

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

ANA ARI (*Apis mellifera* L.)'NİN YUMURTA KANALLARINDAN SPERM  
TORBASINA SPERM GÖÇÜ SÜRECİNDE SPERM REKABETİNİN  
PİROSEKANSLAMA TEKNİĞİ İLE ANALİZİ

Yasin Kahya

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. H. Vasfi Gençer

NİSAN

2017

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kurallara ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yasin Kahya

İmzası

## ONAY

Prof. Dr. H. Vasfi Gençer danışmanlığında Yasin Kahya tarafından hazırlanan bu çalışma 04/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. (Prof.) Çetin FIRATLI

İmza:

Üye: Prof. Dr. (Prof.) H. Vasfi GENÇER

İmza:

Üye: Prof. Dr. (Prof.) Aykut ÖZKUL

İmza:

Üye: Prof. Dr. (Prof.) Cengiz ELMACI

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. (Asst. Prof.) E. Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

Ana arı (*Apis mellifera* L.)'nin yumurta kanallarından sperm torbasına sperm göçü sürecinde sperm rekabetinin pirosekanslama tekniği ile analizi

Yasin Kahya

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. H.Vasfi Gençer

Bal arılarında sperm rekabetinin çiftleşmeden çok kısa bir süre sonra farklı erkek spermlerinin ana arının sperm torbasına göçü sırasında ve/veya ana arının yumurtaları dölemek için sperm kullanımı sırasında olması beklenir. Bununla birlikte, günümüz teknikleri bir kolonideki erkek ebeveyn dağılımının göç sürecindeki rekabetin mi yoksa fertilizasyon sürecindeki rekabetin mi bir sonucu olduğunu ayırt etmeyi sağlamamaktadır. Bu tez çalışmasının birinci amacı; yapay tohumlanmış ana arıların heterospermik sperm torbası içeriklerinin genotipik tanımlanmasını ve böylece sperm torbasına göç sürecinde sperm rekabetinin belirlenmesini sağlayacak pirosekanslama tekniğine dayalı bir yöntem geliştirmektir. Tez çalışmasının ikinci amacı yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinde 2 erkek ebeveyn genotipinin bulunma oranlarına semen enjeksiyon sırasının ve ana arı genotipinin (dişinin gizli seçimi) etkilerinin olup olmadığını ortaya koymaktır.

Kafkas (*A. m. caucasica*) ve İtalyan (*A. m. ligustica*) ırkı birer damızlık koloniden yetiştirilen ana arılar 2 tohumlama grubuna ayrılmıştır. Bir gruptaki Kafkas ve İtalyan ana arılar önce Kafkas (4 µl), sonra İtalyan (4 µl) erkeklerinden eşit hacimde (8 µl) toplanan semen ile, diğer gruptaki Kafkas ve İtalyan ana arılar ise önce İtalyan (4 µl), sonra Kafkas (4 µl) erkeklerinden toplanmış semen ile yapay tohumlanmıştır. Sperm torbası içeriklerinde 2 genotip oranının belirlenebilmesi için yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinden ekstrakte edilen DNA, Kafkas ve İtalyan erkeklerini ayırmayı sağlayan tek SNP bakımından pirosekanslanmıştır.

Pirosekanslama analizi verileri yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarında Kafkas spermlerinin (%69) İtalyan spermlerine (%31) göre önemli düzeyde daha fazla bulunduğunu göstermiştir ( $P < 0,05$ ). Ne ana arı genotipine ne de semen enjeksiyon sırasına göre Kafkas ve İtalyan spermlerinin sperm torbası içindeki oranları değişmiştir ( $P > 0,05$ ). Sonuçlar, göç sürecinde bir erkek arı genotipi lehine sperm rekabetinin gerçekleştiğini açıkça ortaya koymuştur.

**2017, 122 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Bal arısı, sperm rekabeti, dişinin gizli seçimi, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica*, ana arı, erkek arı, sperm torbası, SNP, DNA dizileme, pirosekanslama

## ABSTRACT

PhD Thesis

The analysis of sperm competition during migration of sperm from oviducts into spermathecae of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens by pyrosequencing technique

Yasin Kahya

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. H.Vasfi Gençer

Sperm competition is expected to occur in honey bees during migration of sperm from several drones into the spermatheca of the queen shortly after mating and/or during sperm use by the queen for fertilizing the eggs. However, present techniques do not enable to recognise whether the patriline distribution within the colony is the result of competition during migration or during fertilization process. The first aim of the study was to develop a pyrosequencing based method enabling the genotypic identity of the heterospermic contents in the spermathecae of instrumentally inseminated queens (IIQs) to detect sperm competition during sperm migration process. The second aim was to disclose whether injection order of semen and queen genotype (cryptic female choice) affect the proportions of two drone genotypes in spermathecal contents of these IIQs or not.

The Caucasian (*A. m. caucasica*) and Italian (*A. m. ligustica*) queens that were reared from one breeder colony of each subspecies were allocated into 2 insemination batches. The first batch of the virgin Caucasian and Italian queens were instrumentally inseminated with equal volumes of semen (8  $\mu$ l) collected first from Caucasian (4  $\mu$ l) and then from Italian drones (4  $\mu$ l), while the second batch of queens were inseminated with the same amount of semen collected first from Italian and then from Caucasian drones. The extracts of DNA isolated from spermathecal contents of IIQs were pyrosequenced in order to determine two genotypic proportions in each spermathecal content by using single SNP discriminating Caucasian drones from Italian drones.

Pyrosequencing analysis data demonstrated that the mean proportion of Caucasian sperm (69%) was significantly more than that of Italian sperm (31%) in spermathecae of IIQs at all events ( $P < 0.05$ ). Neither queen genotype nor injection order of semen affected the proportions of Caucasian and Italian sperm ( $P > 0.05$ ). The results clearly proved that sperm competition during migration process occurred in favour of one genotype.

**2017, 122 pages**

**Keywords:** Honey bee, sperm competition, cryptic female choice, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica*, queen, drone, spermatheca, SNP, DNA sequencing, pyrosequencing

## TEŞEKKÜR

Her bilimsel çalışma, farklı düzeyde risk, çaba, özveri, sabır, hayal kırıkları, mücadele ve odaklanma gerektirir. Doktora eğitimi boyunca bir öğrenci hepsinden bir parça tatmaktadır. Bu süreçte öğrenci yalnız değildir ve ders aşamasından bir tezin yürütülüp yazımına kadar birçok kişinin desteği bulunmaktadır. Sunulan tezin yürütülmesine de özel katkısı olan birçok değerli bilim insanı vardır. Bunların başında şüphesiz, lisans eğitimimin ilk yıllarımdan bu yana birlikte çalışma şansına sahip olduğum, tezin saha, yapay tohumlama ve yazım aşamalarında değerli katkıları bulunan sevgili hocam Prof. Dr. H.Vasfi GENÇER (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü) gelmektedir. Hocama büyük bir minnet ve şükranla teşekkür ederim.

Doktora tezinin moleküler genetik çalışmalarına yön vererek A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın moleküler genetik laboratuvarı olanaklarını kullanmamı sağlayan anabilim dalı başkanlığına, değerli görüşlerinden her zaman yararlanmaya çalıştığım Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı) ve değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem OĞUZOĞLU'na (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı) özellikle teşekkür ederim.

Tezin moleküler analizleri için alternatif yolları göstererek 24 saat ulaşılabilir olanağı bulduğum değerli bilim insanı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. E. Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü) minnet duygularımı sunmak istiyorum.

Tez çalışmasının pirosekanslama analizlerinin gerçekleştirilmesine destek veren Prof. Dr. Olcay KANDEMİR'e ve teknisyen Dilay TÜRKER'e (Dr. Abdurrahman YURTASLAN Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği), ATQ Biyoteknoloji'nin çalışanlarına, tezin saha çalışmalarına yardımcı olan Siamek HAMEDNİA'ya, Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarda bulunması olası SNP'lerin gerçek konumunun bal arısı genom veri tabanındaki adreslerini veren öğretim üyesi Dr. Amro ZAYED'e (York Üniversitesi, Kanada), tez çalışmasının bir bölümüne 1120007 nolu proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve doktora tezini değerlendiren jüri üyelerine teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN .....</b>	<b>i</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>vi</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. BAL ARISI KOLONİSİ .....	5
2.2. BAL ARILARININ TEMEL ÜREME ÖZELLİKLERİ .....	6
2.2.1. HAPLODİPLOİDLİK.....	6
2.2.2. POLİANDRİ .....	7
2.2.3. KAST FARKLILAŞMASI.....	9
2.3. ANA ARI ÜREME ORGANLARI .....	9
2.4. ERKEK ARI ÜREME ORGANLARI .....	12
2.5. BAL ARISI SEMENİ VE SPERM HÜCRESİ.....	14
2.5.1. BAL ARISI SEMENİ .....	14
2.5.2. SPERMATOGENEZ .....	15
2.5.3. SPERM HÜCRESİ.....	16

<b>2.6. DOĞAL ÇİFTLEŞME .....</b>	<b>18</b>
<b>2.7. SPERM GÖÇÜ VE SPERM DEPOLAMA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.8. CİNSEL SEÇİLİM.....</b>	<b>20</b>
2.8.1. SPERM REKABETİ .....	22
2.8.2. DişİNİN GİZLİ SEÇİMİ .....	24
<b>2.9. CİNSEL SEÇİLİM VE MOLEKÜLER GENETİK .....</b>	<b>24</b>
<b>2.10. DNA DİZİLEME.....</b>	<b>25</b>
<b>2.11. PİROSEKANSLAMA TEKNİĞİ .....</b>	<b>28</b>
2.11.1. PİROSEKANSLAMA VE HETEROPLAZMİ .....	29
2.11.2. PİROSEKANSLAMA REAKSİYONU .....	30
2.11.3. PİROSEKANSLAMA ENZİMLERİ.....	32
2.11.3.1. Klenow DNA Polimeraz .....	32
2.11.3.2. ATP Sülfürilaz.....	33
2.11.3.3. Lusiferaz.....	33
2.11.3.4. Apiraz .....	34
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u></b>	<b><u>36</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>38</b>
4.2.1. ERKEK ARI YETİŞTİRME.....	38
4.2.2. ANA ARI YETİŞTİRME .....	40
4.2.3. YAPAY TOHURLAMA.....	41
4.2.4. ERKEK ARILARIN SPERM ÖZELLİKLERİ.....	43



4.2.4.1.	Sperm Sayısı, Sperm Konsantrasyonu ve Ejakülat Hacmi .....	43
4.2.4.2.	Sperm Canlılığı .....	45
4.2.4.3.	Sperm Uzunluğu.....	48
4.2.5.	ERKEK ARILARDAN DNA İZOLASYONU .....	48
4.2.6.	SPERM TORBASI İÇERİĞİNDEN DNA İZOLASYONU .....	49
4.2.7.	TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ (SNP) TARAMASI .....	53
4.2.8.	PIROSEKANSLAMA ANALİZİ .....	55
4.2.9.	İSTATİSTİK ANALİZ .....	60
<b>5.</b>	<b><u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>61</b>
5.1.	YAPAY TOHURLAMA .....	61
5.2.	ERKEK ARILARIN ÜREME ÖZELLİKLERİ.....	62
5.3.	KAFKAS VE İTALYAN İRKINA ÖZGÜ SNP'LER .....	63
5.4.	PIROSEKANSLAMA .....	66
<b>6.</b>	<b><u>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b>72</b>
6.1.	ERKEK ARI ÜREME ÖZELLİKLERİ VE SPERM REKABETİ .....	73
6.2.	ENJEKSİYON ÖNCELİĞİNİN ETKİSİ.....	76
6.3.	Dişinin gizli seçimi ve sperm göçü .....	77
6.4.	PIROSEKANSLAMA ANALİZİNİN GÜVENİLİRLİĞİ .....	79
6.5.	SONUÇ.....	79
<b>7.</b>	<b><u>KAYNAKLAR .....</u></b>	<b>82</b>
<b>8.</b>	<b><u>EKLER.....</u></b>	<b>97</b>
<b>9.</b>	<b><u>ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>	<b>107</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bal arılarının dünya üzerinde yayılma alanı (15).....	4
Şekil 2.2. Ana arı üreme organları (78).....	10
Şekil 2.3. Sperm torbasının yapısı (83).....	12
Şekil 2.4. Erkek arı üreme organları (EPH: Endofallus, vst; vestibulum, crv; serviks, blb; soğan, ED; ejakülasyon kanalı, SV; seminal keseler, MG; mukus bezleri) (97).....	14
Şekil 2.5. Bal arısı sperminin yapısı (113). ....	17
Şekil 2.6. Cinsel seçilim kuramının unsurları .....	21
Şekil 2.7. Zincir sonlandırma işlemi için nükleotidlerin modifiye edilmesi (164).....	27
Şekil 2.8. Sanger DNA dizileme yöntemi (165).....	28
Şekil 2.9. Pirosekanslama reaksiyonu (189).....	31
Şekil 2.10. dATP- $\alpha$ -S ve dATP'nin yapısal farklılığı (194).....	34
Şekil 4.1. Ana arı ızgaralı plastik kafes içerisine alınmış erkek arı peteği.....	38
Şekil 4.2. Pupa aşamasına ulaşmış erkek arı petek gözleri .....	39
Şekil 4.3. Erkek arı markalama .....	40
Şekil 4.4. Yapay tohumlama ile oluşturulan deneme grupları .....	42
Şekil 4.5. Semen örneğinin spektrofotometre ile analizi için hazırlanması .....	44
Şekil 4.6. Sperm sayılarının tahmininde kullanılan kalibrasyon eğrisi. ....	45
Şekil 4.7. Parafin blok üzerinde sabitlenmiş bir erkek arı.....	46
Şekil 4.8. Seminal kese ve mukus bezlerinin abdomenden çıkartılması.....	46
Şekil 4.9. Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica DM3000).....	47

Şekil 4.10. Ölü (kırmızı) ve canlı (yeşil) spermlerin floresan mikroskopta görünümü.....	47
Şekil 4.11. Sperm uzunluğu ölçümü.....	48
Şekil 4.12. Floresan boyama ile farklı büyütmelelerde (20x ve 40x) çekilmiş bulaşksız sperm torbası içeriği .....	50
Şekil 4.13. Ana arının sperm torbasının çıkarılması .....	51
Şekil 4.14. Saat camına aktarılan sperm torbasının boşaltılması aşamaları .....	52
Şekil 4.15. Vakum istasyonu .....	58
Şekil 4.16. Pyromark Q24 pirosekanslama cihazı.....	59
Şekil 5.1. P bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: A, İtalyan: G).....	64
Şekil 5.2. P bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: T, İtalyan: C).....	65
Şekil 5.3. W bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: T, İtalyan: C) .....	65
Şekil 5.4. Pirosekanslama analizi sonuçlarının görüntülediği Pyromark yazılım arayüzü	66
Şekil 5.5. Pirosekanslama analizi sonunda elde edilen piklerinin görünümü .....	67
Şekil 5.6. Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkeklerine özgü SNP payları .....	68
Şekil 5.7. Sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların SNP paylarının (%) ana arı genotipine göre değişimi.....	69
Şekil 5.8. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların sperm torbası içeriklerinde SNP paylarının (%) semen toplama önceliğine göre değişim grafiği .....	70
Şekil 8.1. Erkek arı vücut dokularından izole edilen DNA agaroz jel görüntüsü .....	99
Şekil 8.2. SNP analizi için taranan J, P, T, W ve X bölgelerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: Merdiven 100-3000 bç) .....	100
Şekil 8.3. W bölgesinin pirosekanslanması öncesi gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerinden biri (Ürün büyüklüğü:204 bp, Merdiven 100-3000 bç). .....	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kafkas (K) ve İtalyan (I) ırkı erkek arılarının çekirdek DNA'sında SNP taranması için kullanılan primerler.....	54
Çizelge 4.2. DNA dizi analizinde kullanılan PCR komponentleri ve konsantrasyonları....	54
Çizelge 4.3. Erkek arıların DNA dizi analizi için gerçekleştirilen PCR koşulları .....	55
Çizelge 4.4. Pirosekanslama analizinde kullanılan primerler.....	55
Çizelge 4.5. Pirosekanslamada kullanılan PCR komponentleri ve konsantrasyonları .....	56
Çizelge 4.6. Pirosekanslama analizinin PCR koşulları.....	56
Çizelge 4.7. Örnek başına bağlanma karışımı solüsyonunun içeriği.....	57
Çizelge 4.8. Her bir örnek başına pirosekanslama karışımı içeriği .....	58
Çizelge 4.9. Validasyonda kullanılan Kafkas ve İtalyan DNA'sı karışım oranları (%).....	59
Çizelge 5.1. Yapay tohumlanmış ana arıların yumurtlama süreleri (gün).....	62
Çizelge 5.2. Kafkas ve İtalyan ırkından erkek arıların canlı ağırlık (mg), ejakülat hacmi (µl), sperm sayısı, sperm konsantrasyonu (milyon/µl), sperm canlılığı (%) ve sperm uzunluğuna (µm) ilişkin tanımlayıcı değerleri .....	63
Çizelge 5.3. Yapay tohumlamada her 4 µl semen toplamak için kullanılan erkek arı sayısı* .....	63
Çizelge 5.4. Kafkas ve İtalyan ırkı bal arılarının ayırımını sağlayan SNP'ler .....	64
Çizelge 5.5. Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı belirteç SNP'in payları (%).....	68
Çizelge 5.6. Sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların SNP paylarının (%) ana arı genotipine göre değişimi .....	69
Çizelge 5.7. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların sperm torbası içeriğindeki SNP paylarının (%) semen toplama önceliğine göre değişimi.....	70

Çizelge 5.8. Farklı oranlarda karıştırılan Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların DNA'ları ve pirosekanslama analizinde gözlenen SNP oranları (%).....	71
Çizelge 8.1. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların vücut dokularından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıkları .....	97
Çizelge 8.2 Kafkas ve İtalyan ırkı ana arıların sperm torbalarından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıklarına ilişkin veriler .....	98
Çizelge 8.3. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arı DNA'ları karışımların pirosekanslama analizi sonuçları .....	102
Çizelge 8.4. Sperm torbasının pirosekanslama analizinde gözlenen SNP oranları .....	103



## SİMGELER DİZİNİ

Kafkas	K
İtalyan	İ
MKS	Modifiye Kiev Solüsyonu
$\mu\text{g}$	Mikrogram
ng	nanogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
bç	Baz çifti
dk	Dakika
sn	Saniye
ms	Metre/saniye
HGV	Hymenoptera Genom Veritabanı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
rpm	Dakikadaki devir sayısı
DMSO	Dimetil sülfoksit
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
kDa	Kilodalton
PPi	Pirofosfat
PI	Propidiyum İyodid

## 1. GİRİŞ

Dünya üzerinde  $8,7 \pm 1,3$  milyon türün var olduğu tahmin edilmektedir (1). Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (The International Union for Conservation of Nature)'nin 2014 yılı raporuna göre, tanımlanmış türlerin (yaklaşık 1,7 milyon) % 60'a yakını böcekler (yaklaşık 1 milyon) oluşturmaktadır (2). Böcekler dünyası içerisinde biyolojik ve ekolojik özelliklerinin fazlalığıyla dikkat çeken Hymenoptera takımına ait (Hymenoptera) türlerin ilginç sosyal yaşam öyküleri vardır. Başta arılar olmak üzere, testere sinekleri, karıncalar ve vaspları içeren zarkanatlı takımı; insan sağlığını ve tarımsal faaliyetleri, yararlı (tozlaştırıcı), zararlı ve parazitoid olarak çeşitli şekillerde etkilemektedir. Hymenoptera takımında tanımlanmış 115 bin'in üzerinde tür bulunmaktadır (3) ve tanımlanan her 9 böcekten birisi bu grupta yer almaktadır.

Hymenoptera takımının ekolojik ve ekonomik bakımdan en önemli üyesi batı bal arısı (*Apis mellifera* L.)'dir. Bal arıları tozlayıcı ajan olarak bitkilerin üremelerinde etkin rol almaktadırlar. Bu nedenle küresel ekoloji ve tarımsal faaliyetler için önemli ve gereklidirler. Bal arısından elde edilen ürünlerdeki çeşitlilik (bal, balmumu, polen, propolis, arı sütü, ve arı zehri), arıcılığı dünyada en yaygın yapılan böcek yetiştiriciliği haline getirmiştir. FAO verilerine göre (4) günümüzde dünya üzerinde 83 milyonun üzerinde bal arısı kolonisi ile arıcılık yapılmaktadır.

Bal arıları birçok bilimsel çalışmanın canlı materyali olmuş ve bazı bilim disiplinleri için model organizma olarak kabul edilmiştir. Bal arılarının ilk başta sergiledikleri sosyal davranışlar ilgi çekmektedir. Bal arılarının üyesi oldukları gerçek sosyal böceklerin yaşam özelliklerinin genetik ve epigenetik temellerini oluşturan sosyogenler artık bilinmeye başlamıştır. Özellikle bal arısı genom projesinin yayınlanmasından sonra; koloni yaşamının düzenlenmesine ilişkin işbölümü, koloni bireylerinin yaşam süreleri, üreme ile ilişkili genler ve bu özellikleri düzenleyen moleküler mekanizmaların tanımlanma hızı artmıştır. Böylece bal arıları sosyogenomik çalışmalar için bir model organizma haline gelmiştir.

Bal arıları sahip oldukları temel üreme özellikleri nedeniyle de önemli bir model organizmadır. Bal arılarının bu özelliklerinden; haplodiploidlik, partenogenetik üreme, erkekler lehine cinsiyet dengesizliği, ana arıların birden çok erkek arı ile çiftleşmesi

(poliandri), erkek arıların çiftleşme sırasında ölmesi (monogami), spermilerin ana arının sperm torbasında yıllarca canlı kalması ve yumurtaların döllenesinde stok sperm kullanılması gibi üreme özellikleri ilk akla gelenlerdir. Literatür incelendiğinde cinsel seçim kuramının yoğunlukla Hymenoptera takımında yer alan sosyal böceklerde, özellikle de bal arılarında araştırılan bir konu olduğu görülür (5, 6). Bu nedenle bal arısı çiftleşme biyolojisinin özel konularından olan cinsel seçim kuramını tartışmaya olanak veren kapsamlı veri ile karşılaşılmaktadır (7-10).

İlk kez Darwin tarafından tartışılan cinsel seçim kuramı günümüzde çok disiplinli olarak çalışılan sosyobiyojoloji konusudur. Cinsel seçim; kısaca bir türün bireyleri arasında çiftleşme öncesi ve sonrası dönemde gerçekleşen üreme rekabetidir. Çiftleşme öncesi dönemde gerçekleşen cinsel seçim; dişi ile çiftleşmek için erkekler arasındaki rekabet (intraseksüel seçim) ve dişinin çiftleşeceği erkeği seçmesi (interseksüel seçim) olmak üzere iki unsurdan oluşmaktadır. Bu tezin konusu olan çiftleşme sonrası dönemdeki cinsel seçimin unsurları ise sperm rekabeti ve dişinin gizli seçimidir.

Çiftleşme sonrasında dişinin üreme kanallarında farklı erkeklerin spermeleri arasındaki yarış, sperm rekabeti olarak adlandırılır (10). Çok erkek eşli türlerde sperm rekabetinin sperm torbasına sperm göçü (inseminasyon rekabeti) ve yumurtaların döllenesi için sperm torbasından sperm salımı (fertilizasyon rekabeti) sırasında olmak üzere iki aşaması vardır. İnseminasyon aşamasındaki sperm rekabeti farklı erkeklerin spermelerinin yumurta kanallarından sperm torbasına göçü sürecinde gerçekleşmektedir. Fertilizasyon aşamasındaki sperm rekabeti ise sperm torbasından salınan spermelerin yumurtayı dölleme yarışıdır. Dişinin gizli seçimi ise yumurta hücrelerini dölleyecek/döllemeyecek sperm için dişi tarafından manipüle edilmesi ya da belirlenmesi olarak tanımlanabilir (11).

Bir bireyin üreme başarısının ölçütünün döl sayısı olması, cinsel seçim araştırmalarının yavrularda gerçekleştirilmesine yol açar. Bu nedenle bal arılarında da cinsel seçim çalışmaları bir koloniyi oluşturan ana arının dölllerinde (işçi arılarda) erkek ebeveynlerin belirlenmesi yoluyla yürütülmektedir. Moleküler tekniklerin bilinmediği dönemlerde işçi arıların fenotipik varyasyonu (12, 13) kullanılarak erkek ebeveynleri belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hızlı ve ucuz olmasına karşın ebeveyn testlerinde kullanılabilen fenotipik özelliklerin azlığı, bu fenotipik özelliklerin kullanım potansiyelini

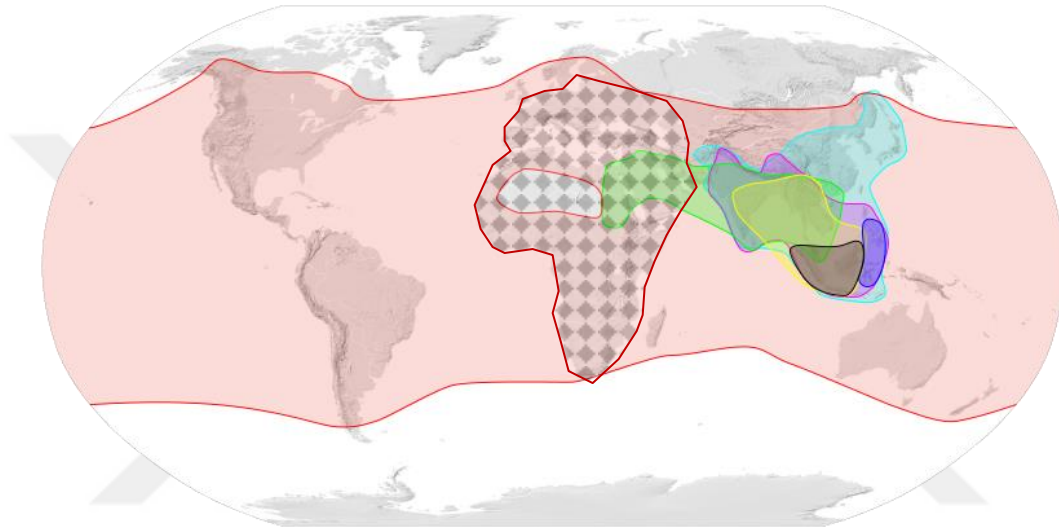


sınırlandırmaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesine bağlı olarak ebeveyn testleri de kolaylaşmıştır. Çalışılan tür ister tek ister çok eşli olsun günümüzde ebeveyn testlerinde rutin olarak mikrosatellit DNA varyasyonundan yararlanılmaktadır. Çok erkek eşli türlerde, mikrosatellit DNA analizlerinden elde edilen veriler kullanılarak alt aile frekansları hesaplanmaktadır. Alt aile frekanslarında bir ya da birkaç baba lehine önemli sapmaların varlığı çiftleşme sonrası dönemdeki sperm rekabeti ve/veya dişinin gizli seçimi mekanizmasının göstergesidir. Ancak potansiyel olarak sperm rekabeti; inseminasyon ya da fertilizasyon aşamasında olabileceği gibi her 2 aşamada da gerçekleşebilir. Çok erkek eşli türlerde erkek ebeveynlerin döl frekansları hem inseminasyon hem de fertilizasyon aşamasında olası sperm rekabetinin etkisi ile ortaya çıkar. Dişinin gizli seçimi olgusunun potansiyel varlığı da dikkate alınırsa işçilerde babalık testi sonuçlarından yola çıkarak cinsel seçim olgusu doğru tartışılmaz. Sonuç olarak deneysel çalışmalarda olası cinsel seçim ve sperm rekabetinin aşamalarını birbirinden ayırarak araştırmak gereklidir. Şimdiye kadar yapılan deneysel araştırmalarda sadece inseminasyon rekabetini ortaya çıkarabilecek bir yöntem geliştirilmemiştir. Bu tez çalışmasının konusu sperm göçü sürecinde sperm rekabetinin varlığını test edebilmeye yarar bir yöntem geliştirmektir.

Cinsel seçim-sperm rekabeti araştırmalarında genellikle izlenen yol/uygulanan yöntem sınırlı sayıda örneklenmiş döllerin mikrosatellit DNA analizidir. Bu araştırmada, döller yerine sperm torbası içeriğinin tamamının kitlesel olarak analizini sağlayan, böylece potansiyel erkek ebeveynlerin sperm torbası içeriğindeki paylarını daha doğru tahmin etmeyi sağlayan bir yaklaşım geliştirilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Bal arıları ekonomik ve ekolojik önemi büyük canlılardır. Dünya üzerinde çoğunluğu Güney Doğu Asya'da doğal yayılma alanı gösteren 9 bal arısı (*Apis*) türü (Mikrapis: *A. andreniformis*, *A. florea*, Megapis: *A. dorsata*, *A. laboriosa*, Apis: *A. mellifera*, *A. cerena*, *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis*) bulunmaktadır (14). Ancak bunlardan sadece Batı bal arısı (*Apis mellifera* L.) doğal yayılma alanı dışında da yaygın olarak yetiştirilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bal arılarının dünya üzerinde yayılma alanı (15).<sup>1</sup>

Batı bal arısı (*Apis mellifera*) geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Afrika, Asya ve Avrupa'nın çeşitli habitatlarında evrilmiş bu türün, morfolojik, moleküler, davranış ve fizyolojik özellikler bakımından birbirinden farklılaşmış çok sayıda alttürü (coğrafi ırklar) bulunmaktadır. Batı bal arısında gözlenen bu çeşitliliğin büyük ölçüde yaşadığı geniş coğrafyaya uyumun bir sonucu olduğu saptanmış ve sadece doğal seleksiyonun etkisi ile farklılaşmış/çeşitlenmiş alttürleri doğal ırklar ya da coğrafik ırklar olarak adlandırılmıştır (16, 17). Batı bal arısı alt türleri; Tropikal Afrika (A), Batı Akdeniz ve Kuzey Avrupa (M), Orta Akdeniz ve Güney Doğu Avrupa (C) ve Yakın ve Orta Doğu (O) olmak üzere 4 morfo-genetik soya ayrılmaktadır (16). Yakın geçmişte gerçekleştirilen SNP çalışmaları

---

<sup>1</sup> Kare dolgu desenli alan batı bal arısının (*Apis mellifera* L.) doğal yayılma alanını, kırmızı ile işaretlenmiş alan ise batı bal arısının günümüzdeki yayılma alanını göstermektedir. Diğer renkler ile işaretlenen alanlar ise diğer bal arısı türlerinin yayılma alanlarını göstermektedir. Harita üzerinde 7 bal arısı alt türü işaretlenmiştir.

(18-20) ile doğruluğu desteklenen bu sınıflandırmaya göre; Türkiye bal arısı popülasyonları (*A. m. caucasica*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. meda*, *A. m. syriaca*) O morfogenetik soyu içinde yer almaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesine paralel olarak sınıflandırmaya yönelik araştırmaların çoğalması morfo-genetik gruplandırmanın güncellenmesini sağlamıştır. Nitekim, morfo-genetik sınıflandırmaya göre O soyunda yer alan Yemen bal arısı (*A. m. jemenitica*)'nın bu gruptan ayrılmasının ve 5. soy (Y)'un temsilcisi olmasının daha doğru olacağı sonucuna ulaşılmıştır. Bu saptamanın ardından (21) yapılan çalışmalara dayanılarak batı bal arısının (*Apis mellifera* L.) günümüzde 5 soya dağılmış 27 alttürünün (coğrafi ırk) bulunduğu bildirilmektedir (22-24). Batı bal arısı ırklarından 4'ü ise ekonomik önemi olan ırklar olarak kabul edilir. Bunlar sırasıyla; Kafkas arısı (*A. m. caucasica*), Karniyol arısı (*A. m. carnica*), Avrupa Esmer arısı (*A. m. mellifera*) ve İtalyan arısı (*A. m. ligustica*)'dır (25).

Avrupa, Asya ve Ortadoğu'nun kavşağında bulunan ve farklı iklim özellikleri gösteren Anadolu büyük bir biyoçeşitliliğe sahiptir (26). Bu biyoçeşitlilik Anadolu'da doğal yayılım gösteren bal arısı popülasyonlarına da (coğrafi ırklara) yansımıştır. Günümüzde Anadolu'da Kafkas, Anadolu ve İran bal arısı alttürleri ve bunların ekotipleri egemendir (16, 17, 27, 28).

## **2.1. BAL ARISI KOLONİSİ**

Bir bal arısı kolonisi; bir ana arı ve bunun kısır-dişi dölleri olan işçi arılar ve erkek arılardan oluşan sosyal bir topluluktur. İleri derecede iş bölümünün gerçekleştiği çok sayıda bireyden oluşan bu topluluk tek bir organizma gibi hareket eder ve süperorganizma olarak adlandırılır. Koloninin büyük kitlesini oluşturan işçi arıların sayısı mevsimlik olarak birkaç binden 60 bin'e kadar değişim gösterir. Erkek arılar ise sadece üreme mevsiminde birkaç bin civarında yetiştirilen iri yapılu bireylerdir.

Normal koşullarda her kolonide tek olan ana arı, koloni içerisinde yumurtlama faaliyetini tekeline almış koloninin en önemli bireyidir. Koloni üyeleri arasında en uzun yaşam süresine sahip olan ana arı (ortalama 2-3 yıl), döllenmiş ve döllenmemiş yumurta yumurtlayabilme yeteneğindedir (29, 30). Ana arının sağlık, morfoloji ve çiftleşme kalitesi hem kendisinin hem de koloninin üreme ve yaşam süresini etkileyen önemli faktörlerdir (31-35). Ana arının üreme özelliklerindeki herhangi bir olumsuzluk işçi arılar tarafından

algılanabilmektedir. Böylece düşük kaliteli ana arı işçi arılarca değiştirilerek kolonide üreme faaliyetini sürdürecektir genç ana arı(lar) yetiştirilmektedir (36).

Gelecek nesli oluşturacak bireylerin bakım ve beslenmesi işçi arıların sorumluluğundadır. Çok az sayıda (2-12) yumurta tüpünden oluşan gelişmemiş yumurtalıklar ve dejenere olmuş sperm torbası bulunmasına karşın, işçi arılar çiftleşebilme yetenekleri olmadığı için kısırdirler. Ana arı salgıladığı feromonlar aracılığı ile işçi arıların yumurtalıklarını baskılamaktadır. Böylece işçi arı yumurtalıklarında programlanmış hücre ölümü mekanizması tetiklenmektedir. İşçi arılar larva aşamasındaki yavru bakım ve beslemesinin yanı sıra, ana arının bakımı, koloni içi ortamın düzenlenmesi, balmumu salgılama ve petek örme, nektarı olgunlaştırarak bala dönüştürme, koloniyi savunma, nektar ve polen toplama (tarlacılık) gibi birçok faaliyetin yürütülmesini üstlenirler. İşçi arıların yaşam süreleri ilkbahar ve yaz ayları için 3-6 hafta, kış mevsiminde 3- 4 aydır (29).

Erkek arılar koloni içerisinde üremenin yoğunlaştığı dönemde (ilkbahar ve yaz) bulunurlar. İşçi arı sayısı bakımından belirli güce ulaşan kolonilerde erkek arı yetiştiriciliği, uygun mevsim, besinlerin varlığı ve kolonide bulunan erkek arı yavrusu (larva-pupa) miktarı gibi çeşitli çevre faktörlerinin etkisi altında düzenlenmektedir (37). Erkek arıların üreme faaliyeti dışında koloni içi işlere herhangi bir katkısı yoktur ve genel olarak ilkbahar ve yaz aylarında yaşamlarını 40-60 günde tamamlarlar (30).

## **2.2. BAL ARILARININ TEMEL ÜREME ÖZELLİKLERİ**

### **2.2.1. HAPLODİPLOİDLİK**

Haplodiploidlik Hymenoptera takımının tüm üyelerinde görülen cinsiyet belirleme mekanizmasıdır. Bu üreme mekanizmasına sahip türlerde yumurtanın döllenip döllenmemesine bağlı olarak bireyin cinsiyeti belirlenmektedir. Eşsiz üremenin doğal bir formu olan partenogenez; döllenmemiş yumurtadan embriyonun ve sonucunda bireyin gelişmesidir. Partenogenetik üremenin ise arhenotoki ve telitoki olmak üzere iki formu vardır (38). Hymenoptera'da partenogenetik üremenin arhenotoki formu görülür. Arhenotoki'ye sahip türlerde döllenmiş yumurtalardan dişi kastlar (ana arı ve işçi arı), döllenmemiş yumurtalardan ise erkek bireyler oluşmaktadır. Erkek arılar haploid oldukları

için ana arı genomunun rasgele yarısını içeren kromozom setine sahiptirler. Bu nedenle bir erkek arının ürettiği spermier oozomal hücrelerin klonlarıdır.

### 2.2.2. POLİANDRİ

Cinsel seçilimin temelini oluşturan çiftleşme sistemleri; bir ya da birkaç üreme sezonunda dişi ya da erkek bireyin karşı cinsten kaç birey ile çiftleştiğini belirten bir kavramdır. Çiftleşme sistemlerinden biri olarak poliandri; bir üreme sezonunda bir dişinin birden fazla erkek ile çiftleşmesidir.

Doğada bir dişinin birden çok erkek ile çiftleşmesi; (1) en iyi erkeğin belirlenmesindeki zorluklar, (2) materyal kazançları (besinsel hediye vb), (3) erkekleri elde etme maliyetinden kaçınma, (4) daha fazla sperm gereksinimi, (5) genetik uyum sorunları (akrabalık dejenerasyonu), (6) en iyi erkeğe erişim zorlukları ve (7) yavrularda genetik çeşitliliğin sağladığı yararlar (adaptasyon) nedenleriyle gerçekleşmektedir (39). Çok erkek ile çiftleşmenin sağladığı avantajlara ilişkin yukarıda verilen 7 genel maddeden ilk 3'ü sosyal böceklerde görülen poliandrinin gerekçeleri olarak kabul edilebilir gözükmemektedir. Daha fazla sperm gereksinimi, yavrularda genetik çeşitliliğin avantajları ve genetik uyum sorunları sosyal böceklerdeki çok erkek eşlilik için kabul edilebilir gerekçelerdir (5, 39-41).

Dişilerin fazla sperm gereksinimi çok erkek eşliliğin önemli gerekçelerinden birisidir. Sosyal böceklerde koloni büyüklüğü erkek ebeveyn sayısı ile pozitif ilişkilidir (42). Geniş koloniler kuran kraliçelerin yeterli spermi elde edebilmek için birden fazla erkek ile çiftleşmeleri gerekmektedir (43-45). Diğer yandan sosyal böcek dişilerinin fazla sperm gereksinimi; çiftleşmelerin kısa süreli ve belirli bir zaman diliminde gerçekleşmesi, sperm depolama organında yeteri kadar sperm depolanabilmesini ve gelecekte sperm torbasındaki stok kullanılarak binlerce bireyin üretilebilmesini garanti altına almak içindir (39).

Sosyal Hymenoptera'da poliandri olgusunun ortaya çıkmasının gerekçeleri arasında en çok desteklenen kuram koloni içinde genetik varyansın artırılması kuramıdır (46, 47). Yavrularda yüksek genetik çeşitliliğin kimi avantajlarının bulunduğu bilinmektedir. Sosyal böceklerde döller arasındaki genetik çeşitlilik; hastalıklara (41, 48-51) ve parazitlere

direnci (41, 52), farklı görevlerin (iş bölümü) yerine getirilmesini (53-55), koloni üretkenliğini (56, 57) ve çevre değişimlerine toleransı (58) sağlamaktadır.

Sosyal Hymenoptera'da çok erkek eşliliğin gerekçelerinden birisi de cinsiyetlerin tamamlayıcı cinsiyet mekanizması ile cinsiyetlerin belirlenmesidir (40, 59). Hymenoptera takımında cinsiyet kromozomları yoktur ve cinsiyet, tamamlayıcı cinsiyet belirleme (CSD) geni allellerinin heterozigot, homozigot ve hemizigot olması durumu ile belirlenir (60-63). Tamamlayıcı cinsiyet geninin 87 alleli tanımlanmıştır (61). Bu genin allelleri bakımından heterozigot yumurtalar dişi birey olarak gelişmektedir. Bir yumurta cinsiyet belirleme lokusu bakımından homozigot ise erkek olmaktadır (diploid erkekler). Haploid yapıdaki erkeklerin aksine diploid erkek bireyler kısır dırlar ve yumurtadan larva olarak çıkışta bakıcı işçi arılar tarafından imha edilerek gelişimleri sonlandırılmaktadır. Çok erkek ile çiftleşme, hem diploid erkeklerin üretimini hem de bu erkeklerin larva döneminde işçiler tarafından belirlenip yok edilme maliyetini azaltmaktadır (40, 64, 65). Dolayısıyla bir kolonide cinsiyet allelerinde görülen genetik çeşitlilik koloninin yaşam süresini etkileyen önemli unsurlardan birisidir.

Çok erkek eşliliğin koloni yapısına önemli etkileri vardır. Poliandrinin bir sonucu olarak koloni içerisinde genetik çeşitliliğin artması, farklı babaların döllerinin bir arada bulunmasına neden olmaktadır. Bir bal arısı kolonisi; ana arının birden çok erkek arı ile çiftleşmesi sonucunda ana bir baba ayrı üvey kız kardeş gruplarından oluşan bir süper ailedir (66-68). Bir kolonideki alt aile sayısı ana arı ile çiftleşen erkek arı sayısı kadardır. Ancak alt aileleri oluşturan birey sayısında (alt aile büyüklüğünde) önemli farklılıklar bulunabilmektedir (68, 69). Ana arı ile çiftleşen erkek arıların ana arının sperm torbasına katkısındaki eşitsizlik (farklılık) alt aile frekansını etkilemektedir. Örneğin, semen hacmi ve sperm sayısı diğerlerine göre fazla olan erkek arıların döl frekansları da fazla olmaktadır (70).

Polinadrinin alternatifi olarak bazı sosyal böcek kolonilerinde poligini yolu ile koloni içi genetik çeşitlik artırılmaktadır. Örneğin; bazı birden fazla kraliçeli karınca türlerinde döllere babalık eden erkek birey sayısı ile koloni içerisindeki kraliçe sayısı arasında negatif ilişki vardır (71, 72).

Çok erkek eşlilik türlerin sperm özelliklerini de etkileyebilmektedir. Sperm uzunluğu ile poliandri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada karınca ve arı türlerinde erkek ebeveyn frekansları incelenmiştir. Çok erkek eşliliğin görüldüğü türlerin erkeklerin sperm uzunluklarında gözlenen varyasyonun az sayıda erkek ile çiftleşen türlerin erkeklerinde gözlenen varyasyondan düşük olduğu, yani poliandri olgusunun sperm uzunluğundaki varyasyonu azalttığı saptanmıştır (73).

### 2.2.3. KAST FARKLILAŞMASI

Sosyal Hymenoptera'da kastlar, bir kolonide farklı işlevleri olan dişi formları ifade etmektedir. Kast farklılaşması aynı genom yapısına (2n) sahip dişi bireylerin ana arı ya da işçi arı olarak gelişmesidir. Erken larva döneminde larvaların buldukları petek gözlerine göre (işçi arı petek gözü ve ana arı yüksüğü) farklı diyetler ile beslenmeleri kast farklılaşmasının temel nedenidir (30). Kolonide larvaların bakım ve beslenmesinden sorumlu işçi arıların mandibula ve hipofarinks bezlerinin salgılarının bileşim ürünü olan arı sütünün içeriği ve larva beslenmesinde kullanılan miktar bu süreçte önemli rol oynamaktadır (74, 75). Ana arı olarak yetiştirilecek larvalar larva dönemi boyunca bakıcı işçi arılar tarafından zengin içerikte ve bol miktarda arı sütü ile beslenir. İşçi arı petek gözlerindeki larvalar ise ilk 3 gün boyunca azalan miktarda yavru besini ile sonraki larva döneminde ise bal ve polen karışımından oluşan diyet ile beslenirler. Larva diyetlerindeki bu farklılık ana arı ve işçi arılara özgü doku ve organların gelişimini tetikler.

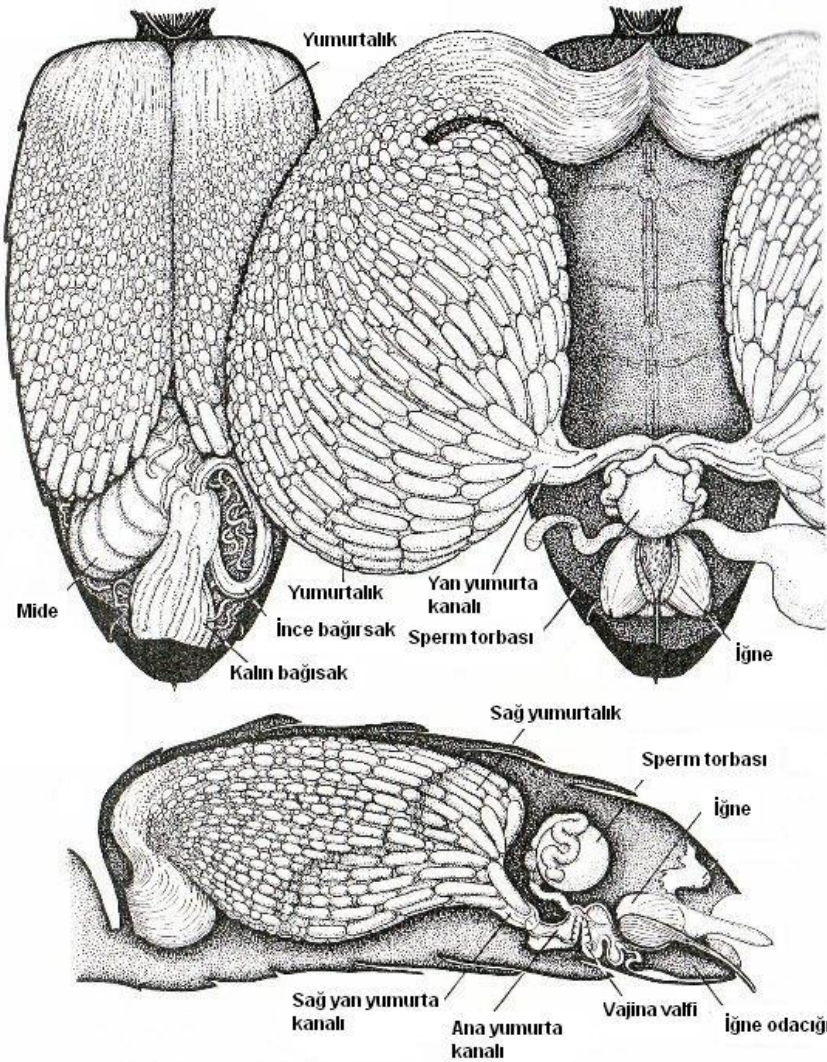
### 2.3. ANA ARI ÜREME ORGANLARI

Ana arı üreme organlarının temel işlevleri yumurta üretmek ve çiftleşme sırasında erkek arılardan alınan spermleri sperm torbasında yaşamı boyunca canlı tutmaktır. Ana arı üreme organları; abdomenin dorso-lateralinde bulunan bir çift yumurtalık, her bir yumurtalığın açıldığı bir yan yumurta kanalı, yan yumurta kanallarının birleşmesinden oluşan bir ana yumurta kanalı ve vaginaya açılan bir sperm torbasından (spermateka) oluşmaktadır (76). Ana arı üreme organları iğne odacığı ile vücut dışına açılmaktadır. Vajinadan sonraki kısım *Bursa copulatrix* olarak isimlendirilir (Şekil 2.2).

Her bir yumurtalık; yüzden fazla (100-180) yumurta tüpü (ovariol) içeren (77) meroyistik politrofik yumurtalık tipinde organlardır (Şekil 2.2). Yumurtalık; terminal kısım,



germaryum ve vitallariumdan oluşur. Yumurta tüpleri içerisinde silsile halinde yumurtayı besleyen besleyici hücreler ve bunlara bağlı yumurtalar bulunmaktadır. Yumurta tüpleri içerisinde yumurta yan yumurta kanallarına doğru ilerledikçe besin hücreleri küçülür ve en sonunda yok olur. Her bir yumurta tüpü kaliks denilen yapı ile yan yumurta kanallarına açılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ana arı üreme organları (78)

Yumurtalıklar ana arı yüksükten ergin olarak çıktığı dönemde gelişmemiş durumdadır ve cinsel olgunlaşma dönemi boyunca aktif değildir. Ana arının yumurtalıkları, çiftleşme/çiftleşmeler tamamlandıktan sonra gelişir ve abdomenin büyük bir bölümünü kaplayarak canlı ağırlığın yaklaşık %25'ini oluşturur (79). Yumurtalıklar ana arının koloni gereksinime bağlı olarak gerçekleştirdiği yumurtlama faaliyetine göre gelişip büyüme-

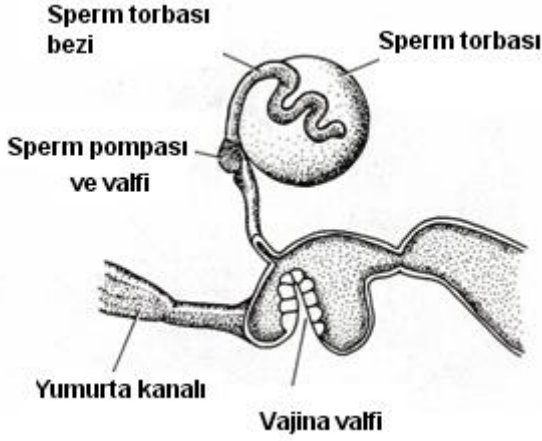


küçülme yeteneğine sahiptir. Dolayısı ile farklı yumurtlama hızının sergilendiği mevsimlerde ana arının yumurtalıklarının büyüklüğü de farklıdır (80). Her bir yumurta tüpü içerisinde günde 5-7 kadar yumurta üretilebilmektedir. Bir ana arının yılda 200.000 yumurta yumurtladığı tahmin edilmektedir (30, 76).

Yan yumurta kanallarının etrafı kaslarla çevrilidir ve genişleyebilme yeteneğine sahip olduğu için çiftleşmeden sonra geçici sperm depolama organı olarak görev yapar. Ana yumurta kanalı 0.3 mm genişlikte (yumurtanın kalınlığı 0.35 mm), 0.9 mm uzunlukta daha kaslı bir kanaldır. Ana yumurta kanalının *Bursa copulatrix*'e açılan bölümünün etrafı bir sfinkter ile çevrelenmiştir ve yumurtanın yumurtlanması aşamasında ana yumurta kanalını daraltan bu yapının uyguladığı basınç embriyonik gelişimi tetiklemektedir (81).

Sosyal böceklerde spermin uzun süreli depolanması önemli bir gerekliliktir. Sperm torbası (spermateka); spermin uzun süreli depolanmasına olanak verecek biçimde özelleşmiş dişi üreme organıdır (Şekil 2.3). Sperm torbası vaginanın üzerinde yer alan yaklaşık 1mm<sup>3</sup> hacimde (79) küresel yapılı bir kesedir. Sperm torbasının çapı 0.7-1.3 mm arasında değişmektedir. Sperm torbasının epitelyum doku kalınlığı 27-30 µm'dir ve ana arı yaşının artmasıyla kalınlığı artmaktadır (1 yaşlı ana arılarda 60 µm). Sperm torbasının üzeri trake ağı ve bir çift tüp yapıda sperm torbası bezi ile kaplıdır. Sperm torbası, sperm salınımını kontrol eden kaslarla çevrili Breslau sperm pompası ve valfi bulunan bir kanal ile vaginaya açılmaktadır (Şekil 2.3) (76). Sperm torbasının epitel dokusu organik iyonların geçişine izin vermektedir (82).

Sperm torbasının etrafını saran trake ağının sperm torbası lumeni ile bir bağlantısı yoktur. Sperm torbasının yan-ön kısmında trake ağı farklılaşarak 1 çift sperm torbası bezini oluşturmuş ve uzun kıvrımlı bir yapı oluşturarak hem torba hem de kanal ile bağlantılı hale gelmiştir. Sperm torbası bezleri S yapıdadır ve spermlerin sperm torbasından salımı sırasında spermin aktivasyonunda rol aldıkları düşünülmektedir.



Şekil 2.3. Sperm torbasının yapısı (83)

Sperm torbası üzerindeki pompa ve valf aracılığı ile sperm salımı kontrol edilerek yumurtanın döllenişmesi için benzer sayıda sperm çıkışı sağlanmaktadır. Bir yumurtanın döllenişmesi için ana arının sperm torbasından salınan sperm sayısı için farklı (1-100 sperm) bildirişler vardır (84, 85). Spermiler yumurtanın mikrofilinden yumurta içerisine giriş yapmaktadır. Spermilerin yumurta içerisine girişinden en fazla 15 dk sonra döllenişmenin gerçekleştiği tahmin edilmektedir (85). Bir ana arının yaşamı boyunca 1.5 milyon yumurtayı dölleme kapasitesinde olduğu tahmin edilmektedir (86).

#### 2.4. ERKEK ARI ÜREME ORGANLARI

Erkek arı üreme organları; 1 çift testis, 1 çift vas deferens, 1 çift seminal kese (*Vesicula seminalis*), 1 çift mukus bezi, ejakülasyon kanalı (*Ductus ejaculatorius*) ve çiftleşme organı (endofallus)'nından oluşmaktadır (87, 88).

Testisler, sperm hücrelerinin üretiminin gerçekleştiği testiollerin birleşiminden oluşan, yassı organlardır. Her bir testis içinde 200 civarında testiol bulunur (88). Testislerin büyüklük ve şekilleri erkek arı yaşına göre değişmektedir. Erkek arılar petek gözlerinden ergin olarak çıktıkları dönemde testisleri yapı olarak en gelişmiş durumdadır (0 günlük yaş) ve abdomenin büyük bir kısmını kaplamaktadır. Ancak ergin olarak çıkıştan sonra testisler dejenere olmakta ve büyüklükleri cinsel olgunlaşma süreci ve sonrasında sürekli azalarak yeşilimsi sarı bir renk (Şekil 2.4) almaktadır (76, 89-91).

Her bir testisin testiolleri bir odacığa, bu odacıktan da *Vas deferens*'e açılmaktadır. Vasdeferens, testisi seminal keseye bağlayan kıvrımlı bir kanaldır. Sperm hücreleri

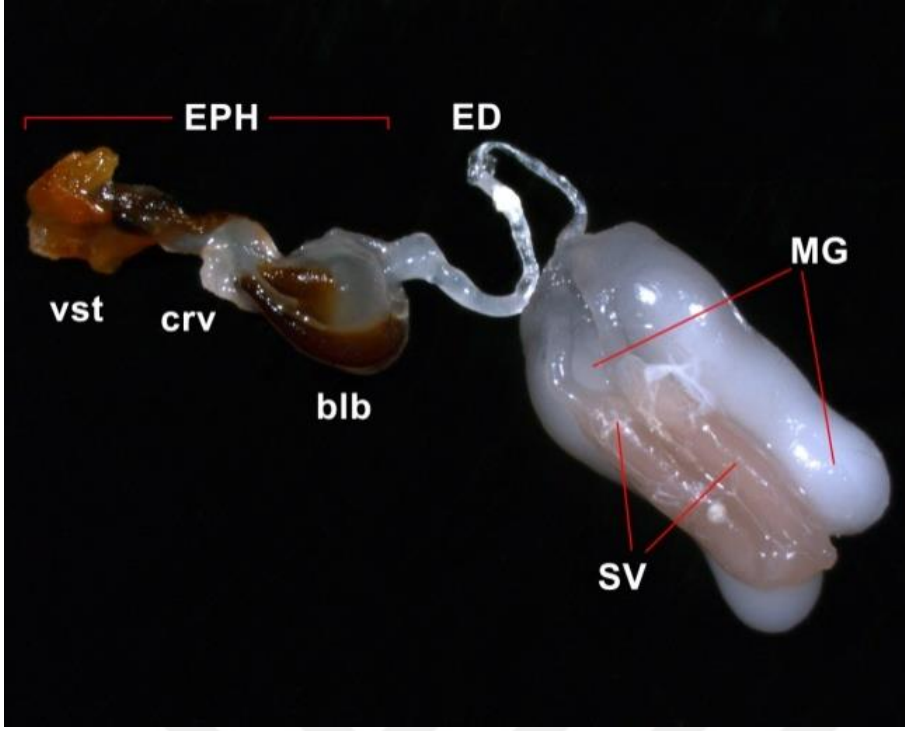
testiollerde gelişmelerini tamamladıktan sonra *Vas deferens*'ten geçerek seminal keselere ulaşırlar.

Her bir *Vas deferens* abdomenin iki tarafında bulunan sperm muhafazası için özelleşmiş bir seminal keseye açılmaktadır. Seminal keseler mukus bezleri ile birlikte ejakülasyon kanalına, ejakülasyon kanalı da endofallusa açılmaktadır. Erkek arılar ergin olarak petek gözlerinden çıktıktan sonra spermlerin testislerden seminal keselere göçü 2–3 günlük yaşta başlamakta ve 6-7 günlük yaşa kadar büyük oranda tamamlanmakla birlikte (89, 91) 12 günlük yaşa kadar devam etmektedir (88). Bu dönemde testislerdeki küçülmeye karşılık seminal keseler ve mukus bezlerinde boyut ve ağırlık artışı gözlenmektedir (89, 90). Seminal kese duvarlarında bulunan epitel hücreler sperm olgunlaşması ve muhafazası sürecinde kritik öneme sahip seminal sıvıyı üretmektedirler (92). Testislerden seminal keselere göç eden spermler seminal keselerin epitel dokularına tutunmakta ve olgunlaşmaya devam ederek motilitelerini artırmaktadır. Bu süreçte spermlerin beslenmesi ve olgunlaşmasına katkı yapan seminal kese epitel dokularındaki hücreler küçülmektedir (93, 94). Seminal keseler sperm hücreleri ile dolduktan sonra sarımsak renkli bir yapıya kavuşmaktadır (89, 95).

Seminal keseler mukus bezlerine proksimal uçtan bağlıdır. Kalınlıkları erkek arı yaşına göre değişen kas tabaka, epitel doku ve lumen olmak üzere mukus bezleri 3 katmana sahiptir. Mukus bezlerinin epitel dokusunda bulunan salgı hücrelerinin aktiviteleri ergin çıkışın ilk günlerinde yüksek düzeye ulaşır ve mukus üretimi 6 günlük yaşta tamamlanır (96). Tam dolu bir mukus bezi beyaz renkli ve şişkindir (89, 96).

Erkek arıların üreme organlarındaki değişim (ağırlık ve boyut) sadece cinsel olgunlaşma dönemi ile sınırlı değildir. Cinsel olgunlaşma dönemi tamamlandıktan sonra testislerde büyük bir değişim olmamasına karşın seminal keseler ve mukus bezlerinin boyut ve ağırlıklarında kısmi azalmalar gerçekleşmektedir (89).

Ejakülasyon kanalının açıldığı endofallus; soğan, serviks ve vestibulum olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır (76, 96). Abdomen içerisinde paketlenmiş halde bulunan endofallusun (Şekil 2.4) temel işlevi mukus bezleri ve seminal keselerden ejaküle edilen mukus ve semenin çiftleşme sırasında ana arının üreme kanalına aktarımını sağlamaktır.



Şekil 2.4. Erkek arı üreme organları (EPH: Endofallus, vst; vestibulum, crv; serviks, blb; soğan, ED; ejakülasyon kanalı, SV; seminal keseler, MG; mukus bezleri) (97)

## 2.5. BAL ARISI SEMENİ VE SPERM HÜCRESİ

### 2.5.1. BAL ARISI SEMENİ

Krem renkli bir sıvı olan bal arısı semeni; sperm hücreleri ve seminal sıvıdan oluşmaktadır. Bal arısı semeninin pH'sı 6,0 ile 7,1 arasında değişmektedir (92). Semen konsantrasyonu arttıkça rengi koyulaşır. Bal arısı semeninin renginde iklim koşulları ve mevsimden etkilenen bir varyasyon vardır (98). Bir erkek arı cinsel olgunlaşmasını tamamladığında 1,50-1,75 mm<sup>3</sup> semen üretir ve bu hacim ortalama 10-11 milyon sperm hücresi içerir (99). Bal arısı semeninin sperm konsantrasyonu ise 7,0-7,5 milyon/ $\mu$ l civarındadır (92, 100).

Bal arısı seminal sıvısının kimyasal yapısının %0,21'i karbohidratlardan oluşur. Testisler, seminal keseler ve mukus bezlerinde bulunan bu karbohidratların (fruktoz, glukoz ve trehaloz) hemolenften üreme sistemine taşındığı düşünülmektedir. Seminal sıvıda bulunan bu karbohidratların başlıca görevi spermlerin enerji gereksinimini karşılamaktır (100, 101).

Seminal sıvının protein konsantrasyonu %0,67'dir (101). Seminal sıvı proteinleri; farklı fonksiyonlara sahip enzimler, düzenleyici ve yapısal proteinlerdir (102, 103). Bu proteinlerin başlıca fonksiyonları sperm canlılığının sperm göçü sürecinde koruma edilmesi, mikrobiyal kontaminasyona ve sperm canlılığını olumsuz etkileyebilecek dışı fizyolojisine karşı korumadır (87, 95, 102, 104).

Bal arısı seminal sıvısı içerisinde çoğunluğu fosfolipidlerden oluşan, serbest yağ asitleri, trigliseritler, steroller gibi lipidler bulunmaktadır (105). Seminal sıvı lipidlerinin sperm hücrelerinin iç solunum sürecindeki enerji kaynaklarından birisi olduğu düşünülmektedir (92). Bunların yanı sıra seminal sıvı içerisinde;  $Mg^{+}$ ,  $Ca^{+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Fe^{+}$ ,  $Cu^{+}$  ve  $Mn^{+}$  iyonlarının bulunduğu bilinmektedir (92, 106).

## **2.5.2. SPERMATOGENEZ**

Erkek arıda spermatogenez pupa döneminin sekizinci gününde başlamakta (17. gün) ve ergin birey olarak petek gözünden çıkışta (24. gün) tamamlanmaktadır (107). Testis tüplerinin üst uçlarında konumlanmış üreme hücreleri primer spermatogonia olarak bilinir. Apikal besin hücreleri ile stoplazmik köprüler kurarak gelişen her spermatogonium ileri doğru itilmektedir (94). Bir spermatogonium çok sayıda spermatozoid içermektedir. Spermatozoidler ise mayoz hazırlı hücrelerdir. Spermatogenez sırasında tüm spermatozoidler aynı anda mayoz bölünme geçirmektedir.

Hymenoptera takımında spermatogenezin mekanizması farklıdır. Bu mekanizmada bir abortif mayotik bölünme (erken ya da prematüre mayoz-I) gerçekleşmektedir. Böylece diploid (2n) organizmalarda olduğu gibi kromozom sayısı yarıya indirgenmemektedir. Bu süreç, kromozom sayısını yarıya indiren bölünmenin gerçekleşmediği “erken mayoz-I” ve “anormal mayoz-II” aşamalarından oluşmaktadır (94). Spermatogenezin mayoz-I aşamasında primer spermatozoid çekirdeğinin dışında iç iplikçikleri oluşmaktadır. Ancak bu aşamada primer spermatozoid hücrelerinin çekirdek zarı erimemekte, böylece mayoz-I sonunda kromozom seti yarıya indirgenmemektedir. Özel koşullarda yetiştirilen diploid erkek arıların diploid sperm hücreleri üretmesi erken mayoz-I aşamasına ilişkin bulguları desteklemektedir (108). Mayoz-I aşaması sonunda oluşan 2 adet sekonder spermatozoidten birisi 16 kromozom içerirken diğeri kromatin yapı (DNA) içermeyen stoplazmik tomurcuk şeklindedir (94, 108). Ancak oluşan stoplazmik tomurcuk kromatin yapı içermemesine

karşın çekirdek dışı iğ iplikçikleri ve proteinlerine sahiptir (94). Mayoz-II aşaması mitoz özellik göstermektedir. Bu aşamada çekirdek zarı erimekte ve açığa çıkan kromozomlar iğ iplikleri yardımı ile kutuplara doğru çekilmektedir. Mayoz-II sonunda oluşan her 2 hücre de (spermatid) 16 kromozom setine sahiptir. Ancak stoplazma bölünmesi eşit olmadığı için yeni hücrelerden birisi büyük diğeri ise küçüktür. Sadece büyük hücreden sperm hücresi geliştiği görüşüne karşın (94), her 2 hücrenin de sperm hücresi olarak geliştiği ileri sürülmüştür (109). Ergin çıkışın 3. gününde seminal keselere göç etmeye başlayan spermeler baş kısımları kesenin epitel dokusuna gömülü olarak ejakülasyon öncesi son hallerine kavuşurlar.

Hymenoptera takımının erkeklerinde görülen bu özel spermatogenez biçimi moleküler mekanizmalar ile kontrol edilmektedir. Testere sineğinde (*Athalia rosae*) Deleted in Azoospermia (DAZ) gen ailesinin bir üyesi olan “bol” geninin, spermatogenez mayozunda, hayvan hücre döngüsü 25 geninin translasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı saptanmıştır (110). Daha sonra bu genin ortologlarının tüm Hymenoptera genomlarında korunmuş olduğu saptanmış ve bu özel spermatogenezin nasıl gerçekleştiği kısmen aydınlatılmıştır (110).

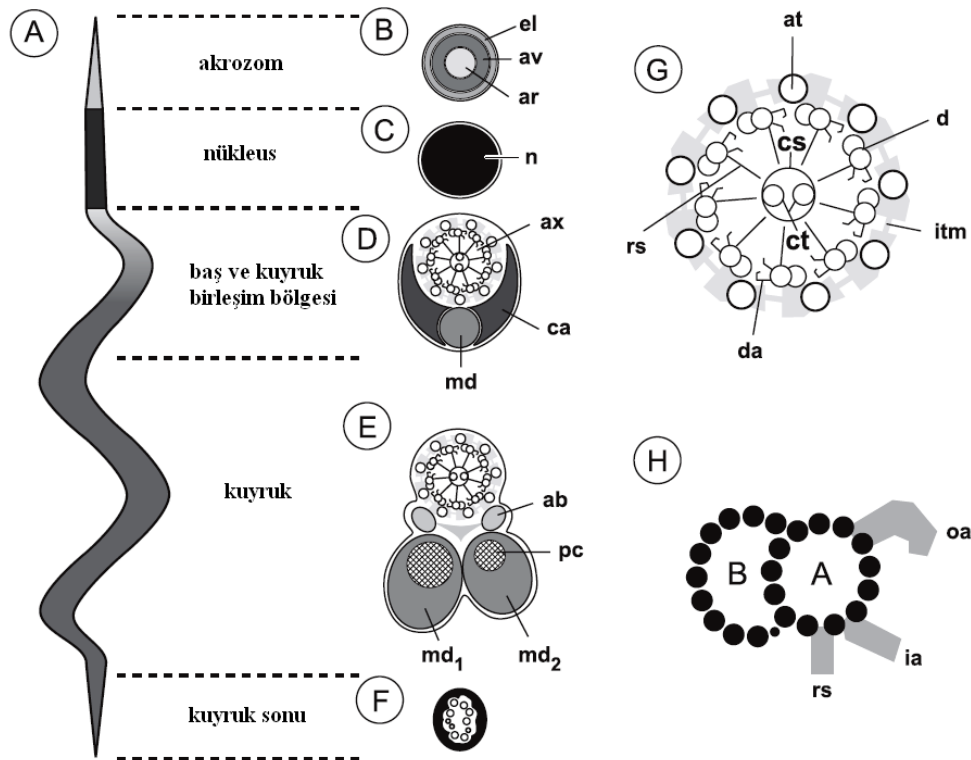
### **2.5.3. SPERM HÜCRESİ**

Erkek arı sperm hücresi yaklaşık 240–250 µm uzunluğunda, ince bir iplikçik şeklindedir (111, 112). Sperm hücresi, kolayca ayırt edilemeyen bir baş ve flagellum olmak üzere 2 ana bölüme ayrılmaktadır. Baş bölgesi (akrozomal kompleks) akrozom ve genetik materyalin bulunduğu nükleustan oluşmaktadır. Sperm hücresinin baş ve kuyruk birleşim bölgesinin ardından flagellum ve kuyruk sonu bölümleri gelmektedir. Sperm hareket organı flagellum; aksonem, aksoneme paralel uzanan mitokondri türevleri (2 adet) ve aksesuar cisimlerden (2 adet) meydana gelmektedir (111). Kristal yapıdaki (113) mitokondri türevlerinin uzunluğu spermin toplam uzunluğunun yaklaşık % 80'i kadardır (106, 114).

Bal arılarında sperm morfolojisi ve ince yapısı birçok araştırmanın konusu olmuştur (111, 112, 115). Bal arısı sperminin ince yapısı diğerk böceklerle oldukça benzerlik göstermektedir (115-117). Sperm hücresinin baş ve kuyruğu birbiri ile sıkı bir biçimde

kaynaşarak iç içe geçmiştir (115). Sperm hücresinin en geniş bölümü ortalama 0.7 µm kalınlığındadır (112).

Akzonem (aksiyal filament); tüm böcek türlerinde 9+9+2 tüp düzenindedir (116, 117). Kuyruk boyunca uzanan akzonem iç içe tüplerden oluşur. Bal arısı spermının akzonem tüp yapısı diğer böceklerde olduğu gibi en dışta 9 aksesuar tüp, ortada 9 çift mikrotüp ve merkezde 2 mikrotüp düzenindedir (113, 115). Filament demetlerinden oluşan mikrotüpler bir matriks ve sperm hareketini sağlayacak şekilde (Şekil 2.5) özelleşmiş motor protein kolları ile birbirine bağlanmıştır (113).



Şekil 2.5. Bal arısı spermının yapısı (A). (B) akrozom yapısı, ar: akrozom çubuğu, av: akrozom kesesi, el: dış akrozom katmanı. (C) nükleusun enine kesiti, n: nükleus. (D) baş-kuyruk birleşim bölgesi, ca: birleşim materyali, ax: akzonem, md: mitokondri türvlerinin ucu. (E) kuyruk, ab: aksesuar cisimcik, md1-md2: mitokondri türevleri, pc: parakristalin materyal. (F) kuyruk sonu. (G) 9+9+2 akzonem yapısı, d: mikrotüp çifti, da: motor kolları, rs: radyal çubuk, ct: merkezi mikrotüpler, cs: merkezi kılıf, at: aksesuar tüpler, itm: tüpler arası materyal. (H) mikrotüp çiftlerinin A ve B alt tüpçüklerinin protofilament düzenlenmesi, rs: radyal çubuk, ia: iç motor kol, oa: dış motor kol (113).

## 2.6. DOĞAL ÇİFTLEŞME

Ergin birey olarak çıkıştan sonra ana arılar yaklaşık 1 haftada, erkek arılar ise 10-12 günde cinsel olgunlaşmalarını tamamlamaktadır (30). Ana arı ve erkek arılar özel çiftleşme alanlarında çiftleşirler. Erkek arı toplanma alanları olarak isimlendirilen bu alanlardaki çiftleşmeler açık havada gerçekleşmektedir. Bir bölgede bulunan bal arısı kolonilerinin erkek arıları birden çok erkek arı toplanma alanı oluşturulabilir (118). En azından birkaç yıl boyunca konumu sabit kalan (118) bu alanların oluşturulmasının mekanizması belirgin olmamakla birlikte, ışık yoğunluğu ve fiziki coğrafya şeklinin önemli rol oynadığına ilişkin bulgular bulunmaktadır (119).

Bir erkek arı toplanma alanında çevredeki bal arısı kolonilerinden gelen binlerce (10 000-15 000) erkek arı bulunabilmektedir (120). Genellikle günün öğleden sonraki saatlerinde uygun hava koşullarında (sıcaklık, rüzgar hızı vb) erkek arı ve ana arılar çiftleşme uçuşları gerçekleştirirler (121). Ana arılar bir ya da birkaç çiftleşme uçuşu yapar (30, 79). Ana arı 5 dakikadan daha az süren 1 veya 2 yön belirleme uçuşunun ardından çiftleşme uçuşuna çıkar (122). Her bir çiftleşme uçuşunun süresi ise 10-30 dk arasında (ortalama 22 dk) değişmektedir (122). Erkek arı toplanma alanlarında ortalama 2.7 ms uçuş hızında çiftleşmeler gerçekleşmektedir ve bir ana arı ile çiftleşmeye yarışan 100'e yakın erkek arı bulunabilmektedir (120).

Ana arı ile çiftleşmeyi başaran her bir erkek arı ejakülatını ana arının ana yumurta kanalı ve yan yumurta kanallarına boşaltır. Bir çiftleşme uçuşu sırasında ardı sıra gerçekleşen çiftleşmeler 5 saniyeden az sürmektedir (123). Çiftleşme sırasında erkek arı paraliz olur ve endofallusunun bir parçası koparak ana arıdan ayrılır. Çiftleşme sırasında genital kanalı tıkayan çiftleşme işareti bir sonraki erkek arı tarafından uzaklaştırılır. Ana arı tek ya da birkaç çiftleşme uçuşunda erkek arılar ile çiftleştikten sonra çiftleştiği son erkek arıdan kalan çiftleşme işareti ile kovana döner (124, 125).

Bir ana arının çiftleşme uçuşları sırasında çiftleştiği erkek arı sayısına ilişkin farklı bildirişler bulunmaktadır. Çeşitli araştırmalarda tahmin edilen ortalama çiftleşme frekansları 6,5 (66) ile 41,3 (44) arasında değişmektedir. Ana arıların tek ya da birkaç çiftleşme uçuşu sırasında 10-17 erkek arı ile çiftleştiği kabul edilebilir (35, 59, 99, 126,



127). Çiftleşme frekansı ana arı kalitesi ile ilişkili olabilmektedir. Çiftleşme frekansı iri vücutlu ana arılarda 16,2, küçük boyutlu olanlarda 12,7 bulunmuştur (34).

## 2.7. SPERM GÖÇÜ VE SPERM DEPOLAMA

Çiftleşme uçuşları ve sperm torbasının dolması, ana arıların önemli anatomik, fizyolojik ve davranış değişikliklerine neden olan olaylardır. Erkek arılar çiftleşme sırasında spermlerini ana arının yumurta kanallarına boşaltmaktadırlar. Çiftleşme uçuşu dönüşünde ana arıların yumurta kanallarında bulunan spermler sperm torbasına doğru göç etmeye başlar (67). Çiftleşme uçuşundan dönen bir ana arının yumurta kanallarında bulunan ortalama 100 milyon spermin (99) %5 kadarı sperm torbasına göç eder. Çiftleşmeden sonraki ilk 10 saat içinde sperm torbasının büyük bölümü dolar, ancak sperm göçünün bütünüyle sona ermesi 24-48 saati bulur (128, 129). Ana arının yumurta kanallarına ejaküle edilen spermlerin büyük bir kısmı ana arının üreme kanallarından geri atılmaktadır. Batı bal arısında sperm göçü, spermlerin sperm torbasına aktif hareketi ve üreme kanalı kasılmalarına bağlı sperm aktarımının kombinasyonudur (130). Ana arıların yan yumurta kanallarında geçici olarak stoklanmış spermlerin *Bursa kopulariks*'e ittirilmesinde abdominal kasılmaların rolü vardır (76). Sperm göçü sürecinde rol alan önemli yapılardan birisi de sperm torbası üzerinde bulunan Bresslau sperm pompasıdır. Çiftleşmelerin ve sperm göçünün tamamlanmasından birkaç gün sonra ana arılar yumurtlamaya başlarlar (79).

Çiftleşme sonrası dönemde sperm göç mekanizmasının; sperm kalite ve motilitesi, ana arının kasılmaları ve seminal sıvı ve sperm torbası sıvısının katkılarının bileşiminden etkilenmesi beklenebilir. Erkek arı üreme başarısı ile sperm kalite düzeyi arasında yüksek ilişki vardır (100, 131). Sperm kalitesi, sperm torbasına sperm göçü ve sperm torbasında spermlerin yıllarca canlı kalma başarısını etkileyecek önemli unsurlardandır. Bu nedenle yüksek kalitede sperm üretimi ve bunu korumanın maliyetini olumsuz etkileyebilecek stres faktörleri çeşitli araştırmaların konusu olmuştur (76). Bu araştırmalarda başlıca sperm canlılığı, sperm sayısı, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm uzunluğu, sperm motilitesi, ozmolite gibi semen ve sperm özellikleri üzerine erkek arıların yaşı, ırkı, kolonide maruz kalınan sıcaklık ve kimi hastalık ve zararlılara karşı kullanılan ilaçların etkisi üzerinde durulmuştur.

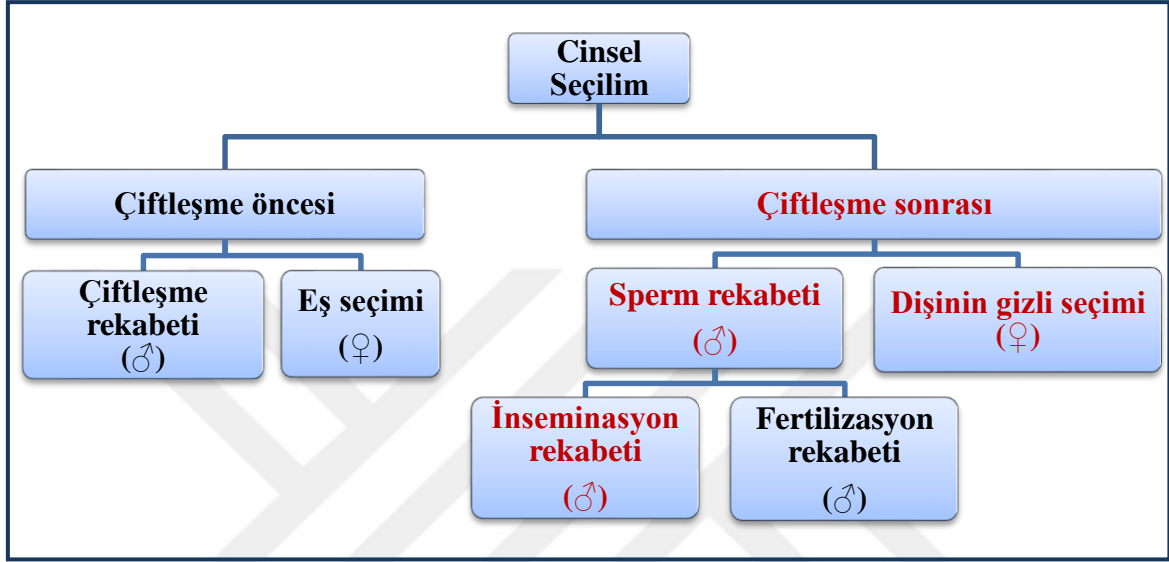
Sperm canlılığı, erkek arı üreme başarısını etkileyen başlıca parametrelerden birisi olarak kabul edilmektedir. Ancak bal arısı sperm canlılığı araştırmalarında çelişkili sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Örneğin; erkek arıların cinsel olgunlaşma döneminde sperm canlılığının yaş ile birlikte azaldığını (132) bildiren çalışmaların yanı sıra sperm canlılığının yaştan etkilenmediğine ilişkin bulgularla da karşılaşılmaktadır (89, 133). Erkek arıların üreme başarısını etkileyen diğer önemli parametreler; sperm sayısı, sperm konsantrasyonu ve sperm uzunluğu gibi sperm özellikleridir. Sperm canlılığında olduğu gibi sperm sayısı ve konsantrasyonuna ilişkin yürütölen araştırmaların sonuçlarında da büyük bir çeşitlilik ile karşılaşılabilmektedir. Çünkü; sperm sayımında kullanılan yöntemlerde (mikroskopik ve spektrofotometrik), sperm sayımının gerçekteştirilmesi için semen elde etme yöntemine (seminal kese veya ejakölat), erkek arı genotipine ve yetiştirme koşullarında büyük farklılıklar bulunmaktadır (100, 134, 135).

Sperm torbası bezlerinin salgıları torba içerisindeki spermilerin canlı kalmasına katkı sağlamaktadır. Erkek arı seminal sıvı proteinlerinin ana arı sperm torbası bezleri proteinlerine benzemediği ve ana arının sperm muhafazası sürecinde erkek arılar tarafından sentezlenen proteinlerden farklı olduğu saptanmıştır (87). Sperm torbası içerisinde sperm muhafazasında rol oynayan enerji metabolizması ve antioksidan savunma enzimleri ise dikkate değer şekilde yoğundur (136). Yaşlı ana arıların sperm torbası bezlerinde poliploidisyon ve heterojen kromatin dağılımı gözlenmiş ancak hücre ölümine ilişkin işaretler ile karşılaşılmamıştır. Bu sonuçlara dayanılarak sperm torbası bezlerinin salgı üretimlerinin yaşlanma ile değişebileceği düşünölmektedir (137). Sperm torbası içerisinde fosfolipid konsantrasyonunun da uzun süreli sperm depolamada önemli rolö olabileceği düşünölmektedir (138).

## **2.8. CİNSEL SEÇİLİM**

İlk kez Darwin tarafından tartışılan, daha sonra önlö genetik ve istatistikçi Fisher tarafından geliştirilen cinsel seçilim kuramı son dönemlerde yoğun araştırılan bir konudur (6, 139). Cinsel seçilim, doğal seçilimin araçlarından biridir. Kuramın temeli, bireyin döllerinin sayısının o bireyin gerçekte üreme başarısı ölçütö olduğuna dayanır. Darwin, cinsel seçilim kuramını; erkekler arasındaki görölen dişi ile çiftleşme rekabeti ve dişinin çiftleşeceği eşi seçmesi olmak üzere iki ana yapıya ayırmıştır. Bu çerçevden bakıldığında cinsel seçilim (genellikle dişilerin) karşi cinsiyetten eşi seçimi (interseksöel seçilim) ve aynı

cinsiyet grubu içerisinde (genellikle erkekler arasında) görülen karşı cinsiyet ile çiftleşme yarışı (intraseksüel seçilim) olarak tanımlanır. Ancak cinsel seçilimin çiftleşmeden sonra da devam eden bir süreç olduğuna ilişkin bulgular, yukarıda verilen tanımın çiftleşme öncesi dönem ve çiftleşme sonrası dönemi kapsayacak biçimde geliştirilmesine neden olmuştur. Çiftleşme sonrası dönemde görülen cinsel seçilim kuramının unsurları sperm rekabeti ve dişinin gizli seçimi olmak üzere iki ana başlığa ayrılmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Cinsel seçilim kuramının unsurları<sup>2</sup>

Çiftleşme sonrasında görülen cinsel seçilim ve unsurlarının gerçekleşmesi için çok erkek eşlilik ön şarttır. Sosyal böcek kraliçelerinin çok erkek ile çiftleşmesinin çevreye uyum bakımından önemi yaklaşık 30 yıldır birçok araştırmacının dikkatini çekmekte ve poliandri, çeşitli hipotezler öne sürülerek tartışılmaya devam etmektedir (9, 46, 47, 140, 141). Çok erkek eşlilik dişinin üreme organlarında farklı erkeklere ait ejakülatların bir arada olmasına (heterospermi) neden olmaktadır. Böylece, çiftleşme sonrası dönemde cinsel seçilim ve sperm rekabetinin ortaya çıkma şansı doğmaktadır. Biraz daha açmak gerekir ise; çiftleşme sonrasında, dişinin üreme kanallarında farklı erkek spermlerinin yumurtayı dölmek için yarışması (sperm rekabeti) (10) ve dişinin hangi spermin yumurta hücrelerini döleyeceğini etkilemesi (dişinin gizli seçimi) yoluyla (11) cinsel seçilim gerçekleşebilir (142). Çiftleşme sonrası dönemde gerçekleştiği düşünülen böyle bir seçilimin dişi ve erkek özelliklerinin oluşumunu etkileyen önemli bir selektif güç olduğu

<sup>2</sup> Tez kapsamında irdelenen cinsel seçilim kuramı konuları kırmızı renkle yazılmıştır.

kabul edilmektedir (143). Bunların yanı sıra bal arıları gibi ticari yetiştiriciliği yapılan türlerin cinsel seçim unsurlarının anlaşılması etkin ıslah-yetiştiricilik programlarının tasarlanmasına katkı sağlamaktadır (8).

Cinsel seçim sürecinde sperm rekabeti ve dişinin gizli seçiminin ayrı ayrı ve birlikte etkilere sahip olması beklenir. Ancak genellikle cinsel seçim kuramı daha çok sperm rekabeti üzerine odaklanmıştır. Bu nedenle dişinin gizli seçimi olgusunun kısmen göz ardı edilmiş bir konu olduğu söylenebilir (6).

### **2.8.1. SPERM REKABETİ**

Çiftleşme sonrasında bir dişinin üreme kanallarında farklı erkeklere ait spermler arasındaki yarış sperm rekabeti olarak adlandırılır (10). Sperm rekabetinin gerçekleşmesi için ön koşul; dişinin birden fazla erkek ile çiftleşmesi ve bir yumurtanın döllemesi için gerekenden fazla spermin bir arada bulunmasıdır (144). Sperm rekabeti mekanizmasının işlemesi için 4 önemli gereklilik daha vardır. Bunlar: ejakülatların rekabet edebilmesi için uygun boşluk, yumurta hücresini dölleme olasılığı olan ejakülatlar arasındaki doğal eşitsizlikler, ejakülatların karışım düzeyi ve ejakülatın hem erkek hem de dişi tarafından fiziksel manipülasyonudur (145).

Apis türlerinin çoğunluğunda erkekler diğer böceklerde olduğu gibi spermlerini doğrudan sperm torbasına transfer etmemekte, çiftleşmelerde alınan ejakülatlar ana arının önce ana yumurta kanalına, sonra da yan yumurta kanallarına itilerek burada geçici olarak stoklanmaktadır. Sperm torbasına sperm göçü sürecinde ana arının yan yumurta kanallarında bulunan spermlerin çok az bir kısmı (%5-10) 24-48 saat içerisinde sperm torbasına göç etmektedir (128, 146). Ana arıların çok eşli olması ve yaşamları boyunca yumurtlayacakları yumurtaların döllemesi için gerekli olandan daha fazlasını sperm torbasında stoklamaları sperm rekabetinin gerçekleşebilmesi için uygun platform oluşturur (7).

Sperm rekabeti; (1) farklı erkeklere ait sperm hücrelerinin sperm torbasına göçü (inseminasyon) ve (2) yumurta hücresinin döllemesi için sperm torbasından sperm hücrelerinin salımı (fertilizasyon) sırasında olmak üzere 2 farklı aşamada gerçekleşmesi beklenir.

Bal arısında inseminasyon aşmasında sperm rekabetinin sınırlı düzeyde gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Bu görüşü destekleyen kimi bulgular bulunmaktadır. Bunlardan birincisi farklı erkek arılara ait ejakülatların yan yumurta kanalları içerisinde yarı kümeleşmiş halde bulunduğunun ileri sürülmesidir (147). Bu saptamaya dayanarak Baer (7), tam karışım halinde bulunmayan sperm hücreleri arasında sperm rekabetinin gerçekleşmesini olanaklı görmemektedir.

Çok erkek eşli bazı türlerde, dişi ile çiftleşen erkeklerden sonucusunun döllerde temsil edilme üstünlüğünün (son erkek üstünlüğü) olduğuna ilişkin bulgular vardır. Örneğin Hymenoptera takımında yün tarayıcı (*Anthidium manicatum*) arılarda bu olgudan söz edilmektedir (148). Ancak bir araştırma dışında (13) bal arılarında son erkek üstünlüğü ile ilgili araştırmaların hiçbirisinde son erkek arı lehine sonuç ile karşılaşılmamıştır (7, 70, 147). Bal arılarında son erkek avantajı görülmediği gibi işçi arı döllerinde ana arının çiftleştiği erkeklerin biri veya birkaçı lehine önemli bir sapma da söz konusu değildir (70, 127, 147, 149). Doğal çiftleşmiş ana arılarda son erkek avantajının bulunmamasının sperm göçü sürecinde sperm rekabetinin gerçekleşmediği görüşünü desteklediği ileri sürülmektedir (7, 147). Ancak bu görüşün doğruluğunu doğrudan test eden herhangi bir araştırma ile karşılaşılmamıştır.

Ana arının sperm torbasında spermler tamamen karışmış haldedir (68, 69). Bu durumda Baer'e göre (7) Apis türlerinde sperm rekabetinin sperm göçü sürecinden çok sperm torbasından sperm salındıktan sonraki aşamada (fertilizasyon aşamasında) olması beklenir. Sperm rekabeti; sperm özelliklerinden canlılık (7) ya da motilite (113) ile ilgili olmalıdır. Sperm rekabetini etkileyecek sperm özelliklerinden birisi de sperm uzunluğudur. Bal arısı spermi (240-250 µm) bazı böcek türlerinin spermleri ile karşılaştırıldığında daha uzundur. Örneğin bombus arılarında spermler 166-169 µm (150), ateş karıncalarında ise yaklaşık 70 µm (151) uzunluktadır. Spermin uzun olması daha hızlı hareket etmesi için bir avantajdır. Bazı karşılaştırmalı çalışmalarda sperm uzunluğunun rekabette avantaj sağladığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Baer'e (7) göre, sperm depolama (inseminasyon) başarısı ejakülat hacminin, fertilizasyon başarısı ise bireysel sperm kalitesinin bir fonksiyonudur.

Sperm depolama ve göç sürecini etkileyebilecek sperm uzaklaştırma, sperm öldürme, sperm yıkama ve sperm inkapasitasyonu gibi sperm rekabetini olumsuz etkileyebilecek

olguların bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu olguların bal arıları ve diğer çok yıllık koloni kuran sosyal Hymenoptera türlerinde bu olguların olmasını beklemek mantıklı değildir (7).

### **2.8.2. DIŞININ GİZLİ SEÇİMİ**

Çok erkek eşli türlerde döllerin erkek ebeveynlere oransal dağılımını etkileyebilecek bir diğer önemli faktör; dışının gizli seçimidir. Dışının gizli seçimi; yumurta hücrelerini dölleyecek sperm (ya da sperm hareketlerinin) dışı tarafından fiziksel ya da kimyasal mekanizmalar ile kontrol edilmesidir (11). Sperm rekabetinde olduğu gibi dışının gizli seçimi de potansiyel olarak sperm depolama ve/veya sperm kullanımı sırasında gerçekleşebilir.

Sosyal olmayan böceklerde dışının gizli seçiminin gerçekleştiğine ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (10). Ancak bal arılarında dışının gizli seçiminin gerçekleştiğine ilişkin tartışmalar spekülatifdir. Örneğin bu spekülasyonlardan birisi, ana arının bazı erkekler için spermleri çiftleşme gerçekleşir gerçekleşmez vücut dışına atabileceğidir. Bir diğer hipotez, sperm torbasına göç sürecinde hem yumurta kanallarındaki kasılmalar hem de sperm torbası üzerindeki sperm pompası aracılığı ile ana arının bazı erkekler için spermleri farklı şekilde işleyebileceği üzerinedir (7). Dışının gizli seçiminin yumurtanın döllemesi aşamasındaki sperm kullanımı (fertilizasyon) sırasında da gerçekleşebilme potansiyeli vardır. Bu aşamadaki seçim sperm seçimi olarak da adlandırılır (10) ve bazı böcek türlerinde bu durumun gerçekleştiği kabul edilmektedir (7). Bununla birlikte bal arılarında bir sperm torbası içerisinde tamamen karışmış halde bulunan spermlerden hangisinin yumurtayı dölleyeceğinin nasıl belirlendiğine ilişkin mekanizmaları tahmin etmek zordur. Sperm depolama sperm torbasının hacmi ile sınırlıdır ve böyle bir “istenmeyen sperm seçiminin” depolama sürecinden önce gerçekleşmesi daha mantıklıdır. Sonuç olarak bal arılarında sperm seçimi yolu ile dışının gizli seçimi olgusunun gerçekleştiğini beklemek zordur, ancak bu konuyu aydınlatacak çalışmaların yokluğu da dikkat çekmektedir (7).

### **2.9. CİNSEL SEÇİLİM VE MOLEKÜLER GENETİK**

Tüm organizmaların faaliyetleri başta genotip olmak üzere, çevrenin ve genotip-çevre interaksiyonunun kontrol ve düzenlenmesi altındadır. Genom sürekli biçimde hücresel faaliyetleri kontrol ederek organizmanın yaşamını sürdürmesinde rol alan en işlevsel

yapıdır. Her ne kadar hücrenin küçük bir kısmını oluştursa da biosfer üzerindeki tüm yaşam formlarının sahip olduğu bu yaşam molekülünün 50 milyar ton ağırlığa sahip olduğu tahmin edilmektedir. Diğer taraftan bu organizmaların toplam DNA transkripsiyon hızının saniyede  $10^{24}$  DNA alt ünitesi olduğu düşünülmektedir (152).

DNA'nın ikili sarmal yapısının 1954'te çözülmesinden günümüze moleküler genetikte önemli gelişmeler yaşanmış ve yaşam bilimlerinin neredeyse tüm dalları bu gelişmelerden etkilenmiştir. Moleküler genetik yöntemlerin geliştirilmesi ve yaygınlaşması ebeveyn testlerinin yapılabilmesini de kolaylaştırmıştır. Günümüzde ebeveynler ve döller arasındaki ilişkinin ortaya konulmasında moleküler genetik tekniklerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Moleküler genetik, ebeveyn testlerinin yoğun kullanıldığı cinsel seçilim çalışmalarının da önemli bir aracı haline gelmiştir.

Ebeveyn testleri için genom üzerinde yer alan belirteçlere (marker) gereksinim duyulur. Günümüzde ebeveyn testlerinde sıklıkla mikrosatellit DNA varyasyonundan yararlanılmaktadır. Mikrosatellitler 1-6 nükleotidlik kısa tekrar motifleridir. Ökaryot genom üzerinde bulunan ve 4-20 kez tekrarlanabilen mikrosatellitler genetik yapının belirlenmesinde sıkça kullanılan belirteçlerdir. Genom üzerinde yer alan basit tekrar dizileri (mikrosatellit belirteçler) ebeveyn testlerinin yanı sıra popülasyon genetiği çalışmalarında, filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında ve marker destekli seleksiyonda ve ebeveyn testlerinde kullanılmaktadır. Günümüzde floresan işaretli primerler kullanılarak mikrosatellit lokusların çoğaltımı yapılmakta ve çoğaltılan fragmentlerin büyüklükleri kapiller jel elektroforez sistemlerinde ölçülmektedir.

Ebeveyn testinde kullanıma potansiyeli olan diğer önemli genomik varyasyon kaynağı ise SNP (tek nükleotid polimorfizmi)'dir. Genom üzerinde tek nükleotidlik değişimler önemli özellikleri etkileyebilmektedir. SNP'ye dayalı genotiplendirme çalışmaları DNA dizileme tekniklerinin gelişmesine bağlı olarak kullanım potansiyeli bulmaktadır.

## **2.10. DNA DİZİLEME**

Yirminci yüzyılın son çeyreğinde organizmaların genomlarının DNA dizileme yöntemi/yöntemleri ile belirlenebilmesi moleküler genetik ve yaşam bilimleri alanında (biyoteknoloji, biyoloji, adli tıp, tanı, sistematik vb) açılım sağlayan en önemli

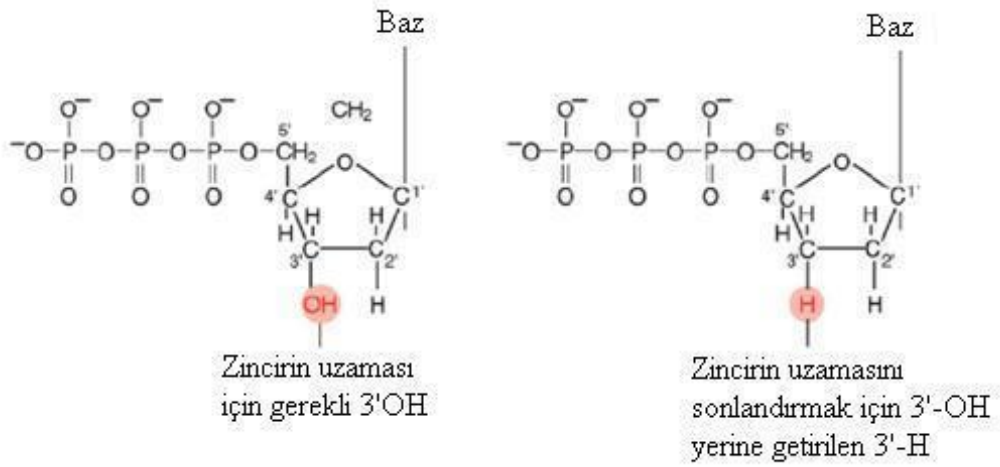
gelişmelerden birisidir. Maxam-Gilbert (153) ve Sanger (154) tarafından 1970'lerde DNA dizileme teknolojisinin öncülerinin geliştirilmesi, özellikle genetik araştırmalarda devrim sayılmaktadır. DNA dizileme teknolojilerinin geliştirilmeye başlaması moleküler genetik çalışmaların önünü alabildiğine açmıştır. Zaman içerisinde DNA dizileme tekniklerinin hız ve kapasitelerinin artırılması genom projelerinin yürütülebilme olanaklarını da artırmış ve tüm genom dizilemesi ilk bitirilen türler sirke sineği ve insan olmuştur. Daha sonra önemli görülen diğer organizmaların genom projelerine başlanmış ve başta Batı bal arısı olmak üzere bazı bal arısı türleri de bunlar içerisinde yerini almıştır.

Bal Arısı Genom Dizileme Konsorsiyumu'nun tamamladığı Bal Arısı Genom Projesi sosyal böceklerin yaşamına genom boyutunda ilk bakıştır (155). Bal Arısı Genom Projesi'ni ekonomik ve ekolojik önemi olan diğer Hymenoptera türlerinin genom dizileme projeleri izlemekte ve veriler kaynak genom veri tabanlarında (Hymenoptera Genom Veritabanı, HGV) (156) toplanmaktadır. HGV; *Apis mellifera* (157), *Bombus terrestris* ve *Bombus impatiens* (158), parazitoid vasp *Nasonia vitripennis* (159), ve 7 karınca türünün dahil olduğu karınca genom portalından oluşmaktadır. Yakın gelecekte HGV'da bal arısı türlerinden *Apis dorsata* ve *Apis florea*'nın genom verileri de kamunun kullanımına açılacaktır. Hymenoptera takımından türlerin genom verileri tek veri tabanında toplanarak bazı sosyal böcek türlerinin birbirleri ile karşılaştırılmaları sağlanabilmiş (156, 160), böylece bal arısını konu alan moleküler çalışmaların hızı ve sayısı artmıştır.

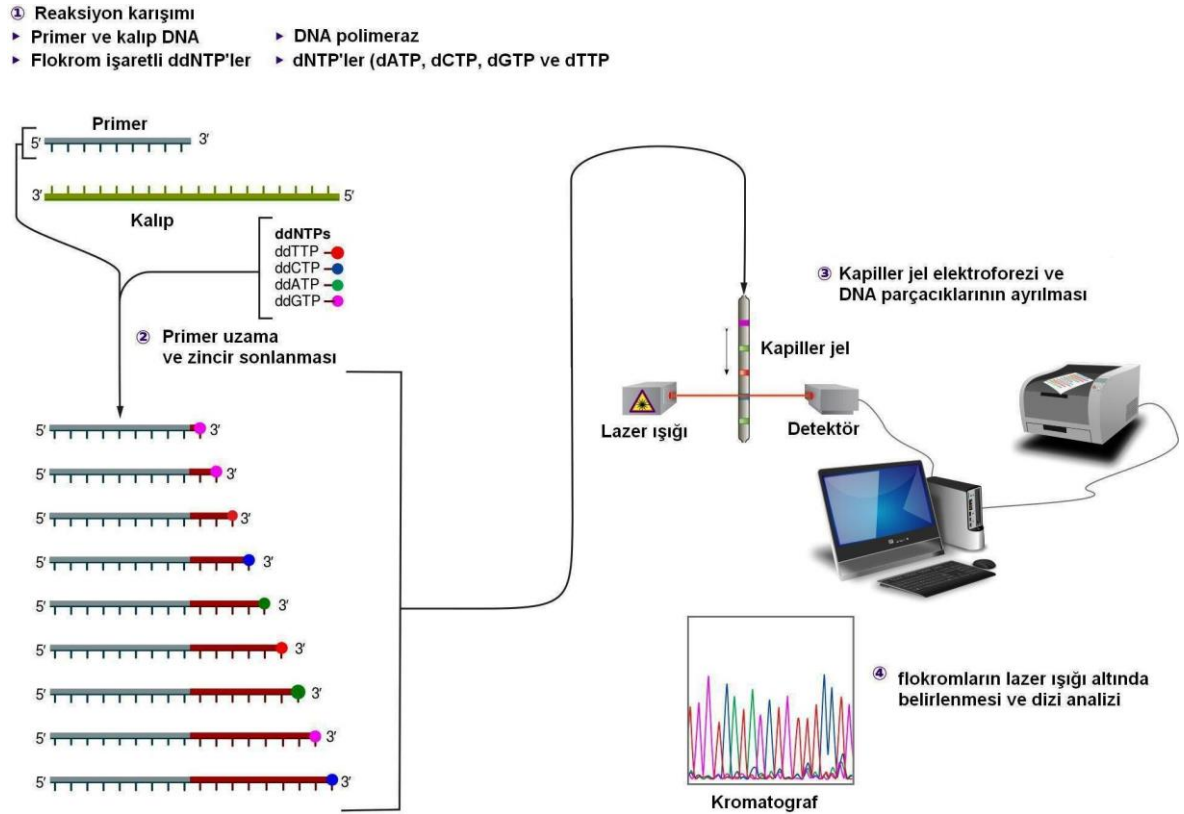
DNA dizileme; bir DNA molekülü içerisinde yer alan nükleotid bazların (Adenin, Guanin, Sitozin, Timin) sıralamasının belirlenmesidir. DNA dizilemesi işleminde en yaygın kullanılan yöntem; zincir sonlandırma (Sanger) yöntemidir (154). İnsan genomu dahil çeşitli türlerin genom projeleri (161-163) bu yöntem ile tamamlanmıştır. Bu yöntemin PCR aşamasında normal nükleotitlerin yanı sıra floresan işaretli dideoksi nükleotidler (ddNTP: ddATP, ddTTP, ddGTP ve ddCTP) kullanılarak çoğaltımı yapılan (yeni sentezlenen) DNA zinciri rasgele sonlandırılmaktadır. Bir DNA zincirinde önceki nükleotidin 5' ucundaki karbon atomu ile izleyen nükleotidin 3' karbon atomları arasındaki fosfodiester bağının kurulması DNA polimerizasyonu için gereklidir. Ancak DNA zincirinin sonlandırılması işlemi için 3' hidroksil grubunun (OH) yerine 3'H getirilerek nükleik asitler modifiye edilmekte (Şekil 2.7) böylece zincirin uzaması olanağı ortadan kaldırılmaktadır. Zincire en son bağlanan modifiye nükleotid (ddNTP) floresan işaretli



olduğu için bir DNA dizisine en son eklenen nükleotidin hangi baz olduğu belirlenebilmektedir. Uzama aşaması rasgele sonlandırılan DNA dizilerinin büyüklüklerine göre sıralanması gerekmektedir. Bunun için PCR işlemi ile çoğaltılan DNA fragmentleri otomatik dizileme sistemlerinde önce denatüre edilerek eksenlerin birbirlerinden ayrılması sağlanmakta, sonra da kapiller jel elektroforezi gerçekleştirilerek fragmentlerin verdiği floresan ışımalar kaydedilmektedir (Şekil 2.8). Sanger yöntemi 300-1000 baz arası büyüklükteki DNA fragmentlerinin dizisinin belirlenmesinde başarı ile uygulanmaktadır.



Şekil 2.7. Zincir sonlandırma işlemi için nükleotidlerin modifiye edilmesi (164)



Şekil 2.8. Sanger DNA dizileme yöntemi (165)

Modern biyolojide DNA dizileme için ucuz ve yüksek işlem gücüne sahip platformların geliştirilmesine gereksinim duyulmuştur. Günümüzde Sanger yönteminin dezavantajlarını ortadan kaldıran yüksek işlem gücüne dayalı farklı yöntem ve teknolojiler kullanılarak daha hızlı yeni nesil DNA dizileme teknikleri ile genom araştırmaları sürdürülmektedir. DNA dizileme için çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Özellikle son 15-20 yılda etkin biçimde geliştirilen ve ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil olarak adlandırılan DNA dizileme teknikleri kullanıma sunulmuştur. Bu yöntemlerin her birinin diğerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte (166-168) DNA dizileme hızı ve kapasitesi giderek artırılmıştır. Pirosekanslama tekniği yeni (ikinci) nesil DNA dizileme tekniklerinden biridir.

## 2.11. PİROSEKANSLAMA TEKNİĞİ

P. Nyren ve M. Ronaghi tarafından geliştirilen (169) pirosekanslama tekniği; tek tüp içerisinde 4 enzim arasındaki işbirliğinden yararlanarak DNA sentezinin eşzamanlı izlenmesini olanaklı kılan elektrofretik olmayan bir yöntemdir. Bu yaklaşım; temeli Nyren tarafından atılan (170, 171) enzimatik luminometrik inorganik fosfat (PPi) belirleme

yöntemi (ELIDA) üzerine kurulmuştur. Bu yöntemde DNA polimerazın her bir nükleotidi zincire bağlanmasından sonra açığa çıkan PPI, ATP sülfürlaz tarafından ATP'ye dönüştürülmekte ve devamında ATP ateş böceği lusiferazı tarafından ışığa çevrilmektedir. Kalıp DNA'ya bağlanan nükleotid miktarına bağlı olarak oluşan eşzamanlı oransal ışımaya CCD kameralar tarafından algılanmakta ve sistem tarafından pikselere dönüştürülmektedir (163, 172, 173). Reaksiyona katılan nükleotidlerin reaksiyon ortamına katılma sırası bilindiği için sentezlenen DNA'nın baz dizisinin içeriği belirlenebilmektedir (163).

### **2.11.1. PİROSEKANSLAMA VE HETEROPLAZMİ**

Pirosekanslama yöntemi hem bilinen bir DNA dizisinin doğrulanması için yeniden dizileme analizlerinde hem de de-novo DNA dizileme analizlerinde kullanılabilir. Pirosekanslama tekniği; gerçek nükleotid değişimi ve değişimin seviyesini doğruya yakın tahmin edebilme, otomasyona sahip olma, hızlı performans ve sonuç verebilme, SNP analizi için kullanılabilir, kompleks ikincil yapıları analiz edebilme gibi avantajlara sahiptir. Ancak yöntemin en büyük dezavantajı uzun baz dizilerini (200 bç'nden büyük) okumaya uygun olmamasıdır (163). Diğer dezavantajları ise, özel donanım gerektirmesi, reaksiyonda kullanılan enzimlerin kalite ve etkinliğinin ölçümlerin kesinliği için kritik olması, enzimlerin aktivitelerini kaybedebilmeleri ve örnek sulandırma işleminin okuma çerçevesi uzunluğunu azaltabilmesidir (174, 175). Pirosekanslama sistemi insersiyon, delesyon, SNP tarama, DNA metilasyon analizleri, kantitatif allel ekspresyonu vb birçok alanda başarı ile kullanılmaktadır (176-179).

Pirosekanslama tekniği ile zincire eklenen nükleotidlerin seviyesinin oldukça başarılı olarak belirlenebilmesi heteroplazmi çalışmalarında kullanım potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Heteroplazmi bir hücre veya doku içerisinde birden fazla organel genomunun bir arada bulunması olarak tanımlanır (174, 180, 181). Heteroplazmi çalışmalarında pirosekanslama tekniği son yıllarda yoğun olarak kullanılmaktadır (180, 182, 183). Bu durumun en önemli nedeni Sanger dizileme yönteminin mutant allel seviyesini belirleme hassasiyetinin düşük olmasıdır (184, 185). Pirosekanslama tekniği; kullanımı kolay, hızlı ve daha kesin miktar belirleyen bir sistem olduğu için heteroplazmi seviyesi ister yüksek ister düşük olsun başarıyla kullanılabilir (174, 177, 185-187). Çok erkek eşliliğin bir sonucu olan sperm torbasındaki heterospermi, heteroplazmi olgusuna oldukça

benzerdir. Bu nedenle pirosekanslama tekniğinin yaygın kullanım potansiyeli bulunan alanlardan birisi de heterospermi çalışmalarıdır.

### 2.11.2. PİROSEKANSLAMA REAKSİYONU

Katı ve sıvı faz olmak üzere iki farklı pirosekanslama stratejisi vardır. Katı faz pirosekanslama prosedüründe DNA Polimeraz I'in Klenow fragmenti, ATP Sülfürilaz ve Lusiferaz olmak üzere 3 enzim rol almaktadır (188). Sıvı faz pirosekanslama sisteminde, bu 3 enzime Apiraz da katılmakta, böylece sistemde 4 enzim bir arada çalışmaktadır (163, 169). Reaksiyon karışımı adenozin fosfosülfat (APS), d-lusiferin ve sekanslama primeri gibi bileşen ve enzim substratlarını da içermektedir (172). Sıvı faz pirosekanslama reaksiyonunun aşamaları (Şekil 2.9) aşağıda adım adım açıklanmıştır.

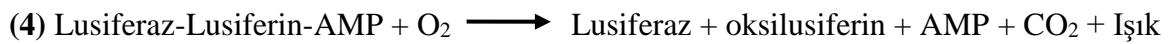
Pirosekanslamanın ilk reaksiyonunda nükleotid ilavesi olduğunda kalıp DNA'ya eşlenik olarak Klenow polimeraz tarafından bir baz çifti oluşmaktadır (1).



Bu adımın ardından Klenow Polimeraz I tarafından inorganik fosfat (PPi) serbest bırakılmakta, bu molekülde ATP sülfürilazın substratı olarak rol alıp ATP üretiminde kullanılmaktadır (2).

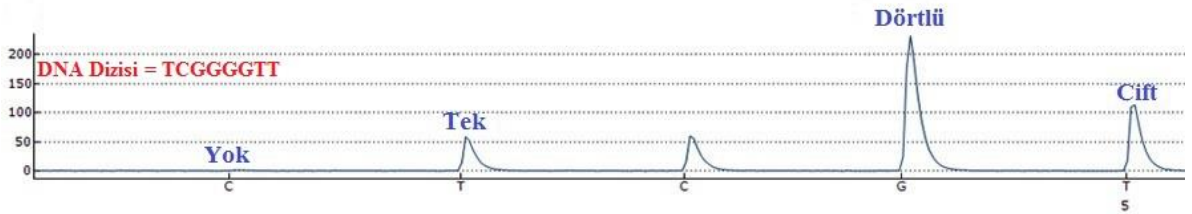
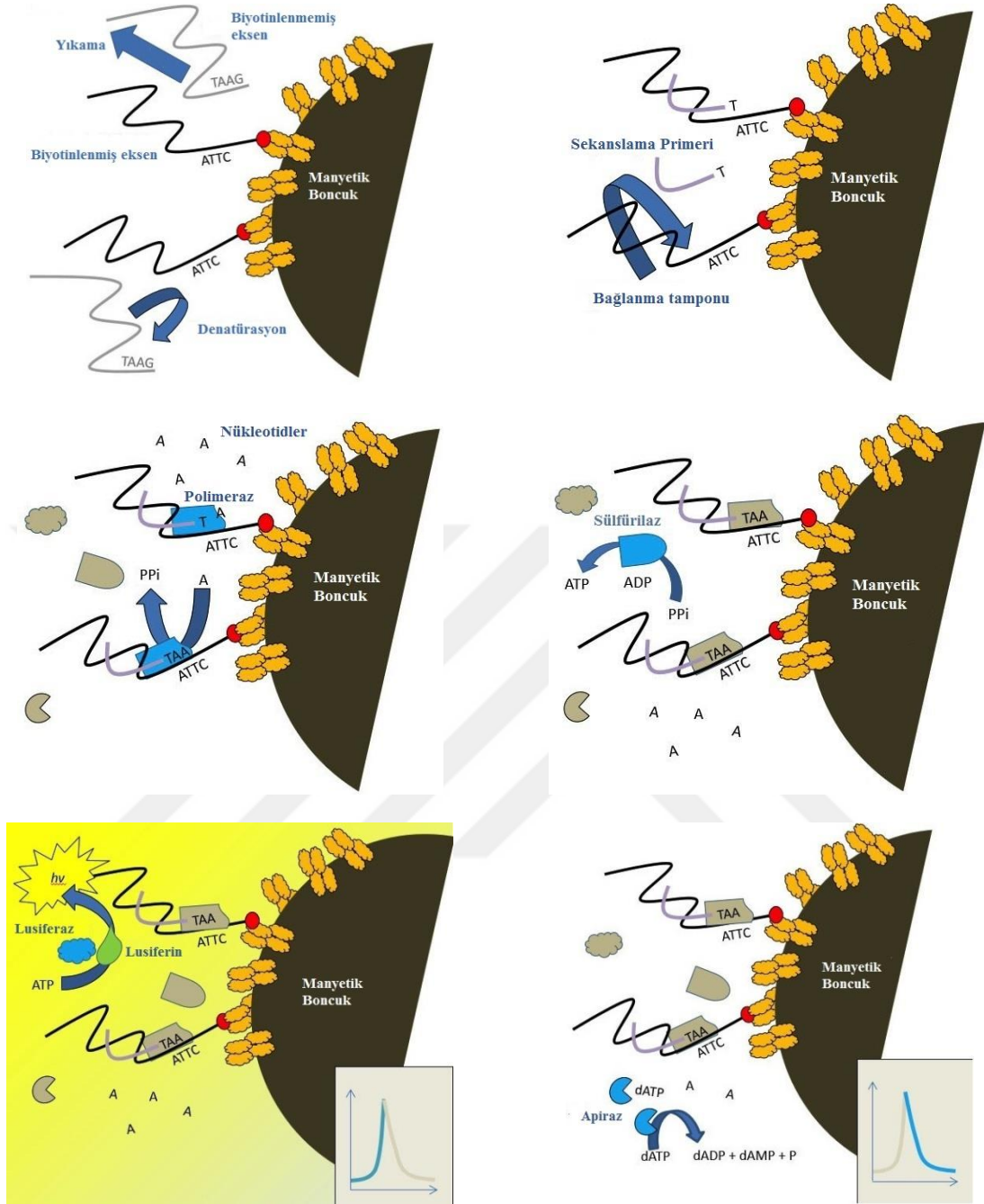


Üçüncü ve 4. reaksiyon adımlarında ATP, lusiferaz tarafından, belirlenebilen ışık sinyaline dönüştürülmektedir. Böylece reaksiyon karışımına kalıp DNA'da yer alan diziye uygun nükleotid eklendiğinde ışık oluşmaktadır (3-4).



Sonraki reaksiyon adımında ortamda bulunan DNA zincirine bağlanmamış nükleotidleri Apiraz ortadan kaldırmaktadır (5-6).





Şekil 2.9. Pirosekanslama reaksiyonu (189)

Pirosekanslama teknolojisinde çift eksenli DNA fragmentlerinin baz dizisinin belirlenmesine olanak verecek yöntemler geliştirilmiş ise de (190) yaygın olarak kullanılan formu tek eksenli DNA zincirinin kullanılmasıdır. Bu yöntemde birisi biyotinle işaretlenmiş primer çifti kullanılmaktadır. Böylece PCR'da oluşturulan DNA'nın bir zinciri biyotinlenmiş olmaktadır (163, 191).

Pirosekanslama analizine başlamadan önce DNA'nın Streptavidin kaplı manyetik boncuklara bağlanması işlemi gerçekleştirilmektedir. *Streptomyces avidinii* bakterisinden elde edilen dört altbirime sahip streptavidin, biyotine karşı yüksek afinitesi nedeniyle biyoteknolojide yoğun kullanım alanı bulmuştur. Sedimentasyondan sonra PCR'dan kalan komponentler saf çift zincir DNA elde etmek için yıkanmaktadır. Bu aşamadan sonra çift zincir DNA'yı tek zincir haline getirebilmek için alkali ortamda denatürasyon gerçekleştirilmektedir. Böylece manyetik boncuk üzerinde sadece biyotinle işaretli tek zincir DNA tutulmaktadır (163, 173). Yaygın kullanılan bu yöntemin yanı sıra enzimatik yöntem ile alternatif pirosekanslama hazırlık prosedürü de bulunmaktadır (163, 190).

### **2.11.3. PİROSEKANSLAMA ENZİMLERİ**

Pirosekanslamada kullanılan 4 enzimin performansı DNA dizileme teknolojisinin doğruluğu için önemlidir. Bu enzimlerin özellikleri ve pirosekanslama reaksiyonu sonuçlarına etkileri aşağıda verilmiştir.

#### **2.11.3.1. Klenow DNA Polimeraz**

Replikasyon ve tamir sürecinde DNA polimerizasyonunu katalize eden bir enzim olduğu için DNA polimeraz (E.C. 2.7.7.7) canlı tüm hücreler için yaşamsaldır. *Escherichia coli* DNA polimeraz I, polimeraz aktivitesinin yanı sıra 3'-5' ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinin her ikisine de sahip olan ve moleküler çalışmalarda çok kullanılan enzimdir.

Polimeraz I'in (109 kDa) subtilisin proteaz ile kesilmesi sonrasında 3'-5' eksonükeaz aktivitesini kaybetmiş büyük parçacığına Klenow Polimeraz adı verilmektedir (192). Daha sonra 2 amino asit mutasyona uğratarak yeni bir polimeraz varyantı (ekzo\_ Klenow Polimeraz) elde edilmiştir. Pirosekanslamada Klenow Polimeraz; primer uzaması ve ortama PPi salımı için kullanılmaktadır. Pirosekanslamada kullanılan Klenow polimerazın 3'-5' eksonükeaz aktivitesini kaybetmesine karşın, bu enzimin kinetik mekanizmasının

yavaş olması ve reaksiyonda Apiraz kullanımı yanlış nükleotidlerin zincire bağlanma olasılığını azaltmaktadır (163, 172).

### **2.11.3.2. ATP Sülfürilaz**

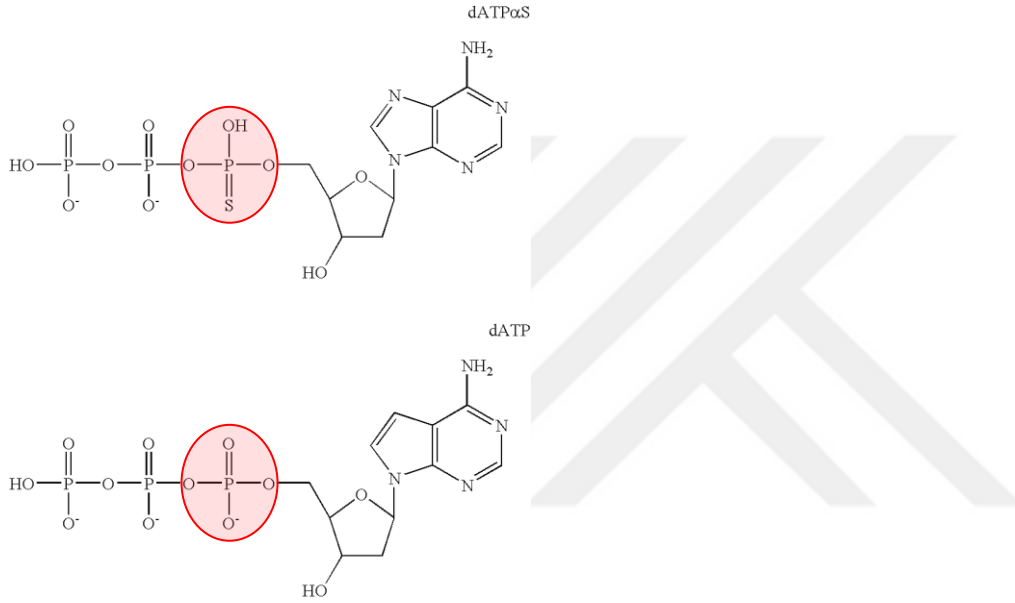
Pirosekanslama teknolojisinde kullanılan ikinci reaksiyon, DNA polimerizasyonuna bağlı olarak serbest kalan P<sub>Pi</sub> molekülünden ATP üretiminin ATP sülfürilaz (E.C. 2.7.7.4) tarafından katalize edilmesidir. Canlılarda ATP sülfürilaz sülfür aktivasyonunda SO<sup>2-</sup><sub>4</sub> ve ATP'den Adenozin fosfosülfat (APS) üretimini katalize eder. Üretilen APS, APS kinaz tarafından fosforlanarak 3'-fosfat 5'-fosfosülfat'a çevrilir ve bu bileşik çeşitli sülfür içerikli maddelerin sentezinde kullanılır. ATP sülfürilaz tarafından katalize edilen reaksiyon eşitliği aslında APS üretimi için elverişli değildir. Fakat APS kinaz tarafından APS ve P<sub>Pi</sub> ortamdaki uzaklaştırılması ve inorganik pirofosfatlar reaksiyonu sağ tarafa doğru kaydırır. Böylece ATP sülfürilaz tarafından katalize edilen reaksiyon P<sub>Pi</sub>'tan ATP üretimi için elverişli hale gelir ve bu durumdan yararlanılarak pirosekanslama teknolojisinde ikinci reaksiyon gerçekleştirilir. İlk defa bir maya türünden (*Saccharomyces cerevisiae*) izole edildiği için bu organizmadan klonlanan ATP sülfürilaz ticari olarak piyasada yerini almıştır. Homo heksamer yapıdaki 315 kDa büyüklüğe sahip bu enzim *E. coli* bakterisi kullanılarak üretilmektedir. Pirosekanslamada kullanılan enzimin rekombinant formu 470 kDa büyüklüğünde ve oktamer yapıdadır. Bu enzim tarafından pirosekanslama reaksiyonunda ATP oluşumu yaklaşık 1,5 sn sürmektedir (163, 172, 193).

### **2.11.3.3. Lusiferaz**

Lusiferaz (E.C. 1.13.12.7) pirosekanslama reaksiyonunda ATP'den belirlenebilir ışık üretimini katalize etmektedir. Bu enzimin çeşitli tipleri tüm biyoluminesans organizmalar tarafından kullanılmaktadır. Ancak ticari olarak en çok kullanılan tipi Kuzey Amerika Ateş böceği (*Photinus pyralis*)'nden klonlanmıştır. Lusiferaz fizyolojik pH düzeyinde 562 nm dalga boyunda yeşil-sarı bölgede maksimum ışımaya yapan 61 kDa büyüklükte bir enzimdir.

İlk lusiferaz kataliz reaksiyonunda enzim magnezyum iyonlarının varlığında yapısal değişime giderek d-lusiferin ile bir kompleks oluşturmaktadır. Reaksiyonda ışık üretimi, Lusiferiladenilat'ın oksidatif karboksilasyonu yoluyla gerçekleşmektedir (172).

Pirosekanslama yönteminin darboğazlarından birisi ortamda bulunan serbest ATP'nin hem DNA'nın yapısında kullanılabilmesi hem de lusiferaz tarafından ışığa çevrilebilmesidir. Bu durum DNA polimerizasyonu için normal dATP yerine lusiferaz tarafından tanınmayan dATP- $\alpha$ -S (deoksi adenozin alfa-tiotrifosfat) kullanılarak aşılmıştır (Şekil 2.10) (169, 188). Pirosekanslama teknolojisinde lusiferazın düşük termostabilitesi reaksiyonun sıcaklığının 25 °C'ye ayarlanmasına neden olmaktadır. Pirosekanslama reaksiyonunda kullanılan diğer enzimler için ise optimum sıcaklık daha yüksektir (172). Lusiferaz tarafından ışık oluşturma aşaması 0,2 sn'den az sürmektedir (163).



Şekil 2.10. dATP- $\alpha$ -S ve dATP'nin yapısal farklılığı (194).

#### 2.11.3.4. Apiraz

Apiraz (E.C. 3.6.1.5) pirosekanslama reaksiyonunda kalıp DNA'ya bağlanmayan nükleotidlerin parçalanarak ortamdan uzaklaştırılması için kullanılır. Apiraz ve ekto-ATPazlar E tipi ATPazlar grubunda yer almaktadır ve çeşitli yönleri ile diğer ATPazlardan farklıdır. Bu enzimlerin en önemli özellikleri aktivitelerinin  $\text{Ca}^{2+}$  veya  $\text{Mg}^{2+}$  gibi divalent katyonlara bağlı olmasıdır. E tipi ATPazlar, sinir hücresi aktivitelerinin düzenlenmesi, pıhtılaşmanın önlenmesi, immun sistemin düzenlenmesi, şeker düzeyinin ve glukozilasyonun kontrolü gibi birçok biyolojik süreçte rol alırlar. Bununla birlikte apiraz tri-, di-, ve mono-fosfat nükleozitleri hidrolize edebildiği için diğer ekto-ATPazlardan farklıdır (172).



Apiraz çeşitli hayvan ve bitki organizmalarında tanımlanmış bir enzimdir. Ancak yaygın olarak kullanılan ticari apiraz formları patates (*Solanum tuberosum*) kökenlidir. *S. tuberosum*'un çeşitlerinden klonlanan farklı apiraz izoenzimleri bulunmaktadır. Ancak bunların en çok bilinenleri Pimpernel ve Desire'e tipleridir (195). Her iki tip apiraz da 49 kDa büyüklükte ancak farklı izoelektrik noktalara sahiptir (196). Bu enzimlerin ATP ve ADP'yi parçalama yeteneği yüksek olduğu için pirosekanslamada kullanımı tercih edilmiştir (172).

Pirosekanslama reaksiyonunda polimerizasyondan oluşturulan ışığın belirlenmesine kadar geçen süre oda sıcaklığında 3-4 sn'dir. Bir pmol DNA ürününden pirosekanslama reaksiyonunda  $6 \times 10^{11}$  ATP üretilmekte, bu da 560 nm dalga boyunda ışığa veren  $6 \times 10^9$  foton'a çevrilmiştir. Bu miktardaki ışık fotodiyot, fotoçoğaltıcı tüp ve CCD kamera tarafından kolaylıkla belirlenebilmekte ve reaksiyon eşzamanlı olarak izlenebilmektedir (163).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Sperm rekabetini etkileyebilecek sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, sperm canlılığı, sperm motilitesi, semen hacmi, erkeğin çiftleşmedeki sırası, erkek arı ve ana arı genotipi vb unsurları konu alan birçok çalışma vardır. Ne var ki sperm rekabetinin sperm göçü ve sperm kullanımına etkisinin analiz edildiği deneme tasarımlarında kullanılan yöntemlerde bazı kısıtlar bulunmaktadır. Bu kısıtlardan birisi örnekleme ile ilgilidir. Sosyal böcek kolonileri çok sayıda bireyden oluşmaktadır. Örneğin bal arıları 60.000 (30), bazı karınca türleri ise 20 milyon (7) bireyden oluşan koloniler kurabilmektedir. Erkek ebeveynler ise her bir işçi bireyde teker teker mikrosatellit DNA analizine dayalı olarak belirlenmektedir. Maliyet ve zaman alması gibi nedenler ebeveyn testi için örneklenebilecek birey sayısını sınırlandırmaktadır. Aynı zamanda dişilerin zamana bağlı olarak sperm kullanımındaki değişimler (197) ve örnekleme hatalarından (198) kaynaklanan sapmalar bir kolonide hesaplanan alt aile frekanslarının güvenilirliğini azaltmaktadır.

Sperm rekabeti çalışmalarında karşılaşılan bir diğer önemli kısıt, farklı erkek spermlerinin sperm torbasına göç ve sperm torbasından sperm salımı süreçlerinin birbirinden ayırt edilemesidir. Çünkü in vivo koşullardaki spermlerin göç, hareket ve motilite yeteneklerini irdelenebilecek yöntemler geliştirilmemiştir (134).

Bu tez çalışmasının biri genel, diğeri özel olmak üzere 2 amacı vardır. Genel amacı; bal arısı spermlerinin ana arının yumurta kanallarından sperm torbasına göçü sırasında olası sperm rekabetini (inseminasyon rekabeti) test edebilmeyi-irdelenebilmeyi sağlayacak tek nükleotid polimorfizmine (SNP) dayalı kantitatif analizleri olanaklı hale getirecek bir yaklaşım geliştirmektir.

Doktora çalışmasının özel amacı ise geliştirilen bu yaklaşımdan yararlanarak yapay tohumlamada kullanılan ana arı ve erkek arı ırkının, semen enjeksiyon sırasının ve bazı sperm kalite özelliklerinin (sperm canlılığı, semen hacmi, sperm sayısı vb) ana arının yan yumurta kanallarından sperm torbasına göçe etkisinin olup olmadığını belirlemektir.

#### **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

Tez çalışması 5 ana aşamadan oluşmaktadır. Canlı materyali oluşturma işlemleri araştırmanın 1. aşamasıdır. Bu aşamada Kafkas ve İtalyan ırkından deneme ana arıları ve erkek arıları yetiştirilmiş, ana arılar 2 ırkın erkeklerinin 2 farklı sırada toplanmış semenleri ile yapay tohumlanmıştır. Bu uygulama ile yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarında heterospermik içerik oluşturulmuştur. İkinci aşamada denetimli yetiştirilen erkek arıların sperm özellikleri belirlenmiştir. Araştırmanın 3. aşamasında yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarının diseksiyonu, sperm torbasındaki spermelerden ve erkek arıların vücut dokularından DNA izolasyonu yapılmıştır. Buraya kadar tüm işlemler A.Ü.Z.F. Zootekni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma ve Uygulama Birimi'nin saha ve laboratuvar olanakları ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın dördüncü ve beşinci aşamaları moleküler genetik çalışmalarını içermektedir. Dördüncü aşamada; yapay tohumlamada kullanılan Kafkas ve İtalyan erkek arıların sperm torbası içeriğinde genotipik ayrımı sağlayacak ırka özgü SNP taranmıştır. Bu aşamanın polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları A.Ü.V.F. Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında, DNA dizi analizleri ise REFGEN Şirketinde yürütülmüştür. Tezin son aşamasında sperm torbalarının heterospermik içeriklerinden izole edilen DNA örneklerinin kantitatif tayini pirosekanslama tekniği ile yapılmıştır. Pirosekanslama işlemi ise Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde yürütülmüştür. Projenin tüm bu aşamaları kronolojik olarak aşağıda ayrıntılı anlatılmıştır.

##### **4.1. MATERYAL**

Doktora tezinin canlı materyalini A. Ü. Z. F. Zootekni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma ve Uygulama Birimi'ndeki koloniler oluşturmuştur. Birimde bulunan Kafkas ve İtalyan ırkı kolonilerden seçilen birer koloni ana arı ve erkek arı yetiştirmede kullanılmışlardır.

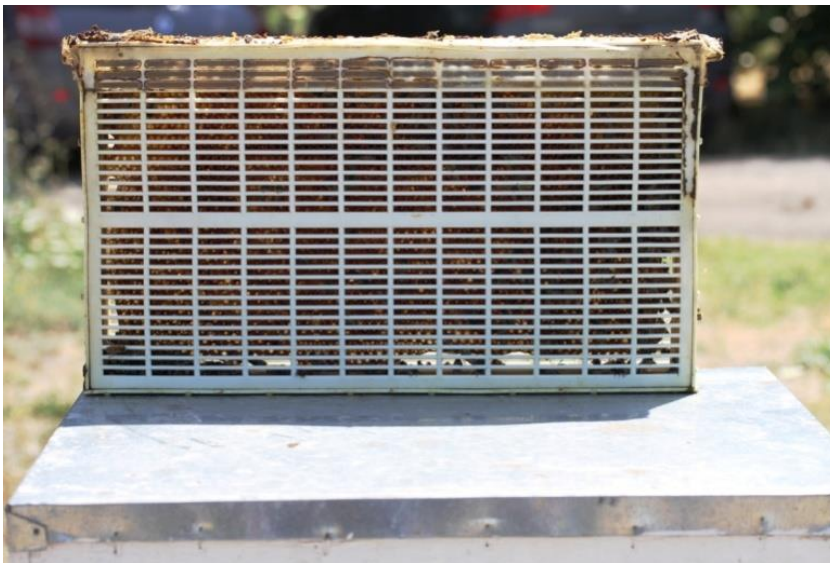
Çalışmanın çeşitli aşamalarında bazı kimyasallar ve kitler kullanılmıştır. Sperm canlılığının belirlenmesinde sperm canlılık kiti (L-7011, Molecular Probes), DNA izolasyonu için DNA izolasyon kiti (Invitrogen, PureLink® Genomic DNA kit), elektroforez aşamasında; Tris-HCl (10 mM) tampon maddesi, Etidyum bromür solüsyonu (EtBr, 10 ml -10 mg/ml), EDTA (BioShop Canada, Katalog No: EDT001.R), Borik asit

(BioShop Canada, Katalog No: BOR001.R), PCR aşamasında; dNTP (Thermo Scientific dNTP Set), ileri ve geri primer (Macrogen), *Taq*. buffer (Thermo Scientific Fermentas), *Taq* polimeraz (Thermo Scientific Fermentas), Pirosekanslama analizinde; PyroMark Custom Assay (Qiagen, Katalog No: 978776), PyroMark PCR Kit (Qiagen, Katalog No: 978703), PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen, Katalog No: 971802), PyroMark Bağlanma Tamponu (Qiagen, Katalog No: 979306), PyroMark Denaturasyon Solusyonu (Qiagen, Katalog No: 979307), PyroMark Yıkama Tamponu (Qiagen, Katalog No: 979308), PyroMark Bağlanma Tamponu (Qiagen, Katalog No: 979309), ImmucorStreptavidin Sepharose HP, kimyasal ve kitleri kullanılmıştır.

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. ERKEK ARI YETİŞTİRME

A. Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma ve Uygulama Birimi Arılığı'ndaki kolonilerin bakımları (varroa parazitine karşı ilaçlama, gelişen kolonilere kabartılmış petek verme ve ballık ilave etme, oğul vermeyi önleme) yapılmıştır. İlkbahar mevsiminde (Mayıs ayı) Kafkas ve İtalyan ırkı kolonilerden güçlü (kuluçkalığını tamamlamış) 1 Kafkas ve 1 İtalyan kolonisi erkek arı üretiminde kullanılmak üzere düzenlenmiştir. Seçilen her koloniye Mayıs ayı sonunda kabartılmış 1 erkek arı peteği ana arı ızgaralı plastik kafes içinde kuluçkalığa yerleştirilmiştir. Erkek arı peteği üzerinde hapsedilmiş ve ana arının erkek arı petek gözlerine yumurtlaması sağlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Ana arı ızgaralı plastik kafes içerisine alınmış erkek arı peteği

Ana arıların erkek arı peteklerine yumurtlaması izlenmiş, ana arı peteğin tamamına yumurtladığı gün belirlenmiştir. Ana arılar erkek arı petek gözlerinin tamamına yumurtladıktan sonra, kafesler kovanlardan çıkartılmış, ana arılar koloniye salınmış, erkek arı peteği kafessiz olarak yerine geri konulmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Pupa aşamasına ulaşmış erkek arı petek gözleri

Ana arıların erkek arı peteklerine yumurtlama tarihlerinden erkek arıların olası ergin çıkış günleri göz önüne alınarak çıkıştan 1-2 gün önce erkek arı petekleri ana arı ızgaralı plastik kafeslere yeniden aktarılmıştır. Bu uygulama ile çıkış yapan erkek arıların kovan içine dağılmaları önlenmiştir (Şekil 4.1).

Ergin erkek arı çıkışları düzenli kontroller ile takip edilmiş ve aynı günde çıkış yapan erkek arılar göğüslerinin üzerinden renkli boya kalemleri (Edding 751 sarı, mavi, beyaz, kırmızı) ile markalanmışlardır (Şekil 4.3). Böylece erkek arıların yetiştirildikleri kolonilerin ve yaşlarının izlenmesi olanaklı olmuştur. Kafkas ırkından toplam 2100 erkek arı, İtalyan ırkından 1960 erkek arı markalanmıştır.



Şekil 4.3. Erkek arı markalama

Markalanan ergin erkek arıların serbest uçuşuna izin verilmemiş ve cinsel olgunlaşma sürecinde (0-12 gün) özel hazırlanmış ana arısız banka kovanının içinde (erkek arı bankalama kovani) tutulmuşlardır. Erkek arı banka kovani yapay tohumlama gününe kadar karanlık serin bir odada tutulmuştur. Yapay tohumlamadan 1 gün önce arılıkta nispeten izole bir yere konumlandırılan erkek arı banka kovanının giriş deliği açılmıştır. Böylece cinsel olgunlaşmasını tamamlamış erkek arıların uçuşlarına izin verilerek yapay tohumlama öncesinde sindirim kanallarını boşaltmaları sağlanmıştır.

#### **4.2.2. ANA ARI YETİŞTİRME**

Kafkas ve İtalyan ırkından ana arı yetiştirmek için 1 başlatıcı ve 1 bitirici koloni hazırlanmıştır. Ana arılar aşılama yöntemi ile yetiştirilmiştir (109) Bu amaçla arılıkta bulunan saf Kafkas ve İtalyan kolonilerden 1'er koloni damızlık (larva kaynağı) koloni olarak belirlenmiştir. Aşılama günü hazırlanan aşılama çerçevelerindeki 50 temel yüksükten 25'ine Kafkas, diğer 25'ine ise İtalyan kolonisinden larvalar aşılanarak başlatıcı koloniye verilmiştir. Aşılama çerçevesi 2 gün sonra bitirici koloniye aktarılmıştır. Birinci parti aşılama 2 gün sonra ilkinde olduğu gibi 2. parti yedek aşılama yapılmıştır.

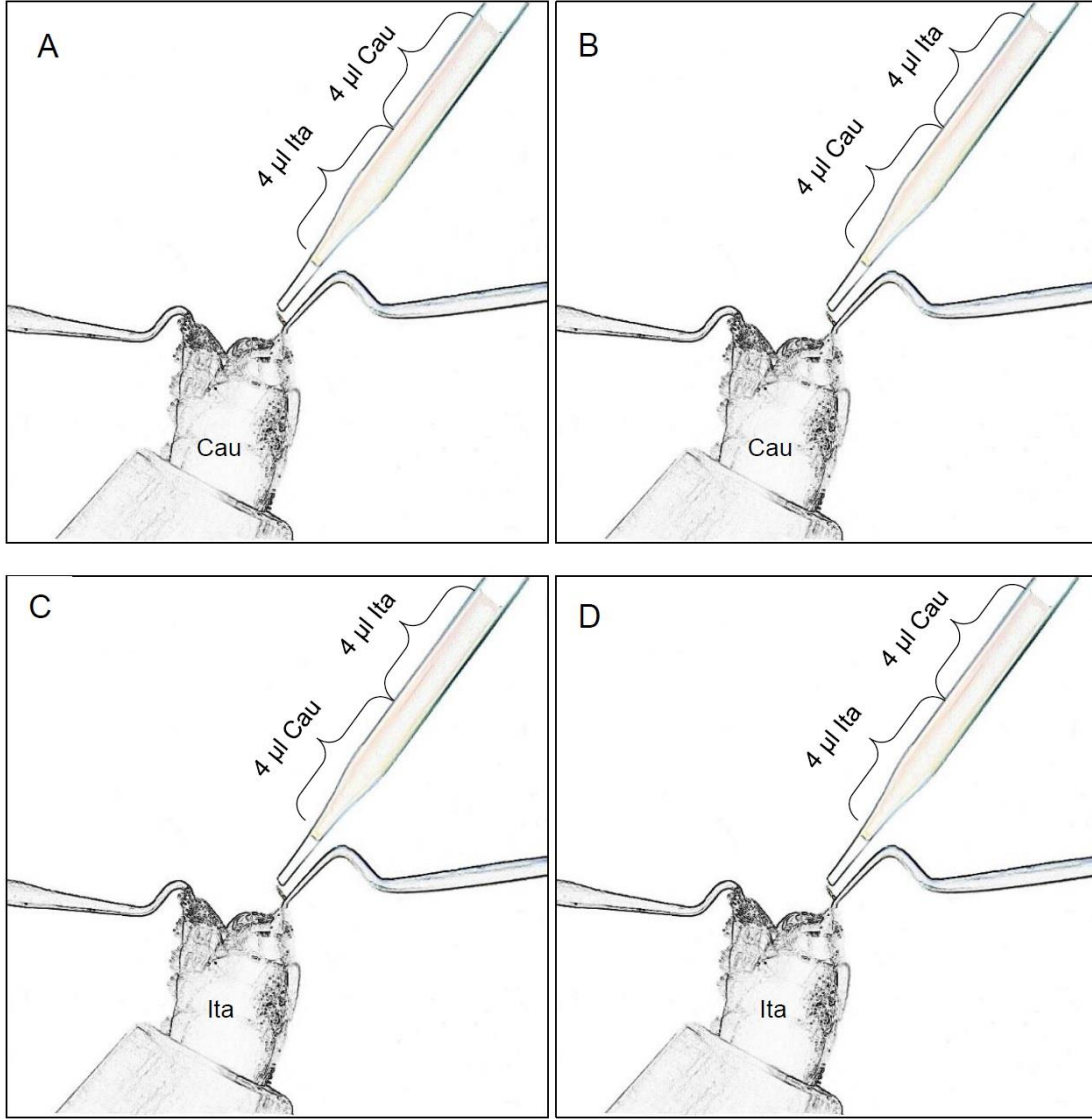
Deneme ana arılarının verileceği çiftleştirme kutuları mevsim başında hazırlanmıştır. Bu çiftleştirme kutularına kapalı yüksük aşamasındaki deneme ana arılarının kabul ettirilmesi

için kapalı yüksüklerin verilmesinden 4 gün önce kutuların yumurtlayan ana arıları alınmıştır. Ana arıların çıkış gününden 1 gün önce yüksükler çiftleştirme kutularına verilmiştir. Ana arı yüksükleri çiftleştirme kutularına dağıtıldıktan sonra kutularda ana arı çıkış kontrolü yapılmış, çıkmayan ana arıların yerine yedek yüksükler kullanılarak eksikler tamamlanmıştır. Dağıtılan yüksüklerden (60 adet) 53'ü çiftleştirme kutuları tarafından kabul edilmiştir.

#### **4.2.3. YAPAY TOHURLAMA**

Cinsel olgunlaşma sürecini çiftleştirme kutularında geçiren deneme ana arıları 4 deneme grubuna dağıtılmıştır. Ana arılar önce ırka göre (Kafkas ve İtalyan) gruplandırılmış, ardından her ırk grubundaki ana arılar enjekte edilecek 2 farklı semen kompozisyonu (1: Kafkas + İtalyan semeni, 2: İtalyan + Kafkas semeni) için rasgele 2 gruba ayrılmıştır. Kafkas ırkı ana arılar A ve B, İtalyan ırkı ana arılar C ve D gruplarını oluşturmuştur. Ana arıların her biri 6-7 günlük yaşta 8 µl semen ile yapay tohumlanmıştır. Semen toplama ve enjeksiyon işlemleri Schley yapay tohumlama aleti ile yapılmıştır. Erkek arılardan semen toplama işlemi geleneksel yöntem uygulanarak yapılmıştır. Erkek arı banka kovanından toplanarak laboratuvara getirilen erkek arılarda fiziksel uyarı yolu ile everziyon ve ejakülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. A grubundaki ana arılar için önce Kafkas ırkı erkek arılardan 4 µl, ardından İtalyan ırkı erkek arılardan 4 µl semen mikrosiringanın cam ucuna toplanarak tek ana arı için gerekli doz tamamlanmıştır. B grubu ana arılara enjekte edilecek semen kompozisyonu ise önce İtalyan ırkı erkek arılardan toplanmış 4 µl semen ve ardından Kafkas ırkı erkeklerden toplanmış 4 µl semenden oluşmuştur. Aynı semen toplama düzeni İtalyan ırkı ana arılar için de uygulanmış, C grubu ana arılar İtalyan+Kafkas erkeklerinin semen kombinasyonu, D grubu ana arılar ise Kafkas+İtalyan erkeklerinin semen kombinasyonu ile yapay tohumlanmıştır. Erkek arılardan semen toplama işlemi sırasında her erkek arıdan yaklaşık 1 µl semen Gilmont mikrometreli Harbo şiringası (Gilmont Instruments, Barrington, IL) ölçülerek alınmış, böylece her ana arıya enjekte edilecek semenin doğru hacimde ve kompozisyonda olması sağlanmıştır (199). Bu düzenleme ile erkek arı ırkının (sperm rekabeti), ana arının ırkının (dişinin gizli seçimi) ve semen enjeksiyon sırasının etkisini bir arada test etmeye uygun bir kurgu oluşturulmuştur (Şekil 4.4).





Şekil 4.4. Yapay tohumlama ile oluşturulan deneme grupları (Cau; Kafkas, Ita;İtalyan)

Yapay tohumlamanın her aşamasında her ana arı teker teker işlem görmüştür. Yapay tohumlanan ana arı ayılır ayılmaz kutusuna (kendi kolonisine) doğrudan salınarak kabul ettirilmiştir. Yapay tohumlama işleminden 1 gün sonra ana arılar kutularında kontrol edilmiştir. Kontrol günü ana arılar yumurtlamaya başlamalarını teşvik amaçlı, ikinci CO<sub>2</sub> uygulamasına (5 dk) maruz bırakılmış ve yine ayılır ayılmaz kolonilerine geri verilmişlerdir. Yapay tohumlama işleminden 3 gün sonra çiftleştirme kutuları düzenli aralıklarla (her gün 2 kez) kontrol edilmiştir. Bu kontrollerde yumurtlamaya başlayan ana arıların yumurtlamaya başlama günleri kaydedilmiştir. Çiftleştirme kutularına kabul ettirilen 53 ana arı yapay tohumlanmıştır.



Yapay tohumlanmış ana arıların çiftleştirme kutularında ilk yumurtlamaya başlama gününden itibaren 1 ay kadar yumurtlamayı sürdürmelerine izin verilmiştir. Ardından ana arılar çiftleştirme kutularından alınarak etil alkol (% 96) içeren mikrotüplere (1,5 ml) aktarılmış ve diseksiyon işlemi ve moleküler genetik analizlere kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmişlerdir. Yapay tohumlanmış deneme ana arılarının yanı sıra doğal çiftleşmiş 15 ana arı diseksiyon ve DNA izolasyonu ön çalışmalarında kullanılmak üzere derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **4.2.4. ERKEK ARILARIN SPERM ÖZELLİKLERİ**

Yapay tohumlamada kullanılmak üzere Kafkas ve İtalyan ırkından birer koloniden yetiştirilen erkek arıların bir kısmı sperm özelliklerini belirlemek için tutulmuştur. Cinsel olgunlaşmasını tamamlamış bu erkek arılarda ejakülat hacmi, sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu ve sperm canlılığı belirlenmiştir. Her ırktan 9 erkek arı sperm sayısı, sperm konsantrasyonu ve ejakülat hacmi, 6 erkek arı ise sperm canlılığı testinde kullanılmıştır. Sperm özelliklerinin analizi öncesi her erkek arının canlı ağırlığı hassas terazi (Sartorius BP-121S ± 0.1 mg) ile tartılarak belirlenmiştir.

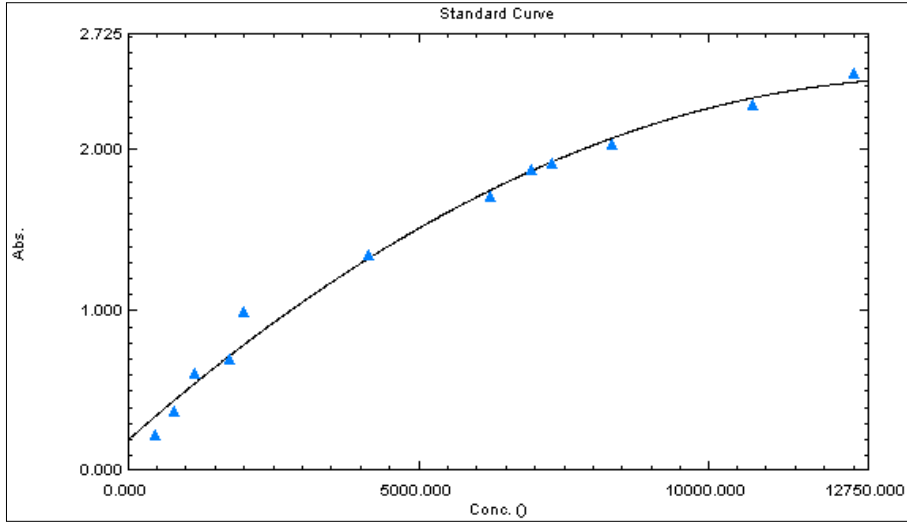
##### **4.2.4.1. Sperm Sayısı, Sperm Konsantrasyonu ve Ejakülat Hacmi**

Ejakülat hacmi; fiziksel uyarı sonucu ters yüz olarak açığa çıkmış endofallus üzerindeki ejakülatın stereomikroskop altında Gilmont mikrometreli Harbo şırıngasının cam ucuna çekilmesi yoluyla belirlenmiştir. Hacmi belirlenmiş semende sperm konsantrasyonunu belirlemek için, mikroşırınganın cam ucundaki semen kullanılmıştır. Semen içinde 1000 µl Modifiye Kiev Solüsyonu bulunan kuvars küvete (Hellma, 1.4 ml) aktarılmıştır (Şekil 4.5). Küvet içinde semen iyice dağıtılmış ve hemen ardından küvet spektrofotometreye (Shimadzu UV1800) yerleştirilerek Kiev-semen karışımının 260 nm dalga boyunda verdiği absorbans değeri saptanmıştır (200).



Şekil 4.5. Semen örneğinin spektrofotometre ile analizi için hazırlanması

Elde edilen absorban değerlerinin sperm sayısına dönüştürülmesi için farklı konsantrasyonlarda 12 semen-solüsyon karışımı örneği önce spektrofotometre ile ölçülmüş, ardından ışık mikroskobu altında Thoma lamı ile sperm sayımı yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda semen-solüsyon karışımı elde etmek için Gilmont mikrometrelili Harbo şırıngasına farklı hacimlerde semen örnekleri toplanmıştır. Toplanan her semen örneği 1 ml MKS solüsyonu içeren küvette dağıtılmış ve spektrofotometre ile absorban değerleri elde edilmiştir. Absorban değerleri elde edildikten sonra mikroskop altında sayımının rahat yapılabilmesi için semen örneklerinin yoğunluğuna göre belirli oranlarda çeşme suyu ilave edilerek seyreltilmiş ve sperm hücrelerinin halkasal konfigürasyonlar oluşturması sağlanmıştır. Sulandırılmış semen örneğinden 1'er damla Thoma lamı üzerinde bulunan 2 sayım alanına damlatılmıştır. İşlemler 3 kez tekrar edilerek her bir semen karışımında 6 kez sayım yapılmış ve sayımların ortalaması alınmıştır. Thoma lamı üzerinde sayılan ortalama sperm sayısı değeri sulandırma faktörüne göre uygun katsayı ile çarpılarak sperm sayısı tahmin edilmiştir. Ardından Thoma lamı sayımları ile spektrofotometre ölçümlerinden kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.6). Kalibrasyon eğrisi, absorban ölçümünde kullanılan spektrofotometrenin yazılımı (Shimadzu-UV Probe, Version 2.33) ile elde edilmiştir.



Şekil 4.6. Sperm sayılarının tahmininde kullanılan kalibrasyon eğrisi.

#### 4.2.4.2. Sperm Canlılığı

Diseksiyon işlemi gerektirmediği için ejaküle edilmiş semende sperm canlılığını belirlemek sperm depolama organlarında (erkek arıda seminal kese, ana arıda sperm torbası) sperm canlılığı belirlemekten daha kolaydır. Ancak, erkek arılarda endofallusun everzasyonu ve bunu izleyen ejakülasyon süreci sperm canlılığının azalmasına neden olmaktadır (97). Bu nedenle tez çalışmasında seminal keselerde sperm canlılığı belirlenmiştir. Bunun için erkek arılar tek disekte edilerek seminal keseler bütün halde vücut dışına çıkartılmıştır. Disekte edilecek erkek arı alt yüzeyi yukarı bakar pozisyonda prafin blok üzerine göğsünden ve abdomen ucundan böcek iğneleri ile sabitlenmiştir (Şekil 4.7). Makroskop görüntü alanında erkek arının karın halkalarının 3.-5. sternitlerinin her 2 yanı ince uçlu diseksiyon makası (Hammacher, Solingen) ile kesilerek geniş bir pencere açılmış, bu açıklıktan seminal keseler ve mukus bezleri ince uçlu bir forseps ile alınmıştır (Şekil 4.8). Seminal keseler mukus bezlerinden forseps yardımıyla ayrılmış, ardından içinde 150 µl MKS bulunan bir saat camına aktarılmıştır. Seminal keselerin içindeki semen dikkatlice boşaltıldıktan sonra boş keseler sıvıdan alınmış, sonra saat camı yavaşça çalkalanarak semen kitlesinin MKS içerisinde homojen dağılması sağlanmıştır. Ardından MKS-semen karışımı bir mikrotüpün (0,5 ml) içine aktarılmıştır.



Şekil 4.7. Parafin blok üzerinde sabitlenmiş bir erkek arı



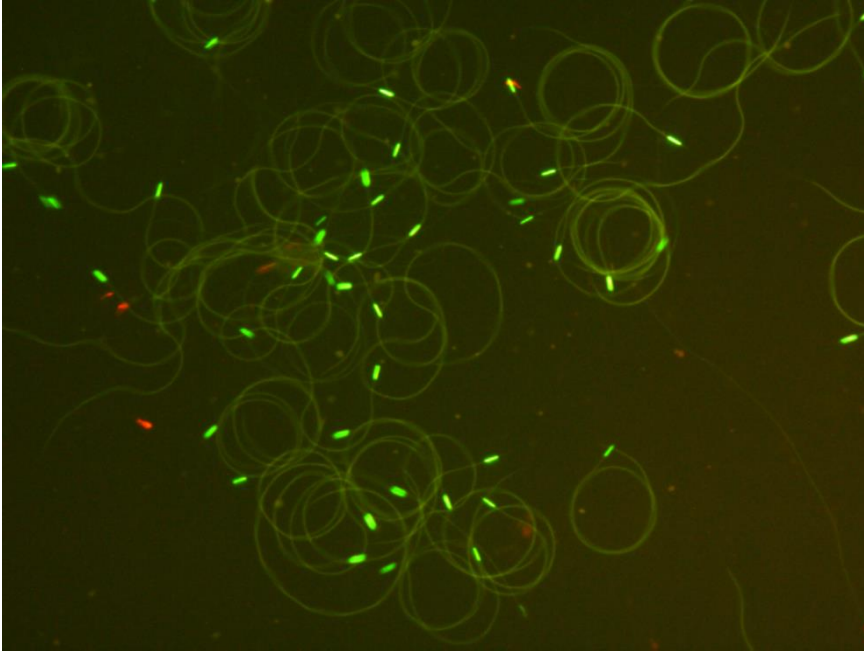
Şekil 4.8. Seminal kese ve mukus bezlerinin abdomenden çıkartılması

Sperm canlılığı testinde ikili floresan boyama tekniği kullanılmıştır. Bunun için SYBR-14 ve Propidiyum İyodid (PI) floresan boya içeren bir sperm canlılık kiti (L-7011, Molecular Probes) kullanılmıştır. Mikrotüp içerisindeki MKS-semen karışımına 0,7  $\mu$ l SYBR-14 ve 0,7  $\mu$ l PI ilave edilmiş, ardından sperm hücrelerinin boyanması için örnekler su banyosunda (Nüve BM 302) 35 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra mikrotüp içerisindeki karışımdan lam üzerine 3 farklı alana 3 damla bırakılarak üzerleri lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica DM3000, mavi eksitasyon filtresi: I3 ve yeşil eksitasyon

filtresi: N21, Şekil 4.9) altında incelenmiştir. Membran bütünlüğü bozulan sperm hücreleri PI floresan boyasını alabildikleri için ölü hücreler floresan mikroskop altında kırmızı ışığa, SYBR 14 boyasını kabul eden canlı hücreler yeşil ışığa yaymaktadır (Şekil 4.10). Lam üzerindeki 3 farklı alanın farklı yerlerinde canlı ve ölü hücreler sayılmış, aynı tüpten 2 preparat daha hazırlanarak toplam 3 lam üzerindeki örneklerde 400'ün üzerinde sperm sayımı yapılmıştır. Sperm canlılığı (%); canlı spermlerin (adet) sayılan toplam (ölü+canlı) sperm hücreleri içindeki payı olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica DM3000)



Şekil 4.10. Ölü (kırmızı) ve canlı (yeşil) spermlerin floresan mikroskofta görünümü

#### 4.2.4.3. Sperm Uzunluğu

Sperm uzunluğu ölçümü için Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların ejakülatlarından örnekleme yapılmıştır. Her erkek arının MKS-semen karışımından 3 damla bir lamın 3 farklı alanına damlatılmış ve üzerleri lamel ile kapatılmıştır. Her bir erkek arının 20 sperminin görüntüsü floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu kullanılarak (Leica DM3000) alınmıştır. Sperm uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), mikroskop yazılımı (Leica Application Suite, Version 3.3.1) yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sperm uzunluğu ölçümü

#### 4.2.5. ERKEK ARILARDAN DNA İZOLASYONU

Bir erkek arının ürettiği spermeler vücut hücrelerinin klonlarıdır. Buna bağlı olarak spermden izole edilen DNA ile vücut dokularından izole edilen DNA aynıdır. Bu nedenle, yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarının heteroplazmik içeriğinde ayırım için gerekli referans (genetik bilgi) erkek arı vücut dokularından sağlanmıştır. DNA izolasyonunda izlenen yöntem aşağıda açıklanmıştır.

Yapay tohumlamada kullanılmış erkek arılar DNA izole edilinceye kadar %96'lık etil alkol içeren cam kavanozlar içerisinde derin dondurucuda ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu için DNA izolasyon kiti (Invitrogen, PureLink® Genomic DNA kit) kullanılmıştır. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.

DNA, erkek arıların göğsündeki uçuş kası dokularından izole edilmiştir. Erkek arıların göğüs kısmı baş ve abdomenden ayrılmış, kanatlar ve bacaklar göğüsten uzaklaştırılmıştır. Daha sonra erkek arı göğsü bistüri ile ortadan ikiye bölünmüş, parçalardan birisi bistüri yardımıyla petri kabı üzerinde daha küçük parçalara ayrılarak mikrotüpe (1.5 ml) aktarılmıştır. Mikrotüpdeki dokular üzerine 180 µl “PureLink® Genomic Digestion Buffer” ve 20 µl Proteinaz K eklenmiş ve 55 °C’ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve BM 302) 4-5 saat tutulmuştur. İnkübasyonun ardından örnekler oda sıcaklığında santrifüj edilmiş (15 000 rpm) ve tüp dibine çökertilen dokuların üzerinde kalan üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarılmıştır. Yeni mikrotüpdeki örneğin RNA’sının parçalanması için 20 µl RNaz eklenerek 5-10 sn vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir. Ardından mikrotüpe 200 µl “PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer” eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra içerisine 200 µl %99’luk etil alkol eklenmiştir.

Lizat içerisindeki DNA’nın ayrıştırılması için toplama tüpüne “PureLink® Spin Column” yerleştirilmiş ve lizat spin kolona aktararak 1 dk santrifüj (10 000 g) edilmiştir. Spin kolonlar başka bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 500 µl “Wash Buffer 1” eklenerek 1 dk santrifüj edilmiştir (10 000 g). Spin kolonların yeni tüplere aktarılmasından sonra 500 µl “Wash Buffer 2” eklenmiş ve 3 dk santrifüj edilmiştir (15 000 rpm).

Saflaştırılmış DNA’nın spin kolondan ayrıştırılması için spin kolon yeni bir mikrotüpe yerleştirilmiş ve üzerine 25 µl “PureLink® Genomic Elution Buffer” eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk bekletmeden sonra mikrotüp 1 dk 15 000 rpm santrifüj edilerek DNA izolasyon işlemi tamamlanmıştır. İzolasyonun ardından her erkek arıdan izole edilen DNA miktarı (ng/µl) ve saflığı nanodrop spektrofotometre (260/280 dalga boyu, ND-2000) ile belirlenmiş, DNA’ların sağlamlıkları ise TAE tamponu ile hazırlanmış %1’lik agaroz jelde koşturularak test edilmiştir. Agaroz jel görüntüleme UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) ile yapılarak dijital ortamda kayıt edilmiştir. İzolasyonu tamamlanan örnekler analizlerde kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) depolanmıştır. PCR analizleri öncesi erkek arı DNA örnekleri sulandırılarak 10 ng/µl konsantrasyonda tutulmuşlardır.

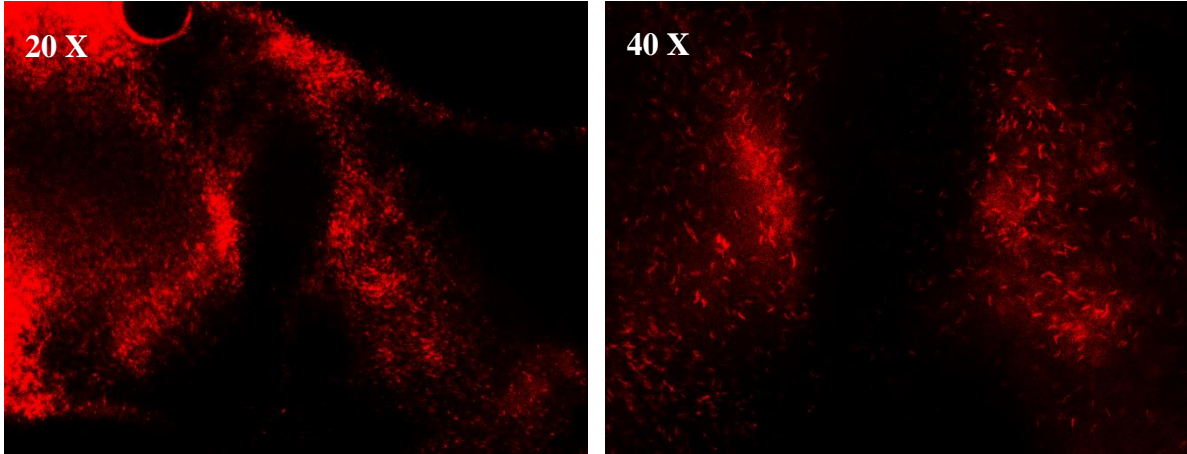
#### **4.2.6. SPERM TORBASI İÇERİĞİNDEN DNA İZOLASYONU**

Sperm torbasının içindeki spermlerin sperm torbası dokularına bulaştırılmaksızın ayrıştırılması doğru sonuç elde etmenin temel koşuludur. Ana arı sperm torbası dokusunun



sperm torbası içeriğine bulaştırılması yapay tohumlanmış heteroplazmik içerikte ana arı ile aynı ırktan erkek arıların DNA miktarının yanlış ölçülmesine (olması gerekenden fazla çıkmasına) neden olacaktır. Bu nedenle ana arıların sperm torbası içeriklerinden DNA izolasyonunun başarıyla gerçekleştirilmesi araştırmanın en kritik aşamalarından birisidir. Ana arının diseksiyonu ve sperm torbasının yabancı doku bulaştırılmaksızın boşaltılması için ön çalışma yapılmış ve aşağıdaki aşamalar izlenerek işlem tamamlanmıştır.

Diseksiyon ön çalışması derin dondurucuda (-20 °C) etil alkolde (%96) tutulan deneme dışı doğal çiftleşmiş ana arılar kullanılarak yapılmıştır. Sperm torbası diseksiyon protokolü ana arıya ait dokuların varlığını floresan boyama yöntemi ile test edilerek oluşturulmuştur. Ana arıların sperm torbalarından çıkarılan sperm, 150 µl serum fizyolojik içinde 0,7 µl PI ile boyanmış ve su banyosunda (35 °C) 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra lam üzerine karışımdan 1 damla örnek alınmış ve flöresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica, DM3000) ile farklı büyütmelelerde (4x, 10x, 20x, 40x ve 60x) inceleme yapılmıştır. Yapılan incelemede sperm hücrelerinden farklı doku ve hücreler taranmış ve uygulanan diseksiyon protokolünün herhangi bir yabancı doku bulaşmasına neden olmadığı kesinleştirilmiştir. Uygulanan diseksiyon protokolü aşağıda özetlenmiştir. Sperm torbasında elde edilen spermlerin farklı büyütmelelerdeki görüntülerine ilişkin bir örnek Şekil 4.12’de verilmiştir.

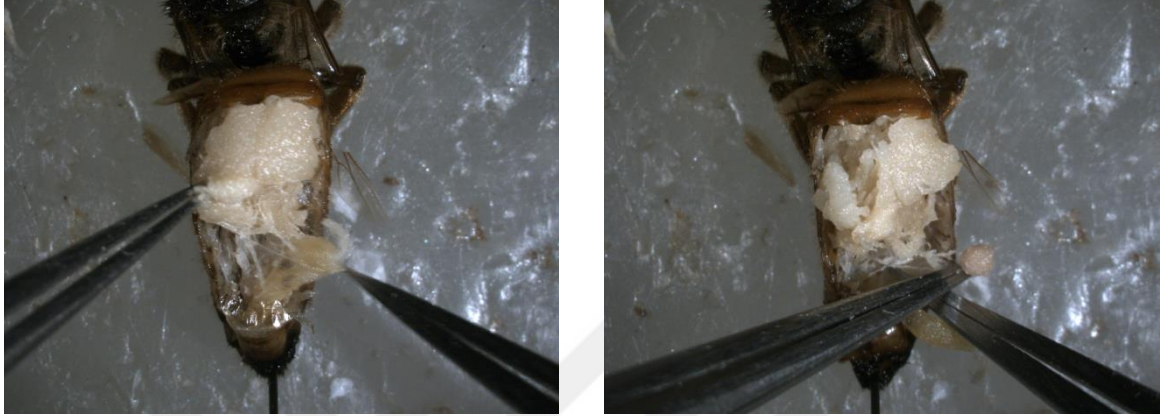


Şekil 4.12. Floresan boyama ile farklı büyütmelelerde (20x ve 40x) çekilmiş bulaşıksız sperm torbası içeriği

Diseksiyon stereomikroskop altında (Leica, Z16 APO) yapılmıştır. Ana arı parafin blok üzerine böcek iğneleri yardımıyla göğüsten ve karnın son segmentinden sabitlenmiştir. Diseksiyona engel olmaması için kanat ve bacaklar böceğin her iki yanından böcek iğneleri

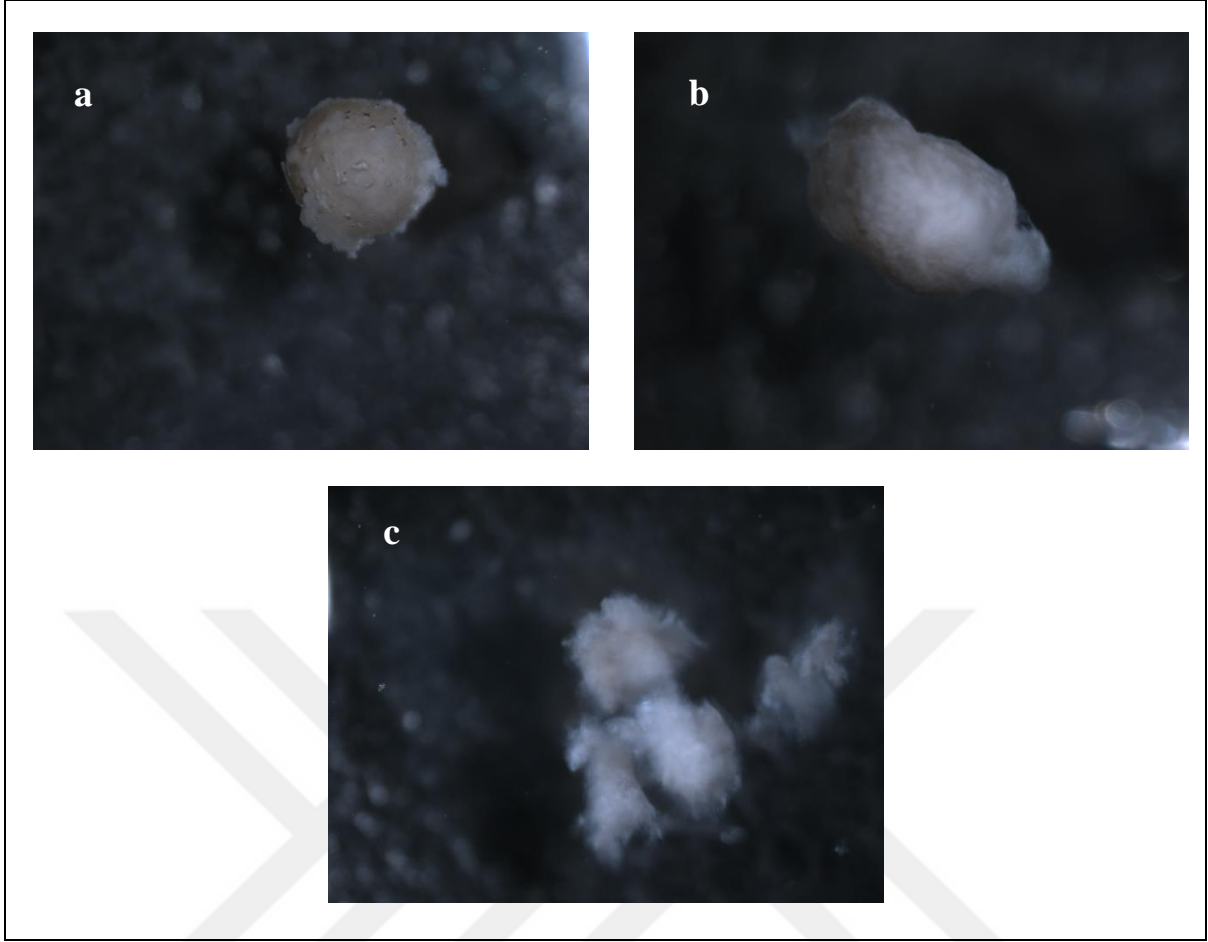


ile geriye alınmıştır. Abdomen halkalarının 2.-5. tergitleri 2 yandan (arkadan öne doğru) diseksiyon makası ile kesilmiştir. Kesilen karın plakaları ince uçlu forsep ile uzaklaştırılmıştır. Ardından sindirim kanalı abdomenden uzaklaştırılmış ve sperm torbası açığa çıkartılmıştır. Sperm torbası sperm torbası kanalından forsep ile tutularak 150 µl serum fizyolojik içeren saat camına aktarılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Ana arının sperm torbasının çıkarılması

Serum fizyolojik içerisindeki sperm torbasının üzerini saran trake ağı ince uçlu forsep ile sperm torbası patlatılmaksızın dikkatlice sıyrılmıştır. Sperm torbası temiz bir steril saat camı içerisine aktarılarak serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Sperm torbası aynı yolla üçüncü kez yıkandıktan sonra yüzeyinde trake ağı ve sperm torbası bezlerine ait dokuların bulunup bulunmadığı mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ardından serum fizyolojik içerisindeki sperm torbası bir forsepin uçları ile kavranarak patlatılmıştır. Sperm torbasından açığa çıkan sperm kitlesi, içerisinde 150 µl serum fizyolojik bulunan saat camına mikro-pipet ucu ile aktarılmıştır. Sperm kitlesi ince uçlu böcek iğnesi ile didiklenerek (Şekil 4.14) dağıtılmıştır.



Şekil 4.14. Saat camına aktarılan sperm torbasının boşaltılması aşamaları; (a) bütün sperm torbası, (b) sperm torbasından çıkartılmış kitlesel haldeki sperm kitlesi, (c) dağıtılmış sperm torbası içeriği.

Sperm torbasından bulaşksız sperm elde etme yöntemi geliştirildikten sonra deneme ana arılarının sperm torbaları içeriklerinden DNA izolasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Sperm torbası içeriğinden DNA izolasyonu için de DNA izolasyon kiti (Invitrogen, PureLink® Genomic DNA kit) kullanılmıştır. İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık ölçümü nanodrop spektrofotometre (ND-2000) ile yapısal bütünlüğü ise TAE tamponu kullanılarak hazırlanmış %1'lik agaroz jel elektroforezi ile saptanmıştır. Agaroz jel görüntüleme UV ışık üzerinde gerçekleştirilmiş ve jel görüntüleri görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) ile dijital ortamda kayıt edilmiştir. Sperm torbaları içeriklerinden PCR ve pirosekanslama analizleri öncesinde örneklerin DNA konsantrasyonu saf su ile seyreltilmiştir (7 ng/μl).

#### 4.2.7. TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ (SNP) TARAMASI

Doktora tezinin bir diğer kritik aşaması Kafkas ve İtalyan bal arısı ırklarını birbirinden ayırmayı sağlayacak ırka özgü SNP'lerin belirlenmesidir. Bu belirleme heteroplazmik sperm torbası içeriğini oluşturan Kafkas ve İtalyan erkekleri spermelerinin moleküler genetik teknikler ile ayırımının ön koşuludur. Çalışmada önce Kafkas ve İtalyan arılarına özgü tek nükleotid polimorfizmi (SNP) mtDNA'da araştırılmıştır. Ancak mtDNA'da Kafkas ve İtalyan kolonilerine özgü olduğu saptanan 2 SNP'in etrafındaki nükleotid dizileri A+T bakımından zengin olduğu için primer bağlanmasına uygun bulunmamış, bunun üzerine çekirdek DNA'da SNP'lerin taranmasına karar verilmiştir. Çekirdek DNA üzerindeki bölgeler ise rastgele taranmamıştır. Farklı bal arısı ırklarının çekirdek DNA'sı üzerinde görülen SNP farklılıklarını konu alan çalışmalar bulunmaktadır (19, 20). Ne var ki genom veri bankalarında bu çalışmaların SNP verilerinin gerçek pozisyonlarına ulaşılamamaktadır. Bu nedenle, farklı bal arısı ırklarının çekirdek DNA'sı üzerindeki SNP farklılıkları üzerine araştırmaları olan Dr. Amro Zayed (York Üniversitesi, Kanada)'in veri tabanından yararlanılmıştır. Kafkas ırkı ile aynı soyda (O soyu) yer alan *A. m. yemenitica* ırkını İtalyan ırkı ile karşılaştıran Dr Zayed, Hymenoptera genom veri tabanı 10. kromozom 10. scaffold'da yer alan ([http://hymenopteragenome.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/bee\\_genome45/](http://hymenopteragenome.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/bee_genome45/)) SNP'lerin tam konumlarını kişisel istek üzerine vermiştir. Ardından bal arısı genom veri tabanından aday SNP'lerin lokasyonlarını içeren alan 1000-1500 bp uzunluğunda DNA dizileri Fasta formatında kaydedilmiştir. Böylece Kafkas ve İtalyan ırklarını birbirinden ayırmayı sağlayacak aday SNP'lerin araştırılacağı 27 primer çifti primer tasarım modülü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak tasarlanmıştır (201). Tasarlanan 27 primer çiftinden bir ön seçim yapılmış ve 5-6 SNP taşıma olasılığı olan 5 primer (Çizelge 4.1) seçilmiştir. Bu primerler uygun oranlarda sulandırılarak stok solüsyonlar oluşturulmuş ve PCR koşulları optimize edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1. Kafkas (K) ve İtalyan (I) ırkı erkek arılarının çekirdek DNA'sında SNP taranması için kullanılan primerler

Primer Adı	Primerler (5'-3')
<b>J</b>	TGCCAGCAAGCCGAAAATTG AATGGCCTTGAGTAGCCGAC
<b>P</b>	TTCCCGATCCCTTTTGACGG TCGAGCTTGTTTCATTCCGCT
<b>T</b>	TCGCGTGATCGTGAATGACA TGCACCGTAAACCCTTTCGT
<b>W</b>	AAAGCGAGCTACACACCGAA GCACACCGAAGTTCCAACAC
<b>X</b>	CTGCGACGGTCACCGATTAT GAGGAGGGTTGACCTTTGGG

Çizelge 4.3'teki her primer çifti için toplam 30 µl hacimde PCR gerçekleştirilmiştir. PCR işleminde dNTP (Thermo Scientific dNTP Set), ileri ve geri primer (Macrogen), *Taq*. buffer (Thermo Scientific Fermentas) ve *Taq* polimeraz (Thermo Scientific Fermentas) kullanılmıştır (Çizelge 4.2). Termal döngü cihazında uygulanan, sıcaklık ve döngü sayısı programı Çizelge 4.3'te sunulmuştur. PCR aşamasından sonra ürünler (3 µl) 1X TAE ile hazırlanmış % 1,6'lık agaroz jelde görüntülenmiştir.

Çizelge 4.2. DNA dizi analizinde kullanılan PCR komponentleri ve konsantrasyonları

Komponent	Konsantrasyon
dNTP	0,167 mM
İleri primer	0,167 µM
Geri primer	0,167 µM
Taq Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM
Taq Polimeraz	1 U/µl
DNA	30 ng

Çizelge 4.3. Erkek arıların DNA dizi analizi için gerçekleştirilen PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
95	1	-
94	1	35 Döngü
55	1	
72	2,5	
72	5	-

Kafkas ve İtalyan erkek arılarından izole edilen DNA kullanılarak yapılan PCR'ı tamamlanan örneklerde Sanger DNA dizileme analizi yapılmıştır. Örneklerin dizi analizi REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Şirketi'nde gerçekleştirilmiştir. Baz dizisi belirlenecek PCR ürünleri, GSCN-Silika solüsyonu ve etanol kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrasında PCR fragmentlerinin konsantrasyonu 5-20 ng'a kadar seyreltilmiştir. Sekans PCR ise Bigdye Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems PN 4336935) ile yapılmıştır. PCR reaksiyonu için, 96 °C'de 1 dk başlangıç denatürasyonu, 96 °C'de 10 sn, 55 °C'de 5 sn ve 60 °C'de 4 dk olacak şekilde termal döngü cihazı ayarlanmıştır. Sekans PCR'ı NaOAc (3 M, pH 5,2) + Etanol ile saflaştırılmıştır. DNA dizi analizleri ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer cihazında yapılmıştır.

#### 4.2.8. PİROSEKANSLAMA ANALİZİ

Sanger DNA dizileme analizleri sonucunda Kafkas ve İtalyan ırkına özgü olduğu saptanan SNP'lerden biri seçilmiş ve bu SNP'in ana arıların sperm torbalarında oranları piroseklama analizi ile belirlenmiştir. Piroseklama analizi için birisi biotinle işaretlemiş bir primer çifti ve 3. primer olarak sekanslama primerine gereksinim vardır. Bu gereksinimi karşılamak için tasarlanan primer dizileri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Piroseklama analizinde kullanılan primerler

	Primer Dizisi (5'-3')
F Primer	Biotin-CTTCGCTGCTCTTTCCATC
R Primer	CCTGCGATATCAAACAATCG
S primer	AATGGCCCCACTCA

Piroseklama için tasarlanan birisi biyotinle işaretli primer çifti kullanılarak hem saf Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılardan hem de ana arıların sperm torbalarındaki

spermlerden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PCR toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR komponentleri ve termal döngü programı Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Pirosekanslamada kullanılan PCR komponentleri ve konsantrasyonları

<b>Komponent</b>	<b>Her reaksiyon için hacim</b>	<b>Son konsantrasyon</b>
ddH <sub>2</sub> O	7 µl	-
Pyro Master Miks	12,5 µl	1X
Coral Load	2,5 µl	1X
PyroMark PCR primer miks	1 µl	0,2 µM
DNA	3 µl	21 ng

Çizelge 4.6. Pirosekanslama analizinin PCR koşulları

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
95	15	-
95	0,5	45 Döngü
56	0,5	
72	0,5	
72	10	-

Pirosekanslama öncesi PCR ile çoğaltılan DNA'nın saflaştırılması ve tek zincirli hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için, bağlanma tamponu, yıkama tamponu, nükleotidler, sekans primeri, denatürasyon solusyonu, streptavidin, reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli pirosekanslama enzim ve substratlarına gereksinim duyulmaktadır. Pirosekanslama protokolü aşağıda sunulmuştur.

Pirosekanslama analizi öncesi, Pyromark yazılımı (PyroMark Q24, Versiyon 2.0.6) aracılığı ile reaksiyonun gerçekleştirileceği cihazı çalıştıracak bir çalıştırma dosyasının hazırlanmıştır Bunun için kullanılan kartuş ile aynı enstrüman metodu (Instrument Method 10) kullanılarak, yazılımın SNP miktarı analiz modu (AQ) seçilmiştir. Pirosekanslama analizi için uygun olan W bölgesi (T/C, Dizi ID: [XR\\_412396.2](#), LOC102654728) için sekanslanacak DNA dizisi (GT/CATGTTAC) çalışma dosyasına kaydedilmiş ve nükleodit atım sırası (AGCTATGT) oluşturulmuştur. PyroMark Q24 yazılımı içerisinde çalışılacak kuyular (24 kuyudan hangilerine örnek konulduğu) seçildikten sonra örnek bilgileri kaydedilmiştir. PyroMark Q24 kartuşu kuyularına yüklenecek enzim, substrat ve nükleotid

(A, T, G ve C) miktarı bilgileri print edilmiştir. Oluşturan cihaz çalışma dosyası PyroMark Q24 cihazına aktarılmak üzere taşınabilir belleğe aktarılmıştır.

Bir ekseni biyotin ile işaretlenmiş PCR ürününün streptavidine bağlanması için hazırlanmış bağlanma miksi (Çizelge 4.7) örnek başına 70 µl olacak şekilde, PCR ürününün bulunduğu Costar tablası kuyularına aktarılmıştır. Ardından 10 µl PCR ürünü Costar tablası içerisindeki bağlanma miksi ile karıştırılmıştır. Costar tablasının üzeri kaplandıktan sonra biyotin ile işaretli DNA eksenlerinin streptavine bağlanmasını artırmak için çalkalayıcıya (T-shaker) yerleştirilmiş ve 1400 rpm’de 10 dk çalkalanmıştır.

Çizelge 4.7. Örnek başına bağlanma karışımı solüsyonunun içeriği

<b>Komponent</b>	<b>Hacim</b>
Streptavidin	2 µl
Bağlanma tamponu	40 µl
ddH <sub>2</sub> O	28 µl

Hazırlanan pirosekanslama karışımı Q24 tablasında yer alan kuyuların herbirine 25 µl dağıtılmıştır. Çalkalama işleminden sonra costar tabla hızlıca vakum istasyonuna (Şekil 4.15) yerleştirilmiş ve el ünitesi ile tabla içerisindeki karışım hızlıca çekilerek (5-10 sn) saflaştırma işlemine başlanmıştır. Ardından el ünitesi %70’lik etil alkolde 5 sn vakumlanarak sırasıyla içerisinde yıkama tamponu 1 (5 sn) ve yıkama tamponu 2 (10 sn) küvezlerine aktarılmıştır. Vakum istasyonunun vakum pompası kapatıldıktan sonra el ünitesi, içerisinde pirosekanslama reaksiyon miksi bulunan Q24 tablasına yerleştirilerek 2 dk hafif hareketlerle çalkalanmıştır. Böylece streptavin kaplı manyetik boncuklara bağlanmış biyotinle işaretli tek eksenli DNA iplikçiklerinin pirosekanslama karışımı (Çizelge 4.8) içerisinde çözünerek el ünitesinden ayrılması sağlanmıştır. Ardından el ünitesi saf su içerisinde 2 kez yıkanarak temizlenmiştir.



Şekil 4.15. Vakum istasyonu

PyroMark Q24 tablası tutucusu ile birlikte ısıtıcı blok üzerinde 80 °C’de 2 dk tutulmuş, ardından oda sıcaklığında 10 dk bekletilerek soğutulmuş ve sekans primerlerinin streptavidin-biyotin kompleksindeki tek zincir DNA molekülüne eşlenerek bağlanması sağlanmıştır.

Çizelge 4.8. Her bir örnek başına pirosekanslama karışımı içeriği

<b>Komponent</b>	<b>Hacim</b>
Bağlanma tamponu	24,2 µl
Sekans primeri	0,8 µl

Pyromark Q24 cihazı kartuşunun ilgili kuyularına enzim, substrat, nükleotidler PyroMark yazılımı tarafından hesaplanan miktarlarda dağıtılmış ve kartuş, cihazın (Şekil 4.16) kartuş tutucu bölümüne yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulan Q24 tablası ise cihazın tabla tutucusuna sabitlenmiş ve daha önce bilgisayarda oluşturulan analiz çalıştırma dosyası program menüsünden seçilerek pirosekanslama reaksiyonu başlatılmıştır. Pirosekans reaksiyonu tamamlandıktan sonra ilgili dosyanın yazılımının yardımı ile analizi gerçekleştirilerek reaksiyonun sonuçları elde edilmiştir.





Şekil 4.16. Pyromark Q24 pirosekanslama cihazı

Toplam 36 ana arının sperm torbası 2 kez pirosekanslanmış ve ortalaması alınarak her ana arı için üzerinde durulan SNP bakımından oran (%) hesaplanmıştır.

Pirosekanslama reaksiyonunun doğru çalışıp çalışmadığı test edilmiştir. Bunun için Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarından elde edilen DNA örnekleri karıştırılmıştır (Çizelge 4.9). Böylece toplam hacimde SNP payları bilinen Kafkas ve İtalyan DNA karışımında pirosekanslama yapılarak beklenen ve gerçekleşen değerler karşılaştırılmıştır. Her karışım en az 3 kez pirosekanslanmış ve ortalamaları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. Validasyonda kullanılan Kafkas ve İtalyan DNA'sı karışım oranları (%)

Sıra	Kafkas erkek arı DNA'sı	İtalyan erkek arı DNA'sı
1	0	100
2	20	80
3	40	60
4	50	50
5	60	40
6	80	20
7	100	0

#### 4.2.9. İSTATİSTİK ANALİZ

Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların semen hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm sayısı, sperm canlılığı, sperm uzunluğu, everziyon-ejakülasyon yetenekleri ve sperm torbası içeriklerinde saptanan oransal SNP verilerinin erkek arı genotipi, ana arı genotipi ve semen enjeksiyon sırası bakımından karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Yapay tohumlanmış ana arıların yumurtlamasına kadar geçen süreler ve sperm torbası içerikleri basit varyans analizi (ANOVA) ile, grup ortalamaları arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. İstatistik analizlerde SPSS (15.0) paket programı kullanılmıştır. Sanger DNA dizi analizi sonuçları; FinchTV (1.4.0) (202), Bioedit (Hall, 1999) ve Mega 6.0 (203) paket programları ile görüntülenmiş ve baz dizileri hizalanmıştır.



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kafkas ve İtalyan ırkıdan yetiştirilmiş erkek arıların semen kompozisyonu ile yapay tohumlanmış, K ve I ırkıdan ana arıların yapay tohumlamadan yumurtlamaya kadar geçen süreleri, K ve I ırkı erkek arıların üreme özellikleri, erkek arılardan ve ana arıların sperm torbalarından izole edilen DNA sonuçları, K ve I ırkına özgü SNP verileri ve belirlenen SNP'lerden en uygun olanı kullanılarak gerçekleştirilen pirosekanslama analizi bulguları sırayla sunulmuştur.

### 5.1. YAPAY TOHURLAMA

Yapay tohumlanmış ana arıların ortalama yumurtlamaya başlama süresi 10,2 gündür. Ana arılar en erken 6 gün, en geç 19 gün sonra yumurtlamaya başlamışlardır. A grubunda yapay tohumlanmış Kafkas ana arılardan 11'i, B grubunda yapay tohumlanmış Kafkas ana arılardan 10'u, C grubunda yapay tohumlanmış İtalyan ana arılardan 8'i, D grubunda yapay tohumlanmış İtalyan ana arılardan 10'u yumurtlamıştır. Yapay tohumlama-yumurtlamaya başlama arası süre A, B, C ve D gruplarında sırasıyla 8,7, 11,2, 9,1 ve 11,6 gün bulunmuştur. Grupların yumurtlamaya başlamasına kadar geçen ortalama süre bakımından farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0,05$ ). Kafkas ırkı ana arıların (A+B grubu) ortalama yumurtlama süresi 9,9 gün, İtalyan ırkı ana arıların (C+D grubu) ise ortalama 10,5 gündür. K ve I ırkı ana arıların ortalama yumurtlamaya başlama süreleri arasındaki fark (0,6 gün) istatistik olarak önemsizdir ( $P>0,05$ ). Ana arıların yumurtlamaya başlama süresi ana arının ırkına bağlı olarak değişmemiştir ( $P>0,05$ ). Mikroşırınganın cam ucuna önce Kafkas ırkı erkek arıların semeni alınarak yapay tohumlanan ana arıların (A+D grubu) ortalama yumurtlama süresi 10,1 gün, önce İtalyan erkek arı semeni alınarak yapay tohumlanan ana arıların (B+C grubu) ortalama yumurtlama süresi 10,3 gündür. Ana arıya enjekte edilen semen kombinasyonundaki erkek arı önceliği de ana arıların ortalama yumurtlamaya başlama süresini etkilememiştir ( $P>0,05$ ; Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Yapay tohumlanmış ana arıların yumurtlama süreleri (gün)\*

Özellik	Yapay Tohumlama Grubu	N	Ortalama	Std. Hata	Min.	Maks.
Yapay tohumlamadan yumurtlamaya kadar geçen süre	A	11	8,7 a	0,73	6	14
	B	10	11,2 a	1,15	7	17
	C	8	9,1 a	0,74	7	13
	D	10	11,6 a	1,59	6	19
	Genel	39	10,2	0,58	6	19

\* Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemsizdir ( $P>0,05$ ).

## 5.2. ERKEK ARILARIN ÜREME ÖZELLİKLERİ

Kafkas ve İtalyan ırkıdan erkek arıların canlı ağırlık (15 günlük yaş), ejakülat hacmi, toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu özelliklerine (Çizelge 5.2) ilişkin ortalamalar farklı bulunmamıştır ( $P>0,05$ ). Ancak, K ve I ırkı erkek arıların sperm uzunlukları arasındaki fark (3,3  $\mu\text{m}$ ) önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Kafkas spermelerinin (242,8  $\mu\text{m}$ ) İtalyan spermelerinden (246,1  $\mu\text{m}$ ) 3,3  $\mu\text{m}$  daha kısa olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.2).

Ana arıların her biri 8  $\mu\text{l}$  semen ile yapay tohumlanmışlardır. Toplam hacmin yarısı (4  $\mu\text{l}$ ) Kafkas ırkı erkek arılardan diğer yarısı (4  $\mu\text{l}$ ) İtalyan ırkı erkek arılardan toplanmıştır. Yapay tohumlama işlemi sırasında 4  $\mu\text{l}$  semen toplamak için manuel uyarı uygulanmasına yanıt verev (everziyon ve ejakülasyonu tamamlayan) erkek arı sayısı bakımından genotipik farklılık önemlidir ( $P>0,05$ ). Kafkas ırkında 4  $\mu\text{l}$  semen toplamak için ortalama 7 erkek arı kullanılmışken, İtalyan ırkında ortalama 8,3 erkek arıdan semen toplanabilmiştir (Çizelge 5.3). Bunun yanı sıra denemede kullanılan Kafkas erkek arıların İtalyan erkek arılara göre daha kolay everze oldukları saptanmış ve erkek arılardan çok azının ejakülatızsız everziyon yapmış oldukları gözlenmiştir.

Çizelge 5.2. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların canlı ağırlık (mg), ejakülat hacmi (µl), sperm sayısı, sperm konsantrasyonu (milyon/µl), sperm canlılığı (%) ve sperm uzunluğuna (µm) ilişkin tanımlayıcı değerleri\*

Özellik	İrk	N	Ortalama	Std. Hata	Min.	Maks.
Canlı Ağırlık (mg)	Kafkas	6	209,4 a	4,98	187,1	220,6
	İtalyan	6	208,7 a	3,14	198,1	217,2
	Genel	12	209,0	2,81	187,1	220,6
Ejakülat Hacmi (µl)	Kafkas	6	1,03 a	0,033	0,9	1,1
	İtalyan	6	1,05 a	0,034	1,0	1,2
	Genel	12	1,04	0,023	0,9	1,2
Sperm sayısı (x10 <sup>6</sup> )	Kafkas	6	6,93 a	0,190	6,18	7,51
	İtalyan	6	6,85 a	0,205	6,13	7,57
	Genel	12	6,89	0,134	6,13	7,57
Sperm Konsantrasyonu (x10 <sup>6</sup> )	Kafkas	6	6,71 a	0,069	6,42	6,87
	İtalyan	6	6,65 a	0,214	6,13	7,35
	Genel	12	6,68	0,107	6,13	7,35
Sperm Canlılığı (%)	Kafkas	5	98,4 a	0,42	96,9	99,5
	İtalyan	5	98,5 a	0,32	97,9	99,7
	Genel	10	98,5	0,25	96,9	99,7
Sperm Uzunluğu (µm)	Kafkas	200	242,8 a	0,29	234,0	252,9
	İtalyan	224	246,1 b	0,28	236,7	256,2
	Genel	424	244,6	0,21	234,0	256,2

\* Her özellik satırında aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık önemsiz (P>0,05), farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık ise önemlidir (P<0,05).

Çizelge 5.3. Yapay tohumlamada her 4 µl semen toplamak için kullanılan erkek arı sayısı\*

Özellik	İrk	Ortalama	Std. Hata	Min.	Maks.
4 µl semen toplamak için kullanılan erkek arı sayısı	Kafkas	7,0 a	0,31	4	12
	İtalyan	8,3 b	0,58	4	19
	Genel	7,7	0,34	4	19

\* Farklı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistik önemlidir (P<0,05).

### 5.3. KAFKAS VE İTALYAN İRKİNE ÖZGÜ SNP'LER

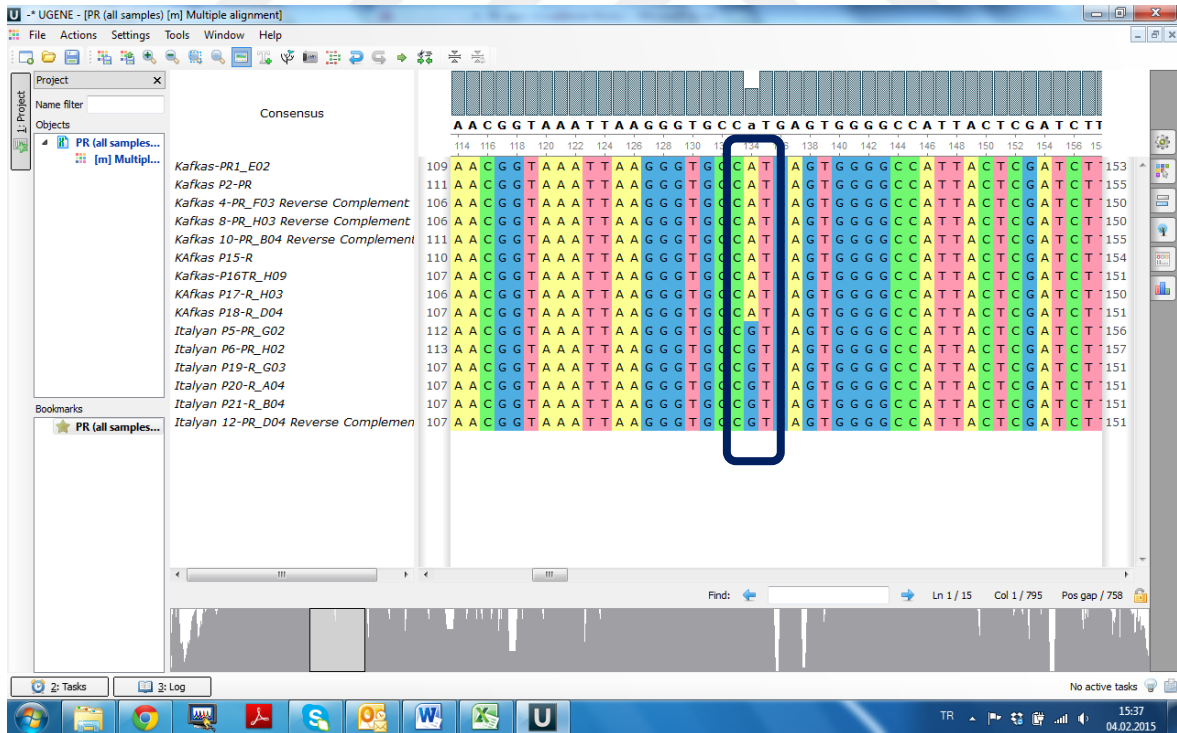
Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların vücut dokularından ve ana arıların sperm torbası içeriklerinden DNA izolasyonu verileri Ek-1 ve Ek-2'de sunulmuştur. Kafkas ve İtalyan

ırkı erkek arılardan DNA ekstraksiyonu sonrası jel görüntülerine ve SNP analizi yapılan 5 bölgenin PCR ürünlerinin jel görüntüsü örnekleri Ek-3 ve Ek-4’te verilmiştir.

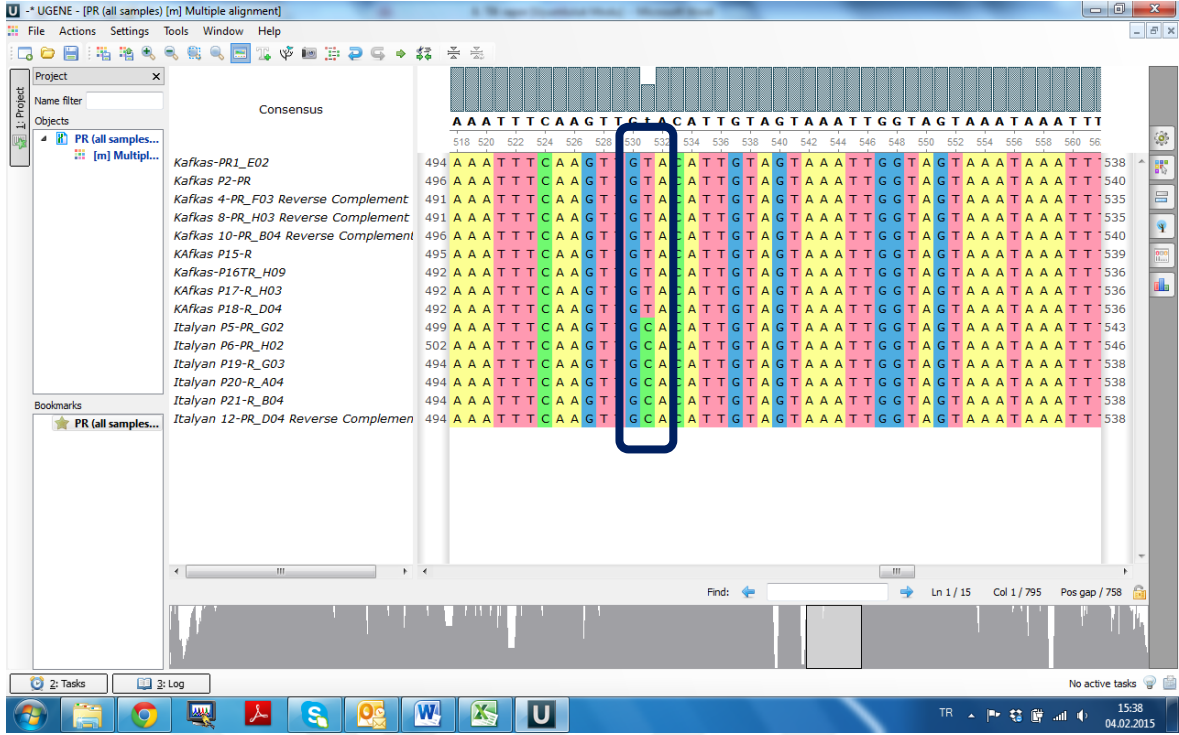
Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların DNA dizi analizi, 10. kromozomun 10. scaffold’u üzerinde seçilen 5 bölgede birçok SNP’in varlığını göstermiştir. Ancak bu farklılıkların büyük bölümünün coğrafi ırka bağlı olmayıp bireysel farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Saptanan SNP’lerden sadece 3’ünün (P bölgesinde 2 SNP, W bölgesinde 1 SNP) Kafkas ve İtalyan ırkını birbirinden ayırabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 5.4, Şekil 5.1-5.3).

Çizelge 5.4. Kafkas ve İtalyan ırkı bal arılarının ayırımını sağlayan SNP’ler

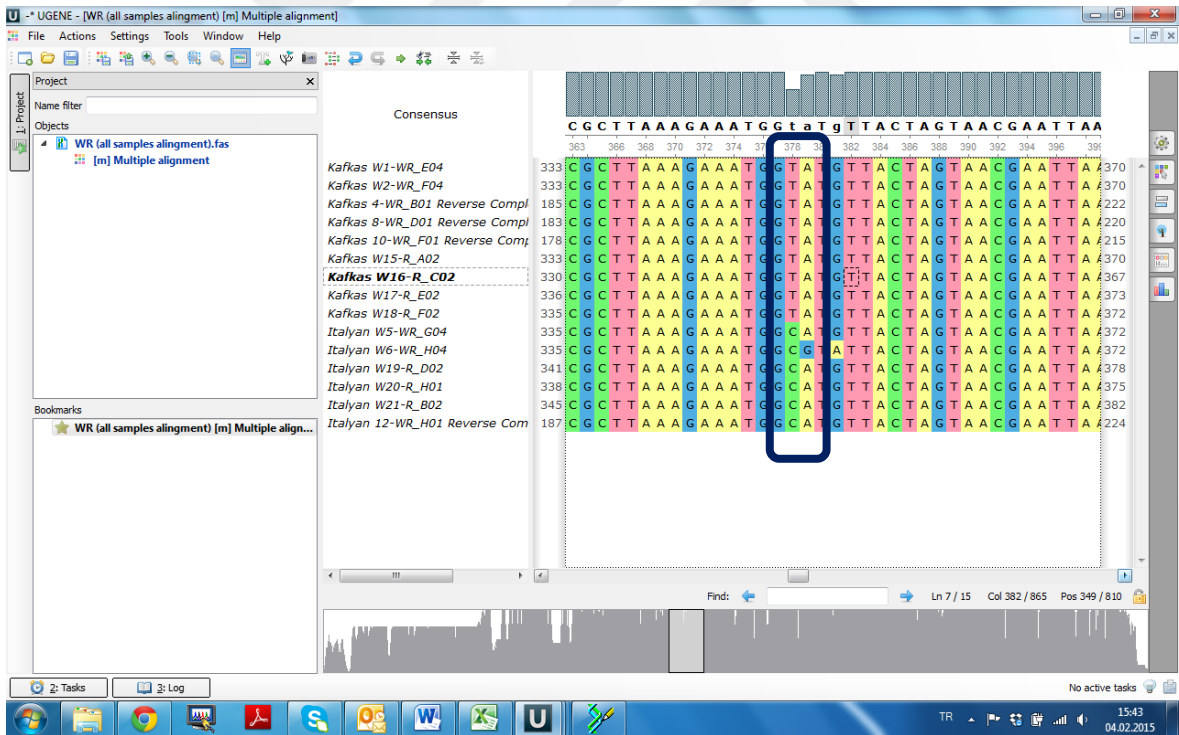
	Kafkas	İtalyan	Genom adresi (NCBI)
P Bölgesi (134. bç)	AAGGGTGCC <u>A</u> TGAGTGGGG	AAGGGTGCC <u>G</u> TGAGTGGGG	Dizi ID: <a href="#">XR_001704350.1</a> (LOC102656656)
P Bölgesi (531. bç)	TTCAAGTTG <u>T</u> ACATTGTAGT	TTCAAGTTG <u>C</u> ACATTGTAGT	Dizi ID: <a href="#">XR_001704350.1</a> (LOC102656656)
W Bölgesi (478. bç)	AGAAATGG <u>T</u> ATGTTACTAG	AGAAATGG <u>C</u> ATGTTACTAG	Dizi ID: <a href="#">XR_412396.2</a> (LOC102654728)?



Şekil 5.1. P bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: A, İtalyan: G)



Şekil 5.2. P bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: T, İtalyan: C)

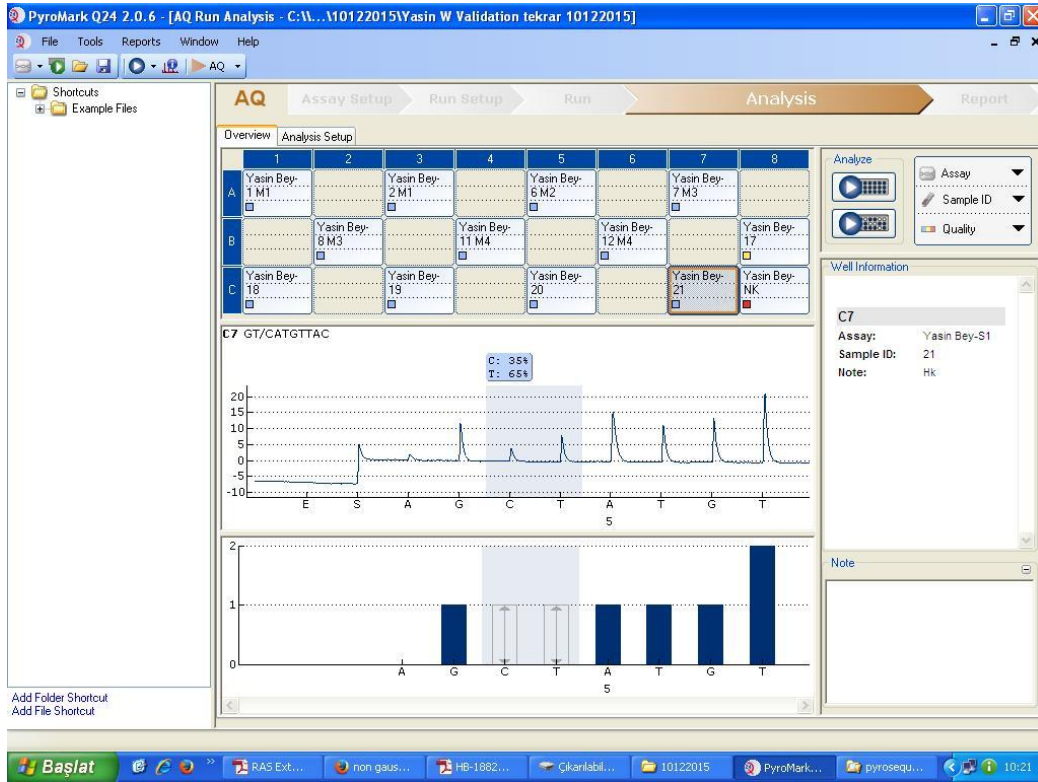


Şekil 5.3. W bölgesinde saptanan SNP (Kafkas: T, İtalyan: C)

## 5.4. PİROSEKANSLAMA

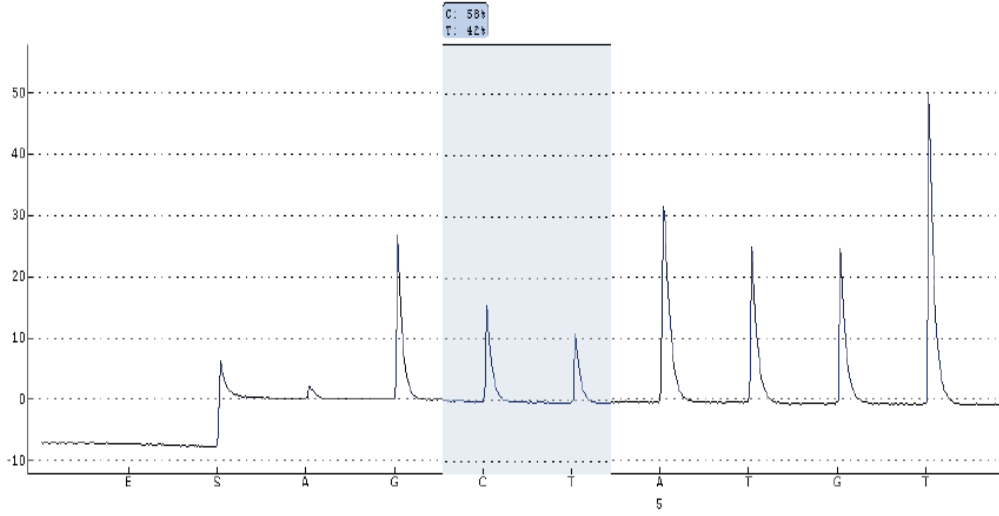
Pirosekanslama analizi öncesinde yukarıda verilen 3 SNP'in her biri için sekans primeri tasarlanmıştır. Tasarlanan sekanslama primerlerinden başarı skoru en yüksek olan W bölgesinde saptanan SNP'in kantitatif pirosekanslama analizinin yapılmasına karar verilmiştir.

Toplam 36 ana arının sperm torbası içeriği pirosekanslanmıştır. W bölgesinde saptanan Kafkas ve İtalyan ırkına özgü belirteçlerin (sırayla T ve C) pirosekanslama analizinde gösterdikleri piklerin yüksekliklerinden (Şekil 5.4-5.5) her bir sperm torbası içinde T bazının ve C bazının bulunma oranları belirlenmiştir.



Şekil 5.4. Pirosekanslama analizi sonuçlarının görüntülediği Pyromark yazılım arayüzü





Şekil 5.5. Pirosekanslama analizi sonunda elde edilen piklerinin görünümü

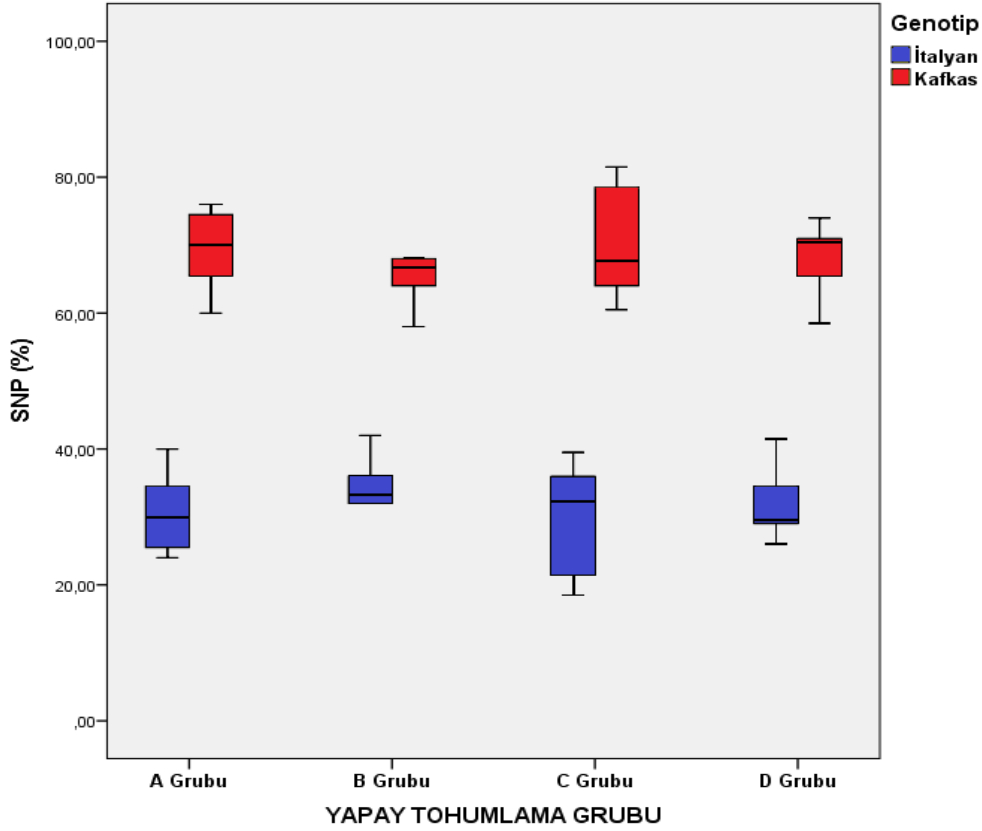
Pirosekanslama analizlerinden elde edilen oran ortalamaları ve diğer tanımlayıcı istatistikler Çizelge 5.5'te ve verilerin box-plot grafiğinde gösterimleri Şekil 5.6'da sunulmuştur. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların sperm torbalarında SNP oranları yapay tohumlama grubuna göre değişmemiştir ( $P>0.05$ ). Yapay tohumlanan tüm ana arıların sperm torbaları içeriklerinde Kafkas ırkı erkeklerin belirteci SNP oranı genel ortalaması %69,2, İtalyan ırkı erkeklerinin belirteci SNP oranı genel ortalaması ise %30,8 bulunmuştur.

Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarının sperm torbası içeriğindeki payları ana arının genotipine göre de değişmemiştir ( $P>0.05$ ). Kafkas ana arıların sperm torbalarında Kafkas erkeklerinin sperm payı %68,9, İtalyan erkeklerinin payı %31,1'dir. İtalyan ana arıların sperm torbalarında ise Kafkas erkeklerinin payı %69,4, İtalyan erkeklerinin payı %30,6'dır (Çizelge 5.6 ve Şekil 5.7). Bundan başka, ana arıya enjekte edilen semen kompozisyonunda (4  $\mu$ l+4  $\mu$ l) erkek arı ırkına tanınan önceliğe göre de Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarının sperm torbası içeriğindeki payları değişmemiştir ( $P>0.05$ ). Kafkas erkeklerinin sperm payları ister önce, isterse sonra ana arıya enjekte edilsin hep İtalyan erkeklerinin sperm paylarından daha yüksek oranda (% 20 daha fazla) sperm torbasında bulunmuştur (Çizelge 5.7 ve Şekil 5.8).

Çizelge 5.5. Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı belirteç SNP'in payları (%)\*

Yapay Tohumlama Grubu		İtalyan SNP (%C)			Kafkas SNP (%T)	
		N	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata
A	K X (K+I)	7	30,6 a (24,0-40,0)	2,33	69,4 b (60,0-76,0)	2,33
B	K X (I+K)	10	31,4 a (13,5-42,0)	2,56	68,6 b (58,0-86,5)	2,56
C	I X (I+K)	10	30,2 a (18,5-39,5)	2,44	69,9 b (60,5-81,5)	2,44
D	I X (K+I)	9	31,1 a (17,5-41,5)	2,38	68,9 b (58,5-82,5)	2,38
Genel		36	30,8 (13,5-41,5)	1,19	69,2 (57,5-86,5)	1,18

\* Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklar önemsiz, farklı harfi taşıyan ortalamalar önemlidir (P<0,05)

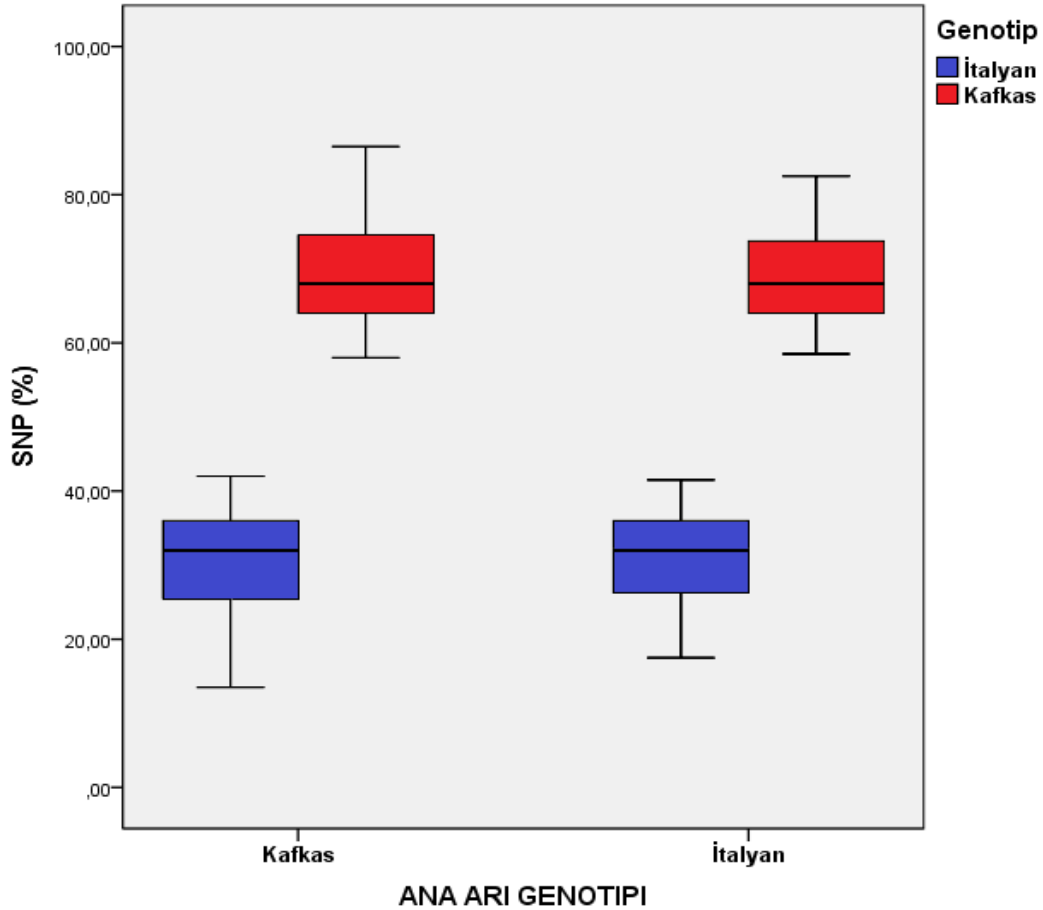


Şekil 5.6. Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkeklerine özgü SNP payları

Çizelge 5.6. Sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların SNP paylarının (%) ana arı genotipine göre değişimi\*

Ana Arı Genotipi	İtalyan SNP			Kafkas SNP	
	N	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata
Kafkas	17	31,1 a (13,5-42,0)	1,74	68,9 b (58,0-86,5)	1,74
İtalyan	19	30,6 a (17,5-41,5)	1,66	69,4 b (58,5-82,5)	1,66
Genel	36	30,8 (13,5-42,0)	1,19	69,2 (58,0-86,5)	1,19

\* Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklar önemsiz, farklı harfi taşıyan ortalamalar önemlidir (P<0,05)

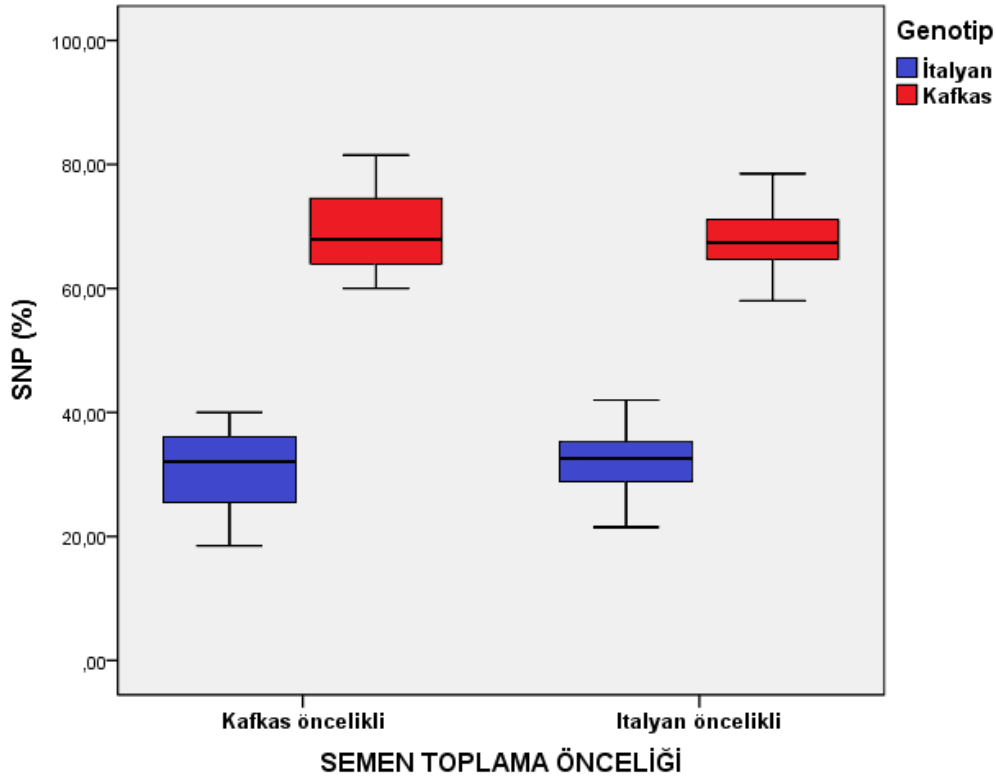


Şekil 5.7. Sperm torbası içeriklerinde Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların SNP paylarının (%) ana arı genotipine göre değişimi

Çizelge 5.7. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların sperm torbası içeriğindeki SNP paylarının (%) semen toplama önceliğine göre değişimi\*

Semen alma önceliği	İtalyan SNP			Kafkas SNP	
	N	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata	Ortalama (min.-maks.)	Std. Hata
Kafkas öncelikli (K+İ)	17	30,3 a (18,5-40,0)	1,67	69,7 b (60,0-81,5)	1,67
İtalyan öncelikli (İ+K)	19	31,3 a (13,5-42,0)	1,71	68,7 b (58,0-86,5)	1,71
Genel	36	30,8 (13,5-42,0)	1,19	69,2 (58,0-86,5)	1,19

\* Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki farklar önemsiz, farklı harfi taşıyan ortalamalar önemlidir (P<0,05)



Şekil 5.8. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların sperm torbası içeriklerinde SNP paylarının (%) semen toplama önceliğine göre değişim grafiği

Kafkas ve İtalyan erkeklerinden izole edilmiş DNA'lar bilinen oranlarda karıştırılarak pirosekanslama analizinin sonuçları test edilmiş, yapay karışımlara uygulanan pirosekanslama analizi sonuçları Çizelge 5.8'de sunulmuştur. Kafkas ve İtalyan

erkeklerinin payları ile pirosekanslamadan elde edilen oranlar birbirleri ile yüksek derecede ( $r^2$ : 0,998) ilişkili bulunmuştur.

Çizelge 5.8. Farklı oranlarda karıştırılan Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarının DNA'ları ve pirosekanslama analizinde gözlenen SNP oranları (%)

	DNA Karışım Oranı	Gözlenen Kafkas SNP			Gözlenen İtalyan SNP			
		N	Ortalama	Min.	Maks.	Ortalama	Min.	Maks.
1	%100 İ + %0 K	5	<b>2,2</b>	1	4	<b>97,8</b>	99	96
2	%80 İ + %20 K	3	<b>23,0</b>	22	24	<b>77,0</b>	78	76
3	%60 İ + %40 K	3	<b>42,7</b>	42	44	<b>57,3</b>	58	56
4	%50 İ + %50 K	3	<b>50,0</b>	49	51	<b>50,0</b>	51	49
5	%40 İ + %60 K	3	<b>61,7</b>	58	64	<b>38,3</b>	42	36
6	%20 İ + %80 K	3	<b>79,0</b>	77	81	<b>21,0</b>	23	19
7	%0 İ + %100 K	7	<b>97,9</b>	1	3	<b>2,1</b>	99	97

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması, bal arısı (*Apis mellifera* L.) ana arısının yumurta kanallarından sperm torbasına göçü (migrasyonu) aşamasında sperm rekabetini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çok erkek eşli türlerde erkeklerin üreme başarısı, çiftleşme başarısına ve çiftleşme sonrası sperm rekabetine bağlıdır. Bal arılarında sperm rekabetinin varlığını kanıtlayan birkaç deneysel çalışma bulunmaktadır (197, 204). Ancak, bu çalışmaların hiçbirinde rekabetin göç aşamasında mı yoksa fertilizasyon aşamasında mı olduğu açıklanmamıştır. Bu tez çalışmasında göç aşamasında sperm rekabetinin varlığını/yokluğunu ortaya çıkarabilecek bir yöntem geliştirilmiş, bu yöntem uygulanarak erkek arı genotipinin ve inseminasyon önceliğinin sperm rekabetindeki rolü araştırılmıştır. Cinsel seçilimin diğer unsuru olan dışının gizli seçimi de erkeklerin üreme başarısının belirleyicisidir. Bal arılarında dışının gizli seçimi olgusunun varlığını kanıtlayan tek çalışma (205) ile karşılaşılmıştır. Sperm rekabetini irdelemek amacıyla yürütülen bu tez çalışmasının önceliklerinden biri olmamakla birlikte, araştırma kurgusu gereği dışının gizli seçimi (çalışmada ana arı genotipi) konusu da sorgulanmıştır.

Deneysel bir kurguya dayalı yürütülen bu çalışma; ana arı ve erkek arı yetiştirme, ana arıları spesifik sperm kombinasyonları ile yapay tohumlama, erkek arıların sperm rekabeti ile ilişkili özelliklerini belirleme ve yapay tohumlanmış ana arıların stokladıkları spermilerin pirosekanslama analizi ile genotiplendirilmesi aşamalarından oluşmuştur. Saha ve laboratuvar çalışmalarının ürünü olan deneme materyali yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarında stoklanmış Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arı spermilerinin toplam içerikteki payları belirlenerek, göç aşamasında sperm rekabeti olup olmadığı ortaya konulmuştur. Sperm torbası içeriklerinin pirosekanslama analizi, göç aşamasında sperm rekabeti olduğunu ve rekabetin Kafkas ırkı erkek arılar lehine gerçekleştiğini çok net olarak göstermiştir. Sperm torbası içeriklerinin pirosekanslama analizi sonuçlarına göre; ana arının ırkı ve erkek arıya tanınan enjeksiyon önceliği ne olursa olsun tüm deneme gruplarında ana arıların sperm torbalarına ulaşan spermilerin çoğunluğunu (%69) Kafkas erkeklerinin spermeleri oluşturmuştur. Rekabet olmasaydı ana arıların sperm torbalarında %50 Kafkas, %50 İtalyan ırkı erkek arılarının spermilerinin olması beklenirdi. Oysa, sperm göçü aşamasında Kafkas ırkı erkekleri sperm torbası içeriklerinin %70'ini oluşturarak İtalyan erkeklerinden %20 daha başarılı bulunmuştur.

Tezin bundan sonraki bölümünde yapay tohumlama sonuçları, erkek arıların üreme özellikleri ve sperm torbalarının pirosekanslama analizi sonuçları birlikte irdelenerek sperm göçü aşamasında sperm rekabeti ve dışının gizli seçimi bu tez çalışması özelinde tartışılacaktır.

Tez çalışmasının tüm aşamaları birbiri ile ilişkilidir ve bir aşamanın gerçekleşmesi bir önceki aşamanın başarısına bağlıdır. Ana arıların yapay tohumlanması çalışmanın önemli aşamalarından biridir. Ana arılara deneme kurgusuna göre semen enjekte edebilmenin tek yolu yapay tohumlamadır. Bununla birlikte, gerek yapay tohumlama öncesi ve sonrası ana arılara sağlanan çevrede gerek yapay tohumlama işlemi sırasındaki uygulamalarda farklılıkların elimine edilmesi sperm rekabetinin varlığını test edebilmenin temel koşuludur. Deneme gruplarında ana arıların yumurtlamaya başlama süreleri yapay tohumlamadaki başarının göstergesidir. Tüm gruplarda ana arılar birbirine yakın sürelerde yumurtlamaya başlamışlardır (ortalama 10,2 gün, Çizelge 5.1). Bu sonuç tüm ana arıların aynı uygulamalara maruz kaldıklarını, yapay tohumlama işleminin sonuçları etkileyebilecek denetlenemez faktör olmadığını göstermesi açısından önemlidir.

### **6.1. ERKEK ARI ÜREME ÖZELLİKLERİ VE SPERM REKABETİ**

Bal arıları gibi çok erkek eşli türlerde sperm kalitesi özellikle yumurta kanallarındaki sperm göçünü etkileyen temel faktörlerdir. Sperm kalitesinin göstergesi olan sperm sayısı, sperm konsantrasyonu (milyon/ $\mu$ l), sperm canlılığı, sperm motilitesi, sperm uzunluğu gibi özellikler, farklı yöntemler kullanılarak analiz edilmektedir. Ne var ki bu özellikler in-vitro testler ile belirlenmektedir ve her özelliğin belirlenmesi işleminin bazı hatalara açık olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (97, 134). Diğer yandan, spermilerin in vivo koşullardaki göç yeteneklerini irdeleyebilecek yöntemlerin eksikliği hissedilmektedir. Doktora tezinde kullanılan yöntem ve yaklaşım ile sperm özelliklerinin göç (inseminasyon) ve fertilizasyon aşamalarına olan gerçek etkisinin ortaya konulabilmesi olanağı sağlanabilmiştir.

Doktora tezinin canlı materyali erkek arıların üreme özelliklerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması, sperm torbası içeriklerini pirosekanslama analizi sonuçlarını doğru yorumlayabilmek için gereklidir. Kafkas ve İtalyan ırkından yetiştirilen erkek arıların canlı ağırlık (209,4 ve 208,7 mg), ejakülat hacmi (1,03 ve 1.05  $\mu$ l/erkek arı), ejakülattaki sperm sayısı (6,93 ve 6,85 milyon), sperm konsantrasyonu (6,71 ve 6,65 milyon/  $\mu$ l) ve sperm

canlılığı (%98,4 ve %98,5) ortalama değerleri arasındaki farklılıklar önemsiz (Çizelge 5.2) bulunmuştur.

Pirosekanslama analizi sonuçlarına göre tüm deneme gruplarında Kafkas ırkı erkeklerin açık üstünlüğü vardır. Ne var ki, Kafkas erkeklerinin sperm uzunluğu ve everziyon-ejakülasyon yeteneği hariç, bu çalışmada araştırılan üreme özelliklerinin hiçbirinde İtalyan erkeklerinden farklı bulunmamıştır. Ana arıların yapay tohumlanmasında her ana arıya her erkek arı ırkından aynı hacimde (4 µl) semen enjekte edilmiştir. Dolayısıyla Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların ejakülat hacimleri farklı olsa bile, bunun sperm göçü sonuçlarına etkisi beklenmemektedir. Ejakülattaki sperm sayısı ve ejakülat hacminin bir fonksiyonu olan sperm konsantrasyonu (milyon/µl) ve sperm canlılığı bakımından saptanacak ırksal farklılıkların sperm göçü sonuçlarını etkilemesi beklenirdi. Ancak, Kafkas ve İtalyan erkek arılarının bu özellikleri bakımından farklılık bulunmaması, bu özelliklerin sperm torbasına göçte Kafkas erkeklerinin başarısı için gerekçe kabul etmeyi önlemektedir.

Sperm torbasına sperm göçünü etkileyebilecek bir diğer özellik sperm uzunluğudur. Bal arısı spermi ortalama 242 µm (221-270 µm) uzunlukta bir hücredir (112). Sperm uzunluğunda önemli varyasyonların bulunabileceği de bilinmektedir. Örneğin bir araştırmaya göre (206); farklı mevsimlerde yetiştirilen erkek arıların sperm uzunlukları farklıdır. Tez çalışmasında yetiştirilen Kafkas ve İtalyan ırkı birer koloniden yetiştirilen erkek arıların sperm uzunlukları (sırasıyla 242,8 ve 246,1 µm) farklı bulunmuştur (Çizelge 5.2). Uzun spermlerin daha hızlı hareket edecekleri, bu nedenle sperm torbasına daha kolay ulaşacakları düşünülebilir. Ancak, İtalyan erkek arı spermlerinden daha kısa oldukları halde Kafkas erkek arı spermleri sperm torbalarına daha çok ulaşmışlardır. Bombus türlerinin sperm uzunluklarını konu alan bir çalışma (150) hem uzun hem de kısa spermlerin sperm torbasına göç sürecinde elendikleri bildirilmektedir. Bu sonuçlara göre, spermlerin uzun olmasının sperm göçünü olumsuz etkilediği söylenebilir.

Sperm ekolojisini etkileyen önemli unsurlar bulunmaktadır. Sperm fonksiyonu üzerine 3 temel etkiden söz edilebilir. Bunlar; spermin motilitesinden sorumlu mitokondriler içerisinde bulunan mtDNA genotipi, spermin nüklear genotipi ve çevredir (207). Bal arılarında nüklear genotipin sperm rekabetine etkisinin olmayacağı kabul edilebilir. Çünkü bal arısı sperm hücresinde memelilerde olduğu gibi yumurta zarını eriten enzimler yoktur



ve yumurtanın dölllenme fizyolojisi farklıdır. Sperm hareketi için mtDNA genotipi ve mitokondrilerin nükleer genotip ve çevreden daha önemli olmaları beklenebilir. Bu çalışmanın sonuçları spermin mtDNA genotipi ve mitokondri türevlerinin işlevlerinin sperm uzunluğu - sperm göçü ilişkisinin araştırılmasında önemli olabileceğini göstermektedir.

Yapay tohumlama işlemi sırasında Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların everziyon ve ejakülasyon için fiziksel uyarıya verdikleri yanıtın (4 µl semen toplamak için sırasıyla 7,0 ve 8,3 erkek arı) farklı olması (Çizelge 5.2) sperm rekabetini etkileyebilecek dolaylı bir ölçüt olarak kabul edilebilir.

Sperm rekabetinde ırksal farklılıkların karşılaştırıldığı sınırlı çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde (204) 2 bal arısı ırkından (*A.m. scutellata* ve Avrupa kökenli bir bal arısı ırkı) erkek arıların semen kombinasyonu ile her 2 ırkın ana arıları yapay tohumlanmışlardır. Sonuçlar kolonilerde tek ırkın (*A. m. scutellata*) babalık yaptığı döllerin frekansının zamanla arttığını göstermiştir (204). Bir başka çalışmada ise 2 Afrika bal arısı ırkı (*A. m. scutellata* ve *A. m. capensis*) erkeklerinin semenleri ile ana arılar yapay tohumlanmış, ancak dölleri bakımından bir ırkın erkekleri lehine üstünlük saptanmamıştır (205).

Pirosekanslama analizi sonuçları ana arıların sperm torbalarına sperm göçü sırasında erkek arı genotipine bağlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 5.7). Bu çalışmada kullanılan İtalyan kolonisi erkeklerinin spermelerinin göç sürecinde başarılı olmadıkları net olarak ortaya çıkmıştır. Ancak Kafkas erkek arısı spermelerinin İtalyan erkek arısı spermelerine göre üstünlüğünün (%20) ırksal farklılıktan kaynaklandığını net olarak ileri sürmek çok doğru değildir. Elde edilen sonuçlarda sadece ırk faktörünün değil, erkek arıların yetiştirildikleri kolonilerin ve erkek arıların bireysel üreme başarılarının da etkili olma olasılığı vardır. Denemede, Kafkas ırkından 1 ve İtalyan ırkından 1 koloniden erkek arı yetiştirilerek kullanılmıştır. Dolayısıyla her ırkın tek koloni ile temsil edildiği bu araştırma sonucundan genelleme yapmak doğru olmayacaktır.

## 6.2. ENJEKSİYON ÖNCELİĞİNİN ETKİSİ

Doğal çiftleşmede erkek arıların ana arı ile çiftleşme sırasının (son erkek avantajının) ve yapay tohumlamada erkek arıların semenlerinin enjeksiyon sırasının sperm göçüne etkisi tartışılan konulardır. Son erkek avantajı bal arılarında görülmemesine karşın (70, 147), yapay tohumlamadaki semen enjeksiyon sırasının zayıf olsa da göçe etkisinin olduğu (13) bildirilmektedir. Son erkek avantajı ve enjeksiyon sırasının varlığı ana arının üreme kanallarında ejakülatların karışmadığının, diğer bir ifadeyle sperm kümeleşmesinin göstergesidir. Deneme desenindeki 2 ırkın erkeklerinden semen (8 µl) toplama biçimi (4µl + 4µl) sperm kümeleşmesine olanak sağlayabileceği için yumurta kanallarındaki sperm karışımı hakkında sınırlı düzeyde bilgi vermektedir. Yumurta kanallarında sperm kümeleşmesinin, varsa semen enjeksiyon önceliğinin sperm torbasına bir yansımasının olması beklenir. Pirosekanslama sonuçları semen enjeksiyon önceliğinin sperm göçüne herhangi bir etkisinin bulunmadığını, yumurta kanallarında sperm kümeleşmesinin olmadığını ortaya çıkarmıştır. Yapay tohumlanmış ana arı ister Kafkas, ister İtalyan ırkı olsun, Kafkas ırkı erkeklerinin spermleri ister önce ister sonra enjekte edilsin, ana arıların sperm torbalarında hep üstün (%20) bulunmuştur.

Burada ana arı üreme kanalının sperm karışımına katkısı tartışılmalıdır. Yapay tohumlamadan kısa bir süre sonra sperm torbası spermler ile dolmaya başlamaktadır (128, 199). Bu nedenle inseminasyon aşamasında sperm karışımı oluyor ise hızlı bir şekilde gerçekleşiyor demektir. Ana arıların ana yumurta kanalının kısa ve dar olması nedeniyle spermler hızlıca yan yumurta kanallarına geçmektedir. Doğal çiftleşmede ejakülasyonun, yapay tohumlamada enjeksiyonun hemen ardından ana yumurta kanalına açılan her 2 yan yumurta kanalına doğru spermlerin dağılmasının spermlerin homojen karışmasına katkı yapması beklenir. Bunun yanı sıra yumurta kanallarında geçici muhafaza sırasında yan yumurta kanalları kaslarının (81) yardımıyla ana arı ejakülatların karıştırmasına katkı yapıyor olabilir. Kısmen karışan spermlerin yan yumurta kanallarından ana yumurta kanalına ve sperm torbası kanalına doğru itilerek vücut dışına geri atıldığı süreç, farklı erkeklerin ejakülatlarının daha da homojen karışmasına neden olabilir. Hem spermlerin vücut içerisine alımı hem de spermlerin vücuttan atımı sırasında vajina valfinin olası hareketleri ejakülatların homojen karıştırılmasını sağlıyor olabilir. Sonuç olarak, sperm torbası içeriklerinin pirosekanslama analizi sonuçları sperm torbasına göç öncesinde hızlı

bir karışım olduğunu göstermektedir. Çünkü sperm torbasına sperm göçü sürecinde yapay tohumlama grubu, ana arının genotipi ve semen enjeksiyon önceliği ne olursa olsun tüm gruplarda Kafkas ırkı erkeklerin inseminasyon başarısı yüksek bulunmuştur.

Burada göz önünde bulundurulması gereken bir diğer durum konunun yapay tohumlanmış ana arılar üzerinden tartışılmasıdır. Yukarıda anlatılan olası sperm karışımı mekanizmalarının gerçekleşmesinden önce, yapay tohumlama rutin prosedürleri de (erkek arı ejakülatlarının mikroşırınga ucuna toplanması sırasında semen çekme ve toplanmış semenin ana arıya enjeksiyonu) doğal çiftleşmeye göre sperm karışımı düzeyini daha da artırmış olabilir. Hem ana arının hem de yapay tohumlama prosedürünün yan yumurta kanallarında sperm karışımını artırıcı etkilerinin olması olasılığı sperm torbasına sperm göçü sürecinde homojen karışmış spermlerin eşit koşullarda yarışmasına katkı sağlaması beklenir. Bu durumda sperm torbasına göç bakımından görülen farklılıkların sperm motilitesinden kaynaklandığı ileri sürülebilir.

### **6.3. DIŞININ GİZLİ SEÇİMİ VE SPERM GÖÇÜ**

Dişinin gizli seçimi; çiftleşme sonrasında dişilerin bir erkeğin inseminasyon ve fertilizasyon başarısını kontrol etmek için fiziksel ve kimyasal mekanizmalar kullanması durumunda ortaya çıkan cinsel seçilimin diğer unsurudur. Bu tez çalışmasında 2 farklı ırktan (Kafkas ve İtalyan) ana arıların kendi ırkından ve diğer ırktan erkek arıların sperm kombinasyonu ile yapay tohumlanarak ana arı ırkının sperm göçüne etkisinin (dişinin gizli seçimi) olup olmadığı araştırılmıştır. Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarında stoklanmış spermlerin erkek arı ırkına dağılımının ana arı ırkına bağlı değişim göstermemesi sperm rekabetini değil, ancak dişinin gizli seçimi olgusunun bal arılarında geçerliliğini kanıtlar. Ana arıların hem çiftleşme sırasında hem de çiftleşmeden sonraki inseminasyon ve fertilizasyon aşamalarındaki sperm göçü ve sperm rekabetini etkileyebileceği görüşü Baer (7) tarafından zorlamalı sayılabilecek çeşitli hipotezler geliştirilerek tartışılmıştır. Ancak bal arılarında dişinin gizli seçimi olgusu hakkında doğrudan bilgi sağlayacak çalışma sayısı birkaçı (204, 205) geçmemektedir.

Doğal çiftleşme sırasında çiftleşmek için yarışan erkek arılardan ana arı ile aynı ırktan olma avantajının olduğu ileri sürülmektedir (208). Çiftleşme sonrasında da aynı ırktan olmanın avantaj olduğu ve ana arı ile aynı ırktan erkek arıların babalık frekanslarının

(kolonide bir babaya ait döl sayısı) daha yüksek olduğu saptanmıştır (205). Farklı coğrafi ırkların (*A. m. scutellata* ve Avrupa kökenli bal arısı ırkı) kullanıldığı başka bir çalışmada (204) erkek arıların ana arı ile aynı ırktan olma avantajının bulunmadığı, *A. m. Scutellata* erkeklerinin döl frekansının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her 2 araştırma da erkek ebeveynlerin döl frekansı mikrosatellit DNA analizi ile belirlenmiştir. Bu nedenle, bu 2 çalışmanın sonuçlarının hem inseminasyon hem de fertilizasyon aşamasında gerçekleşebilecek etkilerin (sperm rekabeti ve dişinin gizli seçimi) bütünü olduğu gözden kaçırılmamalıdır. Doktora tezinin verileri ise sadece inseminasyon aşamasında ana arı genotipinin (Kafkas ve İtalyan ana arı) sperm göçünü etkilemediğini göstermektedir. Bu bulgu inseminasyon aşamasında ana arılar ile erkek arıların aynı ırktan olmasının avantaj sağlamadığını gösteren çalışmayı (204) desteklemektedir.

Burada tartışılması gereken bir diğer durum sperm torbası diseksiyonunun pirosekanslama sonuçlarına etkisinin olup olmamasıdır. Pirosekanslama sonuçlarının ana arı genotipine göre gruplandırılarak analiz edilmesi, sperm torbası içeriğine ana arıdan (sperm torbasından) doku bulaşması olup olmadığını net olarak ortaya koymaktadır. Bulaşma olsaydı sperm torbası içeriklerinin analizinde ana arı genotipi lehine aldatıcı bir sapmanın olması beklenirdi. Bu durum dişinin gizli seçimi olgusunu akla getirecekti. Ancak pirosekanslama analizi sonuçları, ana arı genotipi lehine bir sapmanın olmadığını (Çizelge 5.6), sperm torbası içeriklerinden ana arıya ait dokular bulaştırılmaksızın başarılı bir DNA izolasyonu yapılabildiğini kanıtlamıştır.

Baer (7) sperm rekabetinin inseminasyon aşamasından çok fertilizasyon aşamasında görülebileceğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada fertilizasyon aşamasında sperm rekabeti araştırılmamıştır. Fertilizasyon aşamasında sperm rekabeti olup olmadığını belirlemek için, yapay tohumlanmış ana arıların diseksiyonu öncesi işçi arı dölleri örneklemek ve döllerde mikrosatellit DNA analizleri yapmak gerekir. Ancak bu konu tez kapsamında değildir. Araştırmanın sonuçları; sperm rekabetinin fertilizasyon aşamasından önce, henüz inseminasyon (sperm torbasına göç) aşamasında önemli düzeyde gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir. Sperm rekabeti sperm kalite özelliklerinden en çok motilite ile ilgili olmalıdır. Daha motil spermlerin hem inseminasyon hem de fertilizasyon aşamasında daha başarılı olmaları beklenir. Bu nedenle inseminasyon aşamasındaki rekabetin fertilizasyon

aşamasındaki rekabetten bağımsız olmayacağını savunmak, Baer'in (7) yaklaşımından daha doğrudur.

#### **6.4. PİROSEKANSLAMA ANALİZİNİN GÜVENİLİRLİĞİ**

Heteroplazmi ve heterospermi konularının analizinde kullanılan yöntemlerin başarıları SNP ya da mutant allelleri belirleme eşiklerine bağlıdır (174). Pirosekanslama analizi; kullanımı kolay, hızlı ve bazı koşullarda kesin SNP ve mutant allel miktarını belirleyebilen bir sistem olduğu için heteroplazmi seviyesi ister yüksek, ister düşük olsun doğru sonuç verebilmektedir. Ne var ki pirosekanslama tekniği uygulanmış kantitatif SNP belirleme çalışmalarının başarısı için farklı bildirişler ile karşılaşılmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda beklenen ve gözlenen SNP miktarları arasında yüksek doğrusal bir ilişki gözlenmekte (186) ve %1 SNP düzeyinde bile başarılı belirleme yapılabilmektedir (187). Ancak, bazı pirosekanslama analizi ile mutant allel belirleme çalışmalarının bazılarında beklenenden %5-10'luk sapmalar olmuştur (183, 185).

Pirosekanslama reaksiyonunda kantitatif analizin başarısı büyük oranda sekanslama primerine bağlıdır. Sekanslama primeri; 45-50 °C'lik erime sıcaklığında (tm) ve üzerinde durulacak SNP'in tek veya 2 baz uzağına bağlanacak biçimde tasarlanmaktadır. SNP'in bulunduğu konum ve etrafındaki DNA dizisi reaksiyonun başarısını değiştirebilmektedir. Bu durum pirosekanslama analizinden elde edilen SNP karışım miktarları sonuçlarının doğrulanmasını gerektirmektedir. Bu araştırmada doğrulama işlemi için farklı oranlarda Kafkas ve İtalyan ırkı erkeklerin DNA'ları karıştırılarak yapılan pirosekanslama analizi sonuçları sperm torbası içeriklerinin pirosekanslama analizi verilerinin herhangi bir validasyona gerek olmadığını ortaya koymuştur. DNA karışım oranları bilinen örneklerin pirosekanslama analizinden elde edilen oranlar (Çizelge 5.8) arasında yüksek derecede ( $r=0,99$ ) korelasyon bulunması pirosekanslama analizinden elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermiştir.

#### **6.5. SONUÇ**

Cinsel seçilim, sperm rekabeti ve dişinin gizli seçimi konuları çevre ve genotip tarafından ileri derecede etkilenen karmaşık konulardır. Doğada görülen çiftleşme sistemlerinden birisi olan poliandri ve bu olgunun doğal çeşitliliğe ve türlerin devamına katkısı üzerindeki etkisi tartışılmaya devam edecektir.

Bu tezden elde edilen sonuçlar; bal arıları ve diğer çok erkek eşli türlerde, cinsel seçilim kuramı unsurlarının kantitatif moleküler genetik yaklaşımlarla sorgulanabileceğini göstermektedir. Birden çok erkeğin üreme hücrelerinin bir arada olduğu (heterospermi) türlerde bu yaklaşım, kullanılacak moleküler yöntemin gerektirdiği bazı ön şartların sağlanması durumunda rahatlıkla kullanılabilir. Bu şartlardan en önemlisi erkekleri birbirinden ayırt etmeyi sağlayacak SNP'e dayalı bilginin elde edilmesidir.

Bu tezde uygulanan yöntem, cinsel seçilimin unsurları olan sperm rekabeti ve dışının gizli seçimini, inseminasyon ve fertilizasyon rekabetini birbirinden ayırarak araştırılmaya olanak tanımaktadır. SNP'e dayalı olarak bireylerin kimliklendirilebilmesi ve kantitatif SNP analizlerinin başarılması çok eşli türlerde cinsel seçilim ve üreme başarısını etkileyen birçok faktörü konu alan çalışmaların yapılabilmesi olanağını büyük ölçüde artıracaktır.

Doktora tezinden elde edilen bulgular açık bir biçimde erkek arıların yetiştirildiği koloni ve ırk farklılıklarının üreme özelliklerini etkileyebileceğini göstermektedir. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arılarının sperm uzunluğu ve yapay everziyon ve ejakülasyon başarısı dışındaki diğer üreme özelliklerinde önemli farklılıklar ile karşılaşılması, sperm canlılığı, ejakülat hacmi, sperm konsantrasyonu, ve sperm sayısının sperm göçü sürecindeki sperm rekabetini açıklamak için yeterli olmadığını göstermektedir.

Bal arılarında birey, koloni ve ırk düzeyindeki sperm motilitesinin araştırılması gereklidir. Diğer yandan sperm motilitesi in vitro yöntemlerle belirlenebilmektedir. Ancak bu yöntemlerin sonuçları subjektiftir. Bu nedenle bu tez kapsamında olduğu gibi bir in vivo yarışma platformu oluşturularak spermilerin gerçek motilitelerinin belirlenmesi yerinde olacaktır. Böylece spermilerin gerçek motilite ve göç yeteneklerine ilişkin veriler doğru elde edilebilecektir.

Bal arısı sperm torbası içerisindeki spermilerin analizini konu alan sadece 2 araştırma ile karşılaşmıştır. Bunlardan birisi sperm torbası içeriğinden DNA izole edildikten sonra başarılı PCR gerçekleştirilebileceğini (209) diğeri ise *A. mellifera* ana arılarının *A. cerana* erkekleri ile düşük frekanslı da olsa çiftleştiğini kanıtlayan (210) bir çalışmadır. Her 2 çalışmada kullanılan yaklaşım kantitatif analiz yöntemlerini içermemektedir. Bilindiği kadarıyla dişilerin sperm depolama organları içerisindeki spermilerin kantitatif moleküler yöntemlerle analiz edildiği bir çalışma henüz yoktur. Bu tez çalışması ise sperm torbası

içeriğinin özellikle yeni nesil DNA dizileme tekniklerine dayalı kantitatif moleküler genetik analizlerinin yeni olanaklar sağlayabileceğini göstermiştir.



## 7. KAYNAKLAR

- 1 Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How many species are there on earth and in the ocean? *Plos Biology*. 2011 Aug;9(8).
- 2 Union TWC. IUCN red list of threatened species 2014. 2014.
- 3 Lachaud JP, Pérez-Lachaud G. Diversity of species and behavior of hymenopteran parasitoids of ants: A review. *Psyche*. 2012.
- 4 FAO. <http://faostat3.fao.org/home/E>. 2016.
- 5 Boomsma JJ, Ratnieks FLW. Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*. 1996 Jul;351(1342):947-75.
- 6 West-Eberhard MJ. Darwin's forgotten idea: The social essence of sexual selection. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Oct;46:501-8.
- 7 Baer B. Sexual selection in Apis bees. *Apidologie*. 2005 Apr-Jun;36(2):187-200.
- 8 Jaffe R. An updated guide to the study of polyandry in social insects. *Sociobiology*. 2014 Mar;61(1):1-8.
- 9 Jaffe R, Garcia-Gonzalez F, den Boer SPA, Simmons LW, Baer B. Patterns of paternity skew among polyandrous social insects: what can they tell us about the potential for sexual selection. *Evolution*. 2012 Dec;66(12):3778-88.
- 10 Simmons LW. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Monographs in behavior and ecology* Princeton University Press, Princeton, USA. 2001.
- 11 Eberhard WG. Female control: sexual selection by cryptic female choice. *Monographs in behavior and ecology* Princeton University Press, Princeton, NJ. 1996.
- 12 Bratkowski J, Wilde J, Siuda M, Fuchs S. The influence of drones on colony traits in honeybees. *Pszczeln Zeszyt Nauk*. 1998;42(2):13-4.
- 13 Moritz RFA. Intracolony worker relationship and sperm competition in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Experientia*. 1986;42(4):445-8.
- 14 Hepburn HR, Radloff SE. Honeybees of Asia. 2011.
- 15 Apis distribution map. Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apis\\_distribution\\_map.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apis_distribution_map.svg).
- 16 Ruttner F, Tassencourt L, Louveaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L.. *Apidologie*. 1978;9(4):363-81.
- 17 Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer- Verlag Berlin. 1988.



- 18 Han F, Wallberg A, Webster MT. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and evolution*. 2012 Aug;2(8):1949-57.
- 19 Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, et al. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*. 2006 Oct 27;314(5799):642-5.
- 20 Wallberg A, Han F, Wellhagen G, et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genet*. 2014 Oct;46(10):1081-8.
- 21 Franck P, Garnery L, Loiseau A, et al. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 2001 Apr;86:420-30.
- 22 Sheppard WS, Arias MC, Grech A, Meixner MD. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*. 1997 Sep-Oct;28(5):287-93.
- 23 Sheppard WS, Meixner MD. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*. 2003 Jul-Aug;34(4):367-75.
- 24 Meixner MD, Leta MA, Koeniger N, Fuchs S. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*-*Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie*. 2011 May;42(3):425-37.
- 25 M.L. W. The biology of the honey bee. *Harvard University Press*, Cambridge, Massachusetts, London. 1991.
- 26 Sekercioglu CH, Anderson S, Akcay E, et al. Turkey's globally important biodiversity in crisis. *Biol Conserv*. 2011 Dec;144(12):2752-69.
- 27 Farshineh Adl MB, Gençer HV, Firatli Ç, Bahreini R. Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations. *Journal of Apicultural Research*. 2007;46(4):225-31.
- 28 Gençer HV, Firatli C. Morphological characteristics of the Central Anatolian (*A. m. anatoliaca*) and Caucasian (*A. m. caucasica*) honey bees. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 1999;23:107-13.
- 29 Page RE, Peng CYS. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 2001 Apr;36(4-6):695-711.
- 30 Winston ML. The biology of the honey bee Harvard University Press; Cambridge, Massachusetts, London, UK. 1987:281.
- 31 Delaney DA, Keller JJ, Caren JR, Tarpy DR. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 2011 Jan;42(1):1-13.

- 32 Porporato M, Grillone G, Patetta A, Manino A, Laurino D. Survey of the health status of some honey bee queens in Italy. *Journal of Apicultural Science*. 2015 Dec;59(2):27-36.
- 33 Gregorc A, Skerl MIS. Characteristics of honey bee (*Apis mellifera carnica*, pollman 1879) queens reared in Slovenian commercial breeding stations. *Journal of Apicultural Science*. 2015 Dec;59(2):5-12.
- 34 Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR, Delaney DA. Experimentally induced variation in the physical reproductive potential and mating success in honey bee queens. *Insectes Sociaux*. 2011 Nov;58(4):569-74.
- 35 Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR, Delaney DA. Assessing the mating 'health' of commercial honey bee queens. *Journal of Economic Entomology*. 2012 Feb;105(1):20-5.
- 36 Tarpy DR, Simone-Finstrom M, Linksvayer TA. Honey bee colonies regulate queen reproductive traits by controlling which queens survive to adulthood. *Insectes Sociaux*. 2015.
- 37 Boes KE. Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. *Insectes Sociaux*. 2010 Feb;57(1):1-9.
- 38 Goudie F, Allsopp MH, Solignac M, Beekman M, Oldroyd BP. The frequency of arrhenotoky in the normally thelytokous *Apis mellifera capensis* worker and the Clone reproductive parasite. *Insectes Sociaux*. 2015 Aug;62(3):325-33.
- 39 Strassmann J. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*. 2001;48(1):1-13.
- 40 Crozier RH, Page RE. On being the right size - male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1985 1985;18(2):105-15.
- 41 Schmid-Hempel P, Crozier RH. Polyandry versus polygyny versus parasites. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*. 1999 Feb;354(1382):507-15.
- 42 Bourke AFG. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. *Journal of Evolutionary Biology*. 1999 Mar;12(2):245-57.
- 43 Cole BJ. Multiple mating and the evolution of social-behavior in the Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1983 1983;12(3):191-201.
- 44 Kraus FB, Neumann P, van Praagh J, Moritz RFA. Sperm limitation and the evolution of extreme polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2004 Mar;55(5):494-501.
- 45 Jaffe R, Pioker-Hara FC, dos Santos CF, et al. Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. *Naturwissenschaften*. 2014 Mar;101(3):261-4.

- 46 Palmer KA, Oldroyd BP. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie*. 2000 Mar-Apr;31(2):235-48.
- 47 Crozier RH, Fjerdingstad EJ. Polyandry in social Hymenoptera - disunity in diversity? *Annales Zoologici Fennici*. 2001 2001;38(3-4):267-85.
- 48 Baer B, Schmid-Hempel P. Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature*. 1999 Jan;397(6715):151-4.
- 49 Tarpy DR. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2003 Jan;270(1510):99-103.
- 50 Hughes WOH, Boomsma JJ. Does genetic diversity hinder parasite evolution in social insect colonies? *Journal of Evolutionary Biology*. 2006 Jan;19(1):132-43.
- 51 Seeley TD, Tarpy DR. Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2007 Jan 7;274(1606):67-72.
- 52 Neumann P, Mortiz RFA. Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*. 2000;47(3):271-9.
- 53 Fewell JH, Page RE. Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey-bees, *Apis-Mellifera*. *Experientia*. 1993 Dec 15;49(12):1106-12.
- 54 Page RE, Robinson GE, Fondrk MK, Nasr ME. Effects of worker genotypic diversity on honey-bee colony development and behavior (*APIS-MELLIFERA* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1995 Jun;36(6):387-96.
- 55 Smith CR, Toth AL, Suarez AV, Robinson GE. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews Genetics*. 2008 Oct;9(10):735-48.
- 56 Mattila HR, Seeley TD. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*. 2007 Jul;317(5836):362-4.
- 57 Eckholm BJ, Huang MH, Anderson KE, Mott BM, DeGrandi-Hoffman G. Honey bee (*Apis mellifera*) intracolony genetic diversity influences worker nutritional status. *Apidologie*. 2015 Mar;46(2):150-63.
- 58 Oldroyd BP, Fewell JH. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends in Ecology & Evolution*. 2007 Aug;22(8):408-13.
- 59 Tarpy DR, Page RE. The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. *Annales Zoologici Fennici*. 2001 2001;38(3-4):255-65.

- 60 Gempe T, Hasselmann M, Schiott M, Hause G, Otte M, Beye M. Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *Plos Biology*. 2009 Oct;7(10):11.
- 61 Lechner S, Ferretti L, Schoning C, Kinuthia W, Willemsen D, Hasselmann M. Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Molecular Biology and Evolution*. 2014 Feb;31(2):272-87.
- 62 Cho SC, Huang ZY, Green DR, Smith DR, Zhang JZ. Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: Balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Res*. 2006 Nov;16(11):1366-75.
- 63 Beani L, Dessi-Fulgheri F, Cappa F, Toth A. The trap of sex in social insects: From the female to the male perspective. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Oct;46:519-33.
- 64 Ratnieks FLW. The evolution of polyandry by queens in social hymenoptera - the significance of the timing of removal of diploid males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1990;26(5):343-8.
- 65 Pamilo P, Sundstrom L, Fortelius W, Rosengren R. Diploid males and colony-level selection in formica ants. *Ethology Ecology & Evolution*. 1994 Jul;6(2):221-35.
- 66 Taber S. The frequency of multiple mating of queen honey bees. *Journal of Economic Entomology*. 1954;47 (6):995-8.
- 67 Woyke J. Multiple mating of the honeybee queen (*Apis mellifica* L.) in one nuptial flight. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*. 1955; 3(5):175-80.
- 68 Haberland M, Tautz D. Sperm usage in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1998 Apr;42(4):247-55.
- 69 Franck P, Coussy H, Le Conte Y, Solignac R, Garnery L, Cornuet JM. Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. *Insect Mol Biol*. 1999 Aug;8(3):419-21.
- 70 Schluns H, Koeniger G, Koeniger N, Moritz RFA. Sperm utilization pattern in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2004 Sep;56(5):458-63.
- 71 Keller L, Reeve HK. Genetic-variability, queen number, and polyandry in social hymenoptera. *Evolution*. 1994 Jun;48(3):694-704.
- 72 Hughes WOH, Ratnieks FLW, Oldroyd BP. Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. *Journal of Evolutionary Biology*. 2008 Jul;21(4):1090-5.
- 73 Fitzpatrick JL, Baer B. Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution*. 2011 Oct;65(10):3006-12.

- 74 He XJ, Tian LQ, Barron AB, et al. Behavior and molecular physiology of nurses of worker and queen larvae in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2014 Dec;17(4):911-6.
- 75 Paoli PP, Donley D, Stabler D, et al. Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids*. 2014 Jun;46(6):1449-58.
- 76 Snodgrass RE. Anatomy of the honey bee. Comstock Publ Assoc, 334 p, Ithaca, New York, USA. 1984.
- 77 Jackson JT, Tarpay DR, Fahrbach SE. Histological estimates of ovariole number in honey bee queens, *Apis mellifera*, reveal lack of correlation with other queen quality measures. *Journal of Insect Science*. 2011 Jul 2;11.
- 78 Dade HA. Anatomy and dissection of the honeybee. *International Bee Research Association London*. 1977:158 pp.
- 79 Kahya Y, Gençer HV, Woyke J. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *Journal of Apicultural Research*. 2008;47(2):118-25.
- 80 Shehata SM, Townsend GF, Shuel RW. Seasonal physiological-changes in queen and worker honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 1981;20(2):69-78.
- 81 Sasaki K, Obara Y. Egg activation and timing of sperm acceptance by an egg in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*. 2002 2002;49(3):234-40.
- 82 Dallai R. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*. 1975;21:89-109.
- 83 Goodman LJ. Form and function in the honey bee. *International Bee Research Association*. 2003.
- 84 Harbo JR. Rate of depletion of spermatozoa in the queen honeybee spermatheca. *Journal of Apicultural Research*. 1979;18(3):204-7.
- 85 Yu R, Omholt SW. Early developmental processes in the fertilised honeybee (*Apis mellifera*) oocyte. *J Insect Physiol*. 1999;45(8):763-7.
- 86 Baer B, Collins J, Maalaps K, den Boer SPA. Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecology and evolution*. 2016.
- 87 den Boer SPA, Boomsma JJ, Baer B. Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *J Insect Physiol*. 2009 Jun;55(6):538-43.
- 88 Mackensen O, Tucker KW. Instrumental insemination of queen bees. Agriculture Handbook No: 390. 1970;Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA, 28 pp.

- 89 Hamednia S. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) erkek arılarının üreme özelliklerinde yaşa bağlı değişim. *AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*. 2012:61.
- 90 Harano K, Sasaki K, Nagao T, Sasaki M. Influence of age and juvenile hormone on brain dopamine level in male honeybee (*Apis mellifera*): Association with reproductive maturation. *J Insect Physiol*. 2008;54(5):848-53.
- 91 Mazeed AM, Mohanny KM. Some reproductive characteristics of honeybee drones in relation to their ages. *Entomological Research*. 2010;40(5):245-50.
- 92 Verma LR, Shuel RW. Respiratory metabolism of the semen of the honey-bee, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*. 1973;19(1):97-103.
- 93 Page Jr RE, Peng CYS. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 2001;36(4-6):695-711.
- 94 Milne CP. Cytology and cytogenetics. In: Rinderer, T.E. (ed.), *Bee Genetics and Breeding*. 1986:205-33.
- 95 Collins AM, Caperna TJ, Williams V, Garrett WM, Evans JD. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol Biol*. 2006;15(5):541-9.
- 96 Moors L, Spaas O, Koeniger G, Billen J. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. *Apidologie*. 2005;36(2):245-54.
- 97 Gençer HV, Kahya Y, Woyke J. Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie*. 2014 Nov;45(6):757-70.
- 98 Novak AI, Blum MS, Taber S, Liuzzo JA. Separation and determination of seminal plasma and sperm amino acids of the honeybee (*Apis mellifera*). *Annals of the Entomological Society of America*. 1960;53(6):841-3.
- 99 Woyke J. Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*. 1962;43:21-5.
- 100 Gençer HV, Kahya Y. Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*. 2011 2011;50(2):130-7.
- 101 Stort AC, Gonçalves LS. Storage of Germplasm In: Rinderer, TE (ed), *Bee Genetics and Breeding Academic Press, Inc, London, UK*. 1986:345-59.
- 102 Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, Eubel H, Millar AH. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics*. 2009 Apr;9(8):2085-97.
- 103 Collins AM, Williams V, Evans JD. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*. 2004;13(2):141-6.

- 104 King M, Eubel H, Millar AH, Baer B. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol.* 2011 Mar;57(3):409-14.
- 105 Blum MS, Bumgarner JE, Taber Iii S. Composition and possible significance of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. *J Insect Physiol.* 1967;13(9):1301-8.
- 106 Stort AC, Gonçalves LS. Storage of Germplasm. In: Rinderer, T.E. (ed.) *Bee Genetics and Breeding* 1986;Academic Press, Inc., London, UK.(345-359).
- 107 Da Cruz-Landim C, Beig D, De Moraes RLMS. The Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia.* 1980 1980/01/01;33(1):1-15.
- 108 Woyke J, Skowronek W. Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. *Journal of Apicultural Research.* 1974;13(3):183-90.
- 109 Laidlaw HH, Page RE. Queen rearing and bee breeding. Wiswcas Press, . 1997;Cheshire, Connecticut, USA.:224.
- 110 Sekine K, Furusawa T, Hatakeyama M. The boule gene is essential for spermatogenesis of haploid insect male. *Dev Biol.* 2015 Mar;399(1):154-63.
- 111 Woyke J. Ultrastructure of single and multiple diploid honey bee spermatozoa. *Journal of Apicultural Research.* 1984;23:123-35.
- 112 Woyke J. Lengths of haploid and diploid spermatozoa of the honeybee and the question of the production of triploid workers. *Journal of Apicultural Research.* 1983;22(3):146-9.
- 113 Werner M, Simmons LW. Insect sperm motility. *Biol Rev.* 2008 May;83(2):191-208.
- 114 Stort AC, Gonçalves LS. Storage of germplasm. In Rinderer, T E. (ed). *Bee genetics and breeding* Academic Press, Inc; London, UK. 1986:345-9.
- 115 Lino-Neto J, Bao SN, Dolder H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell.* 2000 Aug;32(4):322-7.
- 116 Dias G, Lino-Neto J, Mercati D, Dallai R. The sperm ultrastructure and spermiogenesis of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) with evidence of cyst degeneration. *Micron.* 2015 Jun;73:21-7.
- 117 de Oliveira CM, Fraga FB, Brito P, Gomes LF, Dolder H, Lino-Neto J. Morphology of spermatozoa of *Dissomphalus connubialis* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Bethyliidae). *Micron.* 2013 Jan;44:268-74.
- 118 Baudry E, Solignac M, Garnery L, Gries M, Cornuet JM, Koeniger N. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences.* 1998 Oct 22;265(1409):2009-14.

- 119 Pechhacker H. Physiography influences honeybee queens choice of mating place (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie*. 1994;25(2):239-48.
- 120 Koeniger N, Koeniger G, Gries M, Tingek S. Drone competition at drone congregation areas in four *Apis* species. *Apidologie*. 2005 Apr-Jun;36(2):211-21.
- 121 Heidinger I, Meixner M, Berg S, Büchler R. Observation of the mating behavior of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens using radio-frequency identification (rfid): Factors influencing the duration and frequency of nuptial flights. *Insects*. 2014;5(3):513.
- 122 Koeniger N, Koeniger G. Mating flight duration of *Apis mellifera* queens: As short as possible, as long as necessary. *Apidologie*. 2007 Nov-Dec;38(6):606-11.
- 123 Koeniger N, Koeniger G. An evolutionary approach to mating-behavior and drone copulatory organs in *Apis*. *Apidologie*. 1991 1991;22(6):581-90.
- 124 Woyke J. The mating sign of queen bees originates from two drones and the process of multiple mating in honey bees. *Journal of Apicultural Research*. 2011;50(4):272-83.
- 125 Woyke J. Three substances ejected by *Apis mellifera* drones from everted endophallus and during natural matings with queen bees. *Apidologie*. 2010 Nov-Dec;41(6):613-21.
- 126 Tarpy DR, Nielsen R, Nielsen DI. A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. *Insectes Sociaux*. 2004 May;51(2):203-4.
- 127 Schluns H, Moritz RFA, Neumann P, Kryger P, Koeniger G. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour*. 2005 Jul;70:125-31.
- 128 Woyke J. Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 1983;22(3):150-4.
- 129 Woyke J. A mathematical-model for the dynamics of spermatozoa entry into the spermathecae of instrumentally inseminated queen honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 1988;27(2):122-5.
- 130 Ruttner F, Koeniger G. The filling of the spermatheca of the honey bee queen - Active migration or passive transport of the spermatozoa ? *Physiologie*. 1971;72(4):411-22.
- 131 Gençer HV, Firatli C. Reproductive and morphological comparisons of drones reared in queenright and laying worker colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2005;44(4):163-7.
- 132 Sturup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav Ecol*. 2013 Sep-Oct;24(5):1192-8.



- 133 Rousseau A, Fournier V, Giovenazzo P. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can Entomol.* 2015;147(6):702-11.
- 134 Holman L. Sperm viability staining in ecology and evolution: potential pitfalls. *Behavioral Ecology and Sociobiology.* 2009 Sep;63(11):1679-88.
- 135 Rhodes JW, Harden S, Spooner-Hart R, Anderson DL, Wheen G. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie.* 2011 Jan;42(1):29-38.
- 136 Baer B, Eubel H, Taylor NL, O'Toole N, Millar AH. Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biol.* 2009;10(6):44.
- 137 Peres LMC, Falco JRP, Aguirra TJ, Mello MLS. Feulgen-DNA content and chromatin organization in the spermathecal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apoidea) queens with aging. *Apidologie.* 2014 Sep;45(5):601-9.
- 138 Wegener J, Zschornig K, Onischke K, Fuchs B, Schiller J, Muller K. Conservation of honey bee (*Apis mellifera*) sperm phospholipids during storage in the bee queen - A TLC/MALDI-TOF MS study. *Experimental Gerontology.* 2013 Feb;48(2):213-22.
- 139 Jones AG, Ratterman NL. Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009 Jun;106:10001-8.
- 140 Page RE, Metcalf RA. Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. *Am Nat.* 1982 1982;119(2):263-81.
- 141 Kraus FB, Moritz RFA. Extreme polyandry in social Hymenoptera: evolutionary causes and consequences for colony organisation. In: Kappeler P, editor. *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 413-39.
- 142 Kvarnemo C, Simmons LW. Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci.* 2013 Mar 5;368(1613).
- 143 Andersson M, Simmons LW. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution.* 2006 Jun;21(6):296-302.
- 144 Boomsma JJ, Baer B, Heinze J. The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology.* Palo Alto: Annual Reviews; 2005. p. 395-420.
- 145 Parker GA, Pizzari T. Sperm competition and ejaculate economics. *Biol Rev.* 2010 Nov;85(4):897-934.
- 146 Koeniger N, Koeniger G, Wongsiri S. Mating and sperm transfer in *Apis florea*. *Apidologie.* 1989 1989;20(5):413-8.

- 147 Franck P, Solignac M, Vautrin D, Cornuet JM, Koeniger G, Koeniger N. Sperm competition and last-male precedence in the honeybee. *Animal Behaviour*. 2002 Sep;64:503-9.
- 148 Lampert KP, Pasternak V, Brand P, Tollrian R, Leese F, Eltz T. 'Late' male sperm precedence in polyandrous wool-carder bees and the evolution of male resource defence in Hymenoptera. *Animal Behaviour*. 2014 4//;90:211-7.
- 149 Laidlaw HH, Page RE. Polyandry in Honey Bees (APIS MELLIFERA L.): Sperm Utilization and Intracolony Genetic Relationships. *Genetics*. 1984;108 (4): 985-97.
- 150 Baer B, Schmid-Hempel P, Hoeg JT, Boomsma JJ. Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Sociaux*. 2003;50(2):101-8.
- 151 Lino-Neto J, Dolder H. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue Cell*. 2002 Apr;34(2):124-8.
- 152 Landenmark HKE, Forgan DH, Cockell CS. An estimate of the total DNA in the biosphere. *Plos Biology*. 2015 Jun;13(6).
- 153 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(2):560-4.
- 154 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
- 155 Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 2006 Oct 26;443(7114):931-49.
- 156 Database HG. <http://hymenopteragenome.org/>. 26012016 tarihinde görüntülendi.
- 157 Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, et al. Finding the missing honey bee genes: Lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*. 2014;15(1).
- 158 Sadd BM, Barribeau SM, Bloch G, et al. The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Genome Biol*. 2015 Apr 24;16.
- 159 Werren JH, Richards S, Desjardins CA, et al. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid nasonia species. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):343-8.
- 160 Elsik CGT, A.; Diesh, C. M.; Unni, D. R.; Emery, M. L; Nguyen, H. N; Hagen, D. E. Hymenoptera Genome Database: integrating genome annotations in HymenopteraMine. *Nucleic Acids Research*. 2015 November 17, 2015(November 17, 2015):8.
- 161 Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb;291(5507):1304-+.

- 162 Lander ES, Int Human Genome Sequencing C, Linton LM, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb;409(6822):860-921.
- 163 Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001;11(1):3-11.
- 164 Zincir sonlandırma işlemi için modifiye edilmiş nükleotidler. Available at: <http://openwetware.org/images/b/be/Be109dideoxynucleotide.jpg>
- 165 Sanger DNA dizileme yöntemi. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger\\_sequencing](https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing)
- 166 Guzvic M. The history of DNA sequencing. *Journal of Medical Biochemistry*. 2013 Oct;32(4):301-12.
- 167 Srinivasan S, Batra B. Four generations of sequencing- is it ready for the clinic yet? *Journal of Next Generation Sequencing & Applications*. 2014;1(1).
- 168 Feng Y, Zhang Y, Ying C, Wang D, Du C. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics Proteomics Bioinform*. 2015;13(1):4-16.
- 169 Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998 Jul;281(5375):363-+.
- 170 Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA-polymerase-activity. *Anal Biochem*. 1987 Dec;167(2):235-8.
- 171 Nyren P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem*. 1985;151(2):504-9.
- 172 Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*. 2006 Jan;363(1-2):83-94.
- 173 Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyren P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem*. 1999 Feb;267(1):65-71.
- 174 Sobenin IA, Mitrofanov KY, Zhelankin AV, et al. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: Perspectives in diagnostics and methodological pitfalls. *Biomed Res Int*. 2014;9.
- 175 Nordstrom T, Ronaghi M, Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R, Nyren P. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000 Apr;31:107-12.
- 176 Garcia CA, Ahmadian A, Gharizadeh B, Lundeberg J, Ronaghi M, Nyren P. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene. *Gene*. 2000 Aug;253(2):249-57.

- 177 Yan JB, Zhang R, Xiong C, et al. Pyrosequencing Is an Accurate and Reliable Method for the Analysis of Heteroplasmy of the A32430 Mutation in Patients with Mitochondrial Diabetes (vol 16, pg 431, 2014). *J Mol Diagn*. 2014 Sep;16(5):591-.
- 178 Langaee T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005 Jun;573(1-2):96-102.
- 179 Anonim. Pyrosequencing – the synergy of sequencing and quantification. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
- 180 Rensch T, Villar D, Horvath J, Odom DT, Flicek P. Mitochondrial heteroplasmy in vertebrates using ChIP-sequencing data. *Genome Biol*. 2016 Jun;17:14.
- 181 Sosa MX, Sivakumar IKA, Maragh S, et al. Next-generation sequencing of human mitochondrial reference genomes uncovers high heteroplasmy frequency. *PLoS Comput Biol*. 2012 Oct;8(10):11.
- 182 Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing. *Front Microbiol*. 2016 May;7:11.
- 183 Yen HC, Hsu WC, Lin CL, Chen GW, Huang YH. Advantages and considerations in the confirmation of mitochondrial DNA mutations by denaturing HPLC and pyrosequencing. In: Wei YH, Tzeng CR, Lee HM, editors. *Mitochondrial Research in Translational Medicine*. Malden: Wiley-Blackwell; 2010. p. 13-20.
- 184 Bintz BJ, Dixon GB, Wilson MR. Simultaneous detection of human mitochondrial DNA and nuclear-inserted mitochondrial-origin sequences (numts) using forensic mtdna amplification strategies and pyrosequencing technology. *J Forensic Sci*. 2014 Jul;59(4):1064-73.
- 185 Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, et al. Comparison of sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of kras mutations diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn*. 2010 Jul;12(4):425-32.
- 186 Andreasson H, Nilsson M, Budowle B, Frisk S, Allen M. Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing. *Int J Legal Med*. 2006 Nov;120(6):383-90.
- 187 White HE, Durston VJ, Seller A, Fratter C, Harvey JF, Cross NCP. Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing. *Genet Test*. 2005 Fal;9(3):190-9.
- 188 Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996 Nov;242(1):84-9.
- 189 Piro sekanslama reaksiyonu. Available at: <http://www.genetargetsolutions.com.au/product/qseq/>

- 190 Nordstrom T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyren P. Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Anal Biochem.* 2000 Jul;282(2):186-93.
- 191 Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem.* 2000 Nov;286(2):282-8.
- 192 Klenow H, Overgaard K, Patkar SA. Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into 2 different catalytic fragments - influence of assay conditions on change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage. *Eur J Biochem.* 1971;22(3):371-&.
- 193 Karamohamed S, Nilsson J, Nourizad K, Ronaghi M, Pettersson B, Nyren P. Production, purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 1999 Apr;15(3):381-8.
- 194 dATP- $\alpha$ -S ve dATP'nin yapısal farklılığı. Available at: <https://www.google.com/patents/US7838236>.
- 195 Kettlun AM, Leyton M, Valenzuela MA, Mancilla M, Traversocori A. Identification and subcellular-localization of 2 isoenzymes of apyrase from *solanum-tuberosum*. *Phytochemistry.* 1992 Jun;31(6):1889-94.
- 196 Kettlun AM, Urra R, Leyton M, Valenzuela MA, Mancilla M, Traversocori A. Purification and characterization of 2 isoapyrases from *solanum-tuberosum* var *ultimus*. *Phytochemistry.* 1992 Nov;31(11):3691-6.
- 197 Brodschneider R, Arnold G, Hrasnigg N, Crailsheim K. Does patriline composition change over a honey bee queen's lifetime? *Insects.* 2012;3(3):857-69.
- 198 Tarpy DR, Nielsen DI. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera : Apidae). *Annals of the Entomological Society of America.* 2002 Jul;95(4):513-28.
- 199 Gençer HV, Kahya Y. The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research.* 2011;50(3):190-4.
- 200 Moritz RFA. The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *Journal of Apicultural Research.* 1984;23(3):164-7.
- 201 Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012:134.
- 202 Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp.* 1999;41:95-8.

- 203 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(12):2725-9.
- 204 DeGrandi-Hoffman G, Tarpy DR, Schneider SS. Patriline composition of worker populations in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by queens inseminated with semen from African and European drones. *Apidologie*. 2003 Mar-Apr;34(2):111-20.
- 205 Holmes MJ, Allsopp MH, Noach-Pienaar LA, Wossler TC, Oldroyd BP, Beekman M. Sperm utilization in honeybees (*Apis mellifera scutellata* and *A-m. capensis*) in South Africa. *Apidologie*. 2011 Jan;42(1):23-8.
- 206 Gontarz A, Banaszewska D, Gryzinska M, Andrasz K. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turk J Vet Anim Sci*. 2016;40.
- 207 Reinhardt K, Dobler R, Abbott J. An Ecology of Sperm: Sperm Diversification by Natural Selection. In: Futuyma DJ, editor. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Vol 46. Palo Alto: Annual Reviews; 2015. p. 435-+.
- 208 Koeniger G, Koeniger N, Pechhacker H, Ruttner F, Berg S. Assortative mating in a mixed population of European honeybees, *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera carnica*. *Insectes Sociaux*. 1989;36(2):129-38.
- 209 Collins AM, Sheppard WS, Shimanuki H. A scientific note on the identification of honey bee semen using a mitochondrial DNA marker. *Apidologie*. 2000 Sep-Oct;31(5):595-6.
- 210 Remnant EJ, Koetz A, Tan K, Hinson E, Beekman M, Oldroyd BP. Reproductive interference between honeybee species in artificial sympatry. *Mol Ecol*. 2014 Mar;23(5):1096-107.

## 8. EKLER

Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların vücut dokularından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıklarına ilişkin çizelge (Ek-1), Kafkas ve İtalyan ırkı ana arıların sperm torbalarından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıklarına ilişkin çizelge (Ek-2), Erkek arı vücut dokularından izole edilen DNA agaroz jel görüntüsü (Ek-3), SNP analizi için taranan bölgelerin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (Ek-4), W bölgesinin pirosekanslanması öncesi gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerinden biri (Ek-5), Kafkas ve İtalyan erkek arı DNA'ları karışımlarının Pirosekanslama analizi sonuçları (Ek-6), Sperm torbalarının içeriklerini pirosekanslama analizinde gözlenen SNP oranları (Ek-7) ve kullanılan makine teçhizat listesi (Ek-8) aşağıda verilmiştir.

### EK-1

Çizelge 8.1. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arıların vücut dokularından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıkları

	Örnek	Genotip	DNA Miktarı (ng/µl)	Saflık (260 / 280)		Örnek	Genotip	DNA Miktarı (ng/µl)	Saflık (260 / 280)
1	I-10-2	İtalyan	68,6	1,61	26	K-16-3	Kafkas	12,7	1,68
2	I-10-3	İtalyan	53,7	1,73	27	K-16-4	Kafkas	7,1	1,36
3	I-10-4	İtalyan	63,4	1,79	28	K-16-5	Kafkas	15,1	1,82
4	I-10-5	İtalyan	37,9	1,8	29	K-2-1	Kafkas	39,8	1,86
5	I-10-6	İtalyan	61,7	1,76	30	K-2-2	Kafkas	78,6	1,79
6	I-10-7	İtalyan	56,5	1,78	31	K-2-3	Kafkas	66,5	1,79
7	I-10-8	İtalyan	22,4	1,7	32	K-2-4	Kafkas	53,1	1,77
8	I-10-9	İtalyan	28,9	1,78	33	K-2-5	Kafkas	74,2	1,81
9	I-10-10	İtalyan	82,5	1,82	34	K-2-6	Kafkas	31,9	1,77
10	I-10-11	İtalyan	59,3	1,86	35	K-2-7	Kafkas	49,3	1,75
11	I-10-12	İtalyan	22,2	1,94	36	K-2-8	Kafkas	80,1	1,79
12	I-15-1	İtalyan	110,5	1,66	37	K-2-9	Kafkas	84,8	1,78
13	I-15-2	İtalyan	45,4	1,73	38	K-30-1	Kafkas	80,6	1,63
14	I-15-3	İtalyan	55,1	1,77	39	K-30-2	Kafkas	43,5	1,81
15	I-15-4	İtalyan	59,6	1,81	40	K-30-3	Kafkas	44,3	1,8
16	I-15-5	İtalyan	100,6	1,79	41	K-30-4	Kafkas	40,3	1,85
17	I-15-6	İtalyan	60,9	1,74	42	K-52-1	Kafkas	33,9	1,69
18	I-15-7	İtalyan	46,9	1,85	43	K-52-2	Kafkas	38,3	1,72
19	I-15-8	İtalyan	41,8	1,81	44	K-52-3	Kafkas	55,5	1,78
20	I-25-1	İtalyan	323,7	1,39	45	K-52-4	Kafkas	54,3	1,77
21	I-25-2	İtalyan	74,8	1,64	46	K-52-5	Kafkas	26,9	1,74
22	I-25-3	İtalyan	50,2	1,83	47	K-52-6	Kafkas	36,1	1,75
23	I-25-4	İtalyan	71,7	1,86	48	K-52-7	Kafkas	17,6	1,64
24	K-16-1	Kafkas	25,1	1,68	49	K-52-8	Kafkas	48,2	1,89
25	K-16-2	Kafkas	24	1,81					

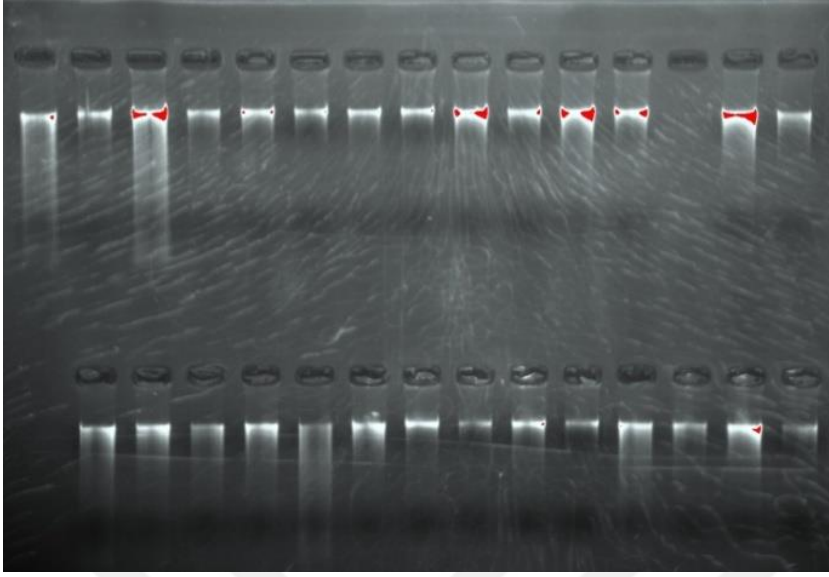
## EK-2

Çizelge 8.2 Kafkas ve İtalyan ırkı ana arıların sperm torbalarından izole edilen DNA'ların miktar ve saflıklarına ilişkin veriler

Örnek	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µl)	Saflık (260 / 280)
A1	47,1	1,90
A2	28,8	1,93
A3	13,7	1,90
A4	11,2	1,92
A5	17,4	1,86
A6	14,0	1,86
A7	20,2	1,89
B1	7,6	2,10
B2	10,3	2,17
B3	49,2	1,83
B4	38,8	2,03
B5	16,6	1,91
B6	21,1	1,91
B7	28,1	1,81
B8	10,1	1,79
B9	6,7	1,85
B10	20,8	1,90
C1	36,0	1,97
C2	24,3	1,94
C3	12,2	1,75
C4	34,0	1,84
C5	12,4	1,62
C6	21,9	1,84
C7	14,4	1,85
C8	4,9	1,76
C9	14,2	2,13
C10	21	1,86
D1	33,7	1,93
D2	21,9	1,92
D3	22,6	2,01
D4	31,1	1,86
D5	38,6	1,85
D6	12,6	1,77
D7	7,2	1,64
D8	21,1	1,96
D9	22,0	1,91

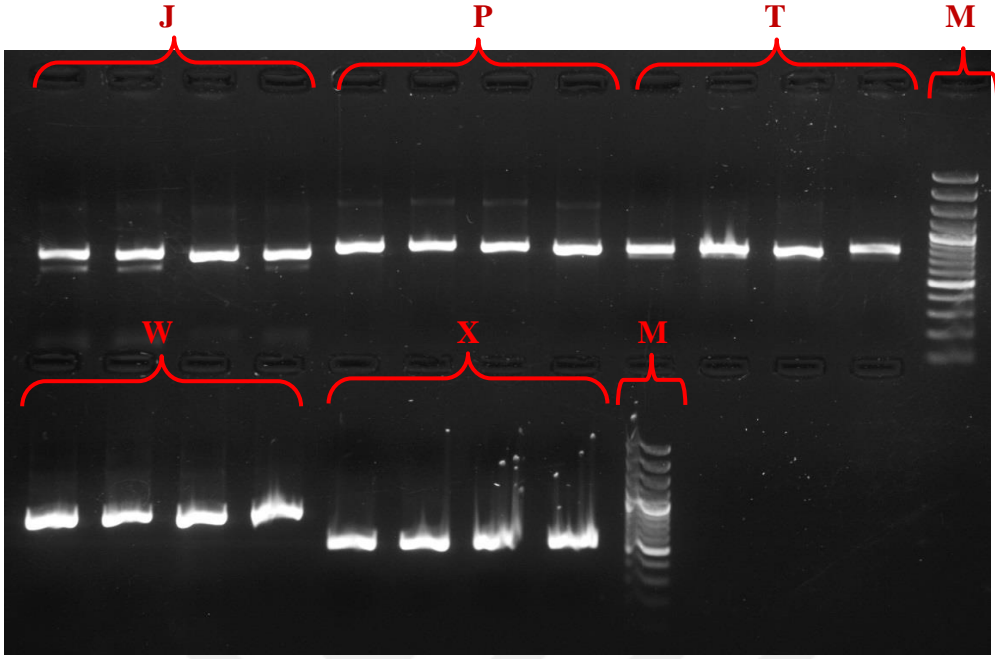


**EK-3**



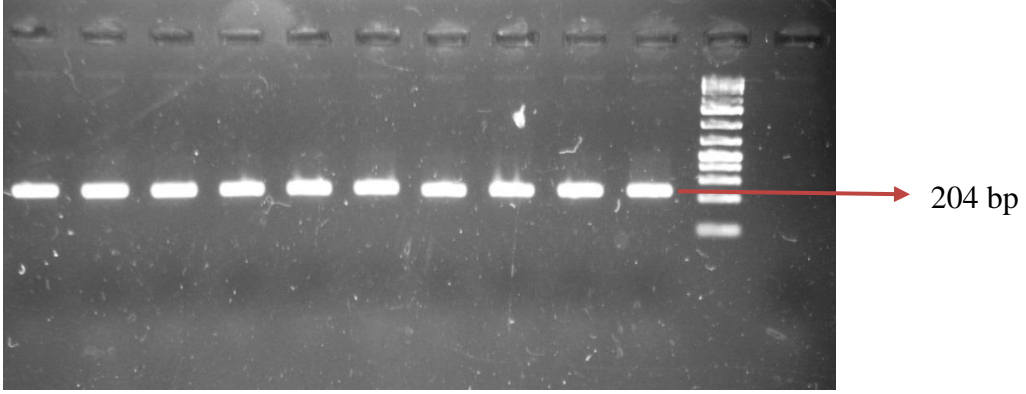
Şekil 8.1. Erkek arı vücut dokularından izole edilen DNA agaroz jel görüntüsü

EK-4



Şekil 8.2. SNP analizi için taranan J, P, T, W ve X bölgelerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: Merdiven 100-3000 bç)

**EK-5:**



Şekil 8.3. W bölgesinin pirosekanslanması öncesi gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerinden biri (Ürün büyüklüğü:204 bp, Merdiven 100-3000 bç).

**EK-6**

Çizelge 8.3. Kafkas ve İtalyan ırkı erkek arı DNA'ları karışımların pirosekanslama analizi sonuçları

Beklenen oransal değer (%)		Gözlenen oransal değer (%)	
Kafkas	İtalyan	Kafkas	İtalyan
0	100	4,0	96,0
0	100	3,0	97,0
0	100	2,0	98,0
0	100	1,0	99,0
0	100	1,0	99,0
	<b>Ortalama</b>	<b>2,2</b>	<b>97,8</b>
20	80	24,0	76,0
20	80	23,0	77,0
20	80	22,0	78,0
	<b>Ortalama</b>	<b>23,0</b>	<b>77,0</b>
40	60	42,0	58,0
40	60	44,0	56,0
40	60	42,0	58,0
		<b>42,7</b>	<b>57,3</b>
50	50	49,0	51,0
50	50	50,0	50,0
50	50	51,0	49,0
	<b>Ortalama</b>	<b>50,0</b>	<b>50,0</b>
60	40	64,0	36,0
60	40	63,0	37,0
60	40	58,0	42,0
	<b>Ortalama</b>	<b>61,7</b>	<b>38,3</b>
80	20	79,0	21,0
80	20	81,0	19,0
80	20	77,0	23,0
	<b>Ortalama</b>	<b>79,0</b>	<b>21,0</b>
100	0	97,0	3,0
100	0	98,0	2,0
100	0	99,0	1,0
100	0	98,0	2,0
100	0	98,0	2,0
100	0	97,0	3,0
100	0	98,0	2,0
	<b>Ortalama</b>	<b>97,9</b>	<b>2,1</b>

**Ek-7**

Çizelge 8.4. Sperm torbasının pirosekanslama analizinde gözlenen SNP oranları

Örnek	1. Analiz		2. Analiz		Ortalama	
	C*	T	C	T	C	T
A1	38	62	36	64	37,0	63,0
A2	27	73	24	76	25,5	74,5
A3	25	75	23	77	24,0	76,0
A4	25	75	26	74	25,5	74,5
A5	40	60	40	60	40,0	60,0
A6	32	68	32	68	32,0	68,0
A7	29	71	31	69	30,0	70,0
B1	13	87	14	86	13,5	86,5
B2	34	66	34	66	34,0	66,0
B3	33	67	31	69	32,0	68,0
B4	37	63	32	68	34,5	65,5
B5	34	66	31	69	32,5	67,5
B6	36	64	36	64	36,0	64,0
B7	35	65	37	63	36,0	64,0
B8	21	79	22	78	21,5	78,5
B9	43	57	41	59	42,0	58,0
B10	33	67	31	69	32,0	68,0
C1	35	65	37	63	36,0	64,0
C2	35	65	37	63	36,0	64,0
C3	22	78	21	79	21,5	78,5
C4	39	61	37	63	38,0	62,0
C5	39	61	40	60	39,5	60,5
C6	21	79	21	79	21,0	79,0
C7	31	69	34	66	32,5	67,5
C8	27	73	26	74	26,5	73,5
C9	18	82	19	81	18,5	81,5
C10	31	69	33	67	32,0	68,0
D1	30	70	29	71	29,5	70,5
D2	27	73	25	75	26,0	74,0
D3	38	62	39	61	38,5	61,5
D4	40	60	43	57	41,5	58,5
D5			29	71	29,0	71,0
D6	35	65	34	66	34,5	65,5
D7	31	69	27	73	29,0	71,0
D8	18	82	17	83	17,5	82,5
D9	34	66	35	66	34,5	66,0

\* C nükleotidi İtalyan ırkının, T nükleotidi Kafkas ırkının ırkının belirteçidir.

## EK-7

### Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
UV/VIS Spektrofotometre, Shimadzu UV1800 (Teknik özellikler için bkz: <a href="http://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/uv1800/uv.html">http://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/uv1800/uv.html</a> )	UV/VIS Spektrofotometre, semen örneklerinin sperm konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
Yapay tohumlama aleti, Schley marka (Teknik özellikler için bkz: <a href="http://www.besamungsgeraet.de/en/">http://www.besamungsgeraet.de/en/</a> )	Erkek arılardan semen toplama ve ana arıların yapay tohumlanması için kullanılmıştır. Yapay tohumlama çalışmaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu, Leica DM 3000 (Teknik özellikler için bkz: <a href="http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/clinical/details/product/leica-dm3000/">http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/clinical/details/product/leica-dm3000/</a> )	Erkek arı sperm canlılık testlerinde kullanılmıştır. Sperm canlılığı belirlemesi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
Stereo mikroskop, Leica Z16APO (Teknik özellikler için bkz: <a href="http://www.leica-microsystems.com/products/stereo-microscopes-macroscopes/macroscopes/details/product/leica-z16-apo/">http://www.leica-microsystems.com/products/stereo-microscopes-macroscopes/macroscopes/details/product/leica-z16-apo/</a> )	Erkek arı ve ana arılarda diseksiyon çalışmalarında kullanılmıştır. Diseksiyon çalışmaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Bal Arısı ve Arıcılık Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
Isı döngü Cihazı, Biometra TI Thermocyclers	PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Bu analizler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji A.B.D'nda yürütülmüştür.
Vakum istasyonu, Pyromark Q24 Vacuum workstation (Teknik özellikler için bkz: <a href="https://www.qiagen.com/us/resources/resource-detail?id=41eed6af-3e3d-4085-ae1b-3607e80539ea&amp;lang=en">https://www.qiagen.com/us/resources/resource-detail?id=41eed6af-3e3d-4085-ae1b-3607e80539ea&amp;lang=en</a> )	Pirosekanlama analizi öncesi çift zincir DNA'nın tek zincir hale getirilmesi ve saflaştırma aşamalarında kullanılmıştır. Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Kliniğinde
Pirosekanlama cihazı, Pyromark Q24 (Teknik özellikler için bkz: <a href="https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-q24/#orderinginformation">https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-q24/#orderinginformation</a> )	Kantitatif SNP'ne dayalı analizlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır. Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Kliniğinde

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Yasin Kahya

**Doğum Yeri:** Çorum/İskilip

**Doğum Tarihi:** 09.10.1980

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce

### EĞİTİM DURUMU

**Lise:** Mehmet Akif Ersoy Lisesi (1997)

**Lisans:** Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü (1998-2003)

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootečni A.B.D. (2003-2006)

### İŞ TECRÜBESİ

**Kurumu:** Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Hayvan Yetiştirme ve Islahı A.B.D

**Görevi:** Araştırma Görevlisi

**Yılları:** 2006-Devam

**Kurumu:** Recoven Biyoteknoloji, Tarım, Eğitim, San. ve Tic. Ltd. Şti.

**Görevi:** Kurucu - Genel Müdür

**Yılları:** 2016-Devam

**Kurumu:** TUBİTAK, 107O343

‘Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Ana Arılarının Çiftleşme Uçuşu ve Yumurtlamaya Başlaması Üzerine Juvenil Hormon (JH) Uygulamasının Etkisi’

**Görevi:** Yardımcı Araştırmacı

**Yılları:** 2007-2008

**Kurumu:** TUBİTAK, 108O447

‘Yalancı Ana Arılı Koloni ve Normal Koloni Erkek Arılarının (*Apis mellifera* L.) Sperm Rekabeti’

**Görevi:** Proje Bursiyeri

**Yılları:** 2009-2010

**Kurumu:** Ankara Üniversitesi BAP, 09B4347006

“Normal ve Yalancı Ana Arılı Koloni Erkek Arılarının (*Apis mellifera* L.) Sperm Özellikleri”

**Görevi:** Yardımcı Araştırmacı

**Yılları:** 2009-2010

**Kurumu:** TÜBİTAK, 112O007

“Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Ana Arılarında Sperm Depolama İşleminin Real-Time PCR İle Analizi”

**Görevi:** Proje Bursiyeri

**Yılları:** 2012-2013

**Kurumu:** Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı TAGEM, TAGEM/15/AR-GE/31

“Damızlık Ana Arı Üretim İşletmelerinde Morfometrik Ve Mikrosatellit DNA Varyasyonunu Belirleme Ve Damızlık İşletmeleri İzleme Sistemi Oluşturma”

**Görevi:** Yardımcı Araştırmacı

**Yılları:** 2015-2018

**Kurumu:** Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

“Türkiye’ de Ana Arı Üretim İşletmelerinde Kullanılan Damızlık Kolonilerin Genetik Yapısının Belirlenmesi”

**Görevi:** Yardımcı Araştırmacı

**Yılları:** 2016-2018

**Kurumu:** Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı TAGEM, TAGEM/16/AR-GE/19

“Kısa Mesafe Kablosuz Ağ ve GSM Tabanlı Koloni Takip Sistemi”

**Görevi:** Yardımcı Araştırmacı

**Yılları:** 2016-2019

**Kurumu:** TÜBİTAK, 2150364

“Balarısı Zehir Bileşeni Melittinin Rekombinant Üretimi”

**Görevi:** Yürütücü

**Yılları:** 2016-2017



## 10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

yok

### Doktora Öncesi Yayınlar

Gençer, H V; **Kahya, Y**; Woyke, J (2014) Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie*, 45(6): 757-770.(DOI: 10.1007/s13592-014-0295-0)

Gençer, H V; **Kahya, Y** (2011) The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera L.*) queens. *Journal of Apicultural Research*, 50(3): 190-194.

Gençer, H V; **Kahya, Y** (2011) Are sperm traits of drones (*Apis mellifera L.*) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50(2): 130-137.

**Kahya, Y**; Gençer, H V; Woyke, J (2008) Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2): 118-125.

## KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Woyke, J; Gençer, H V; **Kahya, Y** (2014) Dlaczego żywotność nasienia zmniejsza się w czasie naturalnego i sztucznego unasielenia matek pszczelich (Why the viability of sperms in honey bee drones and queens diminishes within short time during natural and instrumental insemination). 51 Naukowa Konferencja Pszczelarska, 11-13 Marca 2014, p. 34, Szczyrk, Polska.

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildiriler

Gençer, H.V., **Kahya, Y.**, Woyke, J (2014) The viability loss of spermatozoa in drones during eversion of endophallus. Sixth European Conference of Apidology, 09-11 September 2014, Murcia, Spain. p. 195-196

Gençer, H V; Hamednia, S; **Kahya, Y** (2012) The age dependent variation of reproductive organs of honeybee drones. Fifth European Conference of Apidology, 3-7 September, 2012, p. 192, Halle an der Saale, Germany.

Gençer, H V; **Kahya, Y** (2012) The effect of drone type on sperm competition in honeybees (*Apis mellifera*). Fifth European Conference of Apidology, 3-7 September, 2012, p. 192, Halle an der Saale, Germany.

Hamednia, S; Gençer, H V; **Kahya, Y** (2012) Do the number and viability of sperm in drone honey bees depend on drone age? Third International Mugla Beekeeping and Pine Honey Congress, 1-4 November, 2012, p. 347, Mugla, Turkey

Gençer, H V; **Kahya, Y** (2010) Differences in sperm traits of drones from queenright and laying worker colonies. Fourth European Conference of Apidology, 7-9 September, 2010, p. 149, Ankara, Turkey.

Gençer, H V; **Kahya, Y** (2010) The viability of sperm in reproductive organs of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens. Fourth European Conference of Apidology, 7-9 September, 2010, p. 150, Ankara, Turkey.

**Kahya, Y**; Gençer, H V (2007) The honey bee queen (*A. m. caucasica*) weight at emergence and its effect on live weights at pre and post mating periods” Bees under the Midnight Sun IBRA International Conference on Recent Trends in Apicultural Science, 10-14 June, 2007, p. 134, Mikkeli, Finland.

**Kahya, Y**; Gençer, H V (2006) The weight changes and reproductive traits of honey bee queens (*A. m. caucasica*)” Second European Conference of Apidology, 10th -14th September, 2006, p. 56, Prague, Czech Republic.

### **Ulusal Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler**

Başar, C; **Kahya, Y**; Gençer, H V (2013) Kastamonu İli Abana İlçesi arıcılığının analizi. 9. Ulusal Zootekni Öğrenci kongresi, 23-25 Mayıs 2013, Erzurum, s.124-130.