



MİTOKONDRIYEL DNA SİTOKROM C OKSİDAZ I İLE II ARASINDAKİ İNTERGENİK BÖLGE (COI-COII İNTERGENİK BÖLGE) BAKIMINDAN TÜRKİYE BAL ARISI POPULASYONLARININ TANIMLANMASI¹

Fulya ÖZDİL^{2,3}

Mehmet Ali YILDIZ⁴

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik ABD, Konya/Türkiye

⁴Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik ABD, Ankara/Türkiye

(Geliş Tarihi: 19.02.2008, Kabul Tarihi:21.03.2008)

ÖZET

Bu araştırmada, Türkiye bal arısı populasyonları mitokondriyel genomda sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge bakımından tanımlanmıştır. Türkiye'nin 20 farklı yöresinden toplam 244 adet işçi arı örneği materyal olarak kullanılmış ve bal arısı populasyonlarının tanımlanmasında restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizi yöntemlerinden yararlanılmıştır. COI-COII intergenik bölgenin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu 4 banttan oluşan kesim modeli elde edilmiş ve Türkiye bal arılarında 5 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotipler DNA dizi analizi sonuçları ile kesin bir şekilde belirlenmiştir. Bunlardan üçü (47/41/64/420 bç-C1; 47/40/64/420 bç-C2 ve 47/39/64/420 bç) daha önceki çalışmalarda bildirilmiş, diğer ikisi ise (47/41/64/419 bç ve 47/39/64/418 bç) ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışılan tüm örneklerde *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu literatürde C genetik soyu için bildirilen ve 4 banttan oluşan kesim model elde edilmiş ve bu sonuçla Türkiye bal arısı populasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz (C) genetik soyu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera* L., mtDNA, COI-COII intergenik bölge, PCR-RFLP, DNA dizi analizi

THE IDENTIFICATION OF TURKISH HONEY BEE POPULATIONS INFERRED FROM MITOCHONDRIAL DNA CYTOCHROME C OXIDASE I AND CYTOCHROME C OXIDASE II INTERGENIC REGION (COI-COII INTERGENIC REGION)

ABSTRACT

In this study, the identification of Turkish honey bee populations was carried out using cytochrome C oxidase I and II intergenic region of mitochondrial genome. 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. *DraI* digestion of the COI-COII intergenic region generated four fragments. In this study, *DraI* digestion of the COI-COII intergenic region gave rise to a total of five *DraI* haplotypes which have been accurately identified from DNA sequence results. Three of the *DraI* haplotypes (47/41/64/420 bp-C1; 47/40/64/420 bp-C2 and 47/39/64/420 bp) have been reported in other papers but two of them (47/41/64/419 bp and 47/39/64/418 bp) were first seen in this study. *DraI* digestion of the COI-COII intergenic region generated four fragments in Turkish honeybees which previously have been found to be characteristic of the C lineage and these results confirmed that Turkish honey bee populations belong to East European and Mediterranean (C) lineage.

Key Words: *Apis mellifera* L., mtDNA, COI-COII intergenic region, PCR-RFLP, DNA sequence analysis

GİRİŞ

Bal arısının yaklaşık bir 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. Bal arısı morfolojilerine göre temelde 4 türde incelenmektedir. Ruttner ve ark. (1978) 'e göre bal arısı türleri;

- batı bal arısı (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758)
- doğu bal arısı (*Apis cerana* Fabricius, 1793)
- dev arı (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ve

- cüce arı (*Apis florea* Fabricius, 1787) olarak sınıflandırılmıştır.

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 ve ark. 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, Kauhhausen-Keller ve ark. 1997).

¹ Bu makale DPT tarafından 2003K12019015-5 nolu proje ile desteklenen ve bir bölümü Fulya Özdi'l'in Doktora tezi olarak yürütülen çalışmadan alınmıştır.

³ Sorumlu Yazar: fulyaozdil@selcuk.edu.tr

Son yıllarda mitokondriyel DNA (mtDNA) markerleri kullanılarak yeniden yapılan Batı bal arısı alttürlerinin sınıflandırılmasında, Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller ve ark. (1997) tarafından bildirilen 4 ana sınıflandırma ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, Ruttner (1988) tarafından O genetik soyu içerisinde değerlendirilen *A. m. anatoliaca*, *meda*, *cyprica*, *caucasica*, *adami*, *armeniaca*'nın C genetik soyu içerisinde, Suriye (*A. m. syriaca*) arısının ise yine O genetik soyu içerisinde değerlendirilebileceği ifade edilmiştir (Arias ve Sheppard 1996, Franck ve ark. 2000, Palmer ve ark. 2000). Benzer şekilde Ruttner (1988) ve Kauhausen-Keller ve ark. (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 ve ark. 2001).

Türkiye bal arısı popülasyonlarının sınıflandırılması, tanımlanması ve aralarındaki filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi amacıyla morfometrik (Gürel 1995; Gençer 1996; Gençer ve Fıratlı 1999; Güler ve Kaftanoğlu 1999; Kandemir ve ark. 2005; Farshineh Adl ve ark. 2007), biyokimyasal genetik (Asal ve ark. 1995; Yıldız ve Asal 1996; Kandemir ve Kence 1995; Kandemir ve ark. 2000; Kılıç ve Bilgen 2006), RAPD markerleri (Özdil ve ark. 2006), mtDNA analizleri (Smith ve ark. 1997; Palmer ve ark. 2000; Yıldız ve ark. 2005; Kandemir ve ark. 2006; Özdil ve ark. 2007) ve mikrosatelit markerleri (Bodur ve ark. 2007) temelinde çalışmalar yapılmıştır.

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. Birinci neden 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 İkinci neden ise mtDNA'nın anaya ait kalıtım göstermesidir. 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 (Cornuet ve Garnery 1991, Garnery ve ark. 1992). mtDNA molekülü generasyonlar boyunca büyük ölçüde korunarak dölden döle aktarıldığı için anaya ait kalıtım modellerinin belirlenmesinde ve takip edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır.

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.

Hayvanlarda genellikle mitokondriyel genom büyüklüğü; 16.3-17.0 kb arasında değişirken bitkilerde mitokondriyel genom büyüklüğü 2500 kb'a kadar olabilmektedir (Cornuet ve 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 ve ark. 1986, Cornuet ve Garnery 1991). Bu 37 gen özetle;

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

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^{Leu} geni ile COII genleri arasında yer almakta olup, mtDNA molekülünde en çok genetik varyasyonun tespit edildiği bölgedir (Cornuet ve Garnery 1991, Moritz 1994). 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 ve ark. 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 1). COI-COII intergenik bölgede tRNA^{Leu} lokusundan sonra sadece A+T bazlarından oluşan ve 54 ile 69 bç uzunluğunda P/Po bölgesi yer almaktadır. P bölgesinde farklı bal arısı alttürlerine özgü olan çeşitli nükleotid eksilmeleri tespit edilmiş ve bu nedenle P bölgesi için Po/P₁/P₂ vs. şeklinde gösterimler yapılmıştır. Diğer bütün genetik soylarda P bölgesinin belirtilen formları bulunurken, Doğu Avrupa ve Akdeniz genetik soyuna ait bal arılarında bu bölge tespit edilememiştir.

Q bölgesi ise 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 Q₁, Q₂ ve Q₃ olmak üzere 3 alt bölgeye ayrılmaktadır (Garnery ve ark. 1993). Buna göre;

- Q₁ bölgesi: tRNA^{Leu} geninin devamındaki 48 bç'lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q₁ bölgesi ile 3'-

COI bölgesinin nükleotid içerikleri arasındaki benzerlikten dolayı Q₁ bölgesinin 3'-COI bölgesinin çoğalmasında sonucu meydana geldiği ve evrim sürecinde de bu bölgeden farklılaşarak bugünkü nükleotid içeriğine sahip olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 1).

b) Q₂ bölgesi: Q₁ bölgesinin devamı olup, 79 bç'lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q₂ bölgesi ile tRNA^{Leu} molekülünün 3' ucu arasında büyük bir nükleotid benzerliği bulunmaktadır (Şekil 1).

c) Q₃ bölgesi: Q₂ bölgesinin devamı olup, 5'-COII geni arasında kalan 67 bç'lik uzunluğa sahip bir bölgedir. Q₃ bölgesi Po bölgesi ile hemen hemen aynı nükleotid içeriğine sahip bulunmaktadır (Şekil 1).

Garnery ve ark. (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. Bal arılarının tamamında Q bölgesinin en azından bir set (kopya) halinde bulunduğu, buna karşılık P bölgesinin sadece C genetik soyuna ait bal arılarında bulunmadığı tespit edilmiştir.

P ve Q setlerinin farklılığı dikkate alınarak yapılan çalışmalarda genetik soylar temelinde yapılan bu sınıflandırmalar sonucunda;

a) M genetik soyunda PQQQQ, PQQQ, PQQ ve PQ kombinasyonlarının,

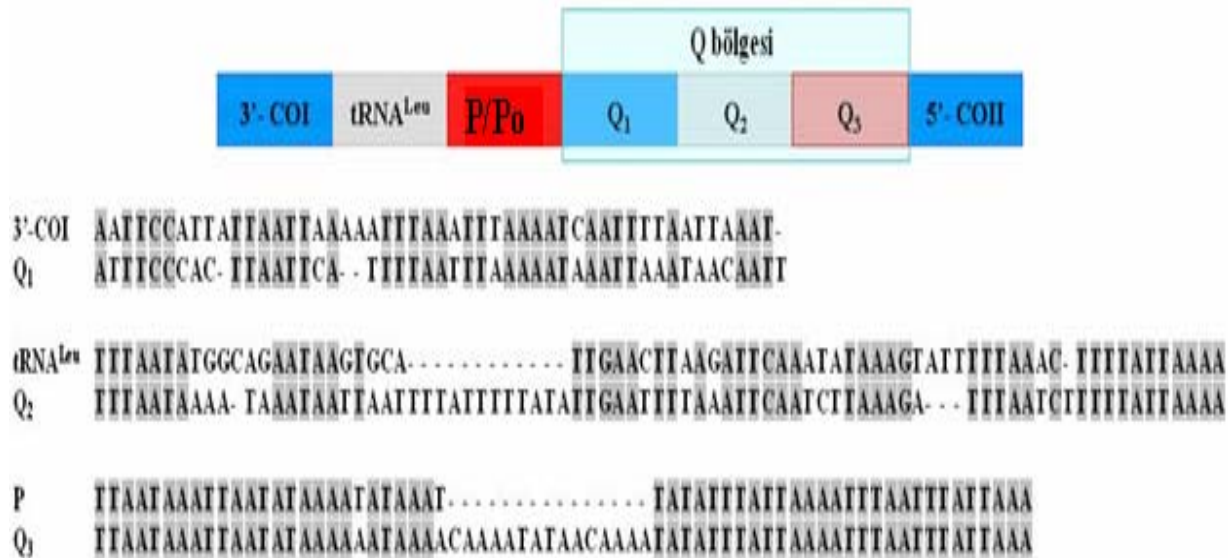
b) A genetik soyunda P₁QQQ, P₁QQ ve P₁Q kombinasyonları ile PoQQQQ, PoQQQ, PoQQ ve PoQ kombinasyonlarının,

c) O genetik soyunda PoQQQ, PoQQ ve PoQ kombinasyonlarının,

d) C genetik soyunda sadece bir adet Q setinin ve

e) Y genetik soyunda sadece P₂Q kombinasyonunun var olduğu tespit edilmiştir (Garnery ve ark. 1993, Franck ve ark. 2000, 2001).

COI-COII intergenik bölge birçok restriksiyon enzimi için tanıma bölgelerine sahip bulunmaktadır. Bu enzim tanıma bölgelerinden *DraI* restriksiyon enzimi kesim bölgesindeki farklılıklardan yararlanarak bal arısı soyları birbirlerinden ayrılmaktadır. *DraI* enzimi kesim bölgesindeki farklılıklardan yararlanarak COI-COII intergenik bölgenin restriksiyon haritası yapılmıştır.



Şekil 1. Bal arılarında COI-COII intergenik bölgenin yapısı (Cornuet *et al.* (1991) ve Moritz (1994)'den değiştirilerek çizilmiştir)

DraI restriksiyon 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 ve ark. 1993, Palmer ve ark. 2000, Franck ve ark. 2000, 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. 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 ve ark. 2001).

Bu çalışmada COI-COII intergenik bölgede *DraI* restriksiyon enzimi kesim bölgesindeki farklılıklardan yararlanarak Türkiye bal arısı popülasyonlarının tanımlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmanın materyalini Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü Arıcılık Ünitesi ve Türkiye Kalkınma Vakfı Arıcılık Ünitesinde (Kazan) saf olarak yetiştirilmekte olan çeşitli yörelere (Arda-

han, Aydın, Antalya ve Ankara) ait bal arısı populasyonları 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 (Tablo 1). Her koloniden birer tane işçi arı olmasına dikkat edilerek söz konusu işletmelerden 10-20 adet ergin işçi arı örnek olarak alınmıştır. Ergin işçi arı örneği, % 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.

Tablo1. Bal arısı örneklerinin alındığı yöreler ve örnek genişlikleri (n)

Yöreler	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
Toplam	244

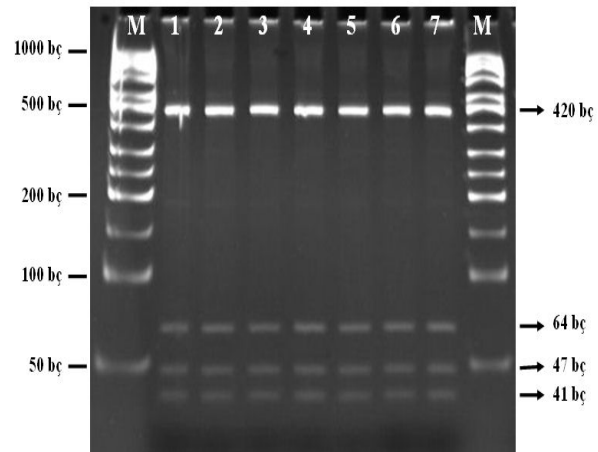
Genomik DNA izolasyonu, Hall (1990)'un tanımladığı fenol-kloroform ekstraksiyon metodu mevcut laboratuvar koşullarına göre değiştirilerek uygulanmıştır. Genomik DNA izolasyonlarının miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop ND-1000 UV Spektrofotometreden yararlanılmış ve 260/280 dalga boylarında 1.8-2.0 saflık derecesi ile miktar olarak 50 ng/μL değerinin üzerinde bulunan her bir örneğe ait DNA molekülleri PCR işlemi yapılmaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

İstenilen nitelikte DNA izolasyonu yapıldıktan sonra F, E2 5' GGC AGA ATA AGT GCA TTG 3' ve R, H2 5' CAA TAT CAT TGA TGA CC 3' primerleri ile (Garnery ve ark. 1992) COI-COII intergenik bölge PCR ile çoğaltılmış ve ardından *DraI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. PCR sıcaklık profili; 95 °C'de 1 dk., 35 döngü 92 °C'de 45 sn., 48 °C'de 45 sn., 62 °C'de 2 dk. ve 72 °C'de 5 dakika basamaklarını içermektedir. Her bir PCR reaksiyonu 2.5 μL 10 X PCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 25 nM her bir dNTP, 25 pM her bir primer ve 0.6 U *Taq* DNA polimeraz enzimi ve reaksiyonu 25 μL'ye tamamlanacak şekilde steril su içermektedir (Garnery ve ark. 1992, Franck ve ark. 2000).

COI-COII intergenik bölge PCR ile çoğaltılıp *DraI* enzimi ile kesildikten sonra elde edilen restriksiyon parçacıkları poliakrilamid jellerinde analiz edilmiştir. Bu amaçla % 10'luk poliakrilamid jelleri hazırlanmıştır. Kesim parçacıkları 50 V/cm'de 3-4 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra jel, etidyum bromür çözeltisi içinde boyanmış ve KODAK Jel Logic 200 görüntüleme sisteminde örneklerin genotipleri belirlenerek fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 2).

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bal arılarında COI ile COII genleri arasında yer alan ve daha sonraları intergenik bölge olarak adlandırılan bölgede genetik farklılığın fazla olduğu bildirilmektedir (Garnery ve ark. 1993). C genetik soyuna dahil olan bal arılarında COI-COII genleri arasındaki intergenik bölge, tRNA^{Leu} 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 3380. 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 ve ark. 1993). Daha sonraları bu bölgede DNA dizi analizi çalışmaları ile de desteklenen ve bir veya birkaç nükleotid farklılığına dayanan ilave haplotipler belirlenmiştir (Franck ve ark. 2000).



Şekil 2. COI-COII intergenik bölgede *DraI* restriksiyon enzimi kesim modellerinin % 10'luk poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi. M, Fermentas GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (SM0371); 1-7. kuyularda Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan bal arısı örnekleri

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 47/41/64/420 bp olmak

üzere 4 banttandır oluşan ve C1 olarak adlandırılan modelin elde edildiği (Şekil 2 ve 3) dolayısıyla bu bölgede *DraI* restriksiyon enzimi için 3 farklı restriksiyon noktasının var olduğu bildirilmektedir (Garnery ve ark. 1993). 47/40/64/420 bç'lik bant modeline sahip olan ve C2 haplotipi olarak ifade edilen diğer bir haplotipin, C1 haplotipinden tek bir nükleotid bakımından farklı olduğu bildirilmektedir (Şekil 3). C1 haplotipinde 3428. pozisyonda bulunan C nükleotidi, C2 haplotipinde bulunmamaktadır (Franck ve ark. 2000).

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 bç-C1; 47/40/64/420 bç-C2 ve 47/39/64/420 bç) daha önceki çalışmalarda bildirilmiş (Franck ve ark. 2000, Kandemir ve ark. 2006) diğer ikisi ise (47/41/64/419 bç ve 47/39/64/418 bç) daha önce bildirilmemiştir (Şekil 3).

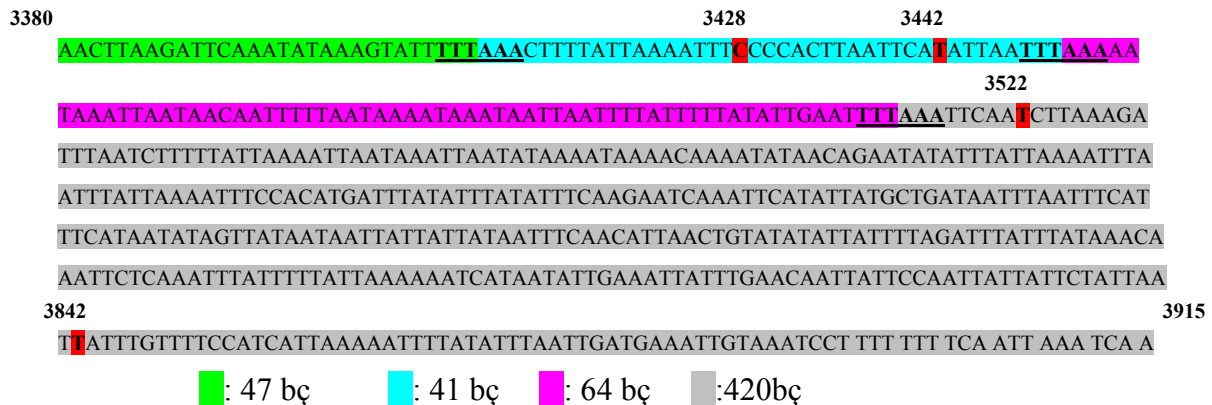
47/40/64/420 bç'lik *DraI* haplotipinde 3428. pozisyonda C nükleotidi eksilmesi tespit edilmiş ve bu nedenle 41 bç'lik parçacık 40 bç olarak hesaplanmıştır. Hakkari / Geçimli Köyü ile Ankara /Kazan /TKV'den alınan örnekler ve Van/Çatak'tan alınan 2 örnekte C nükleotidi eksilmesi belirlenmiştir.

47/39/64/420 bç'lik *DraI* haplotipinde 3428. pozisyonda C nükleotidi eksilmesine ilave olarak 3442. pozisyonda T nükleotidi eksilmesi tespit edilmiş ve bu nedenle 41 bç'lik parçacık 39 bç olarak hesaplanmıştır. İlave T nükleotidi eksilmesi, Adıyaman ve Hakkari/Geçimli Köyü'nden alınan örnekler ile referans olarak analiz edilen 2 adet İran arısı örneğinde belirlenmiştir.

47/41/64/419 bç'lik *DraI* haplotipinde 3522. pozisyonda T nükleotidi eksilmesi tespit edilmiş ve bu nedenle 420 bç'lik parçacık 419 bç olarak bulunmuştur. Aydın/Kuşadası/Davutlar'dan alınan iki örnekte T nükleotidi eksilmesi belirlenmiştir.

47/39/64/418 bç'lik *DraI* haplotipinde 3522. pozisyonda T nükleotidi eksilmesine ilave olarak 3842. pozisyonda yine T nükleotidi eksilmesi tespit edilmiş ve bu nedenle 419 bç'lik parçacık 418 bç olarak bulunmuştur. Belirtilen nükleotid eksilmesi Hakkari/Geçimli Köyü'nden alınan bir örnekte tespit edilmiştir.

Çalışılan tüm örneklerde COI-COII intergenik bölgede *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu literatürde C genetik soyu için bildirilen ve 4 banttandır oluşan model elde edilmiş ve bu sonuçla Türkiye bal arısı populasyonlarının Doğu Avrupa ve Akdeniz (C) genetik soyu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir.



Şekil 3. COI-COII intergenik bölgenin kısmi nükleotid dizi analizi. *DraI* restriksiyon enziminin tanıma dizisi (TTTAAA) altı çizili olarak gösterilmiş ve kesim sonucu elde edilen parçacıkların uzunlukları ve yerleri farklı renklerle belirtilmiştir. Nükleotid eksilmesi olan bazlar kırmızı ile işaretlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Arias, M.C. ve Sheppard, W.S., 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenetics and Evolution*, 5 (3): 557-566.
- Asal, S., Kocabaş, Ş., Elmacı, C. ve Yıldız, M.A., 1995. Enzyme polymorphism in honey bee (*Apis mellifera* L.) from Anatolia. *Turkish Journal of Zoology*, 19(2): 153-156.
- Bodur, Ç., Kence, M. ve KENCE, A., 2007. Genetic structure of honeybee, *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) populations of Turkey inferred from microsatellite analysis. *Journal of Apicultural Research*, 46(1): 60-67.
- Cornuet, J.-M. ve Garnery, L., 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22: 627- 642.
- Cornuet, J.M., Garnery, L. ve 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.
- Farshineh Adl, M.B., Gençer, H.V., Fıratlı, Ç. ve Bahreini, R., 2007. Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *J of Apicultural Res. and Bee World*, 46 (4): 225-231.

- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. and Cornuet, J.-M., 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the near east. *Apidologie*, 31: 167-180.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M. ve Cornuet, J.-M., 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86: 420-430.
- Garnery, L., Cornuet, J.-M. ve Solignac, M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1: 145-154.
- Garnery, L., 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.
- 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, 100 s. Ankara Üniversitesi, Fen. Bil. Ens. Ankara.
- Gençer, H.V. ve Fıratlı, Ç., 1999. Morphological characteristics of the central Anatolian (*A. m. anatoliaca*) and Caucasian (*A. m. caucasica*) honey bees. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23 (Supplement 1): 107-113.
- Güler, A. ve Kaftanoğlu, O., 1999. Morphological characters of some important races and ecotypes of Turkish honeybees (*Apis mellifera* L.)-I *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23 (Supplement 3): 565-570.
- Gürel, F., 1995. Kimi ana arı işletmelerindeki arıların (*Apis mellifera* L.) morfolojik özellikleri ve bunlardan hibrid ebeveyni hatları geliştirme olanakları. Doktora Tezi. 86 s. A.Ü., Fen. Bil. Ens. Ankara.
- Hall, H.G., 1990. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics*, 125: 611-621.
- Kandemir, İ. ve Kence, A., 1995. Allozyme variability in a central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie*, 26: 503-510.
- Kandemir, İ., Kence M. ve Kence, A., 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31: 343-356.
- Kandemir, İ., Kence, M. ve Kence, A., 2005. Morphometric and electrophoretic variation in different honeybee (*Apis mellifera* L.) populations. *Turkish J of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 885-890.
- Kandemir, İ., Kence, M., Sheppard, W.S. ve Kence, A., 2006. Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) population in Turkey. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 45 (1): 33-38.
- Kauhausen-Keller, D., Ruttner, F. ve 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.
- Moritz, R.F.A., Hawkins, C.F., Crozier, R.H. ve 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.
- Özdil, F., Yıldız, M.A., Meydan, H. ve Gençer, H.V. 2006. Genetic structure of Turkish honeybee populations based on RAPD and mtDNA RFLP markers. 2nd European Conference of Apidology, Prague/Czech Republic. September 10-14. p. 53.
- Özdil, F., Gedik, Y., Meydan, H., Yıldız, M.A. ve 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, Finland, June 10-14. p. 47.
- Palmer, M.R., Smith, D.R. ve Kaftanoğlu, O. 2000. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *Journal of Heredity*, 91 (1): 42-46.
- Ruttner, F., Tassencourt, L. ve Louveaux, J., 1978. Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 363-381.
- Ruttner, F., 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, 193 p., Berlin.
- Smith, D.R., Slaymaker, A., Palmer, M. ve Kaftanoğlu, O., 1997. Turkish honeybees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, 28 (5): 269-274.
- Yıldız, M.A. ve Asal, S., 1996. General Protein (P-3) Polymorphism in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Central Anatolia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 20(5): 379-381.
- 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, s. 69-73, Eskişehir.