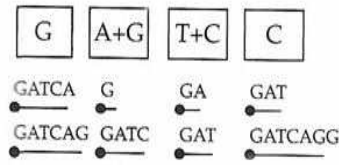
5'-.....GATCAGGCTTAAGCA.....-3' Tek eksenli DNA molekülü

- Radyoaktif ile uç etiketleme

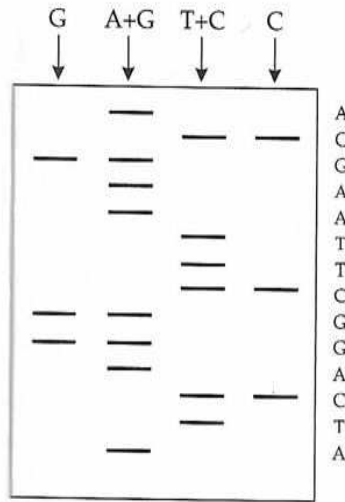


- 4 ayrı kesim reaksiyonu

Kesim



- Elektrophorez ile parçacıkların ayrımı

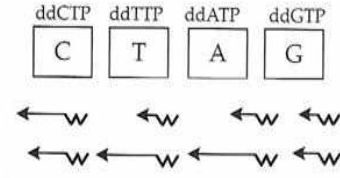


Maxam - Gilbert Yöntemi

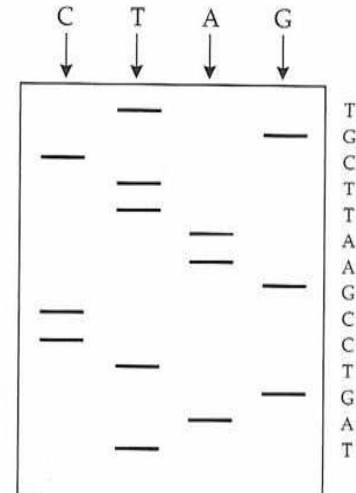
- Primerin bağlanması



- 4 ayrı reaksiyona etiketli dNTP, DNA polimeraz ve ddNT'lerin eklenmesi



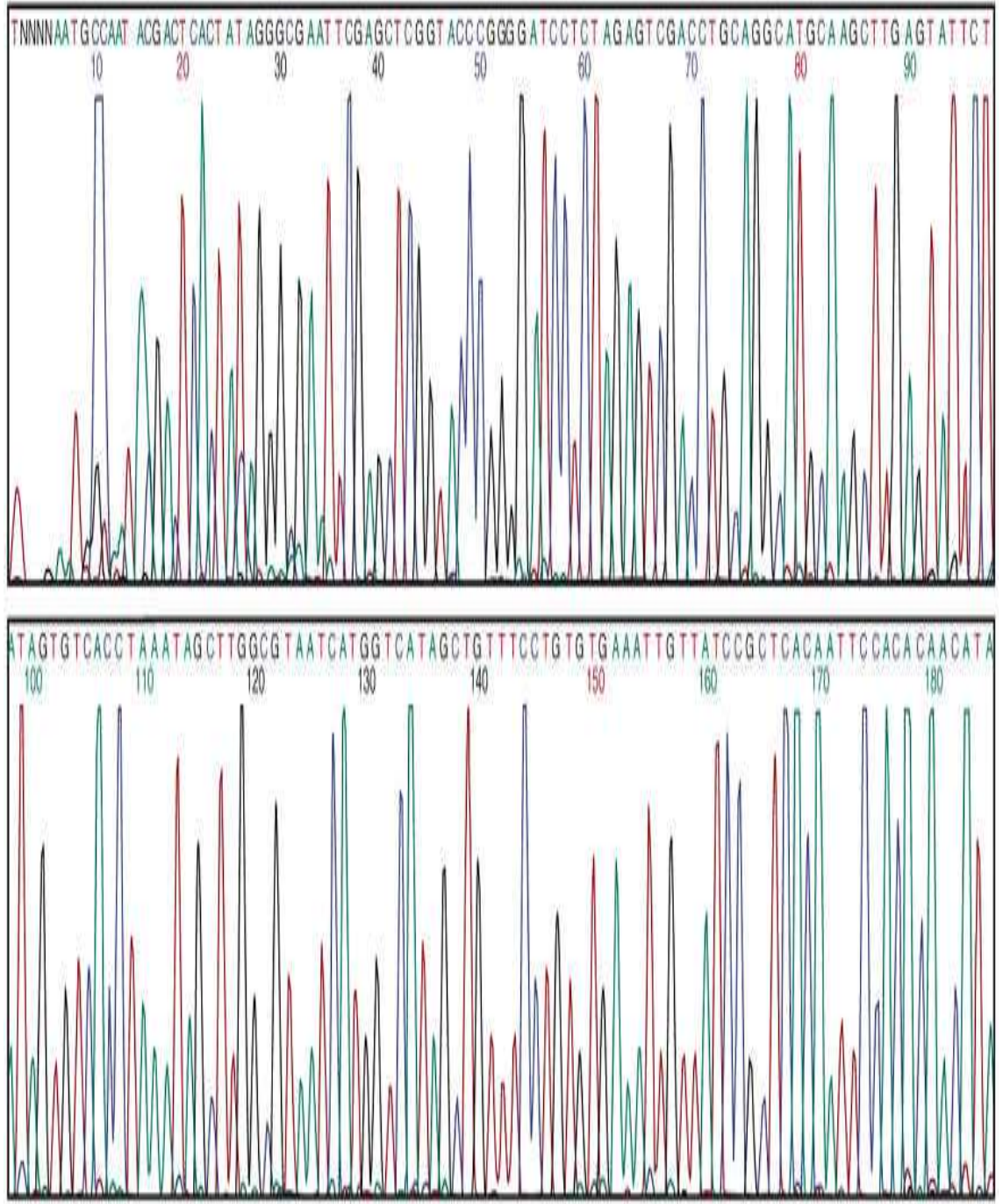
- Elektrophorez ile parçacıkların ayrımı



Sanger Yöntemi

Şekil 2.10 DNA dizi analizi yöntemleri (Avise 2004)

PCR ve DNA dizi analizi işlemleri giderek otomatik sistemlerde kısa sürede yapılmaktadır. Otomatik DNA dizi analizi yapan cihazlarda elde edilen veri çeşitli yazılımlardan yararlanılarak Şekil 2.11'de görüldüğü gibi bir bilgisayar çıktısı şeklinde elde edilmektedir.



Şekil 2.11 Otomatik DNA dizi analizi reaksiyonundan elde edilen veriye ait grafik

Not: Grafikte tek bir DNA ekseninde var olan nükleotidlerin farklı renkte pikler ile belirtildiği bir bilgisayar çıktısı ve 0-185. nükleotidler arasındaki dizi analizi sonuçları görülmektedir.

## 2.2.9 Moleküler genetik karşılaştırılması

Yürütülen çalışmanın amacı, çalışılacak organizmanın türü ve araştırmanın yürütüleceği laboratuvar olanakları gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak, moleküler genetik çalışmalarda daha duyarlı sonuçların elde edilebilmesi için kullanılacak yöntemin belirlenmesi son derece önemlidir. Araştırmanın planlanma aşamasında kullanılacak yöntemin belirlenmesi; araştırmanın yürütülmesi, araştırma maliyetinin belirlenmesi, elde edilecek sonuçların daha duyarlı olması ve çıktıların yorumlanması aşamalarını doğrudan etkileyen ana faktördür. Bu tip nedenlerden dolayı moleküler genetik çalışmalarında yararlanılan güncel yöntemlerin birbirlerinden olan farklılıklarının bilinmesi ve bu farklılıklar doğrultusunda araştırma projelerinin tasarlanmasına dikkat edilmesi son derece önemlidir. Yaygın olarak kullanılan moleküler genetik yöntemlerin çeşitli kriterler bakımından karşılaştırılması Çizelge 2.4’de verilmiştir (Avisé 2004).

Çizelge 2.4 Moleküler genetik yöntemlerin karşılaştırılması (Avisé 2004)

Ele alınan kriter	AFLP	RAPD	STR	nRFLP	mtRFLP	Allozim
Aynı anda çalışılan lokus say.	Çok	Çok	Birkaç	Az	Bir	Çok
Lokus başına allel sayısı	Az	Az	Çok	Çok	Çok	Çok
Sonuçların tekrarlanabilirliği	Yüksek	Az	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Varyasyon belirlenme oranı	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
Markerin kalıtım modeli	Dominant	Dominant	Kodominant	Kodominant	Anaya ait	Kodominant
Uygulanma kolaylığı	Orta	Kolay	Zor	Zor	Orta	Kolay
Uygulanma süresi	Kısa	Kısa	Uzun	Uzun	Kısa	Kısa

AFLP : Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi

RAPD : Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA

STR : Ardışık basit tekrarlar, basit dizilim tekrarları (SSR) ya da mikrosatelit

nRFLP : Southern emdirim yöntemi kullanılarak belirlenen restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

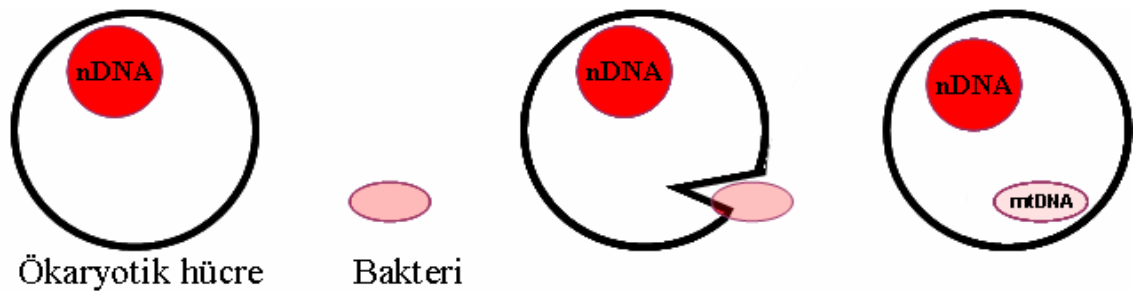
mtRFLP : Mitokondriyel genomda belirlenen restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

Allozim : Enzim polimorfizmi

### 2.3 Hayvansal Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı

Genel olarak ökaryotik canlıların sahip oldukları toplam genetik materyal, çekirdek içinde yer alan ve genomik DNA ya da çekirdek DNA (nDNA) olarak ifade edilen kromozomlara ilave olarak mitokondri (mtDNA) ve kloroplast (cpDNA) organellerinde yer alan DNA moleküllerinin tamamından meydana gelmektedir. Hayvan hücrelerinde sadece mitokondriyel DNA, bitki hücrelerinde ise hem mitokondriyel DNA ve hem de kloroplast DNA molekülleri ekstra kromozomal yapılar olarak bulunmaktadır. Sitoplazmik kalıtım materyalleri olarak da tanımlanan mtDNA ve cpDNA molekülleri anaya ait kalıtım modeline sahip olup yumurtanın sitoplazması vasıtasıyla generasyonlar boyunca aktarılmaktadır. Mitokondri bulunduğu hücre bölündüğünde buna bağlı olarak kendi kendine çoğalabilen bir organeldir. Mitokondri iki hücre membranına sahip, kendine özgü DNA molekülü (mtDNA) ve ribozomları olan, çeşitli enzimleri sentezleyebilen ve adenosin trifosfat (ATP) formunda enerji sentezini gerçekleştiren bir organeldir.

Hayvanlarda mtDNA küçük, dairesel ikili sarmal bir DNA molekülüdür ve aerobik solunumla ilgili genleri içermektedir (Rokas *et al.* 2003). mtDNA molekülünün dairesel, ikili sarmal bir DNA molekülünden oluşması, bu molekülün yapı olarak prokaryotik genetik materyaline olan benzerliğini açıkça ortaya koymaktadır. Ökaryotik hücrelerde mtDNA'nın var oluşu endosimbiyotik teoriyle açıklanmaktadır (Şekil 2.12). Bu teoriye göre bir çekirdek zarı bulunmayan (prokaryotik) hücrenin başka bir hücre tarafından içine alınması ile ilk ökaryotik hücrenin ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Bu iki hücrenin simbiyotik bir yaşam döngüsüne girip ilk organeli oluşturdukları düşünülmektedir (<http://www.mrs.umn.edu/~goochv/CellBio/lectures/endo/endo.html>, 2006).



Şekil 2.12 Endosimbiyotik teori

Populasyon genetiği, filogenetik çalışmalar, tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik/farklılıkların ortaya konulması amacıyla yapılan araştırmalarda mtDNA molekülünün iki önemli özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu özellikler mtDNA molekülünde yeni kombinasyonların oluşmaması ve mtDNA molekülünün anaya ait kalıtım modeline sahip olmasıdır (Avisé 2004).

### 2.3.1 Mitokondriyel DNA molekülünde yeni kombinasyonlar oluşmamaktadır.

mtDNA molekülünün birinci önemli özelliği; 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 gelmemektedir. Buna bağlı olarak da döllerde yeni kombinasyonlar (*recombination*) oluşmamaktadır. Parça değişiminin olmaması genetik markerlerin daima bağlı kalmasını sağlamakta ve sadece çok düşük sıklıklarda ( $2 \times 10^{-8}$ ) gerçekleşen mutasyonlar sonucunda meydana gelen nükleotid farklılıkları mtDNA molekülünde eklemeli olarak toplanmaktadır. Mutasyon olma sıklığı düşük olduğu için, mtDNA molekülünde meydana gelen genetik varyasyonun kaynağı şu şekilde özetlenebilir (Moritz *et al.* 1986, Solignac 1991);

- a) nükleotid eksilmesi (*deletion*),
- b) nükleotid ilave edilmesi (*insertion*),
- c) nükleotid dönüşümleri (*substitution*),
- d) belirli gen bölgelerinde DNA parçalarının farklı uzunluklarda olması ve
- e) herhangi bir lokustaki nükleotid dizilimlerinde gözlenen çeşitli değişimler.

Belirtildiği gibi mtDNA molekülünde meydana gelen değişimler eklemeli olarak generasyonlar boyunca korunmakta ve dölden dölle aktarılmaktadır. Ancak heteroplazmik (*heteroplasmy*) yapının söz konusu olduğu beyaz mersin balığı (*Acipenser transmontanus*), midye (*mytilus*) 'nin kas dokusunda, meyve sinekleri (*Drosophila*) ve bazı hibrit fare hatları ile izogamik (*isogamous*) funguslarda teorik temeli henüz tam olarak ortaya konulmamakla birlikte, sitoplazmada bulunan farklı kaynaklardan gelen mtDNA molekülleri arasında parça değişimlerinin olduğunu bildiren araştırmalara da rastlanılmaktadır. Heteroplazmi (*heteroplasmy*), bir hücrede iki



ya da daha fazla kökene ait farklı mtDNA molekülünün aynı anda bulunması olarak ifade edilmektedir. Bu hücrelere sahip organizmalar da heteroplazmik organizmalar olarak tanımlanmaktadır. Beyaz mersin balıklarında % 42 (Brown *et al.* 1992), *Mytilus edulis* midye türünde % 57 (Hoeh *et al.* 1991), *Drosophila simulans* ve *Drosophila mauritiana* meyve sineği hatlarında % 0.03 (Kondo *et al.* 1990) oranında ve *Mus spretus* X C57BL/6J saf fare hatlarının çeşitli melezlerinde (Gyllenstein *et al.* 1991) babaya ait mtDNA sızıntısının bulunduğu bir heteroplazmik yapının var olduğu yani bu türlerde sitoplazmada hem babaya hem de anaya ait iki farklı mtDNA molekülünün aynı anda bulunduğu tespit edilmiştir (Moritz 1994). İzogami (*isogamy*), yeşil algler (*Chlamydomonas*) ve bazı funguslarda (*fungi*) görülen bir eşeyli üreme şeklidir. Bu tip türlerde mitoz bölünme sonucu oluşan ve aralarındaki çok küçük farklılıklardan dolayı farklı tiplerde ( $mt^+$  ve  $mt^-$  gibi) bulunan, morfolojik yapı ile büyüklük bakımlarından birbirine benzer olan ve normalde eşeysiz üremeyi sağlayan haploid vücut hücreleri kötüleşen besi ortamına bağlı olarak eşey hücresi (gamet) haline dönüşmektedirler. Normalde vücut hücresi iken besin kıtlığı nedeniyle eşey hücreleri haline dönüşen ve o yönde görev yapan bu üreme hücreleri izogametler (*isogametes*) olarak ifade edilmektedir. İzogametlerin birleşmesiyle meydana gelen eşeyli üremenin bu şekli izogami (*isogamy*) olarak tanımlanmaktadır. Bu tip üreme şekline sahip olan organizmalara izogamik (*isogamous*) türler denmektedir (Moritz 1994).

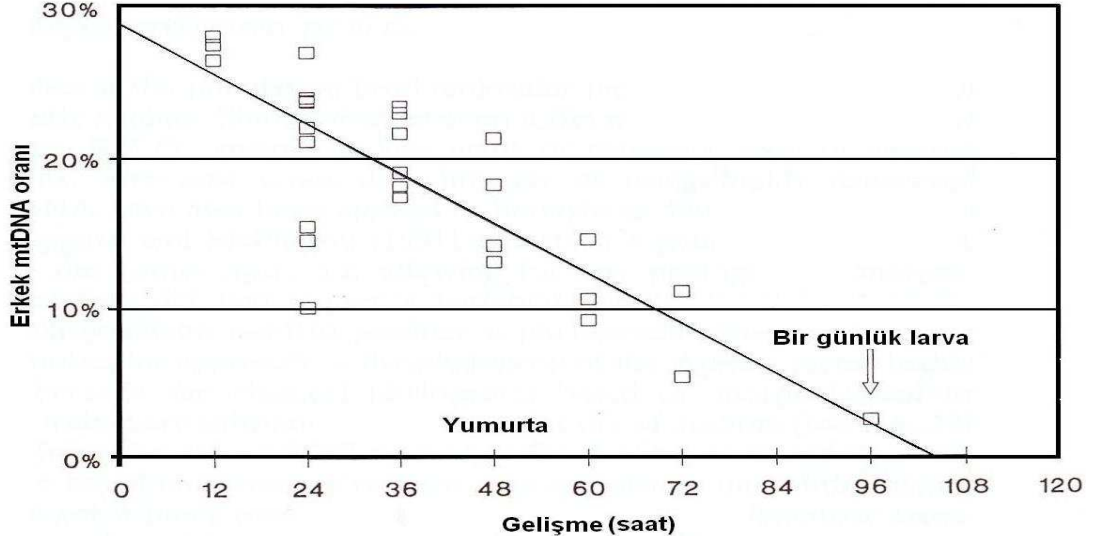
### **2.3.2 Mitokondriyel DNA molekülü anaya ait kalıtım modeline sahiptir.**

mtDNA molekülünün ikinci önemli özelliği, çoğu türde anaya ait (*maternal*) kalıtım modeline sahip olmasıdır. Ancak yukarıda tanımlanan heteroplazmik yapı nedeniyle mtDNA molekülünün anaya ait kalıtım modelinden sapma gösterdiğine ait çok az sayıda da olsa araştırmaya rastlanılmaktadır. Örneğin midye dişileri sahip oldukları mtDNA moleküllerini hem dişi ve hem de erkek döllerine aktarıırken, midye erkekleri sahip oldukları mtDNA moleküllerini sadece erkek döllerine aktarmaktadırlar (Hoeh *et al.* 1991). Moritz (1994)'in bildirdiğine göre, deniz kestanesinde (*Paracentrotus lividus*) babaya ait mtDNA molekülü parçalandığı (Anderson 1968) ve yine yukarıda tanımlanan izogamik funguslarda (Meland *et al.* 1991) babaya ait mtDNA'nın hızlı bir şekilde kaybedildiği tespit edilmiştir.

Bal arılarında yumurtanın dölleme mekanizmasına bakıldığında babaya ait mtDNA molekülünün kalıtımında özel bir durumun söz konusu olduğu görülmektedir. Bal arıları çok spermlili (*polyspermic*) bir dölleme şekline sahiptir. Bal arılarında mtDNA bakımından çok zengin olan kuyruk bölgesi ile birlikte çok sayıda sperm hücresi yumurta içerisine girmektedir. Çok fazla sayıda spermin yumurta içerisine girmiş olmasına rağmen, bunlardan sadece bir tanesi yumurta çekirdeği ile birleşerek dölleme faaliyeti gerçekleşmektedir. Dölleme faaliyeti içerisinde bulunmayan diğer spermler yumurtanın sitoplazmasında ikincil derecede kalmakta ve gelişmenin başlangıç safhalarında hızlı bir şekilde atıl hale gelmektedirler. Bu ikincil derecedeki spermilerin çok ender olarak yalnızca gynandromorph bireylerin üretiminde mitoz bölünmede aktif olabildikleri ifade edilmektedir (Moritz 1994). Bal arılarında herhangi bir mtDNA molekülünün anaya ait bir marker olarak kullanılmasından önce, çalışılacak popülasyonda varolan mtDNA popülasyonunda babaya ait mtDNA moleküllerinin de katkı sağlayıp sağlamadığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, tRNA<sup>Leu</sup> ve COII lokusları üzerinde durularak iki farklı alttürün hibritlenmesiyle bir araştırma yapılmıştır (Meusel and Moritz 1993). Bu çalışmada, *A. m. capensis* ana arısı, *A. m. carnica* erkek arı semeniyle tohumlanmıştır. Taze yumurtalarda % 23 oranında *carnica* erkek arı mtDNA molekülü tespit edilmiştir. Bu oran devam eden yumurta gelişim safhası ilerledikçe hızlı bir şekilde azalmıştır. Bir günlük yaştaki larvada çok düşük oranda dahi olsa babaya ait mtDNA molekülü kalıntıları belirlenirken, daha geç larva safhalarında kontrol edilen döllerde *carnica* erkek arısına ait herhangi bir mtDNA molekülüne rastlanmadığı gibi tespit edilen mtDNA moleküllerinin tamamının anaya ait mtDNA molekülü olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.13). Bal arılarında başlangıçta babaya ait mtDNA molekülünün büyük miktarda bulunmasına rağmen larva döneminde (ilk gün hariç) sadece anaya ait mtDNA molekülü genetik olarak etkin olmaktadır.

Yukarıda özetlenen midye, deniz kestanesi ve fungus türlerinde olduğu gibi anaya ait kalıtım modelinden çok büyük bir sapma olmasına rağmen mtDNA molekülü eşeyli çoğalan çoğu türde ve bal arılarında anaya ait kalıtım modeline sahip bir genetik sistem olarak kabul edilmektedir. Bal arılarında mtDNA molekülünün popülasyonlardaki anaya ait gen akışının çalışılması için oldukça güvenli olduğu görülmektedir. Bunun sonucunda çok sayıda mtDNA markeri geliştirilmekte ve bal arısı popülasyonları ile ırklarının tanımlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bal arılarında anaya ait

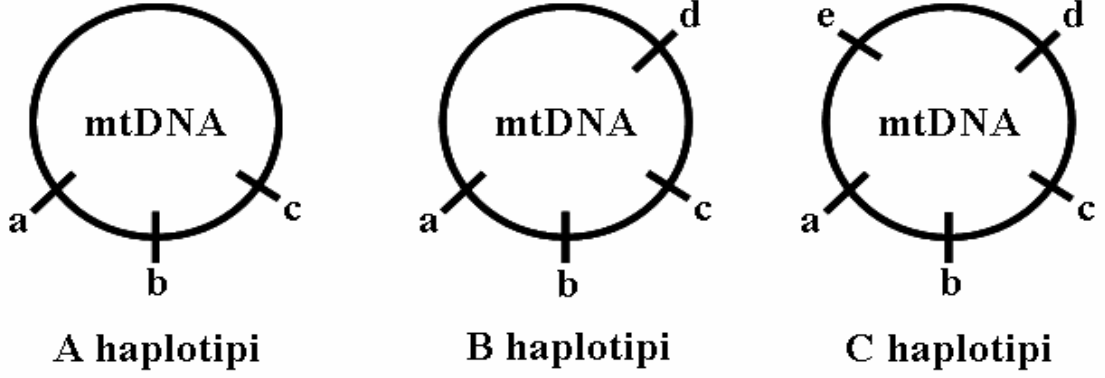
kalıtım yoluyla mtDNA'nın gelecek kuşaklara aktarılıyor olmasının pratikteki önemi büyüktür. Bütün koloni bireyleri ana arı ile aynı mtDNA molekülüne sahip bulunmaktadır. Bunun sonucunda da bal arılarında koloninin tamamı, mtDNA analizlerinde tek bir birey olarak kabul edilebilmektedir (Garnery *et al.* 1992).



Şekil 2.13 Döllenmiş yumurta ve larvada erkek mtDNA oranının azalması (Moritz 1994)

### 2.3.3 Hayvan mitokondriyel DNA molekülünün içeriği

Belirtilen iki önemli özelliğinden dolayı mtDNA molekülü fonksiyonel olarak yaklaşık 37 gen, filogenetik olarak ise çok sayıda genin var olduğu tek bir bağlantı grubundan meydana gelmiş süpergen olarak tanımlanmaktadır. MtDNA genotipleri moleküler klonlar, mitotipler (*mitotypes*) ya da haplotipler (*haplotypes*) olarak tanımlanmaktadır. Mitotip kavramı sadece mitokondriyel genom bakımından genotipi ifade etmektedir. Mitotip kelimesi *mitochondrial genotype* kelimelerinin kısaltılması ile türetilmiştir. Haplotip kavramı ise mitotip kavramından daha geniş anlamda kullanılmakta olup hem mitokondriyel hem de Y kromozomu üzerinde bulunan özellikler bakımından genotiplerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Haplotip kelimesi tek genomlu (n sayıda kromozom içeren) canlıların genotipini yani haploid genotipi çağrıştırmayı amacıyla İngilizce *haploid genotype* kelimelerinin kısaltılmasıyla türetilmiştir. Haplotip kavramı, aynı kromozom üzerinde bağlantı (*linkage*) halinde bulunan ve birlikte dölden döle aktarılan özgün bağlantı grupları ya da gen setleri olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Herhangi bir restriksiyon enzimi bakımında haplotiplerin gösterimi

Genel olarak mtDNA markerleri;

- a) populasyonların tanımlanması,
- b) populasyon ve ekotiplerin orijinlerinin belirlenmesi,
- c) populasyonların coğrafi dağılımlarının ortaya konması,
- d) alttür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi,
- e) populasyonlar arasındaki gen akışı ve hibritlenme seviyelerinin tahmin edilmesi,
- f) anaya ait (*maternal*) kalıtım modellerinin izlenmesi,
- g) populasyonlar içi/arası genetik varyasyon düzeylerinin hesaplanması ve
- h) populasyonların genetik benzerlik ve farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Hayvanlarda genellikle mitokondriyel genom büyüklüğü; 16.3-17.0 kb arasında değişirken bitkilerde mitokondriyel genom büyüklüğü 2500 kb'a kadar olabilmektedir (Cornuet and Garnery 1991). Genel olarak mitokondriyel genomda bulunan genler ve bu genlerin dizilimi evrim sürecinde çok iyi korunmuştur. Hayvanlarda ve bal arılarında mitokondriyel genom 37 gen içermektedir (Moritz *et al.* 1986). Bu 37 gen özetle;

- a) 2 adet ribozomal RNA geni (ribozomun büyük ve küçük alt birimleri),
- b) 22 adet transfer RNA geni ve
- c) ATP sentezi ve elektron taşınmasında yer alan enzimlerin alt birimlerini belirleyen 13 adet protein geni olarak ifade edilmektedir (Cornuet and Garnery 1991).

Çekirdek içi kalıtım materyali (nDNA) ile karşılaştırıldığında hayvansal kökenli mtDNA molekülü arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (Cornuet and Garnery 1991, Griffiths *et al.* 1996). Bu farklılıklar;

- a) Mitokondriyel DNA eşeyli çoğalan türlerde çoğunlukla anaya ait kalıtım göstermektedir.
- b) Hayvansal mtDNA molekülünün çoğunlukla daire şeklinde olduğu bildirilmekle beraber su yılanlarında doğrusal olduğu şeklinde bir araştırmaya da rastlanılmıştır (Warrior and Gall 1985).
- c) Çekirdek içi kalıtım materyali histon proteinleri içerirken mtDNA molekülünde histon proteinleri bulunmamaktadır.
- d) Mitokondriyel genomdaki tüm bölgelerin protein, enzim, rRNA ve tRNA gibi bir ürün karşılığı bulunmaktadır. Diğer bir ifade ile mtDNA'da görevleri tam olarak bilinmeyen intronlar, boş DNA (*junk DNA*) ve uydu DNA (*satellite DNA*) olarak adlandırılan DNA bölgeleri bulunmamaktadır (King and Stansfield 1990).
- e) Çekirdek DNA pek çok canlıda çok büyük (yaklaşık milyon kb) bir molekül iken, mtDNA daha küçük (yaklaşık 16.3-17 kb) bir molekülden ibarettir.
- f) mtDNA'daki bazı kodonlar protein sentezi sürecinde nDNA molekülünde belirtilen evrensel kurallardan farklı anlamlar taşıyabilmektedir. Örneğin;
  - a) UGA kodonunun çekirdek DNA'da stop, mtDNA'da ise triptofan (Trp) amino asidi anlamı bulunmaktadır.
  - b) AUA kodonunun çekirdek DNA'da izolösin (Ile) amino asidi, mtDNA'da ise metiyonin (Met) amino asidi anlamı bulunmaktadır.
  - c) AGA, AGG kodonlarının, çekirdek DNA'da arjinin (Arg) amino asidi, mtDNA'da ise stop anlamı bulunmaktadır.

mtDNA molekülünün hemen hemen tüm DNA diziliminin bir ürün karşılığı bulunduğu için genetik çalışmalarda ekonomik kullanım açısından bu molekül örnek gösterilmektedir (Attardi 1985). mtDNA molekülünde replikasyon ve transkripsiyonun başlatıldığı kontrol bölgesi, omurgalılarda D-loop, *Drosophila*'da A-T'ce zengin bölge olarak adlandırılan ve herhangi bir ürün karşılığı bulunmayan bölge olarak ifade edilmektedir (Cornuet and Garnery 1991).

## 2.4 Bal Arılarında Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı

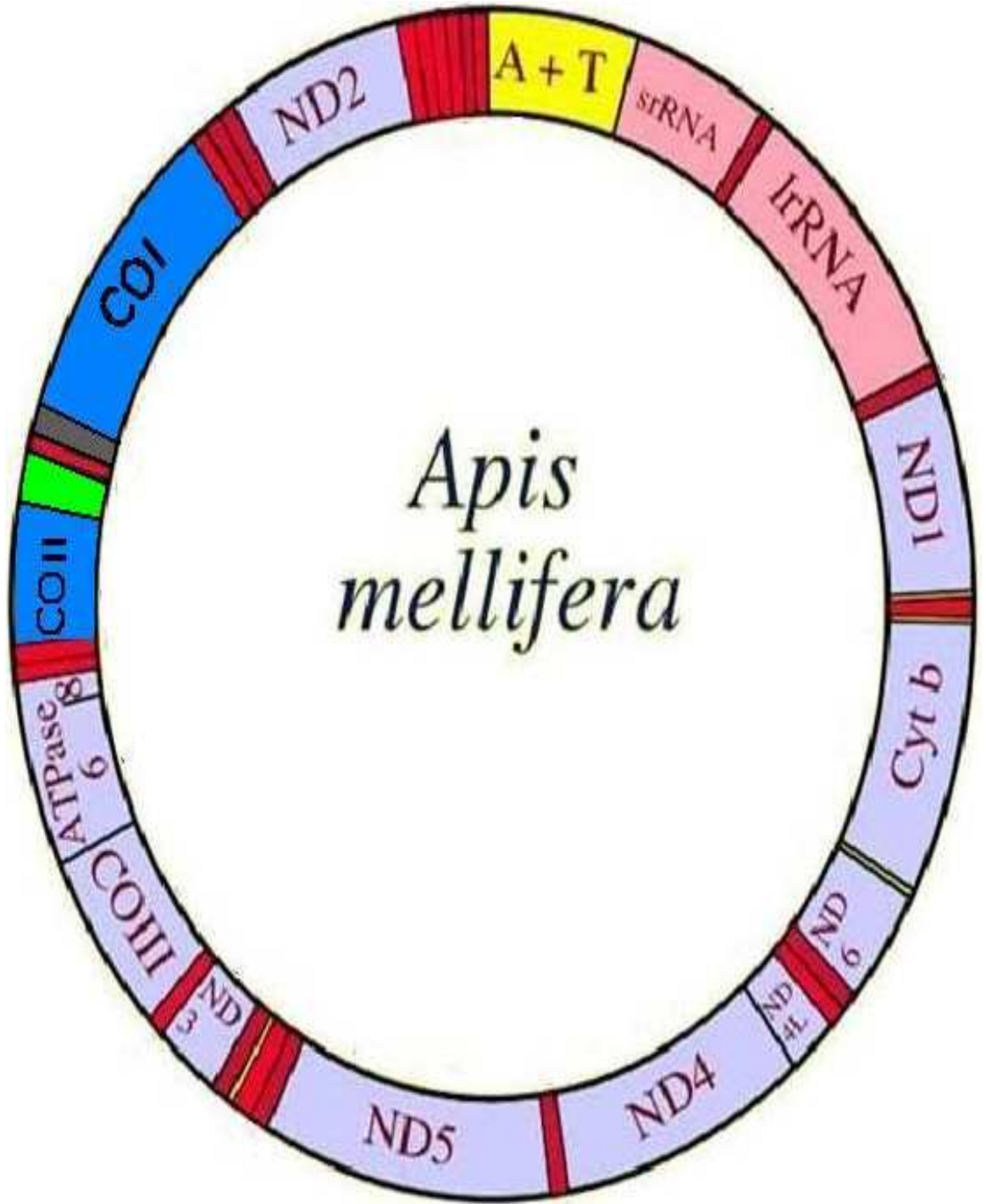
Bal arılarının sınıflandırılması ve coğrafi ırkların ortaya konması bakımından özellikle mtDNA molekülü kullanılarak yapılan çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bal arılarının evrimi ve filogenetik çalışmalarda mtDNA analizlerinin yaygın olarak kullanılıyor olmasının iki temel nedeni bulunmaktadır. Birincisi bal arısı mtDNA molekülünde parça değişiminin meydana gelmemesidir. Parça değişiminin olmaması genetik markerlerin bağlı kalmasını sağlamakta ve düşük frekanslarda da olsa meydana gelen ender nükleotid değişimleri generasyonlar boyunca molekülde toplanmaktadır. İkincisi mtDNA'nın anaya ait kalıtım göstermesidir (Cornuet and Garnery 1991). Bal arılarında anaya ait kalıtım yoluyla mtDNA'nın gelecek kuşaklara aktarılıyor olmasının pratikte önemi büyüktür. Bütün koloni bireylerinin aynı ana arının döleri olmasından dolayı tüm kolonideki bireylerin mtDNA'ları aynıdır. Bu nedenle bal arılarında bütün bir koloni mtDNA analizlerinde tek bir birey olarak kabul edilebilmektedir (Garnery *et al.* 1992). mtDNA molekülü generasyonlar boyunca büyük ölçüde korunarak dölden döle aktarıldığı için anaya ait kalıtım modellerinin belirlenmesinde ve takip edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır.

Bal arılarında mitokondriyel genom büyüklüğü 16.3-17.0 kb arasında değişmekte ve *Drosophila yakuba* mitokondriyel genomunda var olan bütün genler bal arılarında da bulunmaktadır. Bal arısı mtDNA genlerinin çalışılması, ribozomun büyük alt biriminin dizi analizinin yapıldığı araştırma ile başlamıştır (Vlasak *et al.* 1987). Ardından Crozier *et al.* (1989) tarafından dört tRNA (triptofan, lösin, aspartik asit ve lizin) geni ve iki sitokrom C oksidaz alt birimini (COI, COII) kodlayan bölgeyi içine alan 2950 bç'lik bir bölgenin dizi analizi yapılmıştır. Cornuet and Garnery (1991), bu bölgenin başlangıç kısmında 56.-124. pozisyonlar arasında tirozin aminoasidini kodlayan başka bir tRNA olduğunu ancak bu tRNA'nın tam ters yönde transkribe olduğunu bildirmişlerdir. *A. m. ligustica* mtDNA'nın tümünün dizi analizi yapıldığı çalışma ile bal arılarında mtDNA genlerinin yerleri hakkında kesin bilgiler elde edilmiştir (Şekil 2.15). Bal arılarında mitokondriyel genomun belli bölgeleri, bulundukları özgün tanıma sıralarına uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek restriksiyon haritaları oluşturulmuş (Şekil 2.16) ve bu haritaların, *D. yakuba* restriksiyon haritaları ile örtüştüğü gözlenmiştir (Moritz 1994, Crozier and Crozier 1993).

*Apis mellifera* ve *Drosophila yakuba* mitokondriyel genomu karşılaştırıldığında, genlerin yerleri oldukça benzer bulunmuştur. Protein kodlayan genler, kontrol bölgesi ve rRNA genleri, *D. yakuba* mitokondriyel genomu ile aynı dizilimde bulunmuş, buna karşılık 22 tRNA geninden 11'inin farklı noktalarda olduğu tespit edilmiştir. Her iki türde yüksek A+T içeriğinin var olduğu bildirilmektedir. *A. mellifera* mitokondriyel genomunun baz kompozisyonu % 84.9 oranında A+T nükleotidlerinden oluşmakta iken, *D. yakuba* mitokondriyel genomunda bu oran % 78.6'dır. *A. mellifera* mitokondriyel genomunda bulunan ribozomun büyük ve küçük alt birimlerini kodlayan genler ile 13 adet yapısal proteinleri kodlayan genlerin A+T içerikleri, *D. yakuba* mitokondriyel genomu ile olan benzerlikleri ve her bir genin nükleotid içeriği Çizelge 2.5'de verilmiştir. Ele alınan bu iki tür arasında yüksek oranda benzerlik olmasına rağmen, her iki türün mitokondriyel genomları arasında önemli farklılıklar da bulunmaktadır. Örneğin *A. mellifera* mitokondriyel genomunda % 5.5 ile Guanin nükleotidi en az oranda bulunurken, *D. yakuba*'da Sitozin nükleotidi en az oranda bulunmuştur. Ayrıca *A. mellifera* mitokondriyel genomunun, *D. yakuba* mitokondriyel genomundan 300-800 bç daha uzun olduğu bildirilmekte ve bu uzunluk farklarının tRNA<sup>Leu</sup>-COII lokusları arasında kodlama yapılmayan intergenik bölgedeki tekrar eden dizilerden kaynaklandığı bildirilmektedir (Crozier and Crozier 1993, Moritz 1994).

Çizelge 2.5 *A. mellifera* mitokondriyel genomunda yapısal protein ve ribozomun büyük ve küçük alt birimlerini kodlayan genler ile bu genlerin A+T içerikleri, *D. yakuba* mitokondriyel genomu ile olan benzerliği ve her bir genin nükleotid sayısı (Crozier and Crozier 1993, Moritz 1994)

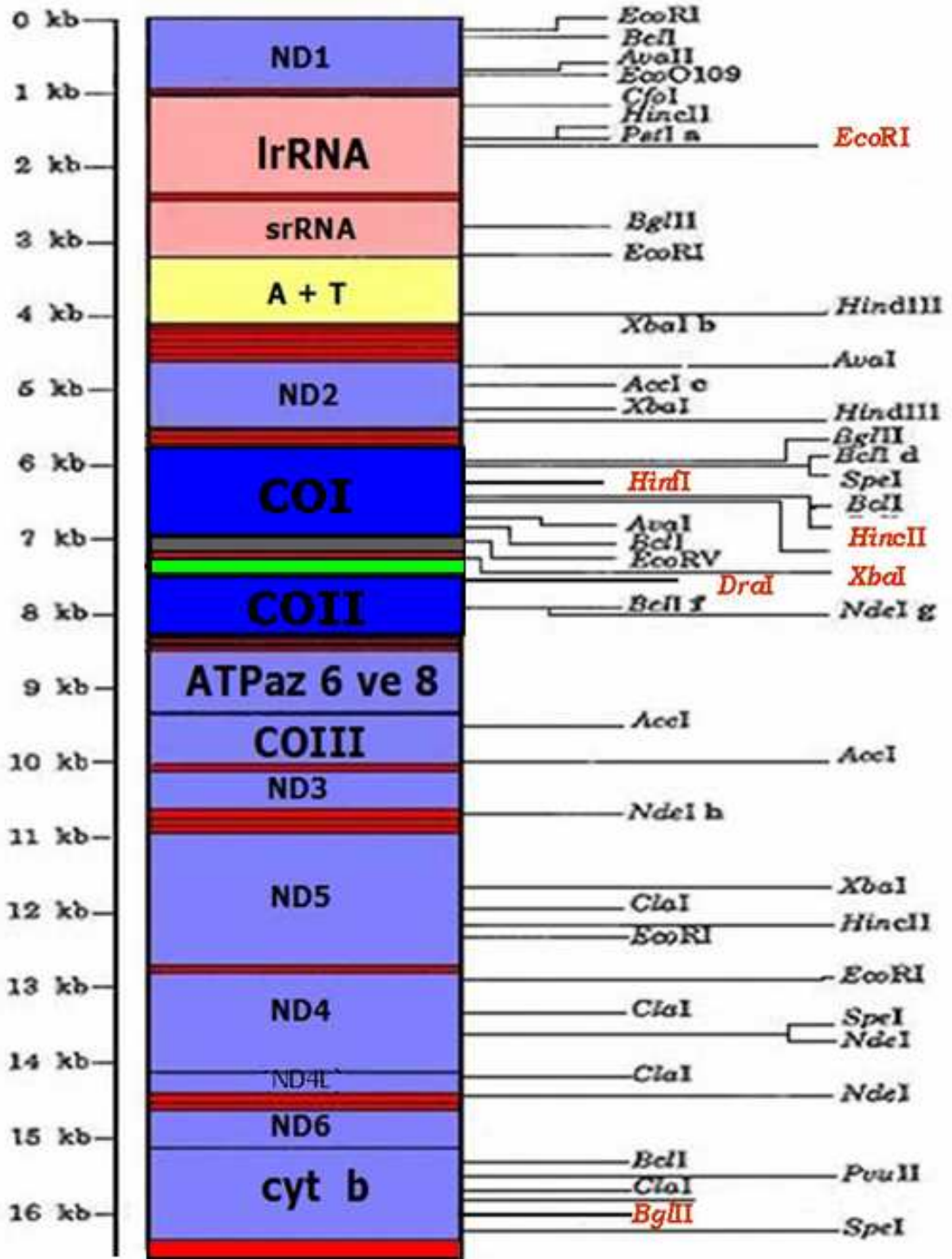
Gen	A + T içeriği (%)	<i>D. yakuba</i> ile benzerlik (%)	Nükleotid sayısı
ATPaz 8	90	64	156
ATPaz 6	85	62	678
COI	84	74	1560
COII	81	68	675
COIII	84	66	777
Cyt b	69	66	1149
ND1	86	64	915
ND2	87	51	999
ND3	87	63	351
ND4	94	64	1341
ND4L	86	57	261
ND5	87	61	1662
ND6	87	53	501
srRNA	81	68	786
lrRNA	85	73	1371



Şekil 2.15 Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) mtDNA genom haritası (Crozier and Crozier 1993)

Not: Sitokrom C oksidaz I, II ve III alt birimlerini kodlayan protein genleri COI, COII ve COIII olarak; sitokrom b geni için cyt b, NADH dehidrogenaz (1-6) alt birimleri için ND1-ND6 şeklinde gösterilmiştir. A+T olarak gösterilen bölgenin replikasyon orijini olduğu bildirilmektedir.





Şekil 2.16 *Apis mellifera* mtDNA genomunun restriksiyon haritası. Cornuet and Garnery (1991)'den değiştirilmiştir

Not: Soldan sağa verilenler: kb skalası ve restriksiyon enzimleri. Kırmızı ile gösterilen restriksiyon enzimleri bu çalışmada kullanılan enzimlerdir. Gri renkle gösterilen tRNA<sup>Leu</sup> (L) ile COII geni arasında yer alan kırmızı ve yeşil olarak gösterilen bölge uzunluğu değişken olan COI-COII intergenik bölge olarak adlandırılmakta ve bu bölge *Apis mellifera*'da bulunurken *Drosophila*'da bulunmamaktadır (Cornuet and Garnery 1991).

Diğer pek çok türde olduğu gibi bal arılarında da mitokondriyel genom 37 gen içermektedir (Şekil 2.14) (Moritz *et al.* 1986, Cornuet and Garnery 1991 Moritz 1994). Bu genler;

a) 2 ribozomal RNA geni

Ribozomun büyük alt birimi (lrRNA)

Ribozomun küçük alt birimi (srRNA)

b) 22 transfer RNA geni

tRNA molekülü olarak;

tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>,  
tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Phe</sup>,  
tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Leu</sup> ve tRNA<sup>Val</sup>

Aminoasit birimi olarak;

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

c) Solunum zincirinde yer alan ve yapısal proteinleri belirleyen 13 gen;

a) 1 adet sitokrom b (cyt b) geni,

b) 3 adet sitokrom C oksidaz (COI, COII, COIII) alt birimlerini kodlayan gen,

c) 2 adet ATP sentaz (ATPaz 6 ve ATPaz8) geni ve

d) 7 adet NADH (Nikotinamid adenin dinükleotid) dehidrogenaz alt birimlerini (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 ve ND6) belirleyen genlerdir.

## 2.5 Bal Arılarında Çalışılan Mitokondriyel (mtDNA) Lokuslar

Batı bal arısı alttürlerinin (*Apis mellifera* L.) de dahil olduğu tüm bal arısı türlerinde mitokondriyel genomda var olan genetik çalışmalar ilk kez Smith and Brown (1990) tarafından başlatılmıştır. Söz konusu araştırmada COI-COII arası bölgede *BclI* restriksiyon enzimi kesimlerinden yararlanılarak 20 ile 100 bp arasında değişen çeşitli uzunluk farklılıklarının bulunduğu bildirilmiştir. Daha sonra Cornuet and Garnery

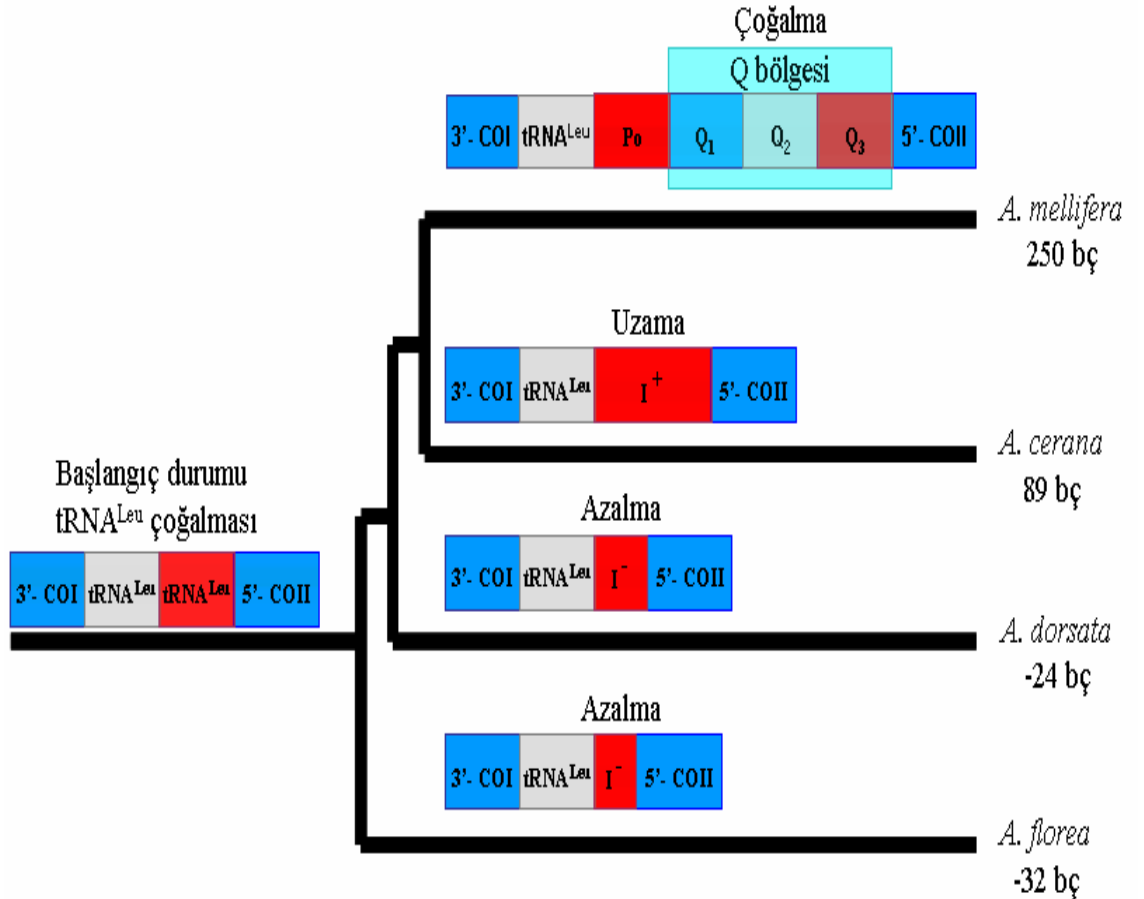
(1991) tespit edilen bu uzunluk farklılıklarına kabul edilebilir açıklamalar getirmişlerdir. Bal arısı mitokondriyel genomu kullanılarak başlatılan bu öncü moleküler genetik çalışmaları takiben yapılan çok sayıdaki çalışmada, Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) alttürlerinin de dahil olduğu tüm bal arısı türlerinde mitokondriyel genomda yaygın olarak çalışılan lokuslar şu şekilde özetlenmiştir.

- 1) Anonim (*Anonymous*) lokus,
- 2) Sitokrom b (*cyt b, cytochrome b gene*) lokusu,
- 3) Sitokrom C oksidaz I (*COI, cytochrome C oxidase subunit I*) lokusu,
- 4) Ribozomun büyük alt birimi (*1rRNA, large subunit ribosomal RNA*) lokusu,
- 5) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (*COI-COII arası, inter cytochrome C oxidase subunit I and cytochrome C oxidase subunit II*),
- 6) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (*COI-COII intergenik bölge, cytochrome C oxidase subunit I and cytochrome C oxidase subunit II intergenic region*),
- 7) ATPaz 6 (*ATP sentase 6, ATPase 6*) lokusu,
- 8) ATPaz 8 (*ATP sentase 8, ATPase 8*) lokusu,
- 9) ND2 (*NADH dehidrogenaz 2*) lokusu ve
- 10) ND5 (*NADH dehidrogenaz 5*) lokusu.

Bal arısı tür ve alttürlerinin tanımlanmasında ve aralarındaki farklılık/benzerliklerin ortaya konmasında yararlanılan öncelikli mtDNA lokuslarının başında COI-COII intergenik bölgenin çalışılması yer almaktadır. Belirtilen bölge tRNA<sup>Leu</sup> geni ile COII genleri arasında yer almakta olup, mtDNA molekülünde en çok genetik varyasyonun tespit edildiği bölgedir (Şekil 2.16).

Garnery *et al.* (1991), COI-COII intergenik bölgenin dizi analizi sonucunda *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* ve *A. florea* bal arısı türleri arasında % 7 ila % 11 arasında nükleotid farklılıklarının bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu bölge bakımından başlangıç durumu olarak tRNA<sup>Leu</sup> geninde bir çoğalmanın olduğu kabul edilmektedir (Şekil 2.17). Evrim süreci içerisinde *mellifera* türünde 250 bç'lik bir çoğalmanın meydana geldiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *cerana* türünde de bir çoğalma (89 bç)

meydana gelmiş, ancak çoğalma miktarı *mellifera*'daki kadar olmamıştır. *A. dorsata* ve *A. florea* türlerinde başlangıç durumuna göre azalmalar meydana gelmiştir. Bu azalmanın miktarı *dorsata*'da 24 bç olurken, *florea*'da 32 bç (daha fazla) olarak gerçekleşmiştir. Cornuet and Garnery (1991) ve Garnery *et al.* (1991) tarafından tespit edilen dizi analizi farklılıklarından yararlanılarak bu 4 farklı türün evriminde göstermiş oldukları farklılaşmayı tahmin etmek için kümeleme analizi yapılmıştır. Kümeleme analizi sonucunda ilk önce *A. florea*'nın diğer türlerden farklılaştığı, *A. dorsata*'nın temel türlerden birisi olarak değerlendirilmesi gerektiği ve *A. mellifera* ile *A. cerana* türlerinin birbirlerine oldukça benzer genetik yapılarında olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.17). Ayrıca bu sonuçların morfometri (Ruttner *et al.* 1978, Ruttner 1988), davranış ve biyokimyasal genetik (Sheppard and Berlocher 1989) verileri kullanılarak elde edilen sonuçlarla da paralellik gösterdiği bildirilmektedir.



Şekil 2.17 Mitokondriyel DNA COI-COII intergenik bölge bakımından *Apis* türlerinin karşılaştırılması. Cornuet and Garnery (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir

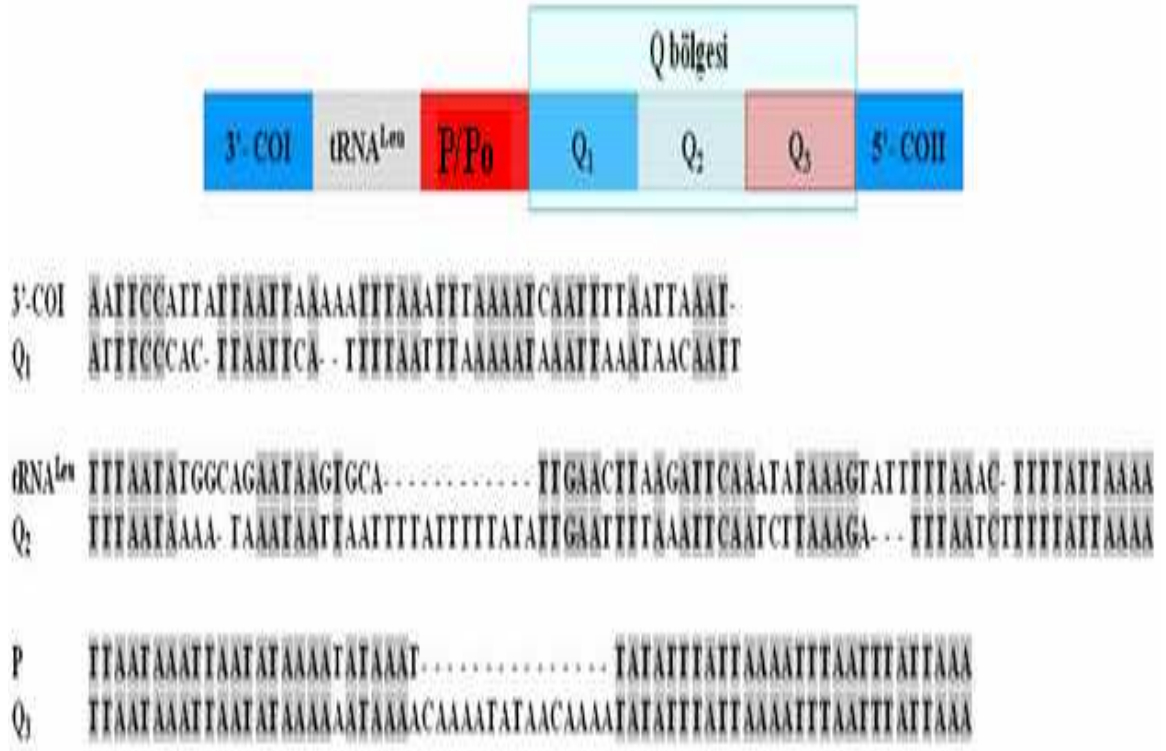
Bal arısı alttürlerinde tespit edilen ancak *Drosophila yakuba* mtDNA molekülünde bulunmayan COI-COII intergenik bölgesinin replikasyon başlangıç yeri olabileceği yönünde çeşitli hipotezler geliştirilmektedir. Bu düşünce bölgenin A+T içeriğinin yüksek olması ve saç tokasına benzer ikincil yapısı ile de desteklenmektedir (Cornuet *et al.* 1991). COI-COII intergenik bölge üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda bu bölgenin farklı nükleotid kompozisyonuna sahip olan P ve Q bölgelerinden meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 2.18). Garnery *et al.* (1992) ve Moritz (1994)'e göre, bal arısı alttürlerinde P ve Q bölgelerinin farklı kombinasyonlarıyla oluşan çeşitli farklılıkların tespit edildiğini ve bu farklılıklar temelinde bal arısı alttürlerinin karşılaştırılabileceğini ifade etmektedirler. Q bölgesi bakımından tür içinde varyasyon bulunurken, P bölgesi bakımından çeşitli alttürler arasında da özgün farklılıklar bulunduğu bildirilmektedir. Bal arılarının tamamında Q bölgesinin en azından bir set (kopya) halinde bulunduğu, buna karşılık P bölgesinin bazı bal arılarında bulunmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 *Apis mellifera* alttürleri ve haplotipler (Moritz 1994)

Haplotipler	Altür	Kaynak
Q	<i>carnica</i>	Cornuet <i>et al.</i> 1991
	<i>caucasica</i>	Crozier and Crozier 1992
	<i>ligustica</i>	Crozier <i>et al.</i> 1989
	<i>lamarckii</i>	Garnery <i>et al.</i> 1992
P (Q) <sub>n</sub>	<i>mellifera</i>	Cornuet <i>et al.</i> 1991
	<i>iberica</i>	Garnery <i>et al.</i> 1992
P <sub>o</sub> (Q) <sub>n</sub>	<i>scutellata</i>	Cornuet <i>et al.</i> 1991
	<i>capensis</i>	Hall and Smith 1991
	<i>montiloca</i>	Moritz and Meusel 1992
	<i>unicolor</i>	Smith 1991, Moritz <i>et al.</i> 1993
P <sub>o</sub> (X)	<i>scutellata</i>	Moritz <i>et al.</i> 1993

X: Po bölgesini izleyen ve henüz tanımlanmamış dizi

COI-COII intergenik bölgede tRNA<sup>Leu</sup> lokusundan sonra sadece A+T bazlarından oluşan P/Po bölgesi yer almaktadır (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Bal arılarında COI-COII intergenik bölgenin yapısı. Cornuet *et al.* (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir

Po bölgesi bakımından d, d1, d2, d4, d6 ve d7 olarak ifade edilen 6 farklı nükleotid eksilmesi tespit edilmiştir (Franck *et al.* 2001). Şekil 2.19 ve Şekil 2. 22'de görülebileceği gibi, bu farklılıklar temelinde genetik soyların sınıflandırılması yapılmaktadır. Tespit edilen d, d1, d2, d4, d6 ve d7 farklılıklarına bağlı olarak Po bölgesi de Po, P, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> ve P<sub>7</sub> olarak gösterilmektedir.

- a) Po bölgesi: A-O genetik soyuna dahil bal arılarının bir kısmında Po bölgesinde herhangi bir nükleotid eksilmesi tespit edilmemiştir. Bu nedenle bu bölge 67-69 bç'lik bir uzunluğa sahip olup Po olarak gösterilmiştir (Şekil 2.19).
- b) P bölgesi: M genetik soyuna dahil bal arıların tamamında Po bölgesinde 13 bç'lik bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d olarak ifade edilmiş olup, Po bölgesi de P ile gösterilmiştir (Şekil 2.19).

- c) P<sub>1</sub> bölgesi: Atlantik okyanusuna kıyısı olan ülkelerde A genetik soyuna dahil bal arılarında Po bölgesi içinde (d nükleotid eksilmesinden farklı bir yerde) 15 bç'lik ikinci bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d1 olarak ifade edilmiş olup, Po bölgesi de P<sub>1</sub> ile gösterilmiştir (Şekil 2.19).
- d) P<sub>2</sub> bölgesi: Etiyopya'dan alınan *A. m. yemenitica* örneklerinde Po bölgesi içinde (d ve d1 nükleotid eksilmelerinden farklı bir yerde) 18 bç'lik üçüncü bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d2 olarak ifade edilmiştir. Franck *et al.* (2001) bu nükleotid eksilmesine bağlı olarak *A. m. yemenitica* örneklerini Y (*yemenitica*) olarak isimlendirilen yeni bir genetik soy içerisinde değerlendirmiştir. Y genetik soyunda d2 farklılığını vurgulamak için Po bölgesi de P<sub>2</sub> olarak gösterilmiştir (Şekil 2.19).
- e) P<sub>4</sub> bölgesi: Nabibya'dan alınan *A. m. adansonii* örneklerinde Po bölgesi içinde (d, d1 ve d2 nükleotid eksilmelerinden farklı bir yerde) 11 bç'lik dördüncü bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d4 olarak ifade edilmiş olup, Po bölgesi de P<sub>4</sub> olarak gösterilmiştir (Şekil 2.19).
- f) P<sub>6</sub> bölgesi: Suriye'den alınan *A. m. syriaca* örneklerinde Po bölgesi içinde (d, d1, d2 ve d4 nükleotid eksilmelerinden farklı bir yerde) 5 bç'lik beşinci bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d6 olarak ifade edilmiş olup, Po bölgesi de P<sub>6</sub> ile gösterilmiştir (Şekil 2.19).
- g) P<sub>7</sub> bölgesi: Gine'den alınan *A. m. adansonii* örneklerinde Po bölgesi içinde (d, d1, d2, ve d4 nükleotid eksilmelerinden farklı bir yerde) 5 bç'lik altıncı bir nükleotid eksilmesi belirlenmiştir. Bu farklılık d7 olarak ifade edilmiş olup, Po bölgesi de P<sub>7</sub> ile gösterilmiştir (Şekil 2.19).

P<sub>0</sub> TTAATAAATTAATATAAAAATAAAA c AAAATa TAA t a g Aa TATATTTAT t a AAA\_ t TTAATTTATTa AAA  
d (-13 bç) eksilmesi

P TTAATAAATTAATATAAAAAT \_\_\_\_\_ At a g Aa TATATTTAT t a AAA\_ t TTAATTTATTa AAA  
d1 (-15 bç) eksilmesi

P<sub>1</sub> TTAATAAATTAATATAAAAATAAAA c AAAATa TAA t a g Aa TATATTTAT t a AAA\_ \_\_\_\_\_  
d2 (-18 bç) eksilmesi

P<sub>2</sub> TTAAT \_\_\_\_\_ At AAAAT t TAA t a a Aa TATATTTATa a AAAAt TTAATTTATTa AAA  
d4 (-11 bç) eksilmesi

P<sub>4</sub> TTAATAAATTAATATAAAAATAAAA c AAA \_\_\_\_\_ TATATTTAT t a AAA\_ t TTAATTTATTa AAA  
d6 (-5 bç) eksilme:

P<sub>6</sub> TTAATAAATTAATATAAAAATAAAA t \_\_\_\_\_ a TAAc a g Aa TATATTTAT t a AAA\_ c TTAATTTATTa AAA  
7 (-5 bç) eksilme:

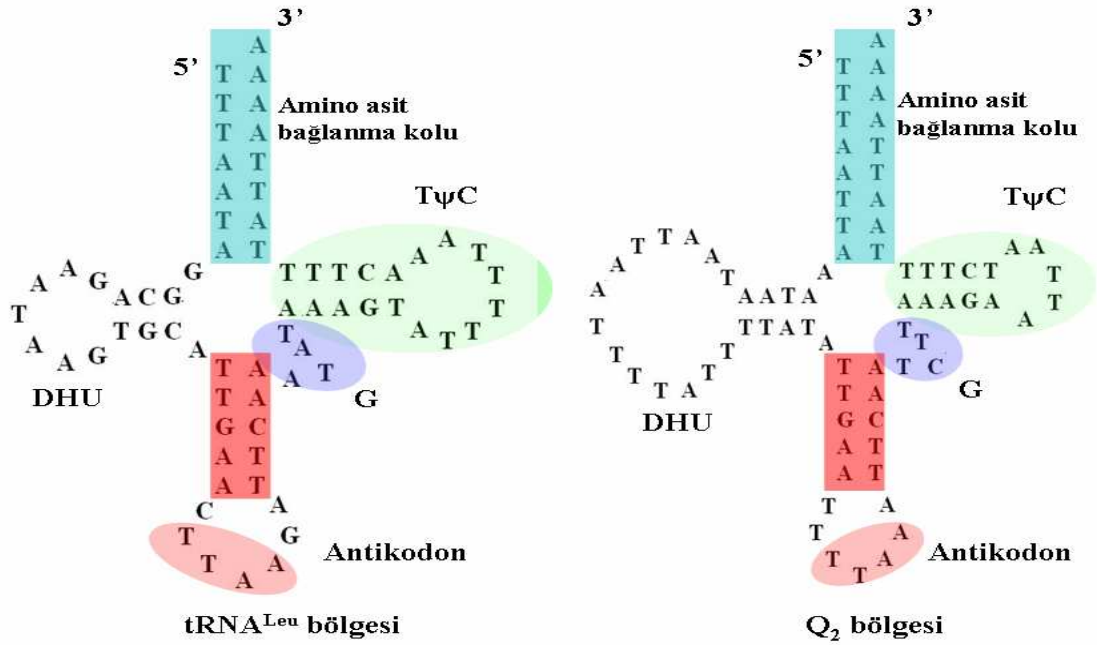
P<sub>7</sub> TTAATAAATTAATATAAAAATAAAA c AAAATa TAAc a \_\_\_\_\_ TATTTAT t a AAA\_ t TTAATTTATTa AAA

Şekil 2.19 Po bölgesinde tespit edilen d, d1, d2, d4, d6 ve d7 nükleotid eksilmeleri. Franck *et al.* (2001)'den çizilmiştir

Şekil 2.18’de görülebileceği gibi, Q bölgesi COI-COII intergenik bölgede 5'-COII bölgesine bitişik olarak bulunmaktadır. Q bölgesi % 93.4 oranında A+T bazlarından oluşmakta ve 192-196 bç uzunluğunda bulunmaktadır. Polipeptid (*primer*) ve ikincil (*secondary*) yapılarıdaki benzerliklere dayanarak Q bölgesi kendi içerisinde Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> ve Q<sub>3</sub> olmak üzere 3 alt bölgeye ayrılmaktadır (Garnery *et al.* 1993). Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> ve Q<sub>3</sub> bölgelerinin evrim sürecinde göstermiş oldukları değişimleri hakkında farklı teoriler bulunmakla beraber, bunlar içinde en kabul gören Cornuet *et al.* (1991) tarafından ileri sürülen teoridir. Bu teorinin esası Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> ve Q<sub>3</sub> bölgelerindeki baz nükleotid dizileri ile diğer bölgelerdeki nükleotidler arasındaki benzerliğe dayanmaktadır (Şekil 2.18 ve 2.19). Yaygın olarak kabul edilen bu görüşe göre, Q<sub>1</sub> bölgesinin 3' COI bölgesinden, Q<sub>2</sub> bölgesinin tRNA<sup>Leu</sup> geninden ve Q<sub>3</sub> bölgesinin Po bölgesinden farklılaşarak bugünkü konumunu aldığı ifade edilmektedir. Buna göre;

- a) Q<sub>1</sub> bölgesi: tRNA<sup>Leu</sup> geninin devamındaki 48 bç’lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q<sub>1</sub> bölgesi ile 3'-COI bölgesinin nükleotid içerikleri arasındaki benzerlikten dolayı Q<sub>1</sub> bölgesinin 3'-COI bölgesinin çoğalması sonucu meydana geldiği ve evrim sürecinde de bu bölgeden farklılaşarak bugünkü nükleotid içeriğine sahip olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 2.18).
- b) Q<sub>2</sub> bölgesi: Q<sub>1</sub> bölgesinin devamı olup, 79 bç’lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q<sub>2</sub> bölgesi ile tRNA<sup>Leu</sup> molekülünün 3' ucu arasında büyük bir nükleotid benzerliği bulunmaktadır (Şekil 2.18). İki bölge arasındaki bu benzerlik özellikle her iki molekülün ikincil (*secondary*) yapıları karşılaştırıldığında daha çarpıcı bir şekilde görülmektedir (Şekil 2.20). Her iki molekülde de amino asit bağlanma kollarıyla (mavi renkli), TψC (yeşil renkli) ve G (bordo renkli) bölgelerinin hemen hemen özdeş olduğu görülmektedir. Bu üç bölgede var olan 17 çift nükleotidden 16 çifti her iki molekülde de aynı konumda bulunmaktadır. İki molekül arasında antikodon bölgesi (kırmızı renkli) bakımından da çok büyük benzerlikler tespit edilmiştir.
- c) Q<sub>3</sub> bölgesi: Q<sub>2</sub> bölgesinin devamı olup, 5'-COII geni arasında kalan 67 bç’lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q<sub>3</sub> bölgesi Po bölgesi ile hemen hemen aynı nükleotid içeriğine sahip bulunmaktadır (Şekil 2.18).





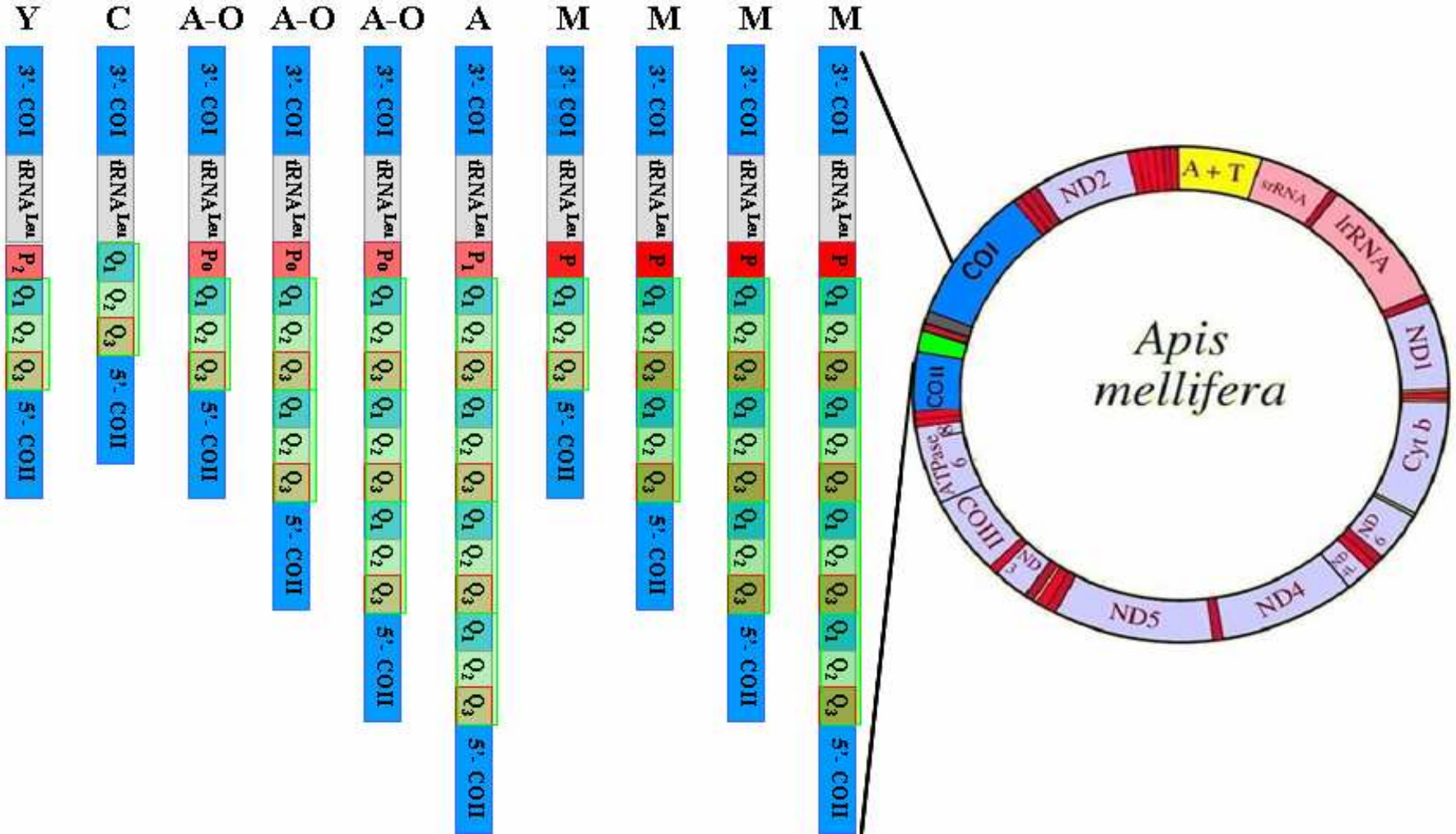
Şekil 2.20 tRNA<sup>Leu</sup> ve Q<sub>2</sub> bölgelerinin ikincil (secondary) yapılarının karşılaştırılması. Cornuet *et al.* (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir

COI-COII intergenik bölgedeki genetik farklılık esas olarak Po/P/P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> ile Q (Q<sub>1</sub> Q<sub>2</sub> ve Q<sub>3</sub>) setlerinin sayısına bağlı bulunmaktadır. COI-COII intergenik bölgedeki bu sınıflandırmadan yararlanılarak bal arısı soylarını tanımlamak ve soylara özgü alttürleri belirlemek mümkün olmaktadır (Çizelge 2.6).

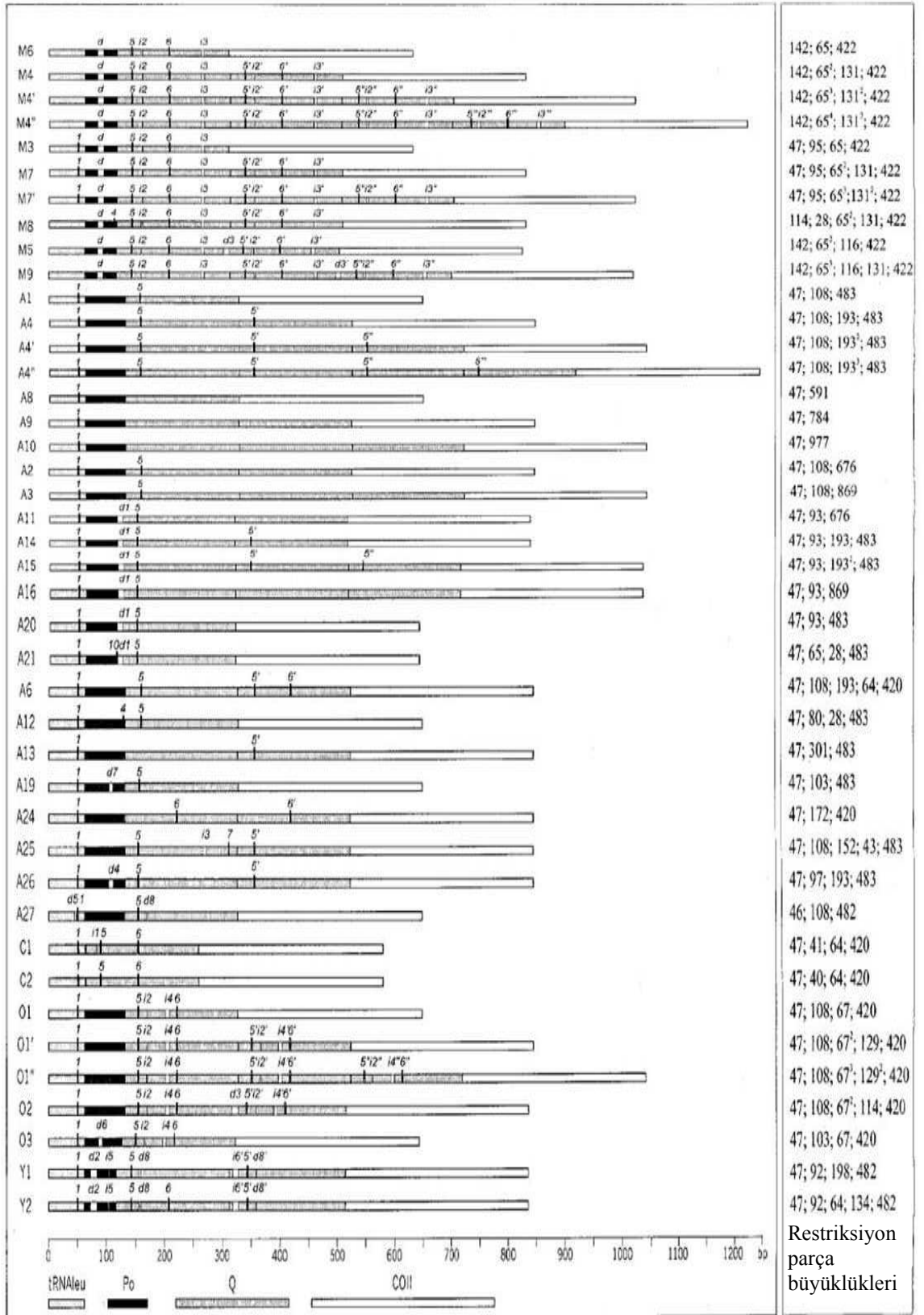
P ve Q setlerinin farklılığı dikkate alınarak yapılan çalışmalarda COI-COII intergenik bölgede 10 farklı ana sınıflandırma yapılmıştır (Şekil 2.21). Genetik soylar temelinde yapılan bu sınıflandırmalar sonucunda;

- a) M genetik soyunda PQQQQ, PQQQ, PQQ ve PQ kombinasyonlarının,
- b) A genetik soyunda P<sub>1</sub>QQQ, P<sub>1</sub>QQ ve P<sub>1</sub>Q kombinasyonları ile PoQQQQ, PoQQQ, PoQQ ve PoQ kombinasyonlarının,
- c) O genetik soyunda PoQQQ, PoQQ ve PoQ kombinasyonlarının,
- d) C genetik soyunda sadece bir adet Q setinin ve
- e) Y genetik soyunda sadece P<sub>2</sub>Q kombinasyonunun var olduğu tespit edilmiştir.

COI-COII intergenik bölge birçok restriksiyon enzimi için tanıma bölgelerine sahip bulunmaktadır. Bu enzim tanıma bölgelerinden *DraI* enzimi kesim bölgesindeki farklılıklardan yararlanarak bal arısı soyları birbirlerinden ayrılmaktadır. *DraI* enzimi kesim bölgesindeki farklılıklardan yararlanarak COI-COII intergenik bölgenin restriksiyon haritası yapılmıştır (Şekil 2.22). *DraI* enzimi kesimine bağlı olarak RFLP analizleri sonucunda A soyu içerisinde 9, M soyu içerisinde 8 ve C soyu için ise tek bir haplotipin var olduğu belirlenmiştir (Garnery *et al.* 1993, Palmer *et al.* 2000, Franck *et al.* 2000a, Franck *et al.* 2001). RFLP yöntemine oranla daha duyarlı bir teknik olan DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılan araştırma sonuçlarına göre belirtilen bölgede çok fazla sayıda haplotipin var olduğu ortaya konmuştur. Şekil 2.22'den de görülebileceği gibi, COI-COII intergenik bölge bakımından şu ana kadar 42 farklı haplotip belirlenmiş ve bu haplotipler; M soyunda 10, A soyunda 23, C soyunda 2, O soyunda 5 ve Y soyunda 2 farklı haplotip olmak üzere sınıflandırılmıştır (Franck *et al.* 2001).



Şekil 2.21 Batı bal arısı alttürlerinin COI-COII intergenik bölge bakımından sınıflandırılması



Şekil 2.22 COI-COII intergenik bölge haplotiplerinin restriksiyon haritası (solda) ile restriksiyon parça büyüklükleri (sağda) (Franck *et al.* 2001)

## 2.6 Kaynak Özetleri

Bal arılarında RFLP markerleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, mitokondriyel DNA (mtDNA) ve nükleer (çekirdek) DNA (nDNA) bölgelerinde hem uzunluk ve hem de farklı restriksiyon enzimlerin kesim noktalarının var olup olmamasına dayanan çeşitli farklılıklar üzerinde durulmuştur.

Çeşitli yöntemler kullanılarak bal arılarında mitokondriyel genom dikkate alınarak yapılan araştırmalarda esas olarak;

- a) türler arasındaki farklılıkların ortaya konması,
- b) aynı tür içinde farklı alttürlerin belirlenmesi ve
- c) aynı ekotip içinde farklı haplotiplerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bal arısı (*Apis mellifera*) mtDNA molekülü ile *Drosophila yakuba* mtDNA molekülü birbiriyle karşılaştırıldığında benzer yapıda olmakla birlikte çeşitli farklılıklar içermektedir. Bal arısı mtDNA molekülü ile *Drosophila* mtDNA molekülleri yapısal proteinleri kodlayan genler ile ribozomal RNA'ların sentezinden sorumlu genlerin genomda buldukları yerler bakımından benzerdirler. tRNA moleküllerini kodlayan 22 genden 11 tanesinin genomda buldukları yerler bakımından bal arısı ve *Drosophila* mtDNA molekülleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Yapısal proteinlerin sentezinden sorumlu gen sıralarında yapılan translyasyon çalışmaları sonucunda, bal arısı mtDNA molekülü ile *Drosophila* mtDNA molekülünün büyük olasılıkla aynı genetik kodlara sahip olduğu sadece iki tRNA antikodonu bakımından farklılığın olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca *Apis mellifera ligustica* bal arısı örneğinde çalışılarak mtDNA molekülünün nükleotid içeriğinin 16.343 bç olduğu bildirilmekte ve kesim enzimleri kullanılarak RFLP haritaları oluşturulmaktadır (Crozier and Crozier 1993).

### 2.6.1 Southern emdirim (*blotting*) temelli araştırmalar

Genel olarak, ilk uygulanan RFLP analizleri araştırmalarında Southern emdirim (*blotting*) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemden yararlanılarak Afrika kökenli bal

arılarının Amerika Kıtasında var olup olmadıklarını test etmek amacıyla 80'li yıllardan sonra yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Afrika arılarını Avrupa arılarından ayırt etmede kullanılacak nDNA ve mtDNA RFLP markerleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda nDNA'da kesim noktalarının var olup olmaması ve mtDNA'da hem uzunluk ve hem de kesim noktalarına bağlı olarak çeşitli farklılıklar belirlenmiştir. Tespit edilen bu farklılıklar, farklı coğrafi bölgelerde bulunan Afrika kökenli bal arılarının belirlenmesinde ve bal arılarında filogenetik analizlerin yapılmasında kullanılmaktadır (Hall 1986, Smith and Brown 1988, 1990, Hall and Muralidharan 1989, Hall 1990; Hall 1992b, McMichael and Hall 1996).

Bal arılarındaki mitokondriyel genom farklılıklarının ortaya konması amacıyla yapılan çalışmalarda çeşitli yöntemler kullanılarak farklı coğrafi bölgelerde bulunan alttürler ve ekotipler araştırılmıştır. Bir çalışmada, *BglII* restriksiyon enzimi kullanılarak *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* ve *A. m. caucasica* alttürlerinde tüm mtDNA kesimi yapılmıştır. *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* örnekleri bu kesim noktası bakımından benzer mtDNA modeline sahipken, *A. m. caucasica* örneklerinde farklı bir mtDNA modeli tespit edilmiştir (Moritz *et al.* 1986). Avusturya, Slovenya ve İtalya'dan alınan *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* mitokondriyel genomlarında *AccI*, *BclI*, *BglII*, *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile RFLP analizleri yapılmış ve bu alttürlerin *XbaI* enzim kesim noktası bakımından birbirlerinden ayrılacakları bildirilmiştir. Belirlenen bu kesim noktasından yararlanılarak Avusturya ve Slovenya kökenli *A. m. carnica* ve İtalya kökenli *A. m. ligustica*'nın birbirlerinden ayrılacağı ifade edilmiştir (Meixner *et al.* 1993). Benzer restriksiyon enzimleri kullanılarak, *A. m. mellifera* alttüründe tek bir *XbaI* kesim modeli (Meixner *et al.* 1993) belirlenirken, *A. m. carnica* alttüründe 2 farklı *XbaI* kesim yeri tespit edilmiştir (Smith and Brown 1990).

İspanya bal arıları (*A. m. iberica*) için oluşturulan mtDNA restriksiyon enzim haritaları, Avrupa (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* ve *A. m. carnica*) ve Afrika alttürleri (*A. m. intermissa* ve *A. m. scutellata*) ile karşılaştırılmıştır. Bu iki Afrika alttürünün mtDNA'ları *HinfI* restriksiyon enzimi ile birbirinden ayrılmıştır. Ayrıca İspanya bal arılarında iki farklı mitokondriyel haplotipin var olduğu ve Kuzey İspanya'dan alınan

örneklerin *A. m. mellifera*'ya, Güney İspanya'dan alınan örneklerin ise *A. m. intermissa*'ya benzer olduğu tespit edilmiştir (Smith *et al.* 1991).

Arjantin bal arısı popülasyonlarının hangi genetik soydan geldiklerini belirlemek amacıyla yapılan bir başka çalışmada morfometri, allozim ve mtDNA analizlerinden yararlanılmıştır. Farklı restriksiyon enzimleri (*BclI*, *EcoRI*, *XbaI*) kullanılarak Arjantin'deki Afrika ve Avrupa kökenli bal arılarının belirlenebileceği ifade edilmektedir (Sheppard *et al.* 1991). Diğer bir çalışmada mitokondriyel genomda *EcoRI* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri kullanılarak Afrika ve Avrupa kökenli alttürlerde farklılıklar araştırılmış ve bu farklılıklara dayanarak Yeni Dünya ve Avustralya'ya götürülen bal arısı popülasyonlarının kökenleri belirlenmiştir (Sheppard *et al.* 1996). Malta Ada'sında bulunan bal arılarının morfometri çalışmaları sonucu ayrı bir coğrafi ırk (*A. m. ruttneri*) olarak düşünülmesi gerektiği belirtilmiş, *EcoRI* restriksiyon enzimi ile mtDNA analizleri yapılan *A. m. ruttneri*'nin Kuzey Afrika'daki *A. m. intermissa* alttürleri ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Sheppard *et al.* 1997).

*BclI* restriksiyon enzimi ile COI ve COII mitokondriyel lokusları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *A. m. capensis* popülasyonlarında 430 bç'lik DNA bölgesinin fazladan bulunduğu, *A. m. scutellata* ve *A. m. carnica* popülasyonlarında ise bu 430 bç'lik bölgenin bulunmadığı bildirilmiştir (Meusel and Moritz 1992).

## 2.6.2 PCR temelli araştırmalar

Southern emdirim yöntemi ile yapılan RFLP analizlerinin oldukça pahalı, karmaşık ve zaman alıcı olması nedeniyle, çok sayıda örneğin aynı anda analiz edilmesi problem olmaktadır. Son yıllarda PCR kullanımına dayanan yöntemlerin geliştirilmesiyle, mtDNA analizlerinin yapılması daha hızlı, kolay ve güvenilir olmuştur (Saiki *et al.* 1985, 1988). PCR-RFLP yönteminin bu üstünlükleri daha yaygın olarak kullanımına neden olmuştur. PCR-RFLP analizlerinde özgün primer çiftleri ile hedeflenen DNA bölgeleri çoğaltılmakta ve ardından çeşitli kesim enzimleri ile kesim yapılmaktadır.

Elde edilen DNA parçacıkları agaroz ya da poliakrilamid jellerinde birbirlerinden ayrıldıktan sonra görüntülenmektedir.

Batı bal arısı alttürlerinin genetik soylarının (M, C ve A) gruplandırılmasında mtDNA molekülünde yer alan farklı lokuslar ile bu lokusların çeşitli restriksiyon enzimleri ile oluşturdukları (lokus-enzim) kombinasyonlarından yararlanılmaktadır.

Bal arısı alttürlerinin hangi genetik soya dahil edilebileceğinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan lokuslar şu şekilde özetlenebilir;

- 1) Anonim lokus,
- 2) Sitokrom b (cyt b) lokusu,
- 3) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu,
- 4) Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu,
- 5) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası),
- 6) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge),
- 7) ATP sentaz 6 (ATPaz 6) lokusu,
- 8) ATP sentaz 8 (ATPaz 8) lokusu,
- 9) NADH dehidrogenaz 2 (ND2) lokusu ve
- 10) NADH dehidrogenaz 5 (ND5) lokusu.

Bal arısı alttürlerinin genetik soy temelinde sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan lokus-enzim kombinasyonları şunlardır;

- 1) Sitokrom b (cyt b) lokusu *Bgl*II enzim restriksiyonu,
- 2) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu *Hinc*II enzim restriksiyonu,
- 3) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu *Hinf*I enzim restriksiyonu,
- 4) Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu *Eco*RI enzim restriksiyonu,
- 5) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) *Xba*I enzim restriksiyonu ve
- 6) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) *Dra*I enzim restriksiyonu.



### 2.6.2.1 Anonim lokus

Bal arılarında anonim lokus mitokondriyel genomun neresinde yer aldığı ve görevinin ne olduğu tam olarak bilinmeyen ve bu nedenle anonim lokus olarak ifade edilen lokustur. Bu lokusun PCR ile çoğaltılması yapıldıktan sonra Afrika kökenli bal arısı alttürlerinde 1100 bp'lik PCR ürünü elde edilirken, Avrupa kökenli bal arısı alttürlerinde 850 bp'lik tek bir bant modeli elde edilmektedir. Anonim lokus bakımından tespit edilen bu farklılığa bağlı olarak Afrika ve Avrupa bal arısı alttürleri birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Hall 1992a).

### 2.6.2.2 Sitokrom b (cyt b) lokusu

Cyt b geni, ND6 ve tRNA<sup>Ser</sup> (S) genleri arasında yer alan (Şekil 2.15), yaklaşık 1149 bp'lik bir lokustur ve mitokondrinin solunumla ilgili zincirinde elektron iletiminden sorumlu genlerden biridir. Cyt b geninin yaklaşık 485 bp'lik bölgesi PCR ile çoğaltılıp, *Bgl*III restriksiyon enzimi (Çizelge 3.6) ile kesim sonucu Avrupa kökenli bal arılarında 291 ve 194 bp'lik 2 banttan oluşan bir model, Afrika orijinli bal arılarında bu kesim noktası bulunmadığından 485 bp'lik tek bir banttan oluşan bir model elde edilmektedir (Crozier *et al.* 1991).

Bir çalışmada *A. m. scutellata* bal arılarında cyt b lokusunun 485 bp'lik kesiminde *Bgl*III kesim noktasının bulunmadığı, ancak Avrupa kökenli bal arılarında bu enzimin kesim noktasının var olduğu bildirilmiştir (Crozier *et al.* 1991). Benzer bir çalışma Amerika'nın neotropik bölgelerindeki Afrikalılaştırmış bal arılarını tespit etmek amacıyla yine cyt b lokusunda *Bgl*III kesim noktası temelinde araştırılmış ve bu kesim noktasına bağlı olarak Amerika kıtasında Afrika orijinli bal arısı alttürlerin var olduğu bildirilmiştir (Pinto *et al.* 2003). Güney Brezilya ve Uruguay'daki bal arısı popülasyonlarını allozim ve mtDNA haplotipleri bakımından tanımlama çalışmasında (Diniz *et al.* 2003), Uruguay'ın kuzey bölgelerinde yüksek oranda Afrika haplotipleri tespit edilmiş ve kuzeyden güneye doğru kademeli olarak haplotiplerin değiştiği gözlenmiştir

### 2.6.2.3 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu

COI lokusu, tRNA<sup>Trp</sup> (W) ile tRNA<sup>Leu</sup> (L) lokusları arasında yer alan (Şekil 2.15) ve mitokondriyel solunum zincirinde elektron transferini kataliz eden enzimin üretiminden sorumlu yaklaşık 1560 bp uzunluğundadır. Bu lokusunun yaklaşık 1044 bp'lik bölgesinde Batı Avrupa (M soyu) kökenli bal arılarında *HincII* ve *HinfI* enzim kesim noktalarının (Çizelge 3.6) var olduğu bildirilmekte (Şekil 2.16) ve *HincII* enzimi ile kesimi sonucu Batı Avrupa kökenli bal arılarında 777 ve 267 bp'lik bant modeli elde edilirken, Doğu Avrupa kökenli bal arılarında bu kesim noktası bulunmamakta ve 1044 bp'lik tek bir bant modeli elde edilmektedir (Hall and Smith 1991).

COI lokusunda *HincII* kesim noktasının Batı Avrupa alttürlerine özgün olduğunu bildiren ilk çalışmada Afrika ve Avrupa bal arılarının birbirlerinden farklılıkları araştırılmıştır. Doğu Avrupa ve Akdeniz bal arısı alttürlerinde COI lokusunda *HincII* ve *HinfI* enzimleri bakımından kesim noktası bulunmamış ve dolayısıyla 1044 bp uzunluğunda tek bir bant elde edilmiştir (Hall and Smith 1991, Sheppard *et al.* 1994).

Yunanistan ve Güney Kıbrıs'ın farklı yörelerinden örneklenen 72 kolonide farklı lokus (16S rDNA, COI ve ND5) enzim kombinasyonları ile varyasyonun araştırıldığı bir çalışmada, COI lokusunda *NcoI*, *Sau3AI*, *FokI*, *BclI*, *SspI*, *StyI*, *BstUI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile bölgeler arasında elde edilen kesim modelleri temelinde farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir (Bouga *et al.* 2005).

Türkiye, Kuzey Kıbrıs, Etiyopya, Suriye ve Mısır'dan alınan bal arılarında, COI/*HinfI* ve Cyt b/*BgIII* lokus enzim kombinasyonları araştırılmıştır. Cyt b lokusunda Etiyopya'dan alınan örnekler hariç bütün örneklerde Avrupa kökenli bal arılarına özgü olan 2 bant modeli elde edilmiştir. Türkiye ve Kuzey Kıbrıs bal arılarının büyük bir çoğunluğunda COI lokusunda *HinfI* restriksiyon noktası tespit edilememiş, sadece Hatay'dan alınan 6 ve Kıbrıs'tan alınan 2 örnekte *A. m. lamarckii* alttürüne özgü olan COI/*HinfI* kesimi modeli elde edilmiştir. Mısır'dan alınan tüm örneklerde *A. m.*

*lamarckii* alttürüne özgü olan model elde edilirken, İran arılarının tamamında söz konusu lokusta COI/*Hinf*I kesim noktası bulunamamıştır (Kandemir *et al.* 2006b).

#### 2.6.2.4 Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu

1rRNA veya 16S rDNA lokusu, tRNA<sup>Leu</sup> (L) ile tRNA<sup>Val</sup> (V) lokusları arasında yer almakta olup yaklaşık 1371 bp uzunluğuna sahip bulunmaktadır (Şekil 2.15). 1rRNA lokusu ribozomun büyük alt biriminin sentezinden sorumludur. Şekil 2.16'de de görülebileceği gibi, 1rRNA lokusunda yer alan *Eco*RI enzim tanıma bölgesinin (Çizelge 3.6) varlığı veya yokluğundan yararlanılarak bal arısı alttürlerinin genetik soy bakımından ayrımının yapılması mümkün olmaktadır.

Doğu Avrupa ve Akdeniz bal arısı alttürleri (C) 1rRNA lokusunda tek bir kesim noktasına sahip iken, Batı Avrupa (M) ve Afrika (A) genetik soylarında belirtilen kesim noktası bulunmamaktadır. 1rRNA lokusunun 738 bp'lik bölümünün *Eco*RI enzimi ile kesilmesi sonucu C genetik soyunda yaklaşık 483 ve 251 bp'lik bant modeli oluşurken, A ve M genetik soylarında bu enzim için kesim noktası bulunmadığından 738 bp uzunluğuna tek bir bant modeli meydana gelmektedir (Hall and Smith 1991). Smith *et al.* (1997) tarafından Türkiye bal arısı popülasyonlarında yapılan çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Yunanistan ve Güney Kıbrıs'ın farklı yörelerinden örneklenen 72 kolonide farklı lokus (16S rDNA, COI ve ND5) enzim kombinasyonları ile varyasyonun araştırıldığı bir çalışmada, 16S lokusunda *Sau*3A1, *Ssp*I, *Dra*I, *Hinc*II, *Eco*RI, *Pst*I ve *Alu*I restriksiyon enzimleri ile bölgeler arasında elde edilen kesim modelleri temelinde farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir (Bouga *et al.* 2005).

16S rDNA varyasyonundan yararlanılarak Güney Amerika bal arısı popülasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile popülasyonlar arası benzerlik/farklılıklar ortaya konmuştur. Çok sayıda restriksiyon enzimi ile çalışılmış ancak *Dra*I ve *Vsp*I enzimleri ile en çok farklılığın tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca

bu çalışmada COI-COII ve 16S mtDNA genlerinin birbirleri ile sıkı bir evrimsel geçmişe sahip oldukları belirlenmiş ve 16S gen parçacığının 10 ayrı noktasında nükleotid farklılıkları belirlenmiştir (Collet *et al.* 2007).

#### 2.6.2.5 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası)

COI-COII arası bölge, bal arılarında COI-COII intergenik bölge olarak da bilinen bölgeyi de içine alan bir bölge olup, COI, tRNA<sup>Leu</sup> (L), COI-COII intergenik bölge ve COII geninin bir kısmını içermektedir (Şekil 2.15). Bu bölgenin PCR ile çoğaltımı sonucu bal arısı alttürlerinde farklı uzunluklarda PCR ürünleri elde edilmiştir. Şekil 2.16'da da görülebileceği gibi, mitokondriyel genomun 3090. pozisyonda başlayan COI-COII genleri arası bölgede COI geni içinde *XbaI* restriksiyon enzimi kesim noktasının (Çizelge 3.6) sadece Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde var olduğu ve bu enzim ile restriksiyon sonucu 649 ve 195 bp'lik 2 banttı oluşıan bir model elde edildiği bildirilmektedir (Hall and Smith 1991). Batı Avrupa (M) ve Afrika (A) alttürlerinde bu kesim noktası bulunmamaktadır. Ancak bu bölgede çeşitli uzunluklarda (70, 270, 540, 810 bp) DNA bölgelerinin fazladan olması nedeniyle bu bölgenin moleküler büyüklüğü Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde 848 bp iken Batı Avrupa ve Afrika alttürlerinde 918, 1118, 1388, 1658 bp'dir (Hall and Smith 1991).

Kostarika'da Avrupa kökenli bal arılarının bulunduğu bir bölgede Afrika arıları ile herhangi bir karışma olup olmadığını belirlemek amacıyla mitokondriyel genomda COI-COII arası bölge *XbaI* kesim noktasına bağlı olarak araştırılmıştır. Ele alınan bal arılarında COI-COII arası bölgede *XbaI* kesim noktasının var olmasından dolayı ele alınan bal arılarının Doğu Avrupa kökenli olduğu ve Afrika arıları ile herhangi bir karışma olmadığı ifade edilmiştir (Hall and McMichael 1992). Ayrıca COI-COII arası bölgede *XbaI* kesim noktasının var olmasından dolayı, Türkiye bal arılarının Doğu Avrupa ve Akdeniz (C) soyu içerisinde değerlendirildiği çalışmada, Trakya bölgesinden alınan bazı örneklerde sadece *A. m. carnica* alttürlerine özgü olduğu bildirilen (Smith and Brown 1990) COI lokusunda ikinci bir *XbaI* kesim noktası daha tespit edilmiştir (Smith *et al.* 1997).

### 2.6.2.6 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge)

COI-COII genleri arasındaki intergenik bölge, tRNA<sup>Leu</sup> (L) geni, COI-COII intergenik bölge ve COII geninin 5' ucunu içine alan yaklaşık 572 bp uzunluğunda bir bölgedir (Şekil 2.15). COI-COII intergenik bölge bal arısı alttürlerinde yüksek oranda polimorfik yapı göstermektedir. Herhangi bir gen ürünü olmayan ve mitokondriyel genomda 3363. pozisyonda başlayan COI-COII intergenik bölgede yapılan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda COI-COII intergenik bölgede A ve M soylarına ait çok sayıda haplotip belirlenmiş olmasına rağmen, C soyuna ait tek bir haplotip bulunmuştur (Garnery *et al.* 1993). Bal arısı mitokondriyel genomu ile *Drosophila* mitokondriyel genomu arasında yüksek oranda benzerlik bulunmasına rağmen, COI-COII intergenik bölgenin *Drosophila*'da herhangi bir karşılığı bulunamamaktadır. Bu bölgede *DraI* restriksiyon enzimi (Çizelge 3.6) ile kesim (Şekil 2.16) ve DNA dizi analizi verileri temelinde alttürler arasında önemli farklılıklar olduğu bildirilmektedir.

COI-COII intergenik bölgenin *DraI* enzimi ile restriksiyonu ve dizi analizi verileri temelinde alttürler arasında önemli uzunluk polimorfizmleri belirlenmiştir. 10 farklı alttürde yapılan bir çalışmada bu bölgede 19 farklı haplotip belirlenmiş ve bu haplotipler morfometri ve allozim çalışmalarıyla uyumlu olarak üç filogenetik soya (A, M ve C) dahil edilmiştir. Ayrıca türlerin dağılım merkezinin Orta Doğu olduğu ve 1 milyon yılda (Myr) % 2 evrim oranı (*divergence rate*) olduğu kabul edildiğinde 3 bal arısı soyunun evrimleşmesinin yaklaşık 1 milyon yıl önce başladığı (1 Myr BP, 1 million year before present) öne sürülmektedir (Garnery *et al.* 1992). Aynı araştırmacıların yürüttüğü bir başka çalışmada COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 12 bal arısı alttüründe 21 farklı haplotip tespit edilmiştir. C soyuna ait tüm alttürler tek bir haplotip içerisinde değerlendirilirken; A ve M soylarında 10'ar farklı haplotip belirlenmiştir (Garnery *et al.* 1993).

Güney Afrika'da 102 bal arısı kolonisinde gerçekleştirilen bir çalışmada COI-COII intergenik bölgede 4 farklı haplotip tespit edilmiş ve bu haplotiplerden birinin daha önce bildirilenlerin dışında yeni bir mitotip olduğu vurgulanmıştır. P<sub>0</sub>QQ tipi, % 76

oranında en yaygın tip olarak bulunmuştur. P<sub>0</sub>Q tipi % 26, P<sub>0</sub>QQQ tipi ise % 2 oranında tespit edilmiştir. Bu bölgede P-Q sistemine uymayan başka bir tip de % 2 frekansta bulunmuştur (Moritz *et al.* 1994).

Fas ve İspanya'dan örneklenen bal arılarının COI-COII intergenik bölgede *DraI* restriksiyon enzimi sonucu, Fas'tan alınan örneklerde 8 farklı haplotip belirlenmiş ve Fas örneklerinin tamamı Afrika (A) soyuna ait bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlara göre, Avrupa'dan 150 yıldır Fas'a arı ithaline karşın, lokal populasyonların anaya ait kalıtım gösteren mitokondriyel genomunda herhangi bir değişikliğe yol açmadığını savunmuşlardır. İspanya'dan alınan örneklerde ise 6'sı Fas örneklerinden elde edilen haplotipler ile aynı olan A soyuna ait 8 haplotip ve M soyuna ait 4 haplotip belirlenmiştir (Garnery *et al.* 1995).

Fransa-İspanya/Portekiz-Fas-Gine'den örneklenen 11 bal arısı popülasyonu, mikrosatelit ve COI-COII intergenik bölge *DraI* restriksiyon enzimi ile araştırılmıştır. Bu yörelerdeki bal arısı popülasyonlarında Afrikalılaşıma gözlenmemiş ve mikrosatelit markerleri bakımından bu popülasyonların Fransa bal arısı popülasyonlarına benzediği belirtilmiştir (Franck *et al.* 1998).

Yakın Doğu popülasyonlarında yapılan bir çalışmada COI-COII arası intergenik bölge ve mikrosatelit analizleri ile Lübnan'ın farklı bölgelerinden alınan 75 bal arısı popülasyonu araştırılmıştır. O soyu olarak ifade edilen 4. genetik soyuna ait 7 farklı haplotip belirlenmiştir. C soyu içinde ise C1, C2a ve C2b olmak üzere yeni haplotipler bildirilmiştir (Franck *et al.* 2000a). Aynı araştırmacılar tarafından İtalya'daki *A. m. ligustica* ve Sicilya'daki *A. m. sicula* alttürlerinde benzer bir çalışma yapılmıştır. Mikrosatelit analizleri sonucu bu iki alttür, C soyu olarak adlandırılan Doğu Avrupa ve Akdeniz soyu içersinde değerlendirilmiş ancak mtDNA analizleri sonucu *A. m. ligustica*'nın M ve C olarak bilinen iki Avrupa soyuna da dahil edilebileceği bildirilmiştir. Bazı *A. m. sicula* örnekleri de A soyuna ait bulunmuştur. Bu sonuçlarla bu iki alttürün melez olabileceği tezi ileri sürülmüştür (Franck *et al.* 2000b).

Kanarya Adaları'ndaki bal arısı populasyonlarının mikrosatelit ve *DraI* restriksiyon enzimi ile COI-COII intergenik bölgenin araştırıldığı bir diğer çalışmada mikrosatelit verilerine dayanarak ortalama allel sayısı ve heterozigotluk derecesi bakımından bu populasyonların düşük genetik varyasyona sahip oldukları bildirilmektedir. C soyundan bal arısı alttürlerinin Kanarya Adaları'na yoğun bir şekilde ithal edilmesine rağmen, M genetik soyuna ait mtDNA haplotipleri yüksek frekansta bulunmuştur (De La Rúa *et al.* 2001).

Afrika kıtasında 64 lokasyondan toplam 738 koloniden alınan bal arısı örneklerinde, *DraI* restriksiyon enzimi ile COI-COII intergenik bölge araştırılmıştır. A genetik soyu, Kuzey doğu bölgeleri hariç diğer bütün bölgelerde tespit edilmiştir. Kuzey-Doğu bölgelerde O ve Y olarak adlandırılan iki yeni genetik soy belirlenmiş ve bu soyların Yakın Doğu populasyonlarından köken aldığı sonucuna varılmıştır. Etiyopya ve Mısır'dan alınan bal arısı örneklerinde önemli genetik farklılıklar tespit edilmiştir. Etiyopya'dan alınan *A. m. yemenitica* örnekleri Y olarak adlandırılan yeni bir mtDNA soyuna dahil edilmiş ve bu sonuç ilk kez söz konusu çalışmada bildirilmiştir (Franck *et al.* 2001).

Kanarya Adaları'nın en büyüğü olan Tenerife'deki bal arısı populasyonlarında yapılan çalışmada 4 farklı mitokondriyel haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerden biri Afrika soyuna özgü, diğer ikisi ise Kanarya Adalarına özgün olarak bulunmuştur. Doğu Avrupa bal arısı alttürlerine özgü olan 4. haplotipin % 35 frekansta bulunmuş olması ise bu bölgede endemik *Apis mellifera* populasyonları ile diğer alttürler arasında hibridizasyonun olduğunu göstermektedir (De La Rúa *et al.* 2002). Benzer bir çalışmada *A. m. iberica* populasyonlarına ait örnekler, tRNA<sup>Leu</sup>-COII genleri arasındaki bölgede DNA dizi analizi verileri ve 6 mikrosatelit lokusu temelinde araştırılmış ve *A. m. iberica* populasyonlarında 5 tanesi A, 1 tanesi de M soyuna ait olmak üzere toplam 6 farklı haplotip bulunmuştur. Bu sonuçların *A. m. iberica* alttürünün melez olabileceği fikrini desteklediği ifade edilmektedir (De La Rúa *et al.* 2004).

Slovenya'dan alınan Karniyol arısının (*A. m. carnica*), mikrosatelit markerler ve *DraI* restriksiyon enzimi ile COI-COII intergenik bölgenin araştırıldığı bir diğer çalışmada, Karniyol arısı örnekleri, mtDNA C soyunda C2c olarak sembolize edilen yeni bir haplotipe dahil edilmiştir. Mikrosatelit lokuslarında düşük seviyede farklılık gözlenmiş ve bu durum, Karniyol arısı popülasyonlarının homojen yapısından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Sušnik *et al.* 2004).

Türkiye bal arısı popülasyonlarında COI-COII intergenik bölge bakımından yapılan çalışmalar sonucunda farklı haplotiplerin bulunduğu bildirilmektedir (Smith *et al.* 1997, Palmer 2000, Palmer *et al.* 2000, Kandemir *et al.* 2006a). Türkiye'nin 16 farklı yöresinden örneklenen bal arılarında Smith *et al.* (1997) tarafından bildirilen lokuslara ilave olarak COI-COII arası intergenik bölgede kısmi DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi ve kesim sonucu elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucu yeni bir 4. haplotipin Türkiye coğrafyasında 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 (Palmer *et al.* 2000).

Türkiye'nin 7 farklı yöresinden alınan bal arısı örneklerinde *DraI* restriksiyon enzimi ile COI-COII intergenik bölge, *TaqI* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri ile COI geni analiz edilmiştir. Ayrıca tüm mitokondriyel genomun *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edilmesi sonucu 3 farklı model elde edilmiştir. *A. m. carnica* ve *A. m. ligustica* için özgün olan mtDNA modeli % 97,9 oranında; Hatay yöresinden alınan örneklerde ise Afrika modeli %1,8 oranında bulunmuştur. Balıkesir'den alınan bir örnekte ise daha önce bildirilmemiş yeni bir model tespit edilmiştir. COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 7 haplotip elde edilmiştir. Türkiye bal arısı popülasyonlarında Tr-DraI olarak tanımlanan haplotipin en yaygın bulunan haplotip olduğu ifade edilmiştir (Kandemir *et al.* 2006a).

*Apis cerana* türü, COI-COII intergenik bölge bakımından *A. c. cerana*, *A. c. indica*, *A. c. japonica* ve *A. c. himalaya* olmak üzere 4 farklı alttüre ayrılmıştır. Filipinler'deki *A.*



*c. indica* populasyonlarında genetik varyasyonu araştırmak amacıyla yurütölen bir çalışmada, tRNA<sup>Leu</sup>-COII gen bölgəsi bakımından 4 farklı haplotip (Ce1, Ce2, Ce3 ve Ce4) belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucu tür içinde önemli varyasyonlar tespit edilmiş ve bu durumun adaların jeolojik geçmişi ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (De La Rúa *et al.* 2000).

Kore ve Filipinler'den toplanan *A. cerana* ve *A. nigrocincta* örneklerinde tRNA<sup>leu</sup> ve COII geni arasındaki bölgenin DNA dizi analizi ile araştırıldığı çalışmada 41 farklı haplotip bulunmuştur. Bu haplotiplerden 36'sı *A. cerana* ve *A. nigrocincta* populasyonlarının filogenetik analizleri için kullanılmıştır. Bu alışma sonucu *A. cerana* populasyonlarının ayırımında kullanılabilircek 5 haplotip grubu bildirilmiştir (Smith *et al.* 2000).

#### **2.6.2.7 ATP sentaz 6 ve 8 (ATPaz 6 ve ATPaz 8) lokusları**

Tayland'ın çeşitli yörelerinden örneklenen toplam 181 adet *Apis cerana* kolonisinde ATPaz 6 ve ATPaz 8 genleri arasındaki bölgede PCR-RFLP yöntemi ile genetik farklılık araştırılmıştır. Bu bölgede 33 farklı restriksiyon enzimi ile kesim ve dizi analizi ile populasyonlar arası genetik benzerlik/farklılıklar belirlenmiştir. ATPaz 6 ve ATPaz 8 lokusları arasındaki 825 bç'lik bölgenin *TaqI*, *SspI* ve *VspI* restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu 8 farklı haplotip belirlenmiş, 6 haplotip Tayland'ın kuzey ve orta bölgelerindeki örneklerde tespit edilirken, kalan 2 haplotip güney bölgelerden alınan örneklerde bulunmuştur (Songram *et al.* 2006).

#### **2.6.2.8 NADH dehidrogenaz 2 (ND2) lokusu**

ND2 ve tRNA<sup>lle</sup> genlerini içine alan mtDNA bölgesinin dizi analizi ile araştırıldığı çalışmada 14 alttürde 20 farklı haplotip belirlenmiştir ve sonuçlar bal arılarında morfometrik değerlendirmeler ile örtüşmüş ve Ruttner (1988) tarafından O soyu olarak bildirilen 4. bir genetik soyun var olduğu doğrulanmıştır. Ancak Ruttner (1988) bildirdiğinin aksine *A. m. lamarckii* alttürü O genetik soyuna dahil edilmiştir. Bu

çalışmada Orta Doğu alttürleri ile Afrika alttürleri arasında bir bağlantı tespit edilmiş ve bu bölgelerdeki alttürler aynı grupta kümelenmiştir (Arias and Sheppard 1996).

Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölge ve ayıca ND2 geninin çalışıldığı bir başka çalışmada, ND2 geninde Ankara ve Hatay'dan alınan iki örnekte dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonuçlarına dayanarak Anadolu arılarının C soyu içinde değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Kandemir *et al.* 2006a).

#### **2.6.2.9 NADH dehidrogenaz 5 (ND5) lokusu**

Yunanistan ve Güney Kıbrıs'ın farklı yörelerinden örneklenen 72 kolonide farklı lokus (16S rDNA, COI ve ND5) enzim kombinasyonları ile varyasyonun araştırıldığı bir çalışmada, ND5 lokusunda *DraI*, *TaqI*, *NlaIII*, *AluI*, *HincII*, *FokI* ve *SspI* restriksiyon enzimleri ile bölgeler arasında elde edilen kesim modelleri temelinde farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir (Bouga *et al.* 2005).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Canlı materyal ve örnekleme

Araştırmanın materyalini Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Arıcılık Ünitesi ve Türkiye Kalkınma Vakfı Arıcılık Ünitesinde (Kazan) saf olarak yetiştirilmekte olan çeşitli yörelere (Ardahan, Aydın, Antalya ve Ankara) ait bal arısı popülasyonları ile çeşitli yörelerdeki özel işletmelerden (Adana, Adıyaman, Antalya, Ardahan, Aydın, Balıkesir, Bingöl, Bursa, Hakkari, Mersin, Muş, Van vs) temin edilen 244 adet bal arısı kolonisi oluşturmaktadır. Söz konusu işletmelerden 10-20 adet ergin işçi arı örnek olarak alınmıştır (Çizelge 3.1). DNA dizi analizi toplam 39 adet bal arısı kolonisi (2'si İran arısı; *A. m. meda*: İran/Tebriz ve İran/Urmia) üzerinde yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Bal arısı örneklerinin alındığı yöreler ve örnek genişlikleri (n)

Yöre	Örnek genişliği (n)
Adana	10
Adıyaman	10
Ankara/AÜZF	15
Ankara/Kazan/TKV	15
Antalya/Elmalı	17
Ardahan	10
Aydın/Merkez	13
Aydın/Kuşadası/Davutlar	10
Aydın/Söke/Bağarası	10
Balıkesir/Merkez	10
Bingöl/Merkez	10
Bingöl/Yenibaşlar Köyü	15
Bingöl/Boncukgöze Köyü	10
Bolu/Yığılca	15
Bursa/Merkez	10
Hakkari/Geçimli Köyü	15
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü	10
Muş/Varto/Köprücük Köyü	15
Van/Çatak	11
Van/Gevaş	13
<b>Toplam</b>	<b>244</b>

### 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

Adı (Modeli)	Çalışmada Kullanım Amacı
Bidestile Saf Su Cihazı (Büchi Fontavapor 285)	DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonları için kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması
Ultra Saf Su Cihazı (Sg Ultra Clear Basic)	Tampon çözeltilerin hazırlanması için gerekli pH'nın belirlenmesi
metre	
ion 420)	
Otoklav (Hyrama)	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu
Nano Drop Spectrofotometre (ND 1000)	İzole edilen DNA örneklerinin yoğunluk ve saflık derecelerinin belirlenmesi
Çalkalayıcı Su Banyosu (Kotterman)	DNA izolasyonu
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı (Janke& Kunkel KG)	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Çalkalayıcı-Vortex (Julabo Paramix3)	Tampon çözeltilerin hazırlanması ve DNA izolasyonu
Santrifüj (NÜVE NF1215 5000 rpm)	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Mikro Santrifüj (SIGMA 1-15, 14.000 rpm)	
Mikro Santrifüj (HERMLE Z 231M, 15.000 rpm)	
Soğutmalı Santrifüj (Thermo I. M. Rf 8467 0260, 16.800 Rpm, 30.000 g)	DNA izolasyonu sırasında örneklerin bozulmadan santrifüj edilmesi
Manuel Hassas Terazi (Sartorius, 200 G)	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerinin tartılması
Dijital Hassas Terazi (Sartorius, R 200 D, 1000G)	
Gradient Thermal Cycler 96 Örneklik (Biorad)	PCR ile lokusların çoğaltılması
Thermal Cycler 25 Örneklik (Techne TC 312)	
Agaroz Jel Elektroferez Takımları (Thermo)	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin tespit edilmesi, restriksiyon sonucu elde edilen bant modellerinin jelde belirlenmesi
Güç Kaynakları (HSI 2500 DC, Bimetra P25, BioRad Model 200/2.0)	Elektroferez sistemlerinin elektrik ortamlarının sağlanması
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi (Kodak Gel Logic 200)	DNA izolasyonu, PCR ürünleri ile RFLP lokusların jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Termal Yazıcı (Sony Digital Graphic Printer Up-D895)	DNA izolasyonu, PCR ürünleri ile RFLP lokusların arşivlenmesi için baskı yapılması
Mikro Dalga Fırını (Arçelik MD 500)	Agaroz jellerin hazırlanması
UV Transilluminatör (Vilber Lourmat)	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin ön denemelerinin agaroz jel elektroferez ayrımı sırasında kontrollerinin yapılması
UV Lambası ve Gözlükleri (Mineralight Lamp UV-254/366 Nm)	
Derin Dondurucu (Rua Instruments, -80 C <sup>0</sup> )	Örnek ve çeşitli sarf malzemelerin saklanması
Derin Dondurucu (Arçelik, -25)	
Derin Dondurucu Buzdolabı (Arçelik, -25)	
Steril DNA İzolasyon Kabini (Metisafe Class II)	DNA izolasyonu ve PCR'ların yapılması
Çeker Ocak (Metisafe Class II)	Tampon çözeltilerin hazırlanması

### 3.1.3 Tampon çözeltiler

Üzerinde durulan farklı lokus-enzim kombinasyonlarının belirlenebilmesi için agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezinden yararlanılmıştır. Agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltilerin bileşimleri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.

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

Çözelti	Yoğunluk	Bileşimi		
Elektroforez/stok jel tampon çözeltisi	50 X TAE	242.0	g	Tris
		57.1	mL	Glasiyal asetik asit
		100.0	mL	0.5 M EDTA, pH 8.0
		1000.0	mL	'ye tamamlanır.
Elektroforez/jel tamponu ve yürütme tampon çözeltisi	1 X TAE	1/50	50 X TAE'den seyreltme yapılır.	
Örnek yükleme tampon çözeltisi	10 X DNA örnek yükleme tampon çözeltisi	5.0	mL	Gliserol
		2.0	mL	Bromofenol mavisi (% 5)
		1.5	mL	0.5 M EDTA
		1.5	mL	Steril bdH <sub>2</sub> O

Çizelge 3.4 Elektroforez ve poliakrilamid jellerinin hazırlanmasında kullanılan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri

Çözelti	Yoğunluk	Bileşimi		
Akrilamid-bisakrilamid stok çözeltisi	% 30	29.0	gr	Akrilamid
		1.0	gr	Bisakrilamid
		100.0	mL	'ye tamamlanır
Elektroforez/stok jel tampon çözeltisi (TBE)	10 X TBE	108.0	gr	Tris
		55.0	gr	Borik asit
		49.0	mL	0.5 M EDTA (pH 8.0)
		1000.0	L	'ye tamamlanır.
Elektroforez/jel tamponu ve yürütme tampon çözeltisi	5 X TBE	25.0	mL	10 X TBE
		25.0	mL	bdH <sub>2</sub> O ile karıştırılır.

Çizelge 3.4'ün devamı				
APS	% 10	0.1	gr	APS (Amonyum persülfat)
		1000.0	µL	'ye tamamlanır
Poliakrilamid jel tampon çözeltisi	60.0 mL	20.0	mL	Akrilamid-bisak. stok çözeltisi
		12.0	mL	5 X TBE
		1.5	mL	APS (%10)
		80.0	µL	TEMED
		28.0	mL	Steril bdH <sub>2</sub> O

### 3.2 Yöntem

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.

#### 3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

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

- 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 ezilmiştir. Daha sonra 25 µL SDS (% 20), 15 µL Proteinaz K (20 mg/mL) ve 8 µL Rnaz (10 mg/mL) ilave edilerek tüpler 58 °C'de gece boyu bekletilmiştir.
- Ertesi gün tüpler 10 dakika santrifüj (8000 rpm) edilmiş ve tüplerin üstünde kalan sıvı kısım (*süpernatant*) yeni 1.5 mL'lik tüplere alınmıştır. Tüplere 150 µL fenol + 150 µL kloroform izoamil alkol (24:1) ilave edilerek karıştırıcıda 20 dakika ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüpler 8000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant tekrar yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 300 µL kloroform izoamil alkol ilave edilerek aynı işlemler tekrarlanmıştır. Örnekler yeni tüplere alındıktan sonra 800 µL -20 °C'de bekletilmekte olan % 95'lik etanol ve 50 µL 3 M

sodyum asetat ilave edilmiştir. Örnekler -20 °C’de gece boyu ya da -80 °C’de 3-5 saat bekletilmiştir.

- c) Derin dondurucudan alınan örnekler 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, % 70 ’lik etanol ile iki kez yıkanmıştır. Bu işlemden sonra çeker ocakta tüplerin ağzı açık olarak 1 saat bekletilerek pelet kurutulmuştur. DNA peleti 100 µL TE tamponu (10:1) içinde çözdürülmüştür.

Genomik DNA izolasyonlarının miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometreden (Çizelge 3.2) yararlanılmış ve elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadığı) kontrolleri % 1’lik agaroz jelde yapılmıştır. Spektrofotometre ölçümleri sonucunda 260/280 dalga boylarında 1.8-2.0 saflık derecesi ile miktar olarak 50 ng/µL değerinin üzerinde bulunan ve ayrıca % 1’lik agaroz jellerinde tek parça olduğu tespit edilen her bir örneğe ait DNA molekülleri PCR işlemi yapılincaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2 Çalışılan mitokondriyel DNA PCR-RFLP lokusları

İstenilen nitelikte DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedeflenen mitokondriyel DNA lokuslarının çoğaltılması PCR ile gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyel genomda çalışılan lokuslar (Çizelge 3.5);

- 1) anonim lokus,
- 2) cyt b lokusu *Bgl*II enzim restriksiyonu,
- 3) COI lokusu *Hinc*II enzim restriksiyonu,
- 4) COI lokusu *Hinf*I enzim restriksiyonu,
- 5) 1rRNA lokusu *Eco*RI enzim restriksiyonu,
- 6) COI-COII arası bölge *Xba*I enzim restriksiyonu,
- 7) COI-COII intergenik bölge *Dra*I enzim restriksiyonu ve
- 8) COI-COII intergenik bölge DNA dizi analizi şeklindedir.

Bu lokuslar özgün primerler yardımıyla PCR cihazında çoğaltılmış ve yukarıda belirtilen restriksiyon enzimleri ile kesilerek analiz edilmiştir. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP lokuslarında kullanılan ileri (F, *forward*) ve ters (R, *reverse*) primer çiftleri, restriksiyon enzimleri ve yararlanılan kaynaklar Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Mitokondriyel DNA PCR-RFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon enzimleri, saflaştırıldıkları organizmalar ve restriksiyon yaptıkları özgün tanıma dizileri Çizelge 3.6’da verilmiştir (Griffiths *et al.* 1996, <http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp#2>, 2006).



Çizelge 3.5 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları, primerler, restriksiyon enzimleri ve kaynaklar

Mitokondriyel DNA lokusları	Primerler (5'→3')	Enzim	Kaynak
1) Anonim lokus Anonim lokus – F Anonim lokus – R	CAG GAG AAT TCT ATA CCA CGA CGT TAT TC GAT CAA TAT CAT TGA TGA CC	–	Hall 1992a
2) Sitokrom b (cyt b) lokusu cyt b – F cyt b – R	TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT	<i>Bgl</i> III	Crozier <i>et al.</i> 1991
3) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu COI – F COI – R	TTA AGA TCC CCA GGA TCA TG TGC AAA TAC TGC ACC TAT TG	<i>Hinc</i> II	Hall and Smith 1991
4) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu COI – F COI – R	TTA AGA TCC CCA GGA TCA TG TGC AAA TAC TGC ACC TAT TG	<i>Hinf</i> I	Sheppard <i>et al.</i> 1994
5) Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu 1rRNA – F 1rRNA – R	TTT TGT ACC TTT TGT ATC AGG GTT G CTA TAG GGT CTT ATC GTC CC	<i>Eco</i> RI	Hall and Smith 1991
7) 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>Xba</i> I	Hall and Smith 1991
8) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) COI-COII intergenik bölge -E2 COI-COII intergenik bölge -H2	GGC AGA ATA AGT GCA TTG CAA TAT CAT TGA TGA CC	<i>Dra</i> I	Garnery <i>et al.</i> 1992

Not: F, ileri primer; R, ters primer

Çizelge 3.6 Kullanılan restriksiyon enzimleri, saflaştırıldıkları organizmalar ve restriksiyon yaptıkları özgün tanıma dizileri

Enzim	Saflaştırıldıkları organizma	Özgün tanıma dizisi (5' → 3')
<i>Bgl</i> III	<i>Bacillus globigii</i>	A ↓ GATCT TCTAG ↑ A
<i>Dra</i> I	<i>Deinococcus radiophilus</i>	TTT ↓ AAA AAA ↑ TTT
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli RY 13</i>	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G
<i>Hinc</i> II	<i>Haemophilus influenzae Rc</i>	GTPy ↓ PuAC CAPu ↑ PyTG
<i>Hinf</i> I	<i>Haemophilus influenzae Rf</i>	G ↓ ANTC CTNA ↑ G
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	T ↓ CTAGA AGATC ↑ T

Her bir lokusa özgü belirlenen en uygun PCR reaksiyonu ve lokusların çoğaltılmasında kullanılan PCR programları ise, Çizelge 3.7’de verilmiştir.

PCR analizleri tamamlandıktan sonra 10 µL PCR ürünü, Çizelge 3.5’de belirtilen restriksiyon enzimleriyle kesim işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla 2–4 U restriksiyon enzimi içeren 10 µL steril deiyonize H<sub>2</sub>O’ya PCR ürünü ilave edilmiş ve bu karışım 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Elde edilen restriksiyon parçacıkları agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezinde ayrılarak, etidyum bromür ile boyanmıştır.

Çizelge 3.7 Çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları ve bu lokusların çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyonları ile programları

Mitokondriyel DNA lokusları	PCR reaksiyonları	PCR programları
1) Anonim lokus	2.5 µL 10 X PCR tamponu	95 °C 1 dk. - Ön denatürasyon
2) Sitokrom b (cyt b) lokusu	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	94 °C 1 dk.
	2.0 mM her bir dNTP	55 °C 1 dk.   35 döngü
	10.0 µM her bir primer	72 °C 3 dk.
	1.5 U Taq DNA polimeraz enzimi	72 °C 15 dk. - Son uzama
3) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu	2.5 µL 10 X PCR tamponu	95 °C 1 dk. - Ön denatürasyon
4) Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusu	2.0 mM MgCl <sub>2</sub>	94 °C 1 dk.
5) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası)	2.0 mM her bir dNTP	50 °C 2 dk.   35 döngü
	10.0 µM her bir primer	72 °C 3 dk.
	1.0 U Taq DNA polimeraz enzimi	72 °C 20 dk. - Son uzama
6) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge)	2.5 µL 10 X PCR tamponu	95 °C 1 dk. - Ön denatürasyon
	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	92 °C 45 sn.
	25.0 nM her bir dNTP	48 °C 45 sn.   30 döngü
	25.0 pM her bir primer	62 °C 2 dk.
	0.6 U Taq DNA polimeraz enzimi	72 °C 5 dk. - Son uzama

COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi dışındaki bütün lokus enzim kombinasyonları (anonim lokus, *cyt b*, COI, *1rRNA* ve COI-COII arası bölge) agaroz jel elektroforezinde çalışılmıştır. Bu amaçla PCR ürünleri % 1'lik ve restriksiyon parçacıkları % 2'lik agaroz (Prona, 091602PR) jellerinde analiz edilmiştir. Agaroz jel hazırlamak amacıyla kullanılan tampon çözeltiler ve bileşimleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. % 2.0'lik agaroz jel hazırlamak için; 2 g agaroz tartılıp, 100 mL 1XTAE tampon çözeltisi (Çizelge 3.3) ile karıştırılmıştır. Agarozun 1XTAE tampon çözeltisi içinde çözünmesi için 2-5 dk mikrodalga fırında yüksek devirde kaynatılmıştır. Kaynayan çözelti, 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 10 µL etidyum bromür (10mg/mL) ilave edilmiştir. Bu çözelti 22 kuyucuklu tarak bulunan jel tablasına dökülmüş, jel donduktan sonra tarak çıkartılarak jelin olduğu çerçeve, 1XTAE jel tampon çözeltisi ile dolu olan yatay elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir. Örnek yükleme tampon çözeltisi (Çizelge 3.3) ile karıştırılan PCR ürünleri ve restriksiyon parçacıkları kuyulara yüklenip 85 V/cm'de yaklaşık 3.0-3.5 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra görüntüleme sisteminde jeldeki örneklerin genotipleri belirlenerek fotoğrafları çekilmiştir.

COI-COII intergenik bölge PCR ile çoğaltılıp *DraI* enzimi ile kesildikten sonra elde edilen restriksiyon parçacıkları poliakrilamid jellerinde analiz edilmiştir. Türkiye bal arılarında COI-COII intergenik bölgede *DraI* enziminin 3 kesim noktası bulunmaktadır. Bu enzim ile kesim sonucu elde edilen restriksiyon parçacıkları 420, 64, 47 ve 41 bp olup, 100 bp'den düşük moleküler ağırlığa sahip bantların net bir şekilde belirlenebilmesi için poliakrilamid jellerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla % 10'luk poliakrilamid (Akriamid, Sigma A9099; Bisakrilamid Sigma M7256) jelleri hazırlanmıştır. Poliakrilamid jelleri için hazırlanan stok ve tampon çözeltilerin bileşimleri Çizelge 3.4'de verilmiştir. Çizelge 3.4'de içeriği verilen jel çözeltisi hazırlanıp dikey elektroforez ünitesinin camları arasına dökülmüş, tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerize olması beklenmiştir. Jel, gece boyu buzdolabında bekletilmiş ve ardından örnekler yüklenmiştir. Kesim parçacıkları 50 V/cm'de 3-4 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra jel, etidyum bromür çözeltisi içinde boyanmış ve görüntüleme sisteminde örneklerin genotipleri belirlenerek fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.2.3 Sitokrom Coksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII intergenik bölge) DNA dizi analizi

COI-COII intergenik bölgenin kısmi nükleotid dizisi, tRNA<sup>Leu</sup> geni, bir Q birimi ve COII geninin 5' ucunu içine alan gen bölgesini kapsamaktadır. Bu bölgenin DNA dizi analizi her bir bölgeden iki örnek olacak şekilde toplam 39 bal arısı kolonisi (2 İran arısı; *A. m. meda*: İran/Tebriz ve İran/Urmia) üzerinde yapılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.7'de verilen 2.5 µL 10XPCR tamponu, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 nM her bir dNTP, 25 pM her bir primer ve 0.6 U Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde PCR reaksiyonu hazırlanmıştır (Garnery *et al.* 1992). PCR ürünlerinin agaroz jelinde kontrolü yapıldıktan sonra, DNA dizi analizi, otomatik DNA dizi analizi sisteminde (*ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer*) Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

### 3.2.4 Populasyonlar arasındaki nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarına ait genetik uzaklıklar ve dendogram

Ele alınan herhangi bir DNA dizi analizinde gerçek veriler kullanıldığında genellikle, purin-purin ya da pirimidin-pirimidin dönüşümlerinin (*transition*) oranının purin-pirimidin ya da pirimidin-purin dönüşümlerinden (*transversion*) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle bireyler arasındaki DNA dizi farklılıklarının belirlenmesi amacıyla herhangi bir noktada meydana gelen nükleotid dönüşümlerinin (*substitution*) miktarının tahmin edilmesi esasına dayalı çeşitli modeller geliştirilmiştir. Bu araştırmada üzerinde durulan COI-COII intergenik bölge DNA dizi analizi verilerinden yararlanılarak yörelere ait populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulması amacıyla Kimura (1980) tarafından önerilen “İki-Parametre Metodu” (*Kimura's Two-Parameter Method*) kullanılmıştır (Nei and Kumar 2000).

Kimura'nın İki-Parametre Metodu, üzerinde durulan her bir nükleotid değişimlerinin miktarının (sayısının) tahmin edilmesini dikkate alan bir yöntemdir. Bu yöntemde herhangi bir nükleotide ait denge frekansı (*equilibrium frequency*) 0.25 kabul edilerek, bir yılda herhangi bir noktada meydana gelen purin-purin ya da pirimidin-pirimidin

dönüşüm oranının ( $\alpha$ ), bir yılda herhangi bir noktada meydana gelen purin-pirimidin ya da pirimidin-purin dönüşüm oranından ( $2\beta$ ) farklı olduğu varsayılmaktadır (Çizelge 3.8). Yine bu modelde bir yılda herhangi bir noktada meydana gelebilecek toplam nükleotid dönüşüm oranı ( $r$ ),  $\alpha + 2\beta$  olarak ifade edilmektedir.

Çizelge 3.8 Kimura'nın İki-Parametre Metodu modelinde nükleotid dönüşümleri

	A	T	C	G
A	-	$\beta$	$\beta$	$\alpha$
T	$\beta$	-	$\alpha$	$\beta$
C	$\beta$	$\alpha$	-	$\beta$
G	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	-

Çizelge 3.8'de verilen model kullanılarak dizi analizinde meydana gelen toplam purin-purin ya da pirimidin-pirimidin dönüşümlerinin (*transition*) oranı ( $P$ ) ve toplam pirimidin-purin dönüşümlerinin (*transversion*) oranı ( $Q$ ) ise, sırasıyla aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplanmaktadır;

$$P = (1/4) \left( 1 - 2e^{-4(\alpha+\beta)t} + e^{-8\beta t} \right)$$

$$Q = (1/2) \left( 1 - e^{-8\beta t} \right)$$

$P$  = Dizi analizinde meydana gelen toplam purin-purin ya da pirimidin-pirimidin dönüşümlerinin oranı

$Q$  = Dizi analizinde meydana gelen toplam pirimidin-purin dönüşümlerinin oranı

$\alpha$  = Bir yılda herhangi bir noktada meydana gelen purin-purin ya da pirimidin-pirimidin dönüşümlerinin oranı

$\beta$  = Bir yılda herhangi bir noktada meydana gelen purin-pirimidin ya da pirimidin-purin dönüşümlerinin oranı

$t$  = iki farklı DNA dizisinin (X ve Y) farklılığından sonra geçen süre

$e$  = 2.718

Buradan hareketle, X ve Y gibi iki farklı DNA dizisi arasındaki herhangi bir noktada meydana gelebilecek nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarı ( $d$ ) ise;

$$d = 2rt$$

$$= 2\alpha t + 4\beta t$$

$$= -(1/2)\ln(1 - 2P - Q) - (1/4)\ln(1 - 2Q) \text{ şeklinde hesaplanabilmektedir.}$$

$d$ 'nin tahmini olan  $(\hat{d})$ , gözlenen P ve Q değerlerinin yer değiştirmesi ile elde edilmektedir.

$\hat{d}$ 'nin varyansı şöyle verilmektedir;

$$V(\hat{d}) = \frac{1}{n} [c_1^2 P + c_3^2 Q - (c_1 P + c_3 Q)^2]$$

Burada;  $c_1 = \frac{1}{1-2P-Q}$ ,  $c_2 = \frac{1}{1-2Q}$ , ve  $c_3 = (c_1 + c_2)/2$

eşitliklerinden hesaplanmaktadır.

COI-COII intergenik bölge DNA dizi analizi verileri kullanılarak yörelere ait populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların ( $d$ ) ortaya konulması amacıyla, MEGA 4 bilgisayar paket programının “*Distance*” ve “*Compute Pairwise*” modüllerinden yararlanılmıştır (Tamura *et al.* 2007).

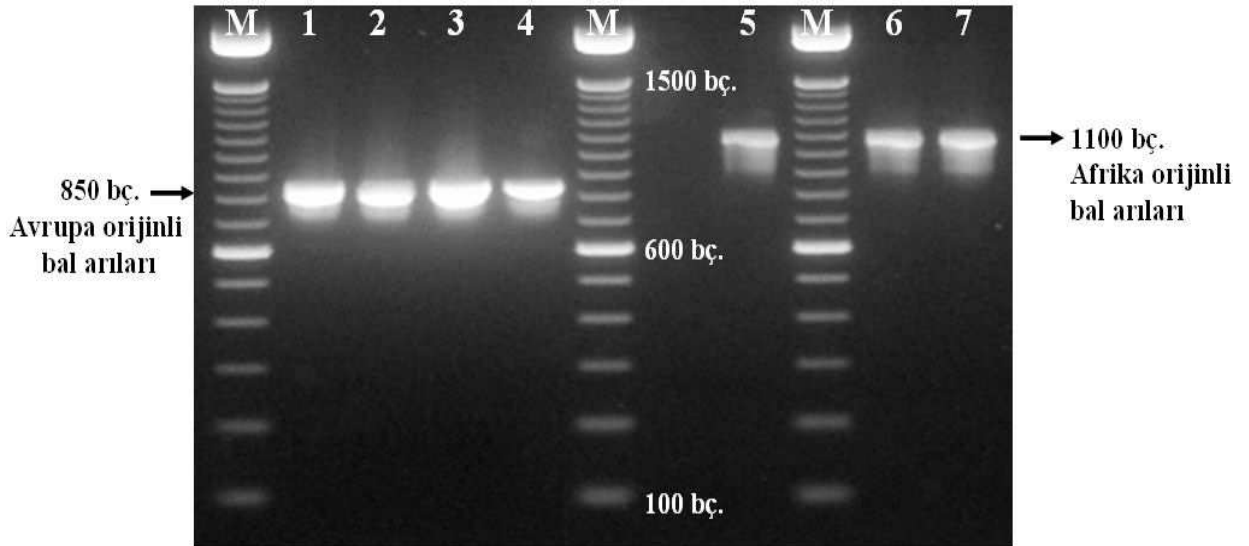
COI-COII intergenik bölge DNA dizi analizi verileri kullanılarak yörelere ait populasyonların filogenetik ilişkilerini gösteren kümeleme analizi, Kimura'nın İki-Parametre Metodu ile 1000 Bootstrap tekerrürü yapılarak hesaplanan genetik farklılıklardan ( $d$ ) yararlanılarak Komşu Birleştirme Metodu (*NJ: Neighbor Joining Method*) kullanılarak yapılmıştır. Komşu Birleştirme Metodu iki temel varsayım üzerine geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu varsayımlardan ilki, populasyonların evrim süreçlerinin farklı zamanlarda gerçekleşmiş olma olasılığıdır. İkinci varsayım ise, belirli bir zaman aralığında her bir populasyon içindeki birey sayılarının değişken olabileceğidir (Saitou and Nei 1987). Komşu Birleştirme Metodu kullanılarak populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konulması amacıyla, MEGA 4 paket programının “*Phylogeny-Bootstrap Test of Phylogeny*” ve “*Neighbor Joining*” modüllerinden yararlanılmıştır (Tamura *et al.* 2007).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırmada PCR çoğaltımına dayalı bir adet (anonim) lokus ile çeşitli lokus-enzim kombinasyonlarıyla oluşturulmuş olan 6 farklı PCR-RFLP lokusu ve bu lokuslara ilave olarak Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII intergenik bölge) DNA dizi analizi sonucunda tespit edilen farklı mutasyon noktaları üzerinde durulmuştur.

##### 4.1 Anonim Lokus

Bal arılarında mitokondriyel genomun neresinde olduğu tam olarak bilinmeyen ve bu nedenle anonim lokus olarak adlandırılan bu lokus, moleküler büyüklüğe göre Afrika ve Avrupa alttürlerinin ayırımında kullanılmaktadır (Hall 1992a). Bu amaçla anonim lokusun PCR ile çoğaltımı sonrasında agaroz jelinde elde edilen PCR ürünü 850 bç'lik tek bir bant modeli oluşturması durumunda bu arıların Avrupa orijinli, 1100 bç'lik tek bir bant modeli oluşturması durumunda ise bu arıların Afrika orijinli olduklarına karar verilmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Anonim lokus bakımından elde edilen modeller

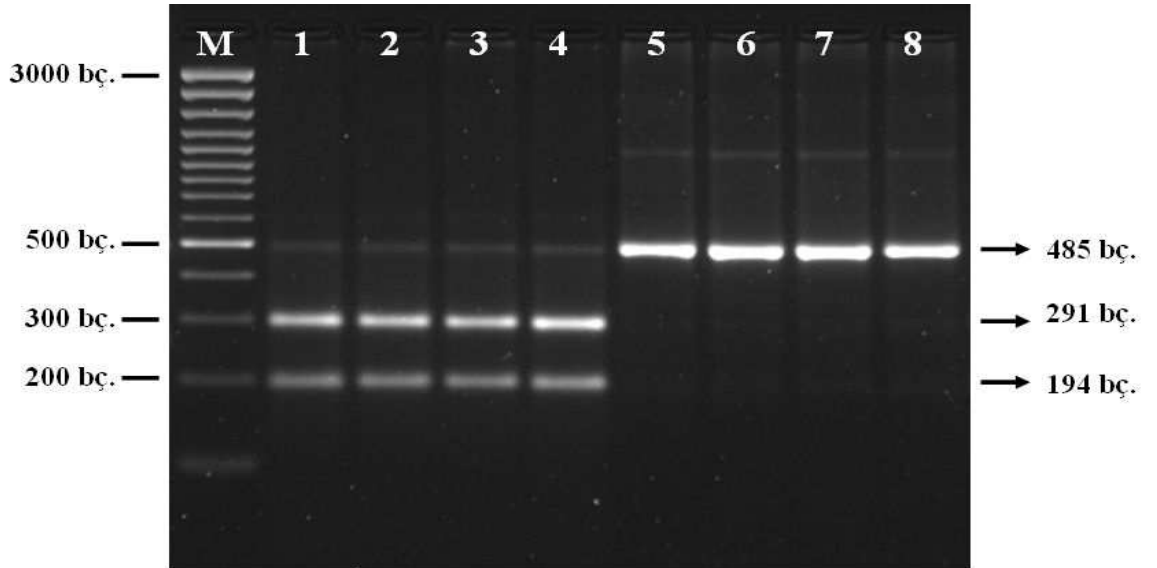
Not: M, Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder (15628-019); 1.-4. kuyularda Türkiye'nin farklı yörelerinden alınan bal arısı örnekleri; 5.-7. kuyularda referans olarak jele yüklenen Afrika orijinli bal arısı örnekleri (University of Florida, Department of Entomology and Nematology, Dr. H. Glenn Hall'dan alınmıştır)



## 4.2 Mitokondriyel DNA PCR-RFLP Lokusları

### 4.2.1 Sitokrom b (cyt b) lokusu *Bgl*III restriksiyon enzimi kombinasyonu

Cyt b lokusu, ND6 ve tRNA<sup>Ser</sup> (S) lokusları arasında yer alan (Şekil 2.15) yaklaşık 1149 bç'lik bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 485 bç'lik bölümü PCR ile çoğaltılmış ve ardından *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. *Bgl*III restriksiyon enzimi kesimi sonucu Avrupa ve Afrika orijinli bal arılarında kesim noktası temelinde farklılık belirlenmiştir. Avrupa orijinli bal arılarında cyt b lokusunda *Bgl*III kesim noktası (Çizelge 4.1) bulunurken Afrika orijinli bal arılarında bu kesim noktası bulunmamaktadır (Crozier *et al.* 1991). Buradan hareketle cyt b lokusunun *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu Avrupa orijinli bal arılarında 291 ve 194 bç'lik 2 banttıan oluşan bir model elde edilirken Afrika orijinli bal arılarında bu restriksiyon noktası bulunmadığından 485 bç'lik tek bir bant modelinin elde edildiği bildirilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan bal arısı örneklerinde Avrupa orijinli bal arıları için bildirilen ve 291 ve 194 bç'lik 2 banttıan oluşan model belirlenmiş ve restriksiyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.2).

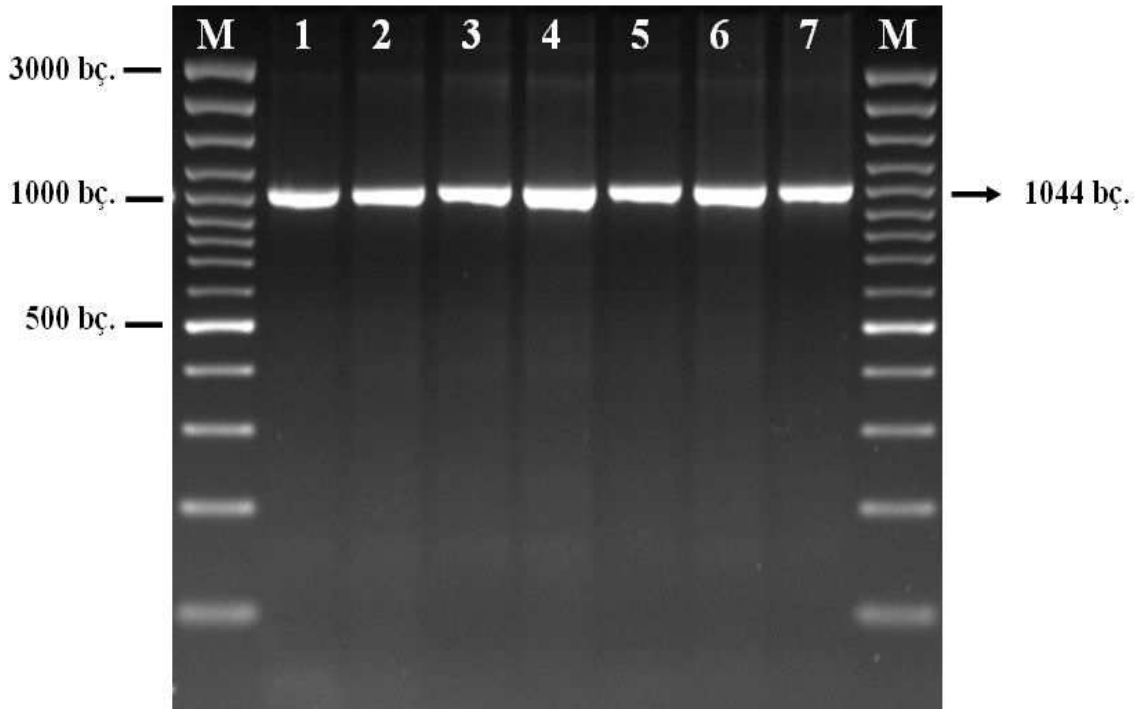


Şekil 4.2 Cyt b lokusunda *Bgl*III restriksiyon enzimi kesim modelleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (SM0321); 1-4. kuyularda Türkiye'nin farklı yörelerinden alınan bal arısı örnekleri, 5-8. kuyularda referans olarak jele yüklenen Afrika orijinli bal arısı örnekleri (University of Florida, Department of Entomology and Nematology, Dr. H. Glenn Hall'dan alınmıştır)

#### 4.2.2 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu *HincII* restriksiyon enzimi kombinasyonu

COI lokusu, tRNA<sup>Trp</sup> (W) ile tRNA<sup>Leu</sup> (L) lokusları arasında yer alan (Şekil 2.15) yaklaşık 1560 bç uzunluğunda bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 1044 bç'lik bölümü PCR ile çoğaltılmış ve ardından *HincII* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Batı Avrupa orijinli bal arılarında *HincII* restriksiyon enzimi kesim noktası (Çizelge 4.1) bulunduğundan dolayı 777 ve 267 bç'lik 2 banttı oluşarı bir modelin elde edildiği, Doğu Avrupa orijinli bal arılarında ise bu enzim kesim noktası bulunmadığından 1044 bç'lik tek bir bant modelinin (PCR ürünü) elde edildiği bildirilmektedir (Hall and Smith 1991). COI lokusunda *HincII* restriksiyon enzimi kesim noktası bulunmamış ve çalışılan tüm örneklerde tek bir bant modeli elde edilmiş ve bu sonuç % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.3).

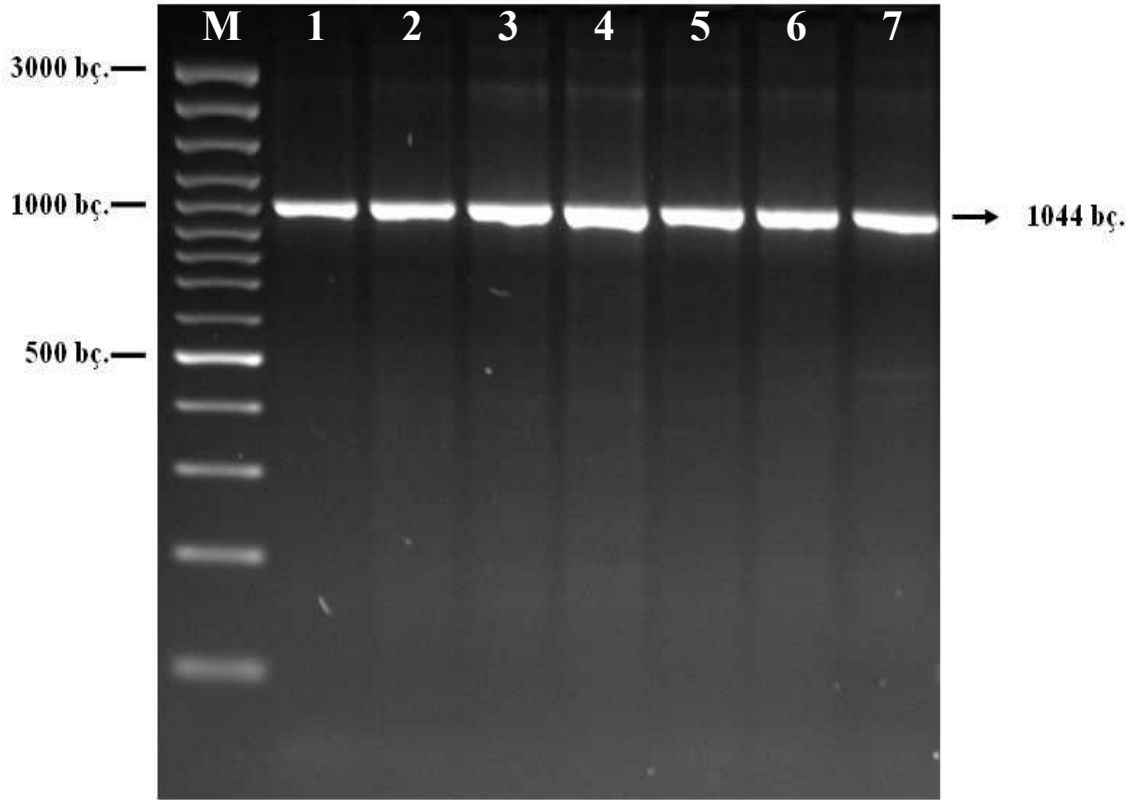


Şekil 4.3 COI lokusunda *HincII* restriksiyon enzimi kesim modelleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (SM0321); 1-7. kuyularda Türkiye'nin farklı yörelerinden alınan bal arısı örnekleri

### 4.2.3 Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu *HinfI* restriksiyon enzimi kombinasyonu

COI lokusu, tRNA<sup>Trp</sup> (W) ile tRNA<sup>Leu</sup> (L) lokusları arasında yer alan (Şekil 2.15) yaklaşık 1560 bç uzunluğunda bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 1044 bç'lik bölümü PCR ile çoğaltılmış ve ardından *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir Doğu Avrupa orijinli bal arısı alttürlerinde COI lokusunda *HinfI* restriksiyon enzimi kesim noktasının (Çizelge 4.1) bulunmadığı dolayısıyla 1044 bç'lik tek bir bant modeli elde edildiği bildirilmektedir (Sheppard *et al.* 1994). COI lokusunda *HinfI* restriksiyon enzimi kesim noktası bulunmamış ve çalışılan tüm örneklerde 1044 bç'lik tek bir bant modeli elde edilmiş ve bu sonuç % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.4).

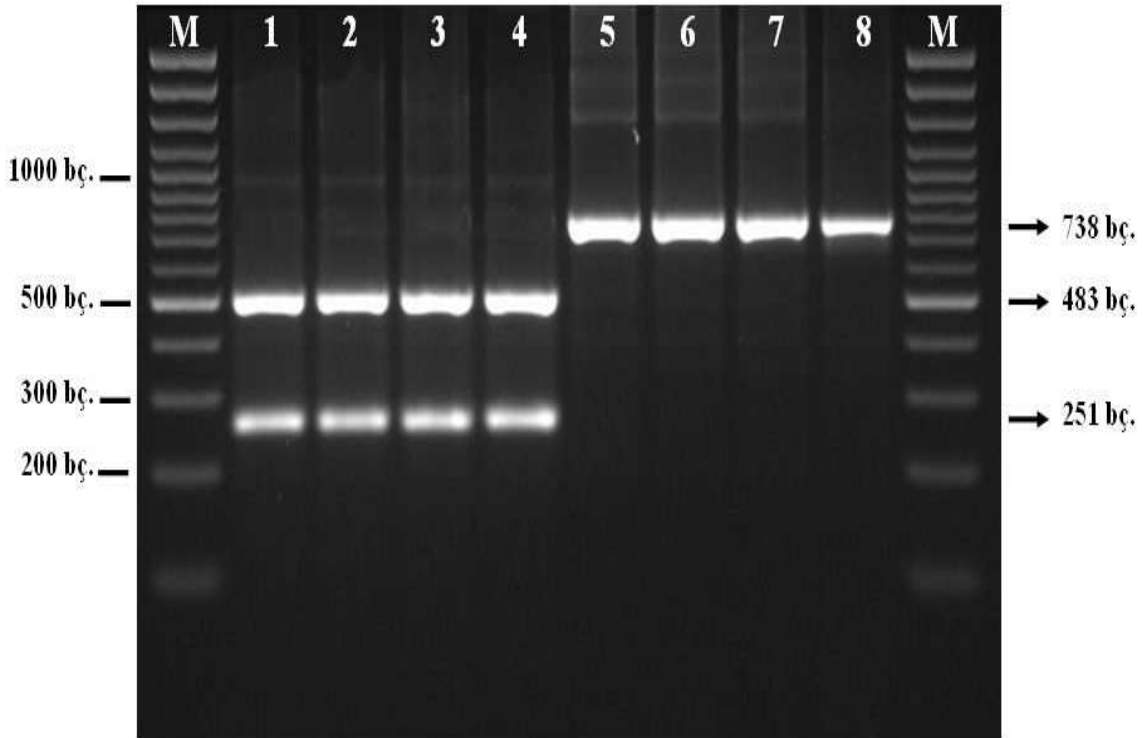


Şekil 4.4 COI lokusunda *HinfI* restriksiyon enzimi kesim modelleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (SM0321); 1-7. kuyularda Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan bal arısı örnekleri

#### 4.2.4 Ribozomun büyük alt birimi (lrRNA) lokusu *EcoRI* restriksiyon enzimi kombinasyonu

lrRNA lokusu, tRNA<sup>Leu</sup> (L) ile tRNA<sup>Val</sup> (V) lokusları arasında yer alan (Şekil 2.15) yaklaşık 1371 bç uzunluğunda bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 738 bç'lik bölümü PCR ile çoğaltılmış ve ardından *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Doğu Avrupa orijinli bal arılarında bu lokusta *EcoRI* restriksiyon enzimi kesim noktasının (Çizelge 4.1) bulunduğu ve bu enzim ile kesim sonucu 483 ve 251 bç'lik 2 banttı oluşturan bir modelin elde edildiği bildirilirken, Batı Avrupa orijinli bal arılarında bu kesim noktasının bulunmadığı ve tek bir bant modelinin (PCR ürünü) elde edildiği bildirilmektedir (Hall and Smith 1991). Çalışılan tüm örneklerde lrRNA lokusunda *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu 483 ve 251 bç'lik 2 banttı meydana gelen bir model tespit edilmiş ve bu sonuçlar % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.5).

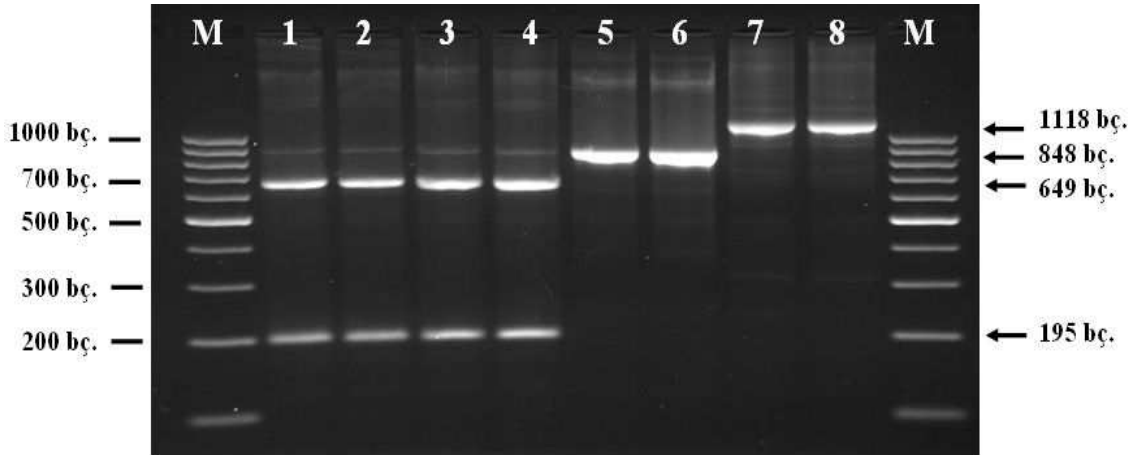


Şekil 4.5 lrRNA lokusunda *EcoRI* restriksiyon enzimi kesim modelleri ve PCR ürünleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (SM0321); 1-4. kuyularda lrRNA lokusu *EcoRI* restriksiyon enzimi kesim ürünleri, 5-8. kuyularda lrRNA lokusu PCR ürünleri

#### 4.2.5 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) *XbaI* restriksiyon enzimi kombinasyonu

COI ile COII genleri arasında yer alan (Şekil 2.15) ve daha sonraları intergenik bölge olarak adlandırılan bölgede genetik farklılığın fazla olduğu bildirilmektedir (Hall and Smith 1991, Garnery *et al.* 1993). Mitokondriyel genomda 3090. pozisyonda başlayan COI-COII genleri arası bölgede, COI geni içinde *XbaI* restriksiyon enzimi kesim noktasının (Çizelge 4.1) sadece Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde var olduğu ve bu enzim ile restriksiyon sonucu 649 ve 195 bç'lik 2 banttı oluşarı bir model elde edilmektedir. Batı Avrupa ve Afrika alttürlerinin tamamında bu kesim noktası bulunmamaktadır. Çeşitli nükleotid ilavelerinin (70, 270, 540, 810 bç) var olması nedeniyle bu bölgenin moleküler büyüklüğü Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde 848 bç iken, Batı Avrupa ve Afrika alttürlerinde 918, 1118, 1388, 1658 bç olduğu tespit edilmiştir (Hall and Smith 1991). Smith *et al.* (1997) sadece Trakya bölgesinden alınan örneklerde *A. m. carnica* alttürlerine özgü olduğu bildirilen (Smith and Brown 1990) COI lokusunda ikinci bir *XbaI* kesim noktasının var olduğunu bildirmektedir. Çalışılan tüm örneklerde COI-COII arası bölgede *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu 649 ve 195 bç'lik 2 banttı meydana gelen bir model tespit edilmiş ve bu sonuçlar % 2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 COI-COII arası *XbaI* restriksiyon enzimi kesim modelleri ve PCR ürünleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (SM0241); 1-4. kuyularda Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan bal arısı örneklerinde COI-COII lokusları arası *XbaI* enzimi restriksiyon ürünleri, 5. ve 6. kuyularda PCR ürünleri, 7. ve 8. kuyularda referans olarak jele yüklenen Afrika arı örneklerinden (University of Florida, Department of Entomology and Nematology, Dr. H. Glenn Hall'dan alınmıştır) elde edilen 1118 bç'lik PCR ve restriksiyon ürünü

Yukarıda tek tek ele alınarak açıklanan anonim lokus, *cyt b*, COI, *lrRNA*, COI-COII arası lokuslarında elde edilen modellere bağlı olarak Türkiye bal arısı popülasyonlarının hangi mitokondriyel genetik soya dahil olduğuna karar vermek için özet bir tablo yapılmış ve Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Bu lokuslar bakımından, Türkiye’nin farklı yörelerinden örneklenen bal arılarının tamamında *cyt b* lokusunda *BglIII* kesim noktası, *lrRNA* lokusunda *EcoRI* kesim noktası, COI-COII arası bölgede *XbaI* kesim noktası tespit edilirken, COI lokusunda *HincII* ve *HinfI* kesim noktası tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuçlara göre 244 adet bal arısı kolonisi ile temsil edilen Türkiye bal arısı popülasyonları Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyu (C) içerisinde değerlendirilmiştir. Bu sonuçların Smith *et al.* (1997) ve Palmer *et al.* (2000) tarafından bildirilen sonuçlar ile benzer olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1 Batı bal arısı genetik soylarını belirlemek amacıyla çalışılan mtDNA PCR-RFLP lokusları, restriksiyon enzimleri ve restriksiyon bölgelerine göre *Apis mellifera* mtDNA genetik soyları (Smith *et al.* 1997, Palmer *et al.* 2000)

Mitokondriyel DNA Lokusları	Enzim	Batı Avrupa (M)	Doğu Avrupa ve Akdeniz (C)	Afrika (A)	Türkiye Bal Arıları (C)
Sitokrom b ( <i>cyt b</i> ) lokusu (Crozier <i>et al.</i> 1991)	<i>BglIII</i>	+	+	-	+
Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu (Hall and Smith 1991)	<i>HincII</i>	+	-	-	-
Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusu (Sheppard <i>et al.</i> 1994)	<i>HinfI</i>	+	-	-	-
Ribozomun büyük alt birimi ( <i>lrRNA</i> ) lokusu (Hall and Smith 1991)	<i>EcoRI</i>	-	+	-	+
Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) (Hall and Smith 1991)	<i>XbaI</i>	-	+	-	+

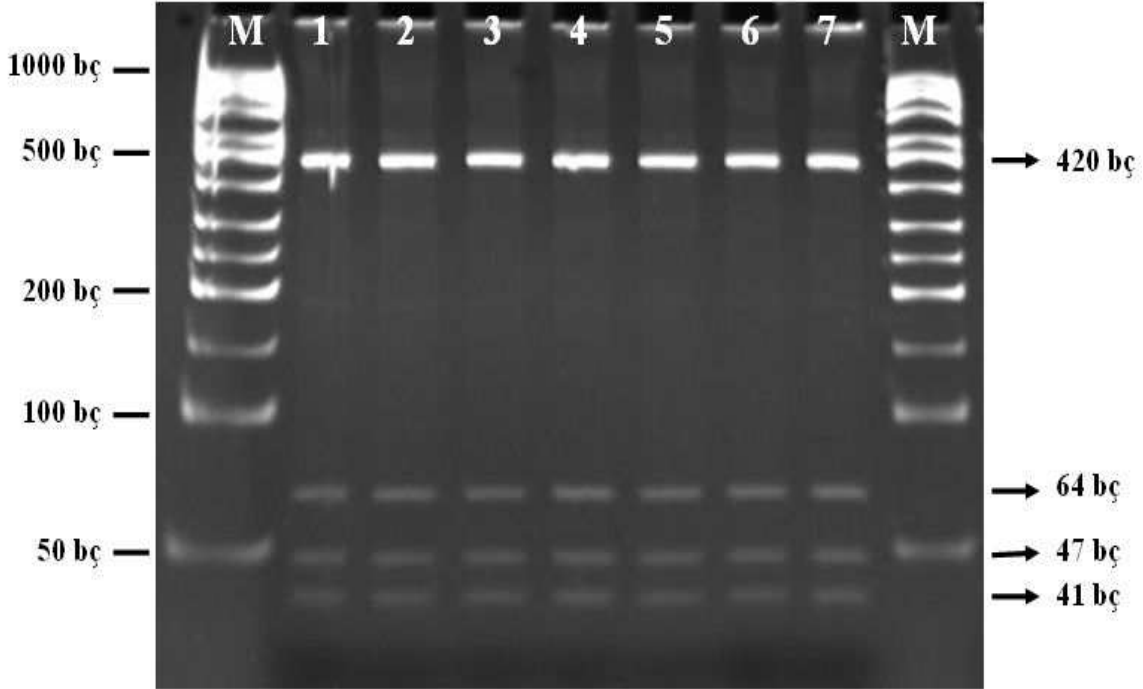
(+) işareti kesim bölgesinin olduğunu, (-) işareti kesim bölgesinin olmadığını göstermektedir.

#### 4.2.6 Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) *DraI* restriksiyon enzimi kombinasyonu

Bal arılarında COI ile COII genleri arasında yer alan (Şekil 2.15) ve daha sonraları intergenik bölge olarak adlandırılan bu bölgede genetik farklılığın fazla olduğu bildirilmektedir (Hall and Smith 1991, Garnery *et al.* 1993). COI-COII genleri arasındaki intergenik bölge, tRNA<sup>Leu</sup> geni, COI-COII intergenik bölgede bir Q birimi ve COII geninin 5' ucunu içine alan yaklaşık 572 bp uzunluğunda bir bölgedir. Herhangi bir gen ürünü olmayan ve mitokondriyel genomda 3363. pozisyonda başlayan COI-COII intergenik bölgede yapılan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda COI-COII intergenik bölgede A ve M soylarına ait çok sayıda haplotip belirlenmiş olmasına rağmen, C soyuna ait tek bir haplotip bulunmuştur (Garnery *et al.* 1993). Daha sonraları bu bölgede DNA dizi analizi çalışmaları ile de desteklenen ve bir veya birkaç nükleotid farklılığına dayanan ilave haplotipler belirlenmiştir (Franck *et al.* 2000a). COI-COII intergenik bölgenin Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde yaklaşık olarak 572 bp'lik moleküler büyüklüğe sahip olduğu bildirilmektedir. Bu bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu Doğu Avrupa bal arısı alttürlerinde 420/64/47/41 bp olmak üzere 4 banttan oluşan ve C1 olarak adlandırılan modelin elde edildiği (Şekil 4.7) dolayısıyla bu bölgede *DraI* restriksiyon enzimi için 3 farklı restriksiyon noktasının var olduğu bildirilmektedir (Garnery *et al.* 1993). 420/64/47/40 bp'lik bant modeline sahip olan ve C2 haplotipi olarak ifade edilen diğer bir haplotipin C1 haplotipinden tek bir nükleotid bakımından farklı olduğu bildirilmektedir. C1 haplotipinde 3428. pozisyonda bulunan C nükleotidi ilavesi, C2 haplotipinde bulunmamaktadır (Franck *et al.* 2000a).

Bu çalışmada, COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu Türkiye bal arılarında 5 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotipler DNA dizi analizi sonuçları ile kesin bir şekilde belirlenmiştir. Bunlardan üçü (47/41/64/420 bp; 47/40/64/420 bp ve 47/39/64/420 bp) daha önceki çalışmalarda bildirilmiş (Franck *et al.* 2000a, Kandemir *et al.* 2006a) diğer ikisi ise (47/41/64/419 bp ve 47/39/64/418 bp) daha önce bildirilmemiştir. Çalışılan tüm örneklerde *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim

sonucu literatürde C genetik soyu için bildirilen ve 4 banttıan oluşan model elde edilmiştir. COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon modelleri % 10' luk poliakrilamid jel kullanılarak elde edilmiştir (şekil 4.7).



şekil 4.7 COI-COII intergenik bölge *DraI* restriksiyon enzimi kesim modelleri

Not: M, Fermentas GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (SM0371); 1-7. kuyularda Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan bal arısı örnekleri

### 4.3 Sitokrom C Oksidaz I İle II Arasındaki İntergenik Bölge (COI-COII İntergenik Bölge) DNA Dizi Analizi

Farklı lokusları (tRNA<sup>Leu</sup> geni, COI-COII intergenik bölgede bir Q birimi ve COII geninin 5' ucu) kapsayan COI-COII intergenik bölgenin DNA dizi analizi, 2 si İran arısı (*A. m. meda*: İran/Tebriz ve İran/Urmia), 37'si de Türkiye'nin farklı yörelerinden alınan bal arısı örnekleri olmak üzere toplam 39 kolonide yapılmıştır. Dizi analizi yapılan örnekler Çizelge 4.5'de verilmiştir. *A. m. ligustica* ve *A. m. caucasica* dizileri daha önce yapılmış olan araştırmadan (Crozier *et al.* 1989, Garnery *et al.* 1992) alınmış ve DNA dizi analiz sonuçları bu diziler ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. DNA dizi analizi sonucunda, Türkiye bal arılarında farklılık olduğu bildirilen dizilere ilave olarak farklı bölgelerde yeni farklılıklar tespit edilmiştir.



Yapılan dizi analizleri sonucunda tespit edilen farklılıklar temelinde C genetik soyu kendi içinde C1, C2a, C2b, C2c ve C2d olmak üzere 5 alt gruba ayrılmıştır (Çizelge 4.2). Bu çerçevede Franck *et al.* (2000a)'da C genetik soyu C1, C2a ve C2b olmak üzere üç haplotipe ayrılmıştır. İtalya'dan alınan *A. m. ligustica* örnekleri C1, Hırvatistan'dan alınan *A. m. carnica* örnekleri C2a ve Fransa'dan alınan *A. m. caucasica* örnekleri C2b haplotipi olarak değerlendirilmiştir. Sušnik *et al.* (2004) bu gösterimi takip ederek Slovenya, Hırvatistan, Polonya ve Almanya'dan alınan bazı *A. m. carnica* örneklerini C2c ve *A. m. macedonica* örneklerini C2d haplotipi olarak değerlendirmişlerdir. C1 ve C2 haplotip grupları içerisinde değerlendirilen örnekler arasındaki tek farklılık Ek 1.'de verilen dizi analizi sonucunda Q<sub>1</sub> birimi içinde 3428. pozisyonda bulunan h dizisindeki C nükleotidinin varlığı/yokluğu ile belirlenmektedir. 3428. pozisyonda C nükleotidi ilavesi varsa (+1) C1 haplotip grubu olarak, C nükleotidi eksikliği (0) olduğu durumlarda ise C2 haplotip grubu olarak gösterim yapılmıştır (Franck *et al.* 2000a). C2 haplotip grubu de kendi içinde C2a ve C2b (Franck *et al.* 2000a) ile C2c ve C2d (Sušnik *et al.* 2004) olarak ifade edilmiştir. Bu haplotipler arasındaki nükleotid farklılıkları, Ek 1'de verilen dizi analizi sonucundan özetlenerek Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 *Apis mellifera* mtDNA C genetik soyu için bildirilen haplotipler ve nükleotid farklılıkları

	Polimorfik diziler				
	Q <sub>1</sub> birimi		Q <sub>2</sub> birimi	COII Geni	
MtDNA nükleotid numaraları (Crozier and Crozier 1993)	<b>3428</b>	<b>3467</b>	<b>3514</b>	<b>3632</b>	<b>3767</b>
Haplotip gösterimi*	<b>h</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
C1 (Franck <i>et al.</i> 2000a)	<b>C</b> CCC	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
C2a (Franck <i>et al.</i> 2000a)	<b>-</b> CCC	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
C2b (Franck <i>et al.</i> 2000a)	<b>-</b> CCC	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
C2c (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	<b>-</b> CCC	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
C2d (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	<b>-</b> CCC	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>

Not: Haplotip gösterimleri **3428(h)**, **3467(14)**, **3514(15)**, **3632(21)** ve **3767(24)**, Franck *et al.* (2000a) tarafından verilen gösterimler izlenerek yapılmıştır.

Ek 1'de verilen dizi analizi sonucunda nükleotid farklılıkları gösterilmiştir.

Literatürde bildirilen bu standart gösterimleri takip ederek Türkiye bal arılarının mitokondriyel genomunda farklı lokusları (tRNA<sup>Leu</sup> geni, Q birimi ve COII geninin 5' ucu) kapsayan COI-COII intergenik bölgede dizi analizi ile tespit edilen farklılıklar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Çalışılan örnekler için tüm dizi analizi sonuçları ise Ek 1'de verilmiştir.

Bu araştırmada Franck *et al.* (2000a) ve Sušnik *et al.* (2004) tarafından C genetik soyu içinde değerlendirilen 5 haplotipten (C1, C2a, C2b, C2c ve C2d) ikisi (C1 ve C2a) tespit edilmiştir. Bolu/Yığılca 'dan alınan bir örnek C1 haplotipi, Van/Çatak'tan alınan iki örnek ise C2a haplotipi içinde değerlendirilmiştir. Bunların dışında kalan diğer örnekler için yeni haplotipler belirlenmiştir. Buradan hareketle bu farklı haplotiplerin gösteriminde yeni bir yöntemin izlenilmesi kaçınılmaz olmuştur. Bu amaçla Franck *et al.* (2000a) ve Sušnik *et al.* (2004) tarafından yapılan standart gösterimlere bağlı kalınarak tespit edilen haplotipler yeni bir sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Buna göre Franck *et al.* (2000a) tarafından C1 olarak gösterilen haplotip ile aynı modeli gösteren haplotip C1a olarak ifade edilmiştir. Bu şekilde C1 haplotipi içinde tespit edilen diğer 6 haplotip de C1b, C1c, C1d, C1e, C1f ve C1g olarak tanımlanmıştır.

Franck *et al.* (2000a) tarafından C genetik soyu için bildirilen polimorfik bölgeler (h, 14, 15, 17, 19, 21, 24 ve 27) ve Türkiye bal arısı populasyonlarında bu çalışma ile tespit edilen yeni polimorfik bölgeler (h<sub>1</sub>, l<sub>1</sub>, 16<sub>1</sub>, 21<sub>1</sub>, 24<sub>1</sub>) bakımından toplam 11 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotiplerden 7'si C1 haplotip grubu içinde değerlendirilmiş ve Franck *et al.* (2000a)'da bildirilen C1 (C1a) haplotipi dışındaki 6 yeni haplotip (C1b, C1c, C1d, C1e, C1f ve C1g) ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Geri kalan 4 haplotip, C2 haplotip grubu içinde değerlendirilmiştir.

Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölge DNA dizi analizi yapılan toplam 37 örneğin 10'u C2 haplotip grubu içinde değerlendirilmiştir. Türkiye bal arısı populasyonlarında Franck *et al.* (2000a) tarafından bildirilen C2a ve C2b haplotiplerinden sadece C2a haplotipi belirlenmiş, Sušnik *et al.* (2004) tarafından bildirilen C2c ve C2d haplotiplerine ise rastlanılmamıştır (Çizelge 4.5). Literatürde C2

haplotip grubu içinde değerlendirilen bu haplotiplere ilave olarak bu çalışma ile C2a haplotipinden başka C2e, C2f ve C2g olarak ifade edilen haplotipler de tespit edilmiştir. Bu haplotiplerden üçü, C2a (Franck *et al.* 2000a), C2e (Kandemir *et al.* 2006a'da TrDra-1 haplotipi olarak ifade edilmiş ancak bir örnekliliğin sağlanması açısından bu çalışmada C2e haplotipi olarak gösterilmiştir.) ve C2g (Garnery *et al.* (1992) tarafından *A. m. caucasica* dizi analizi sonuçları ile birebir örtüşmektedir) daha önceki araştırmalar ile ortaya konulmuş, C2f haplotipi ise ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

COI-COII intergenik bölgede dizi analizi yapılan toplam 37 örneğin 27'si C1 haplotip grubu (3428. pozisyondaki h bölgesinde C nükleotidi ilavesi bulunmakta) içinde, 10 'u ise C2 haplotip grubu (3428. pozisyondaki h bölgesinde C nükleotidi bulunmamaktadır) içinde değerlendirilmiştir. Daha önce Franck *et al.* (2000a)'da C1a haplotipi olarak bildirilen dizi analizi sonucunda 3632. pozisyonda (21) T, 3767. pozisyonda (24) C nükleotidleri bulunmaktadır. Ancak bu çalışma ile araştırılan 37 örneğin 35 'inde C1 ya da C2 haplotip grubunda olmalarına bakılmaksızın 3632. pozisyonda T→C ve 3767. pozisyonda C→T dönüşümleri tespit edilmiştir. Sadece Bolu/Yığılca'dan alınan bir örnekte bu baz dönüşümleri tespit edilememiş ve Hakkari 'den alınan bir örnekte ise 3767. pozisyonda C nükleotidi eksilmesi olduğu belirlenmiştir.

Tespit edilen toplam 11 farklı haplotip ( C1a, C1b, C1c, C1d, C1e, C1f, C1g, C2a, C2e, C2f ve C2g ayrı ayrı ele alınarak aşağıda açıklanmıştır.

#### **4.3.1 C1a haplotipi**

C1a haplotipinde 572 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1a haplotipinde COII geni içinde 3632. pozisyonda (21) T, 3767. pozisyonda (24) C nükleotidleri bulunmaktadır. Bu model Franck *et al.* (2000a) tarafından *A. m. ligustica* için bildirilen ve C1 haplotipi olarak ifade edilen model ile örtüşmektedir. Bu nedenle, Bolu/Yığılca 'da bir örnekte tespit

edilen C1a haplotipi benzer modele sahip olan C1 genetik soyu haplotiplerinden bir tanesidir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.2 C1b haplotipi

C1b olarak tanımlanan haplotip Türkiye bal arılarında en yaygın bulunan haplotiptir. C1b haplotipinde 572 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiş ve dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1b haplotiplerinde belirlenen nükleotid farklılıkları, COII geni içinde 3632. pozisyonda (21) T→C ve 3767. pozisyonda (24) C→T şeklinde nükleotid dönüşümleri sonucunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Antalya/Elmalı, Aydın/Merkez, Aydın/Söke/Bağarası, Balıkesir/Merkez, Bolu/Yığılca, Bursa/Merkez, Mersin/Merkez/Çelebili Köyü, Muş/Varto/Köprücük Köyü, Van/Çatak ve Van/Gevaş'tan alınan toplam 15 koloninin C1b haplotipinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.3 C1c haplotipi

C1c haplotipinde 571 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/40/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiş ve bu restriksiyon uzunlukları C1 soyu içinde ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir. C1c haplotipinde 3428. pozisyonunda Q<sub>1</sub> birimi içindeki h dizisinin 14 bç'i 3' ucunda daha önce bildirilmeyen yeni bir T nükleotidi eksilmesi tespit edilmiştir. 3442. pozisyonda tespit edilen ve h<sub>1</sub> olarak ilk kez bu çalışmada gösterilen bu nükleotid eksilmesine ilave olarak, 3567. pozisyonunda da Q<sub>3</sub> birimi içindeki 16 nolu dizinin 49 bç'i 3' ucunda A→T şeklinde yeni bir nükleotid dönüşümü belirlenmiş ve bu dönüşüm 3567. pozisyonda 16<sub>1</sub> olarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Adıyaman'dan alınan 5 koloninin C1c haplotipinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.4 C1d haplotipi

C1d haplotipinde 572 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1d haplotipinde 3632. pozisyonda COII geni içinde bulunan 21 nolu dizinin 30 bç'i 3' ucunda 3662. pozisyonda T→A şeklinde nükleotid dönüşümü belirlenmiş ve bu farklılık 21<sub>1</sub> olarak gösterilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Bingöl/Yenibaşlar Köyü'nden alınan 2 koloni C1d haplotipi içinde değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.5 C1e haplotipi

C1e haplotipinde 572 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1e haplotipinde, COII geni içerisinde 3662. pozisyonda 21<sub>1</sub> nolu dizide T→C şeklinde nükleotid dönüşümü tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Aydın/Merkez'den alınan iki koloniden birinin C1e haplotipine dahil olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 4.5).

#### 4.3.6 C1f haplotipi

C1f haplotipinde 572 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1f haplotipinde iki ayrı noktada baz dönüşümleri tespit edilmiştir. Bu haplotipte Q<sub>3</sub> birimi içinde 3575. pozisyondaki 17 nolu dizide C→T ve 3587. pozisyondaki 19 nolu dizide G→A nükleotid dönüşümleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Bingöl/Merkez 'den alınan tek bir koloninin C1f haplotipine dahil olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.7 C1g haplotipi

C1g haplotipinde 571 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/41/64/419 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C1g haplotipinde Q<sub>2</sub> biriminde I dizisinin 26 bç'i 3' ucunda A nükleotidi eksilmesi tespit edilmiştir. 3522. pozisyonda I<sub>1</sub> olarak gösterilen bu dizideki eksilme sonucu *DraI* enzimi ile restriksiyon sonucu 420 bç'lik parçacık 419 bç bulunmuş ve bu kesim uzunlukları C1 soyu içinde ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Aydın/Kuşadası/Davutlar'dan alınan iki koloninin C1g haplotipine dahil olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

#### 4.3.8 C2a haplotipi

C2a haplotipinde 571 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/40/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C2a haplotipinde Q<sub>1</sub> birimi içinde 3467. pozisyonda 14 nolu dizide C→A baz dönüşümü tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Van/Çatak'dan alınan iki koloninin C2a haplotipine dahil olduğu belirlenmiş (Çizelge 4.5) ve Franck *et al.* (2000a) tarafından *A. m. carnica* alttürü için bildirilen C2a haplotipindeki dizi sırasıyla örtüştüğü tespit edilmiştir.

#### 4.3.9 C2e haplotipi

C2e haplotipi, C2 haplotip grubu içinde değerlendirilen ve ilk kez Kandemir *et al.* (2006a) tarafından bildirilen ve TrDra-1 olarak gösterilen haplotiptir. Franck *et al.* (2000a) ve Sušnik *et al.* (2004) tarafından yapılan standart gösterimlere bağlı kalınarak ve haplotip gösterimlerinin devamı niteliğinde bu haplotip C2e olarak gösterilmiştir. Türkiye bal arısı populasyonlarında tespit edilen C2e haplotipinde 570 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/39/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C2e haplotipinde C1c haplotipinde Q<sub>1</sub> birimi içinde 3442. pozisyonda tespit edilen ve h<sub>1</sub> olarak ilk kez bu

çalışmada gösterilen T nükleotidi eksilmesi söz konusu bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Hakkari 'den alınan altı koloniden beşinin C2e haplotipine dahil olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

#### **4.3.10 C2f haplotipi**

C2f haplotipinde 568 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/39/64/418 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C2 soyu içinde değerlendirilen bu restriksiyon uzunlukları ilk kez bu çalışma ile bildirilmektedir. C2f haplotipinde Q<sub>1</sub> birimi içindeki h<sub>1</sub> dizisinde T nükleotidi eksikliğine ilave olarak COII geni içinde iki ayrı nükleotid eksilmesi daha tespit edilmiştir. 3767. pozisyondaki 24 ve 3842. pozisyondaki 27 nolu dizilerde T nükleotidi eksikliği belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Hakkari/Geçimli Köyü'nden alınan bir koloni C2f haplotipi olarak değerlendirilmiştir.

#### **4.3.11 C2g haplotipi**

C2g haplotipinde 571 bç'lik bir PCR ürünü elde edilmiştir. Dizi analizi sonucunda *DraI* enzimi tanıma bölgeleri bakımından 47/40/64/420 bç'lik restriksiyon parçacıkları belirlenmiştir. C2g haplotipinde Q<sub>3</sub> birimi ve COII geni içinde iki ayrı noktada nükleotid dönüşümleri tespit edilmiştir. Bu dönüşümler, Q<sub>3</sub> bölgesinde 3567. pozisyondaki 16<sub>1</sub> dizisinde A→T ve COII geni içerisinde 3769. pozisyondaki 24<sub>1</sub> dizisinde C→T nükleotid dönüşümleridir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Ankara/Kazan/TKV 'den alınan ve *A. m. caucasica* orijinli olduğu bildirilen iki koloni C2g haplotipinde bulunmuştur (Çizelge 4.5). Bu haplotipteki nükleotid farklılıkları Garnery *et al.* (1992) tarafından *A. m. caucasica* dizi analizi sonuçları ile birebir örtüşmektedir.

Çizelge 4.3 *Apis mellifera* mtDNA C genetik soyu içinde tespit edilen COI-COII intergenik bölge haplotipleri, *Dra*I restriksiyon uzunlukları ve filogenetik analizlerde kullanılan değişken nükleotid sıraları

		Q <sub>1</sub> birimi										Q <sub>2</sub> birimi				Q <sub>3</sub> birimi						COII geni									
MtDNA nükleotid numaraları (Crozier and Crozier 1993)		3424	3428	3463	3470	3425	3442	3443	3450	3453	3467	3494	3514	3517	3522	3567	3570	3602	3575	3585	3587	3605	3632	3662	3707	3761	3767	3769	3775	3816	3842
Haplotip	<i>Dra</i> I restriksiyonları	g	h	i	j	10	h <sub>1</sub>	11	12	13	14	l	15	16	l <sub>1</sub>	16 <sub>1</sub>	m	n	17	18	19	20	21	21 <sub>1</sub>	22	23	24	24 <sub>1</sub>	25	26	27
C1a (Franck <i>et al.</i> 2000a)	572 Q (47/41/64/420)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	T	T	T	C	C	C	T	A	T
C1b (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C1c (yeni)	571 Q (47/40/64/420)	-1	+1	-1	0	T	-1	A	T	A	C	0	T	A	0	T	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C1d (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	A	T	C	T	C	T	A	T
C1e (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	C	T	C	T	C	T	A	T
C1f (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	T	C	A	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C1g (yeni)	571 Q (47/41/64/419)	-1	+1	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	-1	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C2a (Franck <i>et al.</i> 2000a)	571 Q (47/40/64/420)	-1	0	-1	0	T	0	A	T	A	A	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C2b (Franck <i>et al.</i> 2000a)	571 Q (47/40/63/421)	-1	0	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	A	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C2c (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	571 Q (47/40/64/420)	-1	0	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	T	T	T	C	C	C	T	A	T
C2d (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	571Q (47/40/64/420)	-1	0	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C2e (Kandemir <i>et al.</i> 2006a)	570 Q (47/39/64/420)	-1	0	-1	0	T	-1	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	C	T	A	T
C2f (yeni)	568 Q (47/39/64/418)	-1	0	-1	0	T	-1	A	T	A	C	0	T	A	0	A	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	-1	C	T	A	-1
C2g (Garnery <i>et al.</i> 1992))	571 Q (47/40/64/420)	-1	0	-1	0	T	0	A	T	A	C	0	T	A	0	T	0	0	C	C	G	T	C	T	T	C	T	T	T	A	T

Not: *Apis mellifera* C genetik soyu içerisinde mavi renkte yazılan 3428, 3467, 3514, 3575, 3587, 3632, 3767 ve 3842 numaralı nükleotidlerde varyasyon olduğu daha önceki çalışmalar ile bildirilmiştir (Garnery *et al.* 1992, Franck *et al.* 2000a). Kırmızı renkte yazılan 3442, 3522, 3567, 3662 ve 3769 numaralı nükleotidlerde tespit edilen farklılıklar ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur.



Çizelge 4.4 Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölge bakımından tespit edilen haplotipler ve nükleotid farklılıkları

		Q <sub>1</sub> birimi			Q <sub>2</sub> birimi		Q <sub>3</sub> birimi			COII geni				
MtDNA nükleotid numaraları (Crozier and Crozier 1993)		3428	3442	3467	3514	3522	3567	3575	3587	3632	3662	3767	3769	3842
Haplotipler	<i>Dra</i> I restriksiyonları	h	h <sub>1</sub>	14	15	1 <sub>1</sub>	16 <sub>1</sub>	17	19	21	21 <sub>1</sub>	24	24 <sub>1</sub>	27
C1a (Franck <i>et al.</i> 2000a)	572 Q (47/41/64/420)	+1	0	C	T	0	A	C	G	T	T	C	C	T
C1b (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	+1	0	C	T	0	A	C	G	C	T	T	C	T
C1c (yeni)	571 Q (47/40/64/420)	+1	-1	C	T	0	T	C	G	C	T	T	C	T
C1d (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	+1	0	C	T	0	T	C	G	C	A	T	C	T
C1e (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	+1	0	C	T	0	A	C	G	C	C	T	C	T
C1f (yeni)	572 Q (47/41/64/420)	+1	0	C	T	0	A	T	A	C	T	T	C	T
C1g (yeni)	571 Q (47/41/64/419)	+1	0	C	T	-1	A	C	G	C	T	T	C	T
C2a (Franck <i>et al.</i> 2000a)	571 Q (47/40/64/420)	0	0	A	T	0	A	C	G	C	T	T	C	T
C2b (Franck <i>et al.</i> 2000a)	571 Q (47/40/63/421)	0	0	C	A	0	A	C	G	C	T	T	C	T
C2c (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	571 Q (47/40/64/420)	0	0	C	T	0	A	C	G	T	T	C	C	T
C2d (Sušnik <i>et al.</i> 2004)	571Q (47/40/64/420)	0	0	C	T	0	A	C	G	C	T	T	C	T
C2e (Kandemir <i>et al.</i> 2006a)	570 Q (47/39/64/420)	0	-1	C	T	0	A	C	G	C	T	T	C	T
C2f (yeni)	568 Q (47/39/64/418)	0	-1	C	T	0	A	C	G	C	T	-1	C	-1
C2g (Garnery <i>et al.</i> 1992)	571 Q (47/40/64/420)	0	0	C	T	0	T	C	G	C	T	T	T	T

Not: *Apis mellifera* C genetik soyu içerisinde mavi renkte yazılan 3428, 3467, 3514, 3575, 3587, 3632, 3767 ve 3842 numaralı nükleotidlerde varyasyon olduğu daha önceki çalışmalar ile bildirilmiştir (Garnery *et al.* 1992, Franck *et al.* 2000a). Kırmızı renkte yazılan 3442, 3522, 3567, 3662 ve 3769 numaralı nükleotidlerde tespit edilen farklılıklar ilk kez bu çalışma ile ortaya konmutur.

Çizelge 4.5 Türkiye bal arısı populasyonlarında tespit edilen haplotipler ve örnek sayıları (n)

Yörelere	n	C1 haplotipleri							C2 haplotipleri			
		C1a	C1b	C1c	C1d	C1e	C1f	C1g	C2a	C2e	C2f	C2g
Ankara/Kazan/TKV	2											2
Adıyaman	5			5								
Antalya/Elmalı	2		2									
Aydın/Kuşadası/Davutlar	2							2				
Aydın/Merkez	2		1			1						
Aydın/Söke/Bağarası	2		2									
Balıkesir/Merkez	1		1									
Bingöl/Merkez	1							1				
Bingöl/Yenibaşlar Köyü	2				2							
Bolu/Yığılca	2	1	1									
Bursa/Merkez	1		1									
Hakkari/Geçimli Köyü	6								5	1		
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü	2		2									
Muş/Varto/Köprucük Köyü	2		2									
Van/Çatak	3		1						2			
Van/Gevaş	2		2									
<b>Toplam</b>	<b>37</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Not: *Apis mellifera* C genetik soyu içerisinde mavi renkte yazılan C1a, C2a, C2e ve C2g haplotipleri daha önceki çalışmalar ile bildirilmiştir (Garnery *et al.* 1992, Franck *et al.* 2000a, Sušnik *et al.* 2004, Kandemir *et al.* 2006a). Kırmızı renkte yazılan C1b, C1c, C1d, C1e, C1f, C1g ve C2f haplotipleri ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur.

#### 4.4 Populasyonlar Arasındaki Nükleotid Dönüşümlerinin Beklenen Miktarlarına Ait Genetik Uzaklıklar ve Dendogram

Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölgenin DNA dizi analizi sonucunda gözlenen nükleotid farklılıkları temelinde, Kimura'nın İki-Parametre Metodu kullanılarak populasyonlar arasında tahmin edilen nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarına ( $d$ ) ait genetik uzaklıklar genel olarak düşük (0.000-0.010) seviyede tahmin edilmiştir (Çizelge 4.6). Populasyonlar arasında tahmin edilen ortalama genetik uzaklık değeri  $0.002 \pm 0.001$  olarak hesaplanmıştır. Bu bölgenin dizi analizi sonucunda Türkiye bal arısı populasyonlarının COI-COII intergenik bölge bakımından benzer bir genetik yapıya sahip oldukları görülmektedir. Ancak bu bölge bakımından tek bir nükleotid farklılığı bir populasyonun hangi genetik soya dahil olduğunu belirleyebilecek kadar büyük bir etki meydana getirmektedir (Franck *et al.* 2000a). Bu temel düşünceden hareketle bu bölgenin dizi analizi sonucunda 11 farklı haplotip tespit edilmiştir. Genetik farklılığın bu derece düşük olmasının nedeni olarak;

- a) dizi analizi yapılan bu bölge bakımından C genetik soyu içerisinde genetik varyasyonun sınırlı olması,
- b) örnekleme yapıldığı yörelerde gezginci arıcılığın yaygın olması,
- c) materyal olarak kullanılan işçi arıların analarının sınırlı sayıdaki ana arı üreticisinden temin edilmesi ve
- d) örnekleme yapılan yörelerin izole bölgeler olmaması gösterilebilir.

Genetik uzaklık değerlerinden hareketle, standart olarak kullanılan Kafkas populasyonunun (Garnery *et al.* 1992) çalışılan Türkiye bal arısı populasyonlarından oldukça farklı bir genetik yapıda olduğu görülmektedir. Standart olarak kullanılan Kafkas arısı populasyonu ile Türkiye bal arısı populasyonları arasındaki genetik farklılıklar genel olarak 0.004-0.010 arasında değişmektedir.

Türkiye bal arısı populasyonları içinde önemli farklılığa neden olan populasyonlar Van/Çatak'tan alınan örnekler ile Ankara/Kazan/TKV'den alınan örneklerdir. Aydın/Merkez, Bingöl, Hakkari ve Van/Çatak populasyonları birbirleriyle karşılaştırıldıklarında aralarında genetik farklılıkların (0.004-0.008) olduğu

görülmektedir (Çizelge 4.6). Ancak bu durum çalışılan populasyonlarda genetik varyasyonun düşük olduğu gerçeğini değiştirecek boyutta gerçekleşmemiştir.

Türkiye bal arısı populasyonlarında COI-COII intergenik bölgenin DNA dizi analizi sonucunda gözlenen nükleotid farklılıkları temelinde, Kimura'nın İki-Parametre Metodu kullanılarak populasyonlar arasında tahmin edilen nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarına ( $d$ ) ait genetik uzaklık değerleri ile 1000 Bootstrap tekerrürü yapılarak yeniden Bootstrap genetik farklılıkları tahmin edilmiştir. Bootstrap tahminleri kullanılarak oluşturulan Komşu Birleştirme Metodu ( $NJ$ ) kümeleme analizi sonucunda çalışılan bal arısı populasyonları esas olarak 7 alt grupta sınıflandırılmıştır (Şekil 4.8).

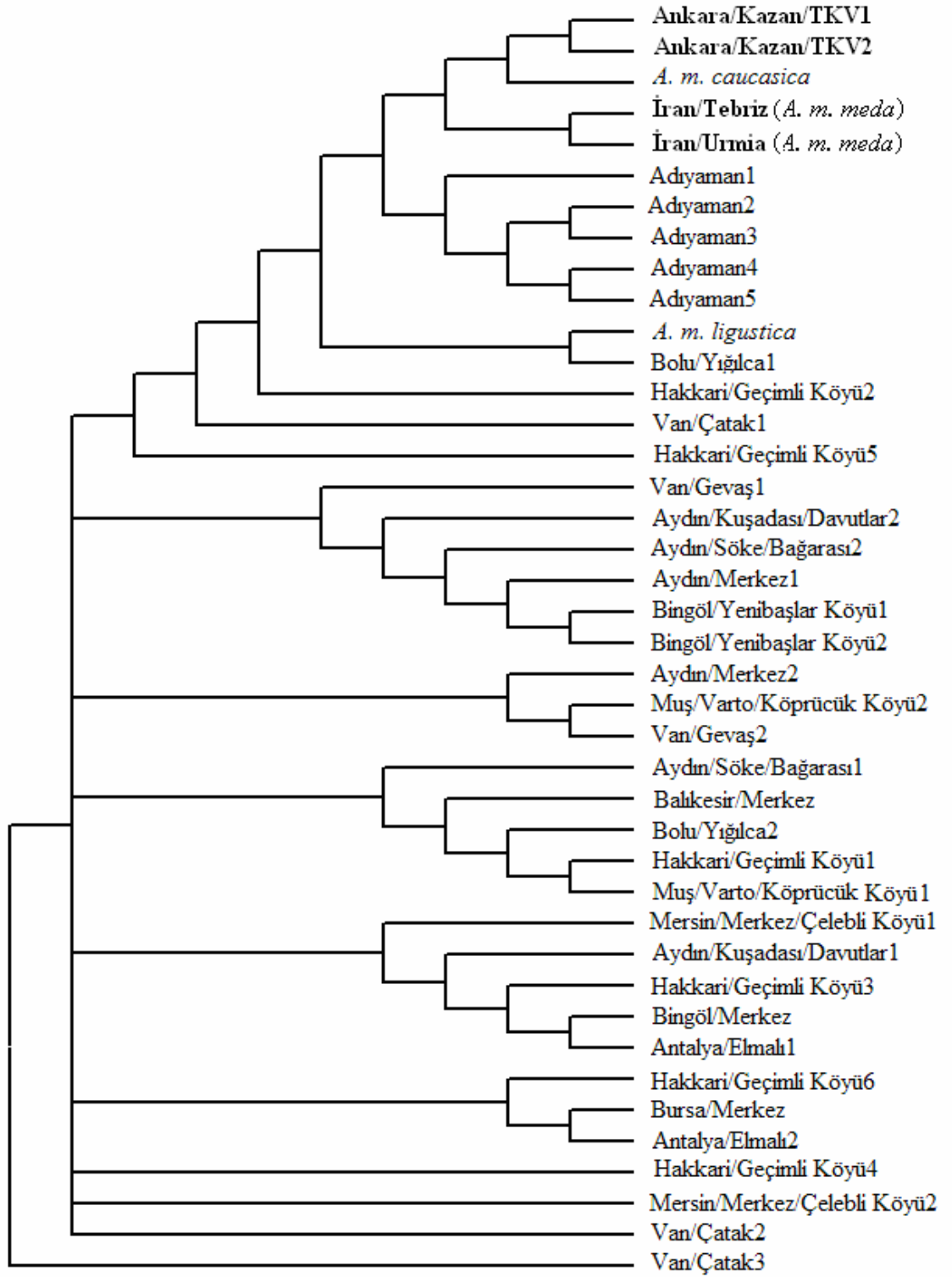
Kümeleme analizi sonucunda, genel olarak Türkiye bal arısı populasyonlarının coğrafi ırk dağılımına uygun olmayan (belirli sapmalar olmakla beraber) gruplandırmaların yapıldığı ifade edilebilir. Oluşturulan bu  $NJ$  kümeleme analizi temelinde;

- a) Ankara/Kazan/TKV'den alınan Kafkas arısı örnekleri ile standart olarak kullanılan Kafkas arısı (*A. m. caucasica*) örnekleri aynı kümede yer almıştır. Buradan hareketle, Ankara/Kazan/TKV örneklerinin standart olarak kullanılan Kafkas arısı örneğiyle benzer genetik yapıda olduğu görülmektedir.
- b) Adıyaman ilinden örneklenen 5 örneğin tamamı benzer genetik yapıda olup farklı bir kümede yer almışlardır.
- c) İran arısı (*A. m. meda*) örnekleri farklı bir küme oluşturmuşlardır. Bu küme Kafkas arısı ve Adıyaman ilinden örneklenen alt kümelerle birleşerek daha büyük bir ana kümeyi oluşturmaktadır.
- d) Ankara/Kazan/TKV, Arıcılık Ünitesi'nde saf olarak yetiştirilen ve Bolu/Yığılca arı örneğiyle, standart olarak kullanılan İtalyan arısı (*A. m. ligustica*) örneği aynı kümede yer almıştır.
- e) Bingöl/Yenibaşlar örnekleri aynı küme içerisinde yer almışlardır.
- f) Van/Çatak'tan alınan örnekler diğer populasyonlardan oldukça uzak olan iki farklı kümede yer almışlardır.

Genel olarak, bir yöreyi temsil eden arı örneklerinin aynı kümede yer alması beklenir. Bu genel düşünce Van, Hakkari, Muş, Bingöl ve Mersin örneklerinin kümelenebilir. Nitekim Van ilini temsilen alınan 5 örneğin (Van/Gevaş1, Van/Gevaş2 Van/Çatak1 Van/Çatak2, Van/Çatak2, Van/Çatak3) tamamı birbirinden oldukça farklı 5 farklı kümede yer almıştır. Benzer bir durum Hakkari/Geçimli Köyü'nden yapılan örnekleme için de geçerlidir. Hakkari/Geçimli Köyü'nden toplam 6 örneğin her birisinin farklı kümelerde yer aldığı görülmektedir. mtDNA molekülünde genetik varyasyon seviyesi çok düşük olduğu için yapılacak kümeleme analizlerinde beklenen azami faydanın elde edilmesi birçok temel faktöre bağlı bulunmaktadır. Bu faktörler esas olarak şu şekilde özetlenebilir.

- a) Uzun süre kapalı yetiştirilmenin yapıldığı çok sayıda izole bölgelerden örnekleme yapılması,
- b) Örnekleme belirli bir bölgeyi/yöreyi temsil edebilecek nitelikte olması ve
- c) Bir coğrafi bölgeyi temsil eden ve kendi içinde bir örnek olan çok sayıda bireyin DNA dizi analizinin yapılmasıdır.





Şekil 4.8 COI-COII intergenik bölge bakımından Türkiye bal arısı populasyonları arasında nükleotid dönüşümlerinin beklenen miktarlarından ( $d$ ) elde edilen dendogram

## 5. SONUÇ

Bu araştırmada, Türkiye'nin 20 farklı yoresine ait bal arılarında mitokondriyel DNA molekülü bakımından genetik yapının tanımlanması, olası yeni haplotiplerin belirlenmesi ve farklı bölgelerde yetiştirilen popülasyonlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amacıyla anonim lokus, sitokrom b (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (1rRNA), sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) ve sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) lokuslarında farklı enzim kombinasyonlarından yararlanılarak PCR, PCR-RFLP analizi ile COI-COII intergenik bölgede DNA dizi analizi yapılmıştır.

Yürütölen bu araştırma neticesinde aşağıda özetlenen sonuçlar elde edilmiştir.

- 1) Anonim lokus olarak ifade edilen lokus bakımından tüm örneklerde 850 bç'lik tek bir PCR ürününden oluşan bant modeli tespit edilmiştir (şekil 4.1).
- 2) Sitokrom b (cyt b) lokusunda *BglII* restriksiyon enzimi bakımından restriksiyon bölgesi tespit edilmiştir (şekil 4.2).
- 3) Sitokrom C oksidaz I (COI) lokusunda *HincII* ve *HinfI* restriksiyon enzimleri bakımından restriksiyon bölgeleri tespit edilmemiştir (şekil 4.3 ve 4.4).
- 4) Ribozomun büyük alt birimi (1rRNA) lokusunda *EcoRI* restriksiyon enzimi bakımından restriksiyon bölgesi tespit edilmiştir (şekil 4.5).
- 5) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölgede (COI-COII arası) *XbaI* restriksiyon enzim bakımından restriksiyon bölgesi tespit edilmiştir (şekil 4.6). Bu durum, Smith *et al.* (1997) tarafından sadece Trakya bölgesinden alınan örnekler için bildirdiği sonuçla farklılık göstermektedir. Söz konusu araştırmada sadece Trakya bölgesinden alınan örneklerde *A. m. carnica* alttürlerine özđü olduğu bildirilen COI lokusunda ikinci bir *XbaI* kesim noktasının var olduğu bildirilmektedir. Bu araştırmada çalışılan tüm yörelere ait popülasyonlarda *A. m. carnica* alttürlerine özđü olduğu bildirilen model tespit edilmemiştir.
- 6) Cyt b, COI, 1rRNA ve COI-COII arası lokusları ile farklı enzim kombinasyonları temelinde yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda Türkiye bal arısı



populasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz mtDNA genetik soyu (C) içerisinde değerlendirilebileceği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

- 7) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) *DraI* restriksiyon enzimi bakımından 3 ayrı noktada restriksiyon bölgesi tespit edilmiştir (Şekil 4.7). C genetik soyu içinde *DraI* enzimi kesimi sonucu farklı bir model elde edildiğine dair herhangi bir bulguya bugüne kadar literatürde rastlanılmamıştır. C genetik soyu içinde farklı haplotiplerin tespit edilmesi DNA dizi analizi ile mümkün olmuştur. Buna göre COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu Türkiye bal arısı populasyonlarında 5 farklı PCR-RFLP haplotipi belirlenmiştir. Bunlardan üçü (47/41/64/420 bç, C1a; 47/40/64/420 bç, C2a ve 47/39/64/420 bç, C2e) daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Franck *et al.* 2000a, Kandemir *et al.* 2006a). Diğer ikisi (47/41/64/419, C1g ve 47/39/64/418, C2f) ise ilk defa bu araştırma sonucunda belirlenmiştir.
- 8) Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgede (COI-COII intergenik bölge) yapılan DNA dizi analizi sonucunda 11 farklı haplotip tespit edilmiştir (Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5). Bu haplotiplerin 7 tanesi C1, geriye kalan 4 tanesi C2 haplotip gruplarına dahil bulunmuştur. Daha önce yapılan standart gösterimlere bağlı kalınarak C1 haplotipleri C1a, C1b, C1c, C1d, C1e, C1f ve C1g olarak, C2 haplotipleri ise C2a, C2e, C2f ve C2g olarak gösterilmiştir. C1a, C2a, C2e, ve C2g haplotipleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Geriye kalan C1b, C1c, C1d, C1e, C1f ve C1g ile C2f olmak üzere toplam 7 haplotip ilk defa bu araştırma sonucu tespit edilmiştir.
- 9) Bolu/Yığılca'dan alınan bir koloninin, Franck *et al.* (2000a) tarafından *A. m. ligustica* alttürü için bildirilen C1 olarak ifade edilen ancak bu çalışmada C1a olarak gösterilen haplotip grubuna dahil olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Bolu/Yığılca örneği ile standart olarak ele alınan *A. m. ligustica* örneğinin kümeleme analizi sonucunda bu ikisinin aynı kümede yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.8). Buradan hareketle Bolu/Yığılca örneklerinin *A. m. ligustica* ile benzer genotipte olabileceği düşünülmelidir.

- 10) Antalya/Elmalı, Aydın/Merkez, Aydın/Söke/Bağarası, Balıkesir/Merkez, Bolu/Yığılca, Bursa/Merkez, Mersin/Merkez/Çelebili Köyü, Muş/Varto/Köprücük Köyü, Van/Çatak ve Van/Gevaş'tan alınan bazı örneklerin C1b haplotipinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). C1b haplotipi Türkiye bal arılarında en yaygın (15 koloni) bulunan haplotiptir.
- 11) Adıyaman ilinden alınan tüm kolonilerde 3442. pozisyonda bir nükleotid eksilmesi tespit edilmiş ve C1c haplotipi olarak ifade edilmiştir. Adıyaman popülasyonunda tespit edilen bu farklılığı test etmek amacıyla İran'ın Batı bölgelerinden alınan iki (İran/Tebriz ve İran/Urmia) *A. m. meda* örneğinde de dizi analizi yapılmış ve aynı noktada bir nükleotid eksilmesi olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak bu nükleotid eksilmesi bulunan noktanın İran arılarına özgü olabileceği ileri sürülmekte ve Adıyaman ilinden örneklenen toplam 5 kolonide yapılan dizi analizi temelinde bu bölgedeki bal arılarının İran arısı (*A. m. meda*) olabileceği düşünülmektedir. Bu düşünce, Adıyaman'dan örneklenen tüm arı örnekleriyle İran'dan örneklenen iki arı örneğinin aynı küme içerisinde yer almasıyla da desteklenmektedir.
- 12) Van/Çatak'dan alınan iki koloni Franck *et al.* (2000a) tarafından *A. m. carnica* alttürü için bildirilen C2a haplotipinde bulunmuştur (Çizelge 4.5). Buradan hareketle Van/Çatak örneklerinin *A. m. carnica* ile benzer genotipte olabileceği düşüncesi dikkate alınmalıdır.
- 13) Türkiye bal arılarında C2b, C2c ve C2d haplotiplerine rastlanılmamıştır.
- 14) Hakkari/Geçimli Köyü'nden örneklenen arıların 6 tanesinin C2e, 1 tanesinin de C2f haplotipinde olduğu tespit edilmiştir. C2e ve C2f haplotiplerinde, Adıyaman ilinden alınan örneklerde de olduğu gibi, tüm kolonilerde 3442. pozisyonda bir nükleotid eksilmesi tespit edilmiştir. Tespit edilen bu farklılığı test etmek amacıyla İran'ın Batı bölgelerinden alınan iki (İran/Tebriz ve İran/Urmia) *A. m. meda* örneğinde de dizi analizi yapılmış ve aynı noktada bir nükleotid eksilmesi olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak bu nükleotid eksilmesi bulunan noktanın İran arılarına özgü olabileceği ileri sürülmekte ve Hakkari/Geçimli Köyü'nden örneklenen toplam 6 kolonide yapılan dizi analizi temelinde bu bölgedeki bal arılarının İran arısı (*A. m. meda*) olabileceği düşünülmektedir. C2e

haplotipi Kandemir *et al.* (2006a) tarafından Türkiye bal arısı popülasyonları için bildirilen ve TrDra-1 olarak ifade edilen haplotiple örtüşmektedir. Söz konusu araştırmada, TrDra-1 haplotipinin C genetik soyu içerisinde yeni bir haplotip olabileceği, Türkiye bal arısı popülasyonlarında yaygın olduğu ve doğudan batıya (Trakya'da %0.97) doğru gidildikçe bu haplotip frekansının arttığı ifade edilmektedir. Hakkari/Geçimli Köyü'nden örneklenen arılardan sadece bir örnekte tespit edilen C2f haplotipinde belirtilen 3442. nükleotidin eksilmesine ilave olarak, 3767. ve 3842. nükleotidlerde de eksilmeler olmuştur.

- 15) Ankara/Kazan/TKV'den alınan ve *A. m. caucasica* orijinli olduğu bildirilen iki kolonide 3567. ve 3769.'uncu noktalarda nükleotid dönüşümleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4). Bu nükleotid farklılıkları Garnery *et al.* (1992)'de verilen *A. m. caucasica* dizi analizi sonuçları ile birebir örtüşmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada C2g olarak adlandırılan haplotipin *A. m. caucasica* için özgün bir haplotip olduğu ve Garnery *et al.* (1992)'de Kafkas arısı için bildirilen dizi analizi sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuçların benzer olduğu görülmektedir. Bu sonuç Kümeleme analizi sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

Palmer *et al.* (2000) ve Kandemir *et al.* (2006a)'da Türkiye'nin Suriye sınırına yakın Hatay yöresinden örneklenen bal arılarında COI-COII intergenik bölgede yapılan DNA dizi analizi sonucu C genetik soyundan farklı yeni bir mtDNA genetik soyunun tespit edildiğini bildirmişlerdir. Palmer *et al.* (2000)'da bu bölgede çalışılan örneklerde C genetik soyunda bulunmayan P<sub>0</sub> birimi tespit edilmiş ve bu nedenle bu örneklerin 4. bir genetik soyu temsil ettiği öne sürülmüştür. Daha sonra Franck *et al.* (2000a) bu bölgenin dizi analizini Lübnan, Suriye, Mısır gibi Yakın Doğu'dan alınan örnekler üzerinde yapmışlar ve O olarak adlandırdıkları yeni mtDNA genetik soyu içinde bu örnekleri değerlendirmişlerdir. Bu yeni genetik soy morfometri çalışmaları ile desteklenmektedir. Bu çalışmada Hatay yöresinden örnekleme yapılamamıştır. Bu araştırma sonucunda, O genetik soyu içerisinde değerlendirilebilecek herhangi bir örneğe rastlanılmamıştır.

## KAYNAKLAR

- Anonymous 2006. The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443; 931-949.
- Arias, M.C. and Sheppard, W.S. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5 (3); 557-566.
- Asal, S., Kocabaş, Ş., Elmacı, C. and Yıldız, M.A. 1995. Enzyme polymorphism in honey bee (*Apis mellifera* L.) from Anatolia. *Turkish Journal of Zoology*, 19(2); 153-156.
- Attardi, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93; 93-145.
- Avice, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2<sup>nd</sup> Ed., Chapman and Hall, 684 p., New York.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67; 35-43.
- Beuzen, N.D., Stear, M.J. and Chang, K.C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary Journal*, 160; 42-52.
- Black IV, W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: Approach with care. *Insect Molecular Biology*, 2 (1); 1-6.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32; 314-331.
- Bouga, M., Harizanis, P.C., Kiliyas, G. and Alhiotis, S. 2005. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36; 335-344.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T. and Smith, M.J. 1992. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 132 (1); 21-228.
- Collet, T., Arias, M.C. and Del Lama, M.A. 2007. 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. *Apidologie*, 38; 47-54.
- Cornuet, J.-M. and Garnery, L. 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22; 627- 642.
- Cornuet, J.M., Garnery, L. and Solignac, M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 1128; 393-403.
- Crozier, R.H., Crozier, Y.C. and Mackinlay, A.G. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 6 (4); 399-411.

- Crozier, Y.C, Koulianos, S. and Crozier, R.H. 1991. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia*, 47; 968-969.
- Crozier, R.H. and Crozier, Y.C. 1992. The Cytochrome *b* and ATPase genes of honeybee mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9 (3); 474-482.
- Crozier, R.H. and Crozier, Y.C. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133; 97-117.
- De La Rúa, P., Simon, U.E., Tilde, A.C., Moritz, R.F.A. and Fuchs, S. 2000. MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines. *Heredity*, 84; 124-130.
- De La Rúa, P., Galián, J., Serrano, J. and Moritz, R.F.A. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, 10; 1733-1742.
- De La Rúa, P., Serrano, J. and Galián, J. 2002. Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridization with East European races. *Biodiversity and Conservation*, 11; 59-67.
- De La Rúa, P., Hernández-García, R., Pedersen, B.V., Galián, J. and Serrano, J. 2004. Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Archivos de Zootecnia*, 53; 195-203.
- Diniz, N.M., Soares, A.E.E., Sheppard, W.S. and Del Lama, M.A. 2003. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (1); 47-52.
- Engel, M.S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research*, 8 (2); 165-196.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52 (4); 1119-1134.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 2000a. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the near east. *Apidologie*, 31; 167-180.
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 2000b. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A.m. sicula*). *Molecular Ecology*, 9; 907-921.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M. and Cornuet, J.-M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86; 420-430.
- Garnery, L., Vautrin, D., Cornuet, J.-M. and Solignac, M. 1991. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22; 87-92.
- Garnery, L., Cornuet, J.-M. and 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. and Cornuet, J.-M. 1993. A simple test using restricted PCR amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera*. *Experientia*, 49; 1016-1021.
- Garnery, L. Mosshine, E.H., Oldroyd, B.P. and Cornuet, J.-M. 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*, 4; 465-471.
- Gençer, H.V. 1996. Orta Anadolu bal arısı (*A. m. anatoliaca*) ekotiplerinin ve bunların çeşitli melezlerinin yapısal ve davranışsal özellikleri üzerinde bir araştırma. Doktora Tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 1996. An introduction to genetic analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, p. 916, New York.
- Gürel, F. 1995. Kimi ana arı işletmelerindeki arıların (*Apis mellifera* L.) morfolojik özellikleri ve bunlardan hibrid ebeveyni hatları geliştirme olanakları. Doktora Tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 86 s. Ankara.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A. and Wilson, A.C. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352; 255-257.
- Hall, H.G. 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, H.G. and Muralidharan, K. 1989. Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature*, 339 (6221); 211-213.
- Hall, H.G. 1990. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics*, 125; 611-621.
- Hall, H.G. and Smith, D.R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88; 4548-4552.
- Hall, H.G. 1992a. DNA studies reveal processes involved in the spread of New World African honeybees. *Florida Entomologist*, 75 (1); 51-59.
- Hall, H.G. 1992b. Further characterization of nuclear DNA RFLP markers that distinguish African and European honeybees. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 19; 163-175.
- Hall, H.G. and McMichael, M.A. 1992. European honeybee (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies kept at high elevations in Costa Rica tested for African DNA markers. *Bee Science*, 2 (1); 25-32.
- Hall, H.G. 1998. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honeybees. *Biochemical Genetics*, 36; 351-361.
- Hames, B.D. and Rickwood, D. 1990. *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford University Press, 383 p., New York.
- Hoeh, W.R., Blakley, K.H. and Brown, W.M. 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science*, 251; 1488-1490.

- Kandemir, I. and Kence, A. 1995. Allozyme variability in a central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie*, 26: 503-510.
- Kandemir, I., Kence M. and Kence, A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. *Apidologie*, 31; 343-356.
- Kandemir, İ., Kence, M., Sheppard, W.S. and Kence, A. 2006a. Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 45 (1); 33-38.
- Kandemir, İ., Pinto, M.A., Meixner, M.D. and Sheppard, W.S. 2006b. *Hinf*-I digestion of cytochrome oxidase I region is not a diagnostic test for *A. m. lamarckii*. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (4); 747-749.
- Kauhausen-Keller, D., Ruttner, F. and Keller, R. 1997. Morphometric studies on the microtaxonomy of the species *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 28; 295-307.
- Kılıç, F ve Bilgen, G. 2006. İzmir ili bal arısı (*Apis mellifera* L.) populasyonlarında enzim polimorfizmi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43 (1); 75-84.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16; 111-120.
- King, R.C. and Stansfield, W.D. 1990. A dictionary of genetics. Oxford University Press. 4<sup>th</sup> Ed., 406 p., New York USA
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T, Ishiwa, H., Takahata, N., and Chigusa, S.I. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*, 126; 657-663.
- MacHugh, D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Ph.D. thesis, University of Dublin, 274 p., Dublin/İrlanda.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (2); 560-564.
- McMichael, M.A. and Hall, H.G. 1996. DNA RFLPs at a highly polymorphic locus distinguish European and African subspecies of the honey bee *Apis mellifera* L. and suggest geographical origins of New World hone bees. *Molecular Ecology*, 5; 403-416.
- McPherson, M.J. and Møller, S.G. 2001. PCR: The basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers Limited, 276 p., Oxford.
- Meixner, M.D., Sheppard, W.S. and Poklucar, J. 1993. Asymmetrical distribution of a mitochondrial DNA polymorphism between 2 introgressing honeybee subspecies. *Apidologie*, 24; 147-153.
- Meusel, M.S. and Moritz R.F.A. 1992. Mitochondrial DNA length variation in the cytochrome oxidase region of honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 23; 147-150.
- Meusel, M.S. and Moritz R.F.A. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*, 24; 539-543.

- Moritz, R.F.A., Hawkins, C.F., Crozier, R.H. and Mackinley, A.G. 1986. A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees *Experientia*, 42; 322-324.
- Moritz, R.F.A. 1994. Molecular biology of the honeybee, In: *Advances in Insect Physiology*, Vol: 25; 105-149.
- Moritz, R.F.A., Cornuet, J.M., Kryger, P., Garnery, L. and Hepburn, H.R. 1994. Mitochondrial DNA variability in South African honeybees. (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 25; 169-178.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- New England Biolabs Inc. 2007. Web Sitesi. <http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp#2>. Erişim tarihi: 21.01.2007.
- Özdil, F., Yıldız, M.A., Meydan, H. and Gençer, H.V. 2006. Genetic structure of Turkish honeybee populations based on RAPD and mtDNA RFLP markers. 2nd European Conference of Apidology, s. 53, Prag/Çek Cumhuriyeti.
- Özdil, F., Gedik, Y., Meydan, H., Yıldız, M.A. and Özkan, M.M. 2007. Molecular characterization of Turkish honeybee populations (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence data. IBRA International Conference on Recent Trends in Apicultural Science, s. 47, Mikkeli, Finlandiya.
- Palmer, M.R. 2000. The evolution and distribution of a mitochondrial VNTR in the honey bee *Apis mellifera* L. Ph.D. Thesis, 73 p., University of Kansas. USA.
- Palmer, M.R., Smith, D.R. and 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.
- Pinto, M.A., Johnston, J.S., Rubink, W.L., Coulson, R.N., Patton, J.C. and Sheppard, W.S. 2003. Identification of Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) mitochondrial DNA: Validation of a rapid polymerase chain reaction-based assay. *Annals of the Entomological Society of America*, 96 (5); 679-684.
- Rokas, A., Ladoukakis, E. and Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (8); 411-417.
- Ruttner, F., Tassencourt, L. and 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 Honeybees*. Springer-Verlag, 193 p., Berlin.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4; 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12); 5463-5467.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. Mullis, K.B. Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230;1350-1354.



- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239; 487-491.
- Sheppard, W.S. and Berlocher, S.H. 1989. Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species. *Apidologie*, 20; 419-431.
- Sheppard, W.S., Rinderer, T.E., Mazzoli, J.A., Stelzer, J.A. and Shimanuki, H. 1991. Gene flow between African and European-derived honeybee populations in Argentina. *Nature*, 349; 782-784.
- Sheppard, W.S., Arias, M.C. and Shimanuki, H. 1994. Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84; 551-554.
- Sheppard, W.S., Rinderer, T.E., Meixner, M.D., Yoo, H.R., Stelzer, J.A., Schiff, N.M., Kamel, S.M. and Krell, R. 1996. *Hinf*I variation in mitochondrial DNA of old world honey bee subspecies. *Journal of Heredity*, 87; 35-40.
- Sheppard, W.S., Arias, M.C., Grech, A. and Meixner, M.D. 1997. *Apis mellifera ruttneri*: a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, 28; 287-293.
- Sheppard, W.S. and Meixner, M.D. 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*. 34: 367-375.
- Shuster, D.E., Kehrl, M.E., Ackerman, M.R. and Gilbert, R.O. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89; 9225-9229.
- Smith, D.R. and Brown, W.M. 1988. Polymorphism in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*, 44; 257-260.
- Smith, D.R. and Brown, W.M. 1990. Restriction endonuclease cleavage site and length polymorphisms in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(1); 81-88.
- Smith, D.R., Palopoli, M.F., Taylor, B.R., Garnery, L., Cornuet, J.M., Solignac, M. and Brown, W.M. 1991. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82; 96-100.
- Smith, D.R., Slaymaker, A., Palmer, M. and Kaftanoğlu, O. 1997. Turkish honeybees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, 28 (5); 269-274.
- Smith, D.R., Villafuerte, L., Otis, G. and Palmer, M.R. 2000. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies. *Apidologie*, 31; 265-279.
- 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.

- Songram, O., Sittipraneed, S. and Klinbunga, S. 2006. Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand. *Biochemical Genetics*, 44; 265-269.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98; 503-517.
- Sušnik, S., Kozmus, P., Poklukar, J. and Meglič, V. 2004. Molecular characterization of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*, 35; 623-636.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8); 1596-1599.
- University of Minnesota Morris. 2006. Web Sitesi. <http://www.mrs.umn.edu/~goochv/CellBio/lectures/endo/endo.html> Erişim tarihi: 05.04.2006.
- Vicente, M.C. and Fulton, T. 2004. Molecular marker learning modules-Vol 1. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. International Plant Genetic Resources Institute Publications. CD-Rom.
- Vlasak, I., Burgschwaiger, S. and Kreil, G. 1987. Nucleotide sequence of the large ribosomal RNA of honeybee mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 15 (5); 2388.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M. van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21); 4407-4414.
- Warrior, R. and Gall, J. 1985. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sci. Geneve* 38: 439-445.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. 1953. A Structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171; 737-738.
- Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, AG, Johnston S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A.V., Weaver, D. and Tsutsui, N.D. 2006. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314; 642-645.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18; 6531-6535.
- Yıldız, M.A. and Asal, S. 1996. General protein (P-3) polymorphism in honey bee (*Apis mellifera* L.) from central Anatolia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 20 (5); 379-381.
- Yıldız, M.A., Özdil, F. and Gençer, H.V. 2005a. The evaluation of Turkish honeybee populations by using mitochondrial DNA PCR-RFLP markers. 39th Apimondia International Apicultural Congress, s.105, Dublin/İrlanda.
- Yıldız, M.A., Özdil, F. and Gençer, H.V. 2005b. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye bal arılarının tanımlanması. XIV Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, s. 69-73, Eskişehir.

Yıldız, M.A., Özdil, F., Meydan, H. and Gençer, H.V. 2006. Genetic variability in Turkish honeybee populations with RAPD method. 2<sup>nd</sup> European Conference of Apidology, s. Proceedings Supplement, Prag/Çek Cumhuriyeti.

Zabeau, M. and Vos, P. 1993. European Patent Publication 92402629 (Publication No. EP0534858A1)



Ek 1'in devamı

	--- Q <sub>1</sub> bölgesi ---*											--- Q <sub>2</sub> bölgesi ---														
	3463	3467	3470									3494			3514	3517	3522									
	i	14	j									1			15	16	1 <sub>1</sub>									
<i>A. m. ligustica</i>	ATT	AAT	AAC	AAT	TTT	TAA	TAA	AAT	AAA	TAA	TTA	ATT	TTA	TTT	TTA	TAT	TGA	ATT	TTA	AAT	TCA	ATC	TTA	AAG	ATT	TAA
<i>A. m. caucasica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Tebriz	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Urmia	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Balıkesir/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bursa/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Ek 1'in devamı

Q<sub>2</sub> bölgesi \*

Q<sub>3</sub> bölgesi

	3567										3570		3575			3585				3587		3602			3605	
	TCT	TTT	TAT	TAA	AAT	TAA	TAA	ATT	AAT	ATA	16 <sub>1</sub>	m	17	AAA	ATA	TAA	CAG	AAT	ATA	TTT	ATT	AAA	ATT	TAA	TTT	ATT
<i>A. m. ligustica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>A. m. caucasica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Tebriz	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Urmia	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Balıkesir/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bursa/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T		T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

## Ek 1'in devamı

## Q3-\* 5'-COII geni

	3632												3662													
	21												21 <sub>1</sub>													
	AAA	ATT	TCC	ACA	TGA	TTT	ATA	TTT	ATA	TTT	CAA	GAA	TCA	AAT	TCA	TAT	TAT	GCT	GAT	AAT	TTA	ATT	TCA	TTT	CAT	AAT
<i>A. m. ligustica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>A. m. caucasica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Tebriz	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Urmia	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman3	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman4	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman5	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Balıkesir/Merkez	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Merkez	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bursa/Merkez	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü3	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü4	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü5	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü6	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak1	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak2	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak3	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...







## Ek 1'in devamı

## 3'-COII geni

	TTT	CCA	TCA	TTA	AAA	ATT	TTA	TAT	TTA	ATT	GAT	GAA	ATT	GTA	AAT	CC
<i>A. m. ligustica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<i>A. m. caucasica</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Tebriz	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
İran/Urmia	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Adıyaman5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Merkez2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Söke/Bağarası2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Aydın/Kuşadası/Davutlar2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Balıkesir/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bingöl/Yenibaşlar Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bolu/Yığılca2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Bursa/Merkez	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Antalya/Elmalı2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Hakkari/Geçimli Köyü6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ankara/Kazan/TKV2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mersin/Merkez/Çelebili Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muş/Varto/Köprücük Köyü2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Gevaş2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Van/Çatak3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölgenin (COI-COII intergenik bölge) kısmi nükleotid dizilimi

Bu bölge tRNA<sup>Leu</sup> geni, bir Q birimi ve COII geninin 5' ucunu içine alan bölgedir. *A. m. ligustica* ve *A. m. caucasica* dizileri literatürden alınmıştır (Garnery *et al.* 1992). Varyasyon olan baz dönüşümü bölgeleri 1-27, insersiyon (+) / delesyonlar (-), a-n olarak Franck *et al.* (2000a) 'da bildirildiği gösterim şeklinde yapılmıştır. Bu çalışma ile ilk kez belirlenen nükleotid farklılıkları **h1, 11, 16<sub>1</sub>, 21<sub>1</sub>, 24<sub>1</sub>** olarak Franck *et al.* (2000a) 'daki gösterimin devamı şeklinde yapılmıştır. *Dra*I kesim bölgesi (**TTTAAA**) kırmızı ile varyasyon olan nükleotidler sarı ile gösterilmiştir.

## ÖZGEÇMİŞ

---

<b>Adı Soyadı:</b>	Fulya ÖZDİL
<b>Doğum Tarihi ve Yeri:</b>	21 / 05 / 1976 Bandırma
<b>Uyruğu:</b>	Türkiye Cumhuriyeti
<b>Medeni Hali:</b>	Evli
<b>Yabancı Dil:</b>	İngilizce (KPDS B – 80; UDS – 77,5)
<b>Adres:</b>	Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Biyometri ve Genetik ABD. Konya
<b>Telefon:</b>	(332) 2232987
<b>Faks:</b>	(332) 2410108
<b>Elektronik Posta:</b>	fulyaozdil@selcuk.edu.tr

---

## EĞİTİM DURUMU

---

<b>Lise:</b>	K.E.V. Anadolu Lisesi	1991-1994
<b>Lisans:</b>	Ege Üniv., Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü	1995-1999
<b>Yüksek Lisans:</b>	Ankara Üniv., Fen Bil. Enst., Zootečni ABD.	2000-2003

---

## ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

---

<b>GÖREV DÖNEMİ</b>	<b>UNVAN</b>	<b>BÖLÜM</b>	<b>ÜNİVERSİTE</b>
2007 – devam ediyor	Uzman	Ziraat Fakültesi	Selçuk Üniversitesi
2001 – 2007	Araş. Gör.	Ziraat Fakültesi	Ankara Üniversitesi
Eylül 2003–Mart 2004	Konuk Araştırmacı	College of Agricultural and Life Sciences	Florida Üniversitesi, ABD
Haziran – Ekim 1998	IASTE Değişim Programı Öğrencisi	Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology	Justus Liebig Üniversitesi, ALMANYA

---

## PROJELER

Destekleyen Kuruluş	Proje Adı ve Kodu	Yılı
TUBITAK	Çeşitli Bal Arısı ( <i>Apis mellifera</i> L.) Populasyonlarında RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Polimorfizmi (VHAG-2046). Yardımcı Araştırmacı	01/04/2004- 01/04/2006
DPT	Türkiye Bal Arısı Populasyonlarının Mitokondriyel ve Çekirdek DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği ile Tanımlanarak Gen Kaynaklarını Koruma Stratejilerinin Oluşturulması (2003K12019015-5). Yardımcı Araştırmacı	01/01/2005- 01/01/2008
TUBITAK	Denizli ve Gerze Tavuk Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Bazı Mikrosatelit Markörler Kullanılarak Belirlenmesi (TOVAG-1050446). Yardımcı Araştırmacı	01/05/2006- 01/11/2007

## FAALİYETLER, KURLAR VE ÖDÜLLER

05-08 Eylül 2007, **5. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi**, Van. Sözlü Bildiri Sunumu.

10-14 Haziran 2007, **IBRA International Conference on recent trends in Apicultural Science**, Mikkeli/Finlandiya. Sözlü Bildiri ve poster sunumu.

17-20 Eylül 2006, **57<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production**, Antalya. Sözlü bildiri sunumu.

17-20 Eylül 2006, **57<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production** toplantısına katılım için Ank. Üniv. Bilimsel Yayınları Özendirme Desteği.

10-14 Eylül 2006, **2<sup>nd</sup> European Conference of Apidology**, Prag/Çek Cumhuriyeti. Sözlü bildiri ve poster sunumu.

21-26 Ağustos 2005, **39<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress**. Dublin/İrlanda. Poster sunumu.

01 Eylül 2003-01 Nisan 2004, **University of Florida, College of Agricultural and Life Sciences Molecular Genetics**, Florida/ABD. Konuk Araştırmacı.

2003 “**Art of Leadership Conference**” University of Florida, Florida/ABD Eğitim bilimleri ile ilgili kurs.

2002 **Rekombinant Antikor Üretiminde Faj Görüntüleme (Phage Display) Teknolojisi** TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gebze/Türkiye. Moleküler teknikler ile ilgili kurs.

1 Haziran-1 Ekim 1998. **Justus Liebig University, Institute of Animal Nutrition and Nutritional Physiology**, Giessen/Almanya. IASTE değişim programı, yaz stajı.

## YAYINLARI

### Uluslararası Bildiriler

- ÖZDİL, F.\***, GEDİK, Y., MEYDAN, H., YILDIZ, M.A. and ÖZKAN, M.M. 2007. Molecular characterization of Turkish honeybee populations (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence data. IBRA International Conference on Recent Trends in Apicultural Science, Mikkeli, Finlandiya. 10-14 Haziran. Sözlü Bildiri. Sf.47.
- GEDİK, Y., FAKHRİ, B., KHOEİ, A.N., MEYDAN, H., **ÖZDİL, F.** and YILDIZ, M.A. 2007. Molecular characterization of *A. m. meda* populations from the west part of Iran. IBRA International Conference on Recent Trends in Apicultural Science, Mikkeli, Finlandiya. 10-14 Haziran. Poster. Sf. 123.
- ÖZDİL, F.\***, YILDIZ, M.A., MEYDAN, H. and GENÇER, H.V. 2006. Genetic structure of Turkish honeybee populations based on RAPD and mtDNA RFLP markers. 2<sup>nd</sup> European Conference of Apidology, Prag / Çek Cumhuriyeti. 10-14 Eylül. Sözlü Bildiri. Sf. 53.
- YILDIZ, M.A., **ÖZDİL, F.**, MEYDAN, H. ve GENÇER, H.V. 2006. Genetic variability in Turkish honeybee populations with RAPD method. 2<sup>nd</sup> European Conference of Apidology, Prag / Çek Cumhuriyeti. 10-14 Eylül. Poster 6.08, Sf. Proceedings Supp.
- MEYDAN, H., **ÖZDİL, F.\*** ve YILDIZ, M.A. 2006. Identification of BLAD and DUMPS as genetic disorders using PCR – RFLP in Holstein bulls reared in Turkey. 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Antalya. 17-20 Eylül. Sözlü Bildiri. Sf. 27.
- YILDIZ, M.A., **ÖZDİL, F.** ve GENÇER, H.V. 2005. The evaluation of Turkish honeybee populations by using mitochondrial DNA PCR–RFLP markers. 39<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress, Dublin / İrlanda. 21-26 Ağustos. Poster 260, Sf. 105.

### Ulusal Bildiriler

- ÖZDİL, F.\***, MEYDAN, H., GEDİK, Y. ve YILDIZ, M.A. 2007. MtDNA'da PCR–RFLP ve DNA Dizi Analizi Verileri Temelinde Türkiye Bal Arılarının Tanımlanması. 5. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Van. 05-08 Eylül. Sözlü Bildiri.
- KAYA, M., **ÖZDİL, F.**, MEYDAN, H. GEDİK, Y. ve YILDIZ, M.A. 2007. Denizli ve Gerze Tavuk Irklarındaki Genetik Varyasyonun Mikrosatelit DNA Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi. 5. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Van. 05-08 Eylül. Sözlü Bildiri.
- MEYDAN, H., **ÖZDİL, F.**, GEDİK, Y. ve YILDIZ, M.A. Siyah Alaca Sığırlarında BLAD, DUMPS ve FACTOR XI Genetik Kusurlarının PCR–RFLP Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi. 5. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Van. 05-08 Eylül. Sözlü Bildiri.
- GEDİK, Y. **ÖZDİL, F.**, MEYDAN, H. ve YILDIZ, M.A. 2007. Siyah Alaca Sığırlarının Beta.Laktoglobulin ve Kappa Kazein Genotiplerinin PCR–RFLP Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi. 5. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Van. 05-08 Eylül. Sözlü Bildiri.
- Yıldız, M.A., **Özdil, F.\*** ve Gençer, H.V. 2005 Mitokondriyel DNA PCR–RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye bal arılarının tanımlanması. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir. 31 Ağustos-2 Eylül. Sf. 69-73.
- ASAL, S. ve **ÖZDİL, F.\*** 2002. Konya-Ermenek bölgesindeki kıl keçi populasyonunda  $\beta$ -laktoglobulin polimorfizmi. III. Ulusal Zootečni Kongresi, Ankara. 14-16 Ekim. Sf. 163.