

Kuzeydoğu Anadolu ve Kuzeydoğu Karadeniz Bölgelerinde Yayılış Gösteren Kafkas Arı Irkı *Apis mellifera caucasica*'nın Hibritleşme Düzeyinin Saptanması

Merve GÜLEN^{1*}, Mehmet Ali KIRPIK², Cem ÖZİÇ³

¹ Kafkas University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of General Biology, Merkez, 36000, Kars, Turkey

²Kafkas University, Faculty of Science Literature, Department of Biology, Merkez, 36000, Kars, Turkey

³Department of Bioengineering, Faculty of Engineering & Architecture, Kafkas University, Kars, 36100, Turkey

(İlk Gönderim / Received: 03.12.2019, Kabul / Accepted: 26.12.2019, Online Yayın / Published Online: 30.12.2019)

Anahtar Kelimeler

Bal arısı,
Kafkas arı ırkı,
Hibritleşme,
PCR,
Filogenetik ağaçlandırma

Özet: Bu çalışma Dünyada ki arı ırkları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye'deki doğal lokasyonlarının Kuzey Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgeleri olduğu bildirilen Kafkas bal arısı (*Apis mellifera caucasica*)'nın hibritleşme düzeyinin PCR tekniği ve filogenetik ağaçlandırma metodu kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Popülasyonlar içerisinde ki seleksiyonların türler üzerinde yarattığı genotipik etkinin düzeyini ölçmek için mitokondriyel DNA (mtDNA) molekülünün Sitokrom C Oksidaz I geni baz alınmıştır. Kuzey Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgelerinde bulunan Kars, Ardahan, Erzurum, Artvin ve Rize illerinin popülasyonları hedef olarak seçilmiştir. Çalışma materyali olarak bu illerin sınırları içerisinde bulunan 57 arılıktan yaklaşık 450 ergin işçi arı örneği (her istasyondan yaklaşık olarak 7-8 adet arı örneği alınmıştır) toplanmıştır. Arılıklardan toplanan ergin işçi arı örneklerinin kalıtsal materyalleri fenolkloroform: izoamilalkol tekniği kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyonları yapılan DNA örneklerinin PCR sonrası elde edilen ürünleri jel elektroforezinde yürütüldükten sonra agaroz jel görüntüleri alınarak dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizi verileri sonucu materyallerin akrabalık düzeyleri filogenetik ağaçlandırma modelinde değerlendirilmiştir.

Determination of Hybridization Level of Caucasion Bee (*Apis mellifera caucasica*) Bread Which is Spread in Northeastem Anatolica and Eastern Black Sea Regions

Keywords:

Honeybee,
Apis mellifera caucasica,
Hybridization,
PCR,
Phylogenetic afforestation

Abstract: As a result of this study on bee breeds which have already been spreading in the world and our country, are intended to be determined based upon data obtained from Turkey has been reported that the natural locations of the North Eastern and Eastern Black Sea Caucasian honey's (*Apis mellifera caucasica*) level of hybridization using the PCR technique and phylogenetic planting method. The genotypic effect of the selection on populations on the species was determined by studying the cytochrome C oxidase I gene of the mitochondrial DNA molecule. The populations of Kars, Ardahan, Erzurum, Artvin and Rize which are located in North Eastern Anatolia and Eastern Black Sea regions are chosen as a goal. As study material approximately 450 adult worker bee samples were collected from 57 bees in the boundaries of these cities (approximately 7-8 bee samples were taken from each station). Hereditary materials of adult bee workers' samples collected from bees were isolated using fenolkloroform: isoamylalcohol technique. Isolation of the DNA samples obtained after PCR products, after running on gel electrophoresis, agarose gel images were taken and sequence analyzes were performed. As a result of sequence analysis, the kinship levels of the materials were evaluated in a phylogenetic afforestation model.

*İlgili yazar: m.gulen1991@gmail.com

1. GİRİŞ

Arıcılık; fitocoğrafyanın sunduğu kaynaklardan yararlanarak, işçinin emeği, sabrı ve sahip olduğu bilgi birikimi ile birlikte canlı arı sayısını arttırabilme ve arı ürünleri elde edebilme becerisi olarak tanımlanabilir. Arıcılık coğrafik koşulların arı kolonilerinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmelerine izin verdiği her yerde yapılabilir. Arıcılıkta canlı materyal ve ürün miktarını arttırmanın en önemli sebeplerinden biride iyi bir gözlemci olabilmektir. Çalışma alanında kullanılan materyalin canlı olması yıl içerisinde yaptığımız çalışmalara karşı dikkat düzeyinizin yüksek olmasını gerektirir; çünkü yapacağınız küçük bir hata yıl içerisinde kolonilere karşı göstermiş olduğunuz tüm emeklerinizin heba olmasına neden olabilir (Sancak, 2013).

Arıcılık tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de son dönemlerde tarımsal faaliyetleri içerisinde bulunduran sektörde pazar payı bakımından oldukça önemli seviyelere ulaşmıştır. Ülke ekonomisindeki etkisi yükselişe geçtikçe yeni yetiştiricilerin ve gen merkezlerinin oluşumunda da artışlar gözlenmeye devam etmektedir. Ülkemizin sahip olduğu fitocoğrafyanın zengin ürün yelpazesi arıcılık sektöründeki dalgalanmaların yükselişe geçmesinde büyük rol oynamaktadır. Sahip olduğu flora ve fauna çeşitliliğinden dolayı da birçok canlı türüne ev sahipliği yapmaktadır. Fakat tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de farklı gen kaynaklarının varyasyonel etkilerden ya da farklı coğrafik koşullardan dolayı yok olma riski vardır. Bundan dolayı yetiştirildikleri coğrafyanın dışına çıkarılmayan yerli ırklar varyasyonel ve coğrafik değişimlere uğramış hibrit ırklara oranla adaptasyon gücü bakımından oldukça dirençlidirler (Çelik,2015, Ertuğrul, 2000).

Doğaya ve insanoğluna yararlarının saymakla bitirilemeyeceği bu canlıların sahip olduğu gen kaynaklarının korunmasında insanların etkisi fazladır. Yerel arıcılığın kontrolü altında bulunan lokasyonlarda yapılan araştırmalar sonucu yerel ırkların saf döller

olarak üremeye devam ettiği bildirilmiştir (Ruttner, 1988).

Karakteristik özellikler bakımında üstün olan ırkların genotipik özelliklerini korumaları hibritleşmeden üremeye devam etmeleriyle bağlantılıdır. Fakat son dönemlerde göçer arıcılığın yaygınlaşmasıyla popülasyonlar arası gen alış verişi arttığından dolayı aynı lokasyonlar içerisinde farklı ırk ve ekotiplerin oluştuğu belirtilmiştir (Kaftanoğlu ve ark., 1993; Öztürk ve ark., 1992).

Canlılardaki hibritleşme düzeyleri ve taksonomik sınıflandırmadaki yerlerinin tayin edilmesi için morfolojik özellikler, kan grupları, biyokimyasal genetik polimorfizmlerinin tayin edilmesi ve filogenetik ağaçlandırmalardan yararlanır. Bal arılarının oluşturduğu popülasyonlarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler klasik yöntemlere göre daha net ve açıklayıcıdır. Bundan dolayı bal arılarının sistematik sınıflandırma ve varyasyonel etkilerinin açıklanması amacıyla yapılan çalışmalarda PCR tekniğinin kullanımı kaçınılmaz olmuştur (Whitfield et al., 2006). PCR çalışılmak istenilen gen bölgesinin belirli primerler kullanılarak laboratuvar ortamında (invitro) çoğaltılması işlemine dayanan moleküler içerikli bir tekniktir. PCR düzeniğinin kurulum şartlarına ilk olarak 1987 yılında Karry Mullis değinmiştir. Karry Mullis tarafından ilk taslağının bilim dünyasına sunulduğu yöntem Saiki et al. (1985) tarafından geliştirilerek son halini almıştır. PCR tekniğinin kullanımının yayılmasıyla birlikte organizmalarda varyasyonlara bağlı etkilerin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Bundan dolayı PCR tekniği moleküler biyoloji alanında gerçekleşen yeniliklerin ön basamağı olarak kabul edilmektedir

Evrimsel sürece bağlı yapılan PCR tekniklerinde canlılık aleminde çalışma materyali olarak kullanılan molekül mitokondriyal DNA dır. Mitokondriyal DNA (mtDNA) molekülünün filogenetik çalışmalarda

öncelikli materyal olarak kullanılması evrimsel sürecini genomik (çekirdek) DNA molekülüne göre daha hızlı tamamlamasına dayandırılmıştır (Avize et. al., 1987). Mitokondriyal DNA molekülünün çalışmalarındaki önceliğini belirleyen özelliklerinden biriside molekülün dairesel ve tek zincirli yapıda olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı hücre bölünmesinden sonra replikasyon sırasında genomik DNA'daki gibi parça değişimi (crossingover) gerçekleşmediği için rekombinant döllerin oluşumu engellenir. mtDNA'nın kalıtsal orjininin anneye (maternal) ait olmasıda organelin önemli özelliklerinden birisidir. Mitokondriyal DNA molekülü yalnızca anneden alındığı için evrimleşme süreçte herhangi bir değişime uğramadan kalıtsal yapısı aynı şekilde korunmaya devam eder.

Arı ırkları da diğer canlılarda olduğu gibi maternal kalıtım molekülünü tüm bireylere aynı şekilde aktarır. Bunun sonucunda koloni içerisinde yer alan bütün bireyler aynı mitokondriyal kalıtıma sahip olurlar (Garnery et al., 1992). Farklı döllere aktarılması sırasında rekombinant yapılar oluşturulmaması bilim dünyasında geçmişe yönelik yapılan çalışmalarda mtDNA molekülünün kullanılmasını arttırmaktadır.

Ayrıca mitokondriyal DNA molekülünün dokular içerisinde birden fazla kopyasının varlığı ve yapısal boyutlarının oldukça küçük olması da moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda tercih sebepleri arasındadır (Dolaş ve ark., 2003; Smith, 1991).

Mitokondri organelinin evrimsel gelişim süreçleri araştırıldığında ise tam olarak kesin bir kaniye varılmamakla birlikte ortaya birçok teori çıkmıştır. Bu teoriler arasında en çok benimsenenlerden birisi endosimbiosiz adı verilen teoridir. Bu teori mitokondri organelinin aerobik bakterilerin en ilkel ökaryotik hücrelerle endosimbiyotik birlikteliğinin sonucunda var olduğunu savunmaktadır. Mitokondri organelinin içerisinde bulunan DNA, moleküle özgü proteinlerin sentezlenmesinden

sorumludur. Mitokondrilerde proteinlerin % 95'inden fazlası, çekirdek DNA, ribozom ile tRNA'nın varlığı, mitokondrinin iç zarına ait proteinlerin sentezlenmesi varsayılan endosimbiyotik teoriyi desteklemektedir (Kılıç, 2005).

Bal arılarında bulunan mitokondriyal DNA molekülünün yapısal özellikleri ise şu şekildedir; (mtDNA) 16800-17000 baz çifti uzunluğundadır. Dairesel yapıda olan molekülün DNA' sını tek zincirden oluşur ve toplamda 37 gen içerir. Mitokondriyal DNA 13 (bazen 12) protein, 22 taşıyıcı RNA (tRNA) , 2 ribozomal RNA (rRNA) kodlayan ve gen ürününün sentezinden sorumlu olan gen bölgeleri (exon) ve kodlamaya katılmayan sadece replikasyonu kontrol eden bölgeleri içermektedir. Mitokondriyal DNA molekülü fonksiyonel olmayan gen bölgelerini içermemektedir (Crozier,1993; Moritz, 1994).

Canlıların evrimsel süreçlerini belirten bir başka yöntemde filogenetik ağaçlandırma metodudur. Filogenetik araştırmalar sonucunda elde edilen veriler filogenetik ağaçlandırma metodları ile değerlendirilmektedir. Filogenetik ağaçlandırma metodlarının temeli türler arası benzerlik ve farklılıklara dayanmaktadır. Türler arası ilişkiyi tespit etmek için morfometrik ve moleküler düzeyde önemli olan karakteristik özellikler baz alınır. Filogeni kavramıyla hazırlanan ağaçlar bir düğüm ve bunu takiben popülasyonları oluşturulan ırklar arasındaki atasal benzerlik ve farklılıklara göre çeşitli dallanmalar gösterir. Taksonomik açıdan değerlendirildiğinde canlılar arasındaki akrabalık dereceleri ortaya çıkar. Popülasyonlardaki atasal benzerlikler ağaçların dallarıyla ifade edilirken; ırklar arasındaki varyasyonel benzerlikler ise düğüm bölgeleriyle gösterilir.

Bu iki tekniği de yapısında bulunduran birçok çalışma Kafkas arı ırkının Türkiye'de Kuzeydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz kıyılarında bulunduğu bildirmiştir (Ruttner, 1998). Türkiye' de Orta Anadolu, Karadeniz' in

geçit bölgesinde Ardahan izole bölgelerinde bulunan bal arısı ekotiplerinin morfolojik özellikler bakımından incelenmesi amacıyla Kekeçoğlu ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerde popülasyonun yayılış bölgelerini destekler niteliktedir. Çalışmada 14 farklı arı popülasyonundan alınan örnekler çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Arı örnekleri morfolojik özelliklerini baz alarak yapılan çalışmada morfometrik yöntemlerden yararlanılmıştır. Orta Anadolu arı popülasyonları türlerini morfolojik karakterler bakımından değerlendirilmesi sonucunda arı kolonilerinin çevre popülasyonlardan ayrıldığı görülmüş ve bölgeyi kapsayan çalışmalarla birlikte standart tiplerin elde edilebileceği savunulmuştur. Benzer özellikler bakımından Karadeniz geçit bölgesindeki popülasyonların tür tayinlerinin yapılmasının zor olduğu ve Ardahan izole bölgesindeki arı popülasyonlarına benzer en fazla bir lokasyonun bulunabileceği belirtilirken popülasyonların morfolojik karakterler bakımından Kafkas arı ırkının sahip olduğu değerlerin sınırları arasında kaldığı bildirilmiştir.

Kafkas arısı sahip olduğu biçim, büyüklük ve kıl örtüsü bakımından karniyol arasına benzer. Kitin rengi koyudur; fakat birinci karın halkası üzerinde kahverengi noktalar görülür. Bu özellikleriyle karniyol arı ırkından kolayca ayrılabilirler. Irkın sahip olduğu morfolojik ve davranışsal özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- ❖ Sahip oldukları kitin tabakası koyu esmer renktedir. Kitin tabakasını dış etmenlere karşı koruyan kıl örtüsü geniş ve kılları kısıdır. Kıl uzunlukları en fazla 0.30-0.40 mm'ye ulaşabilir.
- ❖ Bazı morfolojik ve davranışsal özellikleri bakımından Karniyol arı ırkına benzer özellikler taşıyan Kafkas arısının kıl örtüsü rengi Karniyol arısınıninkine göre daha açıktır.
- ❖ Koloniyi temsil eden dişi arıların kıl örtüsü rengi kurşuni griyken; erkek arıların thorax (göğüs) kılları koyu siyah renktedir.

- ❖ Dağ ve ova tipi olmak üzere ikiye ayrılan Kafkas arı ırkının dağ tipinde tüm abdomen (karın) halkaları siyahtır. Birinci abdomen halkaları üzerinde kahverengi benekler görülür.
- ❖ Uzun dilleri aracılığıyla birçok bitkiden nektar toplayabilirler. Bu karakteristik özellikleriyle zorlu coğrafik koşullara sahip lokasyonlarda bile diğer ırklara göre daha üstün davranışlar sergileyerek bal verimliliklerini en üst seviyeye taşırlar.
- ❖ Kafkas bal arısı ırkı göstermiş olduğu karakteristik özellikleriyle ekonomik açıdan tercih sebebi olmuş önemli *Apis mellifera* L. türleri arasında yer almaktadır (Ruttner, 1998; Karacaoğlu ve ark.; 1998, Doğaroglu ve ark., 1999; Dodoloğlu ve ark., 2000).

Bu çalışmayla daha önce Dünyada ve Türkiye'de yayılış gösteren arı ırkları üzerinde yapılan çeşitli yöntemler kullanılarak benzerliklerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Popülasyonlardaki seleksiyonların çalışmalar sonucunda elde edilen verilere dayanarak Kafkas ırkı arının, Türkiye'de doğal lokasyonlarının Kuzey Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgeleri olduğu bildirilmiştir. Kafkas bal arısı (*A. mellifera caucasica*)'nın hibritleşme düzeyinin PCR tekniği ve filogenetik ağaçlandırma metodu türler üzerindeki genotipik etkisinin düzeyi mitokondriyel DNA (mtDNA) molekülünün Sitokrom C Oksidaz I geni üzerinde çalışılarak tespit edilmiştir.

Kuzey Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgelerinde bulunan Kars, Ardahan, Erzurum Artvin ve Rize illerinin popülasyonları hedef olarak seçilmiştir. Bu bölgelerin hedef bölge olarak seçilmesinin sebebi ise daha önce yapılan çalışmalarda Kafkas arı ırkının Türkiye sınırları içerisinde en iyi adaptasyon gösterdiği bölgeler arasında yer almasıdır. Çalışma materyali olarak bu illerin sınırları içerisinde bulunan 57 arılıktan yaklaşık 450 ergin işçi arı örneği (her istasyondan yaklaşık olarak 7-8 adet arı örneği alınmıştır) toplanmıştır. Arılıklardan toplanan ergin işçi arı örneklerinin kalıtsal

materyalleri fenolkloroform: izoamilalkol tekniği kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyonları yapılan DNA örneklerinin PCR sonrası elde edilen ürünleri jel elektroforezinde yürütüldükten sonra agaroz jel görüntüleri alınarak dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizi verileri sonucu materyallerin akrabalık düzeyleri filogenetik ağaçlandırma modelinde değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Canlı Materyal

Bu tez çalışmasının materyalini Türkiye'nin Kuzeydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgelerinde bulunan Kars, Erzurum, Ardahan, Artvin ve Rize illerinden belirlenen toplamda 57 istasyondan alınan canlı ergin işçi arı örnekleri oluşturmuştur.

Tabloda da görüldüğü üzere belirlenen istasyonlarda bulunan yerli ve gezer arıcıların kolonilerinden toplanan örnekler araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Her bir arılıktan yaklaşık 7-8 örnek toplanmıştır. Bu örnekler içerisinde morfolojik olarak diğerlerin daha iri olan arı çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1: Bal arılarının alındığı bölgeler ve istasyon sayısı

İl	İlçe	İstasyon Sayısı
Kars	Merkez	18
	Arpaçay	6
	Diğor	3
	Sarıkamış	4
	Selim	4
	Susuz	5
	Akyaka	3
Erzurum	Merkez	4
Ardahan	Merkez	3
	Posof	4
Artvin	Camili	2
Rize	Anzer	2
Toplam		58

2.1.2. Araç ve Gereçler

Arazi çalışmaları sırasında materyal olarak kullanılacak bal arısı örneklerin toplanması ve çalışmanın yapılacağı zamana kadar muhafaza edilmesi için cam kavanozlar, %70'lik etil alkol, pamuk, pens, makas,

kloroform, etiket kullanılmıştır. Toplanan örnekler %70'lik etil alkole batırılmış pamuk ihtiva eden cam kavanozlar içerisinde etkisiz hale getirilmiştir. Laboratuvar ortamına getirilen örnekler etil alkolde uzun süre kalarak zarar görmemesi için pens yardımıyla farklı kavanozlara aktarılmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan araç gereçlerin listesi

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Bidestile SafSu Cihazı	DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonunda kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması
Nanodrop Spektrometre	İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık derecelerinin belirlenmesi
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Çalkalayıcı(Vortex)	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Mikrosantrifüj	Katı ve sıvı maddelerin karıştırılması
Dijital Hassas Terazî	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında ve sarf malzemelerin ölçülmesi
Gradient Thermal Cycler 96 Örneklîk	Mikrosentetik lokusların çoğaltılması
Agaroz Jel Elektroforez Takımları	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin tespiti
Güç Kaynakları	Elektroforez sistemlerine elektrik ortamlarının sağlanması
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi	Elektroforez sistemlerinde koşutulan PCR ürünlerinde oluşan bantlaşmaların izlenmesi
Mikrodalga Fırın	Agaroz jellerin hazırlanması
Derin Dondurucu	Örnek ve çeşitli sarf malzemelerin uzun süreli saklanması
Derin Donduruculu Buzdolabı	Çeşitli tampon çözeltilerin saklanması
Otomatik Pipet Takımları	Kullanılan sıvı malzemelerin miktarlarına göre çekilmesi ve tayin edilmesi
Etüv	İnkübasyon sırasında kullanılır

Tablo 2.3: Elektroforez düzeneği ve agaroz jellerin hazırlanması için kullanılan stok ve tampon çözeltilerin listesi

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
TE Tampon Çözeltisi	10 mM 1 mM	
DNA Yükleme Tampon Çözeltisi	1.5 ml 1.5 ml	
10X TBE Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi	1 litreye tamamlanır	Tris 0.5 M EDTA (pH 8) De iyonize bdH ₂ O
1XTBE Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi	200 ml 2 litreye tamamlanır	10XTBE De iyonize bdH ₂ O

2.2. Yöntem

2.2.1. Genomik DNA izolasyon

Örneklerin genomik DNA izolasyonları fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi mevcut laboratuvar koşulları optimize edilerek elde edilmiştir. Çalışma şartları ve uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir:

1. Gün:-20°C'de tutulan örneklerin fiziksel parçalaması sırasında parçalamayı kolaylaştırmak için petri kaplarına alınmış ve 24-48 saat yumuşatma kaplarında bekletilmiştir. Buradan alınan örneklerin baş ve kuyruk kısımlarından ayrılmış ve göğüs (thorax) bölgesi bistüri yardımıyla parçalanmıştır. Parçalanmış örnekler 1.5 ml'lik şeffaf tüpler içerisine alınmıştır. Tüpler üzerine her bir örnek için 100 uL olacak şekilde ELB eklenerek pipetlenmiştir. Daha sonra eklenen ELB solüsyonunun örneklere daha hızlı etki edebilmesi ve parçalamanın kolaylaşması için tüpler 30 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Buz içerisinden alınan tüpler 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı (süpernatant) dökülerek, alt kısımda kalan tortu (pelet) üzerine 100 uL ELB tamponu eklenmiştir. Tüpler 10000 devirde 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dökülmüştür. Pelet üzerine 100 uL NLB solüsyonu ve 50 uL Proteinaz-K eklenerek tüpler homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir. Tüplerin üzerine 200 uL SDS eklenerek örnekler +37 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

2.Gün: İnkübasyondan alınan örnekler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler üzerine 500 uL- 6M NaCl solüsyonu eklenerek 15 saniye yüksek devirde vortekslenmiştir. Vortekslenen örnekler 10000 rpm'de santrifüjlenerek fazların ayrılması sağlanmış ve süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak üzerlerine 1.5 ml tamamlayacak şekilde etilalkol eklenmiştir. Tüpler altüst edildikten sonra -20'de 1 saat bekletilmiştir.

3.Gün: -20'den alınan örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatantlar dökülerek kalan pelet üzerine 100 uL su eklenerek çözülmüştür. (Yoğunluğa bağlı olarak su miktarı artırılabilir).

Genomik DNA izolasyonlarının miktar ve saflık kontrolleri Nanodrop Spektrofotometreden yararlanılarak yapılmış ve elde edilen veriler sonucunda 260/80 dalga boylarında 1.8-2.0 saflık derecesi ile miktar olarak 50 ng/uL değerinin üzerinde bulunmuştur. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının kontrolleri %1'lik agaroz jel içerisinde yatay elektroforez düzeneğinde yapılmıştır. Elde edilen DNA molekülleri PCR işlemi yapıncaya kadar +4° C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. PCR Tekniğinin Uygulanması

Genomik DNA izolasyon yöntemi sonucunda elde edilen DNA molekülleri tRNA genini içeren COI ve COII geninin 5' ucunu içeren intergenik bölgesi ve COII geninin 5' ucunu içeren bölgesi PCR protokolü kullanılarak çoğaltılmıştır (Garnery et al., 1993)

Tablo 2.4: PCR reaksiyonunda kullanılan stok ve primerler (5 et al. 1993)

2,5 uL	DNA
2,5 uL	10×PCR Buffer
1,5 uL	MgCl
0,5 uL	dNTPs
0,5 uL	İleri primer
0,5 uL	Geri primer
0,2 uL	Taq polimeraz

Reaksiyon için kullanılacak kimyasallar laboratuvar ortamında toplamda 25 uL olacak şekilde optimize edilmiştir. Bunun için elde edilen kimyasal karışım üzerine toplam hacim 25 uL olacak şekilde su eklenerek ürünler PCR düzeneğinde işlem görmeye bırakılmıştır.

Tablo 2.5: PCR düzeneğinin aşamaları (Garnery et al.1993)

94°C~1 dk		Ön denatürasyon (DNA halkalarının birbirinden ayrılması)
94°C~1dk	30 döngü	Denatürasyon (DNA eksenlerinin birbirinden ayrılması)
48°C~1dk	30 döngü	Bağlanma (Primerlerin komplementer DNA eksenlerine bağlanması)
72°C~1dk	30 döngü	Uzama (Üzerinde durulan DNA bölgesinin sentezinin yapılması)
72°C~1dk		Son uzama (Üzerinde durulan DNA bölgesinin sentezinin son kez yapılması)

PCR işleminden sonra elde edilen PCR ürünleri 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3. Elektroforez ve Görüntüleme Sistemi

Elektroforez sistemindeki ilk aşama PCR sonucu elde edilen ürünlerin yükleneceği kuyucuların yer aldığı agaroz jelin hazırlanmasıdır. Elektroforez tankı güç kaynağı agaroz jelde DNA örnekleri 80 voltta 50 dakika yürütülecek şekilde ayarlanmıştır. PCR ürünlerindeki bantlaşmalar görüntüleme sisteminde incelenmiş ve bantlaşma modellerinin sekanslama amacıyla dizi analizleri yapılmıştır.

2.2.4. Filogenetik Ağaçlandırma Metodunun Uygulanması

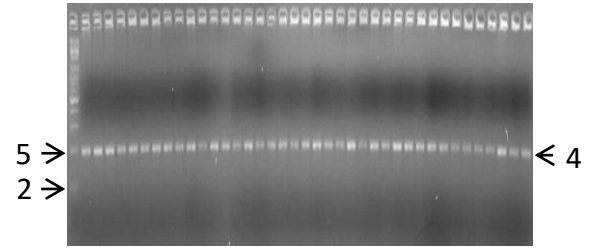
Dizi sekanslama sonucunda elde edilen verilerle çalışma materyalleri filogenetik ağaçlandırma metodu kullanılarak türlerdeki varyasyonel çeşitlilik belirlenmiştir.

3. BULGULAR

Mitokondriyal DNA dizi analizleri için gerekli olan total DNA, arı örneklerine ait dokulardan elde edilmiştir. Hedef gen bölgesi COI'in çoğaltılması için PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.1. Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Hedef gen bölgesi, COI evrensel primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri kalite ve büyüklük açısından kontrol edilmek üzere agaroz jelde yürütülerek jel fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.1 Bazı arı türlerine ait COI geni için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

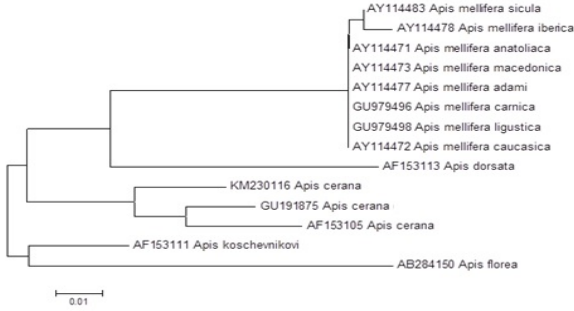
3.2. Dizi Analizi

PCR sonucu elde edilen ürünler jelden saflaştırılmış ve beklenen tahmini ürün büyüklüğü olan 450 bp'lik ürünler elde edilmiştir. Saflaştırılan ürünler hizmet alımı ile dizi analizine tabi tutulmuştur. Nükleotid dizisi belirlenen PCR ürünleri NCBI veritabanında analiz edilmiştir. Daha sonra arı türlerinin COI geninin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için arı türlerinden elde edilen dizi analiz sonuçları kullanılarak, NCBI veri tabanından hangi türlere benzerlik gösterdiği incelenmiştir. Dizi analiz sonuçları elde edilen diziler ve yapılan filogenetik ağaç sonucu, örneklerin uyumsuz genel olarak sadece 3 lokaliteye ait türlerin Kafkas arı ırkı ile benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Bu türün kendi içinde farklı lokalitelerden alınma kriteri göz önüne alınarak, bunlar arasındaki benzerliği belirlemek için nükleotid dizileri EBI veri tabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır. Dikey hizalama sonuçları kullanılarak elde edilen filogenetik ağaç incelendiğinde ise farklı lokalitelerden alınan türler kendi içlerinde genotipik özellikleri bakımından anlamlı bir fark göstermiştir.

3.4. Filogenetik Analiz

Dikey hizalama ve ağaç analizlerinin oluşturulabilmesi için ClustalW(1.83) veri hazırlanmasında kullanılmıştır. Filogenetik

ağaç oluşturmak için MEGA programı kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Kafkas arı ırkının farklı türler ile yapılan filogenetik ağacı (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA5 programları kullanılmıştır).

4. TARTIŞMA SONUÇ

Kuzey Kafkasya sınırları içerisinde bulunan Mozdok lokasyonlarında bulunan arı popülasyonları üzerine yapılan çalışma sonucunda Kafkas arı ırkının ilk tanımlaması yapılmıştır. Bulunan tür remipes olarak isimlendirilmiştir. Alman zoolog Poliman ise Kafkaslardan topladığı örnekler üzerindeki çalışması sonucunda türün yayılış gösterdiği bölgenin ismiyle adlandırılmıştır. Kafkas arı ırkının ilk sistematik sınıflandırması ise Gorbachev tarafından 1919 yılında yapılmıştır.

Ruttner de 1988 yılında Türkiye’de yaptığı çalışmalarla Kafkas arı ırkının doğal lokasyonlarının Kuzeydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgeleri olduğunu bildirmiştir. Ayrıca zamanla ekolojik dengenin etkisiyle birlikte yerel ırk lokasyonlarının değiştiğini ve yeni hibrit alttürlerin oluşumuyla genetik yapılarının korunamadığını belirtmiştir.

Kekeçoğlu ve arkadaşlarının 1994 yılında Orta Anadolu, Karadeniz geçit bölgesi ve Ardahan izole bölgelerinde bulunan bal arısı ekotiplerinin morfolojik özellikler bakımından incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada 14 farklı arı popülasyonundan alınan örnekler çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Arı örnekleri morfolojik özellikleri baz alınarak yapılan çalışmada morfometrik yöntemlerden yararlanılmıştır. Orta Anadolu arı popülasyonları türlerini morfolojik karakterler

bakımından değerlendirilmesi sonucunda arı kolonilerinin çevre popülasyonlardan ayrıldığı görülmüş ve bölgeyi kapsayan çalışmalarla birlikte standart tiplerin elde edilebileceği savunulmuştur. Benzer özellikler bakımından Karadeniz geçit bölgesindeki popülasyonların tür tayinlerinin yapılmasının zor olduğu ve Ardahan izole bölgesindeki arı popülasyonlarına benzer en fazla bir lokasyonun bulunabileceği belirtilirken popülasyonların morfolojik karakterler bakımından Kafkas arı ırkının sahip olduğu değerlerin sınırları arasında kaldığı bildirilmiştir.

Güler ve arkadaşlarının 2000 yılında Kafkas arı ırkının izole bölgelerinden biri olarak kabul edilen Artvin ili Borçka ilçesinde morfometrik yöntemler kullanılarak tanımlanması amacıyla yapılan çalışmada birbirlerinden farklı üç arılıktan toplamda 24 ergin işçi arı örneği alınmıştır. 29 farklı morfometrik karakter baz alınarak materyallerin biyometrik analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde bölgeye hakimiyet kurmuş ırkın adaptasyon süresinde zamanla değişime uğradığı ve Kafkas arı ırkının ekolojik bir türüne dönüştüğü belirtilmiştir.

Önk ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Kafkas (*A.m.caucasica*), İtalyan (*A.m.ligustica*), Karniyol (*A.m.carniaca*) ve Anadolu (*A. m. anatolica*) ırkına ait örnekler toplanarak petri kapları içerisinde fiziksel ve kimyasal parçalama işlemleri yapılmıştır. Izoamil alkol yöntemi kullanılarak materyallerin DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA’ları elde edilen örnekler PCR uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek dizi sekansları yapılmıştır. Filogenetik ağaç profilleri Clustal W (1.83)d ile dikey pozisyonda sıralanmış ve MEGA 5 programı ile hazırlanmıştır. Çalışma materyali olarak kullanılan 4 arı ırkının moleküler ve filogenetik özelliklerinin tayin edilmesi için yapılan bu çalışma sonrasında popülasyonların moleküler düzeyde %98 oranında benzer özellikler gösterdiği; fakat filogenetik

ağaçlandırma modelinde Kafkas arı ırkının farklı bir dallanma gösterdiği bildirilmiştir.

Türkiye sınırları içerisinde buna benzer yapılan çalışmalar Kafkas arı ırkı popülasyonlarının Kuzey Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgelerinde hakimiyet sağladığını destekler niteliktedir.

Elde edilen verilere dayanarak Kafkas arı ırkı (*Apis mellifera caucasica*)'nın hibritleşme düzeyinin saptanması amacıyla yapılan çalışmada doğal lokasyonları olarak belirtilen Kuzeydoğu Anadolu bölgesinden Kars, Ardahan ve Erzurum illeri, Doğu Karadeniz bölgesinden ise Artvin ve Rize illeri istasyon olarak seçilmiştir. Bu illerin sınırları arasında yer alan 11 farklı lokasyonda bulunan 58 arı kolonisinden (her koloniden yaklaşık 8-9) canlı ergin işçi arı örneği toplanmıştır. Popülasyonlar arası hibritleşme düzeyinin saptanması ve arı örnekleri arasında ki atasal benzerlik ve farklılıkları belirlemek için PCR tekniği ve filogenetik ağaçlandırma metodlarından yararlanılmıştır.

Kars Merkez ve merkeze bağlı köylerin yerleşim yerlerinde bulunan yerel veya gezginci toplam 18 arı kolonisinden toplanan canlı ergin işçi arı örneklerinin PCR tekniği ve agaroz jel görüntülerinin dizi analizleri değerlendirildiğinde Kars ve Ardahan illerinde örnek alınan istasyonların arı örneklerinin sergilediği baz dizilimiyle Kafkas arı ırkı popülasyonlarının sahip olduğu baz diziliminin yüksek oranda benzediği görülmüştür.

Ardahan ilindeki Merkez ve Posof ilçelerini kapsayan lokasyonlarda bulunan 6 koloniyi temsil eden örneklerin mtDNA moleküllerinin baz dizimleri değerlendirildiğinde ise tüm örneklerin gösterdiği sekans verilerinin Kafkas arı ırkı ile benzer dizilime sahip olduğu tespit edilmiştir.

Artvin ili Savşat ilçesinde bulunan Kafkas ana arı üretim merkezinden ve farklı bir lokasyondan alınan iki kolonideki çalışma

materyallerinin agaroz jelde sergiledikleri bantlaşma modeli ve dizi sekanslama sonucunda elde edilen nükleotid dizilimlerinin de Kafkas arı ırkı ile yüksek oranda benzediği saptanmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerden bir diğerinde ise Kuzeydoğu Anadolu bölgesi içerisinde seçilen Erzurum ili ve Doğu Karadeniz bölgesinde bulunan Rize ilindeki lokasyonlardan alınan arı örneklerinin agaroz jelde görünen bantlaşma yapıları ve dizi analiz sekanslaması sonucunda elde edilen nükleotid dizilimlerinin Kafkas arı ırkı ile benzer özellikler göstermediği görülmüştür.

Sonuç olarak daha önceki çalışmalarla yaptığımız çalışmada elde edilen veriler karşılaştırıldığında birbirleriyle benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Saf Kafkas arı ırkının sahip olduğu mitokondriyal genom nükleotid diziliminin doğal yayılış alanları olarak kabul edilen Kuzeydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgeleri içerisinde yer alan Kars, Ardahan ve Artvin illerindeki bazı lokasyonlarda varyasyonel, mutasyonel, coğrafik, ekolojik, doğal ve yapay seleksiyonları içinde barındıran çevresel ve insan kaynaklı faktörlerden etkilenmediği ve bunun sonucunda ırkın sahip olduğu mitokondriyal genom nükleotid diziliminin korunduğu görülmüştür.

Arı popülasyonlarının atasal benzerlik ve farklılıkların sonucunda hazırlanan filogenetik ağaçlandırma modülünde ise sadece 3 lokaliteden (Kars-Merkez, Ardahan-Posof, Artvin-Camili) alınan örneklerin Kafkas arı ırkı ile genotipik açıdan yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Elde edilen verilere dayanarak Kafkas arı ırkı mtDNA molekülünün sahip olduğu baz diziliminin Kuzey doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgelerinde bulunan arı popülasyonlarında günümüzde de hala rastlanıyor olması bu bölgelerde birbirine yakın lokasyonlarda farklı ırkların yer aldığı popülasyonların bulunmasını önüne geçmek

için lokasyonların izole bölgeler haline getirildikleri ve bölgede saf ırkların yetiştirildiği yerel arıcılığın hakim olduğu görülmüştür. Böylelikle farklı popülasyonlar arasında herhangi bir gen alış verişinin önüne geçilmiştir.

Yapılan bu çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Kafkas arı ırkının doğal yayılış alanları ile ilgili yapılacak çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi BAP Koordinatörlüğünün, 2015-FM-42 nolu projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alpatov, W.W., (1929). Biometrical Studies on Variation and the Races of Honeybee. *Q. Rev. Biol.* 4, 1-58.
- Avize, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., (1987). Intraspecific Phylogeography; the Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annu Rev. Ecol.*, 18, 489-522.
- Croizer, R.H., Croizer, Y.C., (1993). The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics.* 133, 97-117.
- Çelik, Ş., (2015). Türkiye de Bal Üretiminin Zaman Serileri ile Modellenmesi. Sakarya Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 19 (3), 377-382.
- Dodoloğlu, A., Genç, F., (2000). Kafkas ve Anadolu Balarısı (*Apis mellifera* L.) Irkları ile Karşılıklı Melezlerinin Bazı Fizyolojik Özellikler. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Erzurum.
- Doğaroğlu, M., Özder, M., Polat, C., (1992). Türkiye’de Önemli Balarısı (*Apis mellifera* L.) Irk ve Ekotiplerinin Trakya Koşullarında Performanslarının Karşılaştırılması. *Tr.J. of Veterinary and Animal Sciences.* 16, 403-414.

- Ertuğrul, M., Akman., Dellal, G., Goncagül, T., (2000). Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması ve Türkiye Hayvan Gen Kaynakları. Tr. Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi. Ankara, 285-300.
- Garnery, L., Cornuet, J.M., Solignac, M., (1992). Evolutionary History of the Honeybee *Apis mellifera* Inferred from Mitochondrial DNA Analysis. *Molecular ecology, Wiley online.*
- Güler, A., (2000). Artvin Borçka Camili (Macahel) Yöresi Bal Arısı (*Apis mellifera* L.)’nın Morfolojik Özellikleri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Samsun.
- Karacaoğlu, M. Fıratlı, Ç., (1998). Studies in Characteristics of Anatolian Honeybee Ecotypes (*A.m.anatolica*) and Their Crosses: I. Morphological Characters. *Tr.J. of Veterinary and Animal Sciences.* 22, 7-21.
- Kılıç, N., (2005). Lehninger Biyokimyasının İlkeleri. Nelson D.L. and M.M.Cox 3. Baskıdan çeviri.
- Moritz, R.F. et al., (1986). A Mitochondrial DNA Polymorphism in Honeybees. *Eperientia.* 42, 322-324.
- Önk. K., Sarı, M., Özic, Ç., (2016). Kafkas (*Apis mellifera caucasica*), İtalyan (*Apis mellifera ligustica*) ve Anadolu (*Apis mellifera anatolica*) Irkı Arıların Moleküler ve Filogenetik Özellikleri. 5. Muğla Uluslararası Arıcılık ve Çam Balı Kongresi. 1-5 Kasım, Muğla.
- Ruttner, F., (1988). Biogeography and Taxonomy of Honeybee. *Springer Verlag.* 284.
- Sancak, K., Sancak, A.Z., Aygören, E., (2013). Dünya ve Türkiye’de Arıcılık. dergi park.gov.tr (05.07.2016)
- Whitfield, C.W. et al., (2006). Thrice Out of Africa : Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science.* 314, 642-645.