

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİNGÖL BALINDA METAGENOMİK ANALİZİ

ELİF ÖDEMİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİNGÖL BALINDA METAGENOMİK ANALİZİ

ELİF ÖDEMİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND
APPLIED SCIENCES

METAGENOMIC ANALYSIS OF THE BINGOL HONEY

ELIF ODEMIS

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER
OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07 /02 / 2023 tarih ve 2023/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12 / 05 / 2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Elif Ödemiş'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE : Dr. Öğrt. Üyesi Mine GÜL ŞEKER

ÜYE : Dr. Öğrt. Üyesi Veysel SÜZERER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bal, bitki nektarları ve bitki özütü ile beslenen böceklerin ürettiği salgıların, arılar tarafından işlenmesi sonucunda oluşan doğal besin maddesidir. Balın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin yanı sıra balın botanik kökenin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu sayede baldaki polen çeşitliliğine bağlı olarak balın oluşmasına katkı sağlayan bitki türlerinin belirlenmesi balın kalitesine; mikroorganizma varlığı ise üretimdeki hijyenin takibi ve hem insan hem de arı sağlığı açısından önemlidir. Türkiye’ nin bitki çeşitliliği bakımından zengin olan Doğu Anadolu Bölgesi’nde bulunan Bingöl İli’nde üretilen balların botanik kökeni polen analizleri ile literatürde belirlenmiştir. Ancak, son yıllarda metagenomik yaklaşımlar kullanılarak balın bitkisel kökeni türlere ait DNA dizilerinin belirlenmesi ile tür bazında ortaya net olarak çıkartılabilmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında kalitesi ile dünya birinciliğine sahip Bingöl iline ait belirlenen 40 farklı lokasyondan toplanmış balların ve negatif kontrol olarak da çevre illerinden toplanan çiçek ballarının metagenomik analizlerinin yapılması için öncelikle ballardan çevresel DNA (environmental, e-DNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm metagenomik analizlerde NCBI nükleotid veri tabanı ve taksonomi kaynağı referans olarak kullanılarak e-DNA’dan elde edilen diziler eşleştirilerek her bir okumanın organizma grupları içinde gruplandırılması ile balın botanik kökeni belirlenmiştir.

Bu çalışma , T.C. Strateji ve Bütçe Başkanlığı’nın finanse ettiği Yüksek Öğretim Kurulu’nun Koordine ettiği Bölgesel Kalkınma Odaklı Misyon Farklılaşması ve İhtisaslaşması Programı kapsamında Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından PİKOM-Arı.2019.003 Numaralı “Bingöl Balının Markalaşmasına Yeni Nesil Teknolojik Dokunuş: DNA Barkodlama” isimli proje kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bal, e-DNA, Metagenomik.

SUMMARY

Honey is a natural nutrient formed as a result of processing by the bees of the secretions produced by insects that feed on plant nectars and saps. Identification of the botanical origin that is formed by the physicochemical and biological properties of honey is quite important. Observation of the pollen diversity of honey, existence of microorganisms in honey and such statuses as NGO takes an important place in terms of both health and the country's economy. Characteristic features of honey originate from its vegetative origin. With respect to the plant diversity of Turkey, the city of Bingol in the Eastern Anatolian Region is known to be especially rich in endemic plant diversity. Characteristic features of honey produced in different regions differ based on the region, as well. In this study, Environmental e-DNA isolation was carried out on honey collected from 40 different locations identified in the prize winner city of Bingol and a total of approximately 100 honey samples from flower honey of different cities for negative control. Metagenomical analyses were performed on these DNAs in order to identify the plant origin of the honey, both to determine the characteristics and quality of the honey produced in the region and contribute to the performance of more deliberative production activities by learning the plant groups with nectars that should be preferred by the producers and to regional development. Use of NCBI nucleotide database and the source of taxonomy as reference in all metagenomical analyses and for grouping the matched reference codes within organism groups of each reading later are planned. Distinguishing the groups into default species and types by following the “the lowest common ancestor” approach is aimed at. This study is supported by Bingol University Coordinatorship of Scientific Research Projects under the project called “A New Generation Technological Touch on the Branding of Bingol's Honey: DNA Barcoding” numbered PIKOM-Ari.2019.003 by Bingol University Coordinatorship of Scientific Research Projects within the scope of Regional Development Oriented Mission Differentiation and Specialization Program financed by Republic of Turkey Presidency of Strategy and Budget and coordinated by Board of Higher Education.

Keywords: Honey, e-DNA, Metagenomics.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde yürüdüğüm bu zorlu yolda bana desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bu çalışmamda benimle birlikte üzüntülerimi, sevinçlerimi en derinden hisseden, düştüğümde beni elimden tutup ilk kaldıran, bilgi ve tecrübelerini her zaman sınır tanımadan ailesinden feragat ederek bu yolculuğumda çalışmamın oluşmasının yolunu açan, her zaman sevgi ve minnetle hatırlayacağım güzel anılarımın ışığı danışmanım Sayın Prof. Dr.Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Dr. Öğrt. Üyesi Mine GÜL ŞEKER' e , Dr. Öğrt. Üyesi Veysel SÜZERER'e ve Doç. Dr. Özlem AKKAYA'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamın büyük bir kısmında bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım İlkay ÜNAL'a ve Nicat CEBRAİLOGLU'na teşekkürlerimi sunarım. Bingöl Üniversite'ne tez çalışmama verdikleri destekten dolayı çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni sevgiyle yetiştiren, büyüten, bana olan sonsuz sevgisini, güvenini ve maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen baş kahramanım Canım Babam Şahzet ÇELEBİ'ye ve fedakar Canım Annem Raziye ÇELEBİ'ye çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Balın Botanik Kökeni	4
2.2. Balın İçeriği ve Kalitesi	5
2.3. Türkiye’de Bal Üretimi	8
2.3.1. Türkiye’de Bal İthalatı ve İhracatı	10
2.4. Bingöl Balı ve Üretimi	11
2.5. Dünyada Bal Üretimi	17
2.5.1. Dünyada Bal İthalatı ve İhracatı	18
2.6. Balın Analizinde Kullanılan Yöntemler	19
2.6.1. Melissopalinolojik Analizler	19
2.6.2. Çevresel DNA (eDNA)	20

2.6.3. Metagenomik Analizler	22
2.6.4. Shotgun Analizi	26
2.6.5. Balın Metagenomiği, Bal Arılarının Metagenomik Analizleri ve Mikrobiyotaları	27
2.6.6. Balla İlgili Metagenomik Çalışmalar	30
3. MATERYAL VE METOT	34
3.1. Bal Materyalleri	34
3.2. Kullanılan Kimyasallar	35
3.3. Kullanılan Cihazlar	35
3.4. eDNA İzolasyonu	36
3.5. Nanodrop Saflık ve Miktar Tayini	37
3.6. Metagenomik Analizler	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. eDNA İzolasyonu	39
4.2. Metagenomik (Shotgun) Analizler	39
5. TARTIŞMA	81
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	93
EKLER	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
µL	: Mikrolitre
%	: Yüzde
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Bp	: Basepair
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
ddH ₂ O	: Double distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
eDNA	: Environmental DNA
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
g	: Gram
HCL	: Hidroklorik asit
ITS	: Internal Transcribed spacer
Kg	: Kilogram
matK	: Maturase K
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
Mm	: Milimolar

Ph	: Potansiyel Hidrojen
PZR	: Polimer Zincir Reaksiyonu
rbcL	: Ribulose-bisphosphate carboxylase
rpm	: Revolutions per minute
TGK	: Türkiye Gıda Kodeksi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Türkiye Kovan Sayısı ve Bal Üretimi.	10
2.2: Türkiye’de Bölgelere ve İllere Göre Bal Üretimi.	10
2.3: Ülkelere göre 2016 Yılı Türkiye Bal İhracatı (Ton).	11
2.4: Bingöl İli ve Çevresinin Fiziki Haritası.	13
2.5: Bingöl İli Kovan Sayısı ve Bal Üretimindeki Gelişmeler.	14
2.6: Polenlerin Mikroskopik Görüntüleri.	16
2.7: Türkiye, TRB1 Bölgesi ve Bingöl İline Ait Bal Üretimi.	17
2.8: Bazı Ülkelerin Bal İthalat Miktarı ve Değerleri.	18
2.9: Bazı Ülkelerin Bal İhracat Miktarı ve Değerleri.	19
2.10: Metagenomik Analiz Basamakları.	22
2.11: 16S rRNA Geninin 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Gösterimi.	25
2.12: 16S rRNA Primer Haritası.	25
3.1: Bal Örneklerinin Alındığı İlçelerdeki Lokasyonların Harita Üzerinde Gösterimi.	34
4.1: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA2020) Metagenom Sonuçlarına göre Viridiplantae Sınıflandırılması.	40
4.2: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Embryophyta Sınıflandırılması.	41

4.3:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Mesangiospermae Sınıflandırılması.	42
4.4:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Pentapetalae Sınıflandırılması.	43
4.5:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Rosids Sınıflandırılması.	44
4.6:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Fabids Sınıflandırılması.	45
4.7:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Asterids Sınıflandırılması.	46
4.8:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Malvids Sınıflandırılması.	47
4.9:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Bakteri Domaini Sınıflandırılması Sonuçları.	48
4.10:	Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Proteabakteri Sınıflandırılması Sonuçları.	49
4.11:	Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Viridiplantae Sınıflandırılması Sonuçları.	49
4.12:	Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Embryophyta Sınıflandırılması Sonuçları.	50
4.13:	Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Magnoliopsida	51

Sınıflandırılması Sonuçları.	
4.14: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB2020) Pentapetalae Sınıflandırılması Sonuçları.	52
4.15: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB2020) Rosids Sınıflandırılması Sonuçları.	53
4.16: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB2020) Asterids Sınıflandırılması Sonuçları.	54
4.17: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB2020) Malvids Sınıflandırılması Sonuçları.	55
4.18: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB2020) Bakteri Domaini Sınıflandırılması Sonuçları.	55
4.19: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Viridiplantae Sınıflandırılması.	56
4.20: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Embryophyta Sınıflandırılması.	57
4.21: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Pentapetalae Sınıflandırılması.	58
4.22: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Rosids Sınıflandırılması.	59
4.23: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Fabids Sınıflandırılması.	59
4.24: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020)	60

Astarids Sınıflandırması.	
4.25: Karlova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020)	61
Malvids Sınıflandırması.	
4.26: Karlova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020)	61
Bacteria Sınıflandırması.	
4.27: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	62
Viridiplantae Sınıflandırması.	
4.28: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	63
Embryophyta Sınıflandırması.	
4.29: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	64
Rosids Sınıflandırması.	
4.30: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	65
Fabids Sınıflandırması.	
4.31: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	66
Asterids Sınıflandırması.	
4.32: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	66
Malvids Sınıflandırması.	
4.33: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020)	67
Bakteri Sınıflandırması.	
4.34: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020)	68
Viridiplantae Sınıflandırılması.	
4.35: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020)	69

Embryophyta Sınıflandırması.	
4.36: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020)	70
Rosids Sınıflandırması.	
4.37: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020)	71
Fabids Sınıflandırması.	
4.38: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020)	71
Malvids Sınıflandırması.	
4.39: Merkez İlçesine ait Bal örneklerinin (MEA 2020)	72
Bakteri Sınıflandırması.	
4.40: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020)	73
Embryophyta Sınıflandırması.	
4.41: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020)	74
Rosids Sınıflandırması.	
4.42: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020)	75
Fabids Sınıflandırması.	
4.43: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020)	75
Malvids Sınıflandırması.	
4.44: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020)	76
Asterids Sınıflandırması.	
4.45: Solhan İlçesine ait Bal örneklerinin (SOC 2020)	76
Bakteri Sınıflandırması.	
4.46: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020)	77

Viridiplantae Sınıflandırması.

4.47: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) 78

Rosids Sınıflandırması.

4.48: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) 79

Fabids Sınıflandırması.

4.49: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) 79

Malvids Sınıflandırması.

4.50: Yayladere İlçesine ait Bal örneklerinin (YAB 2020) 80

Bakteri Sınıflandırması.

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bal Tebliğine göre Balın Standart Değerleri	6
2.2: Bingöl İli ve İlçelerinde PİKÖM Projesi Kapsamında 2018-2020 Yıllarında Üretilen Bingöl Balına ait Ortalama (3 yıllık) Bazı Önemli Fizikokimyasal Değerler	12
3.1: DNA İzolasyonu Protokölüne Dahil Kimyasallar	35
3.2: DNA İzolasyonu Protokölüne Dahil Cihazlar	36
4.1: Bal Örneklerinden İzole Edilen eDNA'ların Miktar (ng/μl) ve Saflık (A_{260}/A_{280}) Oranları	39

1. GİRİŞ

Bal, çiçeklerde veya meyve tomurcuklarında bulunan nektarların bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından emilip toplanmasıyla arıların vücutlarında invertaz enzimi sayesinde bileşenlerinin kimyasal değişimi ve kovanlardaki peteklerde depo edilip olgunlaşması sonucu oluşan ve yüksek bir besin değerine sahip olan tatlı bir besin kaynağıdır [Ötleş, 1995]. Ballar; üretim ve pazarlama şekline, rengine ve elde edilen kaynaklara göre sınıflandırılmaktadır. Ballar, rengine göre açık su beyazından, siyah ambere kadar, kaynağına göre ise çiçek ve salgı balları olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Çiçek balları, arıların faydalandığı çiçeklere göre bu çiçeklerin isimlerini aldıkları ballardır. Salgı balları ise, arıların kaynak olarak bitkisel salgıları veya bazı böcek türlerinin salgılarını kullandıkları ballardır [Doğaroğlu, 2004].

Bal, içerik olarak yaklaşık %17 oranında bir neme sahip asidik bir besin olup, kuru içeriğinin %95'i de karbonhidratlardan oluşmaktadır. Balın içeriği, arıların kullandığı bitki kaynaklarına, iklim koşullarına, arının taksonomik sınıfına ve yaşına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği için belirli ve sınırlı bir bal içeriğinden bahsetmem mümkün olmayabilmektedir [Crane, 1975]. Bir besin kaynağı olarak bal; karbonhidratlar, enzimler, su, organik asitler, mineraller, vitaminler, proteinler, aromatik ve antioksidan maddeleri içermektedir [Bogdanov and Haldimann, 2006].

Balın içeriğindeki bir karbonhidrat çeşidi olan fruktozun yıkılmasıyla açığa çıkan “Hidroksimetilfurfural (HMF)” bileşiği, bal kalitesini değerlendirmede en önemli faktörlerden biridir. Balın elde edilmesinden sonra bir ısıtma işlemi uygulanmasıyla fruktoz parçalanarak, baldaki HMF miktarının arttığı gözlemlenmektedir. Bu bağlamda, HMF miktarının çok olduğu bir balın kalitesinin düşük olduğu belirtilmektedir [Tosi et al., 2002].

Bal insanlığın en ilkel çağlarından, mağara döneminden beri on binlerce yıl öncesinden bilinen bir besin kaynağıdır. Bu bağlamda, Fransa, İspanya, Mısır ve Türkiye gibi birçok ülkede ortaya çıkan; mağara resimleri, hiyeroglifler, arı ve arıcılığa ait arı fosilleri, arıcılığa ait levha yazıları gibi arkeolojik bulgular, balın ilkel çağlardan beri

bilindiğini kanıtlamaktadır. İlkel çağdan beri insanlar, tarihsel bir süreç çerçevesinde, ağaç kütükleri, kayalıkların aralıkları gibi yerlerde toprak veya kilden yaptıkları sepetleri kovan olarak kullanıp bal üretimi gerçekleştirmişlerdir. Eski dönemlerde arıcılık ise, arılara zarar verilmeden balları besin kaynağı olarak kullanmaya dayanmakta olup, arıcılık ile ilgili bulgular çerçevesinde, bal arılarının genetik kökenlerinin Orta Doğu olduğuna dair bir çok delil ortaya çıkmıştır [Akaya, 2004].

Bal, günümüzde de çok tüketilen ve üretilen bir besin kaynağıdır. Yapılan araştırmalara göre, modern ülkelerdeki bal üretimi ülkemize göre daha fazla olsa da ülkemizde de son yıllarda arıcılık ve bal üretimi gelişme göstermektedir. Türkiye, bal üretimi için gerekli olan uygun mevsim koşullarına, topografik yapıya ve zengin bir bitki örtüsü ve floraya sahip olması sayesinde, bal üretiminde dünyada dördüncü sırada yer almaktadır. Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Bingöl ili ve yöresi ise bu kapsamda; coğrafi yapısı, zengin bitki örtüsü ve uygun iklim koşullarıyla ülkemizde en verimli ve kaliteli balların üretildiği arıcılık için oldukça elverişli bir bölgedir [Şişek vd., 2007].

Son zamanlarda bal ile ilgili yapılan çalışmalarda; balların coğrafi kökenleri belirlemek, çiçek kompozisyonlarını incelemek, polen/bal tanımlamalarını yapabilmek, ayrıca varsa patojenleri saptamak amacıyla kullanılan metagenomik yöntemlerin önemi vurgulanmaktadır. Metabarkodlama, çevresel DNA (eDNA) analizleri, metagenomik sekanslama ve shotgun gibi uygulamalar bal çalışmaları kapsamında olup, ilgili çalışmaya göre değişkenlik göstermektedir [Liu et al., 2022].

Çevresel genomik veya eDNA'nın dizilenmesi olarak da ifade edilen metagenomik kavramı, özellikle kültürlenemeyen türlerin doğal habitatlarından doğrudan DNA'larının elde edilmesini ve sekans teknikleri ile analiz edilmesini kapsamaktadır. Metagenomik yöntemler, DNA'nın parçalanması veya 16S / 18S rDNA genlerinin amplifiye edilmesiyle sekanslanmasını içermektedir. Bu bağlamda, metagenomik yöntemlerin yeni nesil dizilme teknolojileriyle entegrasyonu, türlerin filogenetik sınıflandırılması ve fonksiyonel çeşitlilikleri gibi birçok incelemelerin yürütülmesini sağlamasının yanı sıra, metagenomik DNA moleküllerinin uygun maliyet ve yüksek bir verimlilikle dizilenmesini kolaylaştırmaktadır [Karen, 2007].

eDNA analizi, ekolojik araştırmalar çerçevesinde çevresel inceleme ve örnekleme stratejisine dayanmakta [Taberlet et al., 2012] ve bal çeşitlerinin örnekleme, belirlenmesi, zamana coğrafi bölgelere göre dağılımlarının incelenmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, bal içeriğindeki tespit edilmesi zor patojenleri saptamak ve incelemek için de kullanılan bir yöntemdir [Taberlet et al., 2012]. Ek olarak, ekogenomik olarak da ifade edilen shotgun metagenomik dizileme, herhangi bir PCR uygulaması olmadan eDNA örneklerinin doğrudan bir şekilde sekanslanmasına dayanan bir dizileme yöntemidir. Shotgun dizileme, farklı alemler veya filumlara dair, yani geniş kapsamlı bir taksonomik sınıflandırma sayesinde, barkodlama yöntemleriyle karakterize edilmesi zor olan çevresel örneklerin veya türlerin analizini kolaylaştırmaktadır [Tringe and Rubin, 2005].

eDNA ve shotgun metagenomik analizleri; çalışmaların amacına, kullanılan organizmalara, örneklerin toplanma yöntemlerine, DNA izolasyonuna ve metagenomik analizlere göre değişkenlik gösterebilmektedir. eDNA analizinin kullanılması ve yaygınlaştırılması, son zamanlarda arıcılık ve bal sektöründe çeşitli hedefler doğrultusunda önerilmektedir [Wilcox et al., 2013; Bovo et al., 2018].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu çalışmada, öncelikle Bingöl ilinin farklı lokasyonlarından toplanmış çiçek bal örneklerinden izole edilen eDNA'ların metagenomik analiz yöntemleri kullanılarak, bal örneklerinin botanik kökenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda “En Düşük Ortak Ata” yaklaşımı kullanılarak toplanan bal örneklerinin taksonomik sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, üreticilerin tercih edebilecekleri nektarlı bitki gruplarının bilinerek daha bilinçli bir üretim yapılması ve bölgesel kalkınmaya katkı sağlanması da hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Balın Botanik Kökeni

Balın coğrafi ve botanik kökeninin incelenmesinde belirli kriterlere göre uygun yöntemler kullanılmaktadır. Balın içeriğinde bulunan HMF (5-Hidroksimetilfurfural), nem, enzim aktiviteleri, kalıntılar vs gibi parametrelerden ziyade genellikle botanik köken hakkında flavanoid modeller, polen analizleri ve aroma bileşikler gibi özel parametreler bilgi vermektedir. Ek olarak, balın kalitesinin ve coğrafi kökeninin belirlenmesi için yapılan birçok araştırmada; pH, asitlik, diastaz enzim aktivitesi, prolin içeriği, amino asitler, polen yapısı, şeker içeriği, mineraller, aromalı uçucu içerikleri ve fenollerin içeriği gibi çeşitli etkenler incelenmektedir [Wang and Li, 2011].

Balın botanik kökeninin tespitinde, çeşitli kimyasal ve fiziksel analizler yapılarak, bal çeşitleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre kolayca ayırt edilse de en önemli parametre monofloral (tek çiçekli) balları polifloral (çok çiçekli) bal gruplarından ayırabilmektir. Balın botanik kökenine göre ballar, tek veya birden fazla çiçek türünü içermesiyle monofloral (tek çiçek türü) ve multifloral veya polifloral (birden fazla çiçek türü) olarak adlandırılmaktadır. Bu bağlamda, balın botanik kökeni, bal örneğinin analiz edilen fiziksel ve kimyasal özelliklerinin monofloral veya polifloral karakteristik özellikleri ile karşılaştırılması yoluyla belirlenebilmektedir [Ruoff et al., 2007].

Bir balın botanik ve coğrafi kökeninin tespit edilmesinde içeriğindeki aminoasitlerin çeşitleri ve konsantrasyonları arasındaki oranlar belirleyici bir faktör olmaktadır. Bu bağlamda, aspartik asit veya prolinin, amidlere veya fenilalanine oranı ve farklı aminoasit paternlerinin sınıflandırılması balın botanik kökeninin belirlenmesinde önemli olabilmektedir. Aminoasit paternleri üzerinde yapılan çalışmalarda; arginin, triptofan ve sistin aminoasit çeşitlerinin balda mevcut olması, bazı çiçek balı türleri için bu içerikler açısından karakteristik olduğu ortaya çıkmıştır. Bazı çalışmalarda ise, genel aminoasit profilinin sadece spesifik türleri belirlemede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak;

aminoasitlerin içerik oranları çeşitli tekniklerle botanik köken tespitinde kullanılabilmektedir [Anklam, 1998].

Balın botanik kökeni için kullanılan bir diğer faktör, uçucu ve aromatik bileşenlerin yapısı ve içeriğidir. Spesifik teknikler ile balın koku ve tat değişimlerine göre çiçek kökenli olup olmadığı tespit edilebilmektedir. Balın içeriğindeki aroma bileşenleri, izolasyon tekniklerine bağlı olmasının yanı sıra botanik kökene de bağlıdır. Bu bağlamda, balda bulunan uçucu maddeler ve aromatik bileşenler spesifik analiz yöntemleri aracılığıyla balın botanik köken tespitinde kullanılabilse de kesin sonuçlar için aromatik bileşen analizleri diğer bileşenleri belirleyen yöntemlerle entegre olmalıdır [Wang and Li, 2011].

Balın botanik köken tespitinde, oligosakkarit ve flavonoid profil analizleri de kullanılmaktadır. Bitkilerdeki fenolik yapıda pigmentleri oluşturan flavonoidler, bitki kaynaklarında fazla bulunmakta olup, kendilerine özgü karakteristik özelliklere sahiptirler. Polende, propoliste ve bal içeriğinde flavonoidlere rastlamak mümkün olabilmektedir. Flavonoidler, HPLC veya CE teknikleriyle analiz edilebilmektedirler [Campos et al., 1990].

Ek olarak, balda bulunan polenlerin ve mineral veya eser elementlerin analizleri de balın botanik kökeni hakkında bilgi verebilmektedir. Polen analizi, mikroskopik inceleme teknikleri ile gerçekleştirilir ve özellikle bir balın tek çiçekli veya çok çiçekli olarak tanımlanmasında önemli bir analizdir. Bu bağlamda, bir balın tek çiçekli olarak tanımlanabilmesi için toplam polen içeriğinin en az % 45 olması gerekmektedir. Polen analizi, çiçeklerin tanımlanması ve balın botanik kökeninin tespit edilmesi için kullanılabilmektedir [Crane, 1975].

2.2. Balın İçeriği ve Kalitesi

Bal, içerdiği maddeler sebebiyle karmaşık bir kompozisyona sahip olmakla birlikte çevresel koşullara ve elde edilme zamanına göre de farklı içeriklere sahip olabilmektedir. Balın içeriğindeki en belirgin özellik, tatlı olmasını sağlayan glikoz, sakkaroz ve fruktoz olmak üzere üç temel şeker grubunu içermesidir. Fruktoz miktarı, genelde balın içeriğinde

en çok bulunan şeker türüdür. Şeker içeriğinin yanı sıra, yaklaşık %2 oranında su içeriğine ve %7 oranında da demir, sodyum, fosfor, albumin, nitrojen, proteinler ve asitler gibi temel yapıtaşları ve minerallere sahiptir. Bunlara ek olarak, bazı araştırmalar sonucunda, bitki kaynaklı ya da arının hormonal bezlerindeki salgı kaynaklı, balın içeriğinde diastaz, invertaz, katalaz gibi birçok enzimin de bulunduğu gözlemlenmiştir (Hoyt, 1965). Bir balın standart içerikleri Tablo 2.1’de gösterilmektedir [Anonim, 2012].

Tablo 2.1: Bal Tebliğine göre Balın Standart Değerleri.

Özellik(100 gr bal)	Çiçek balı	Salgı balı	Karışım balı
Su (en fazla)	20	20	20
Sakaroz (en fazla)	5-10	5-10	5-10
Fruktoz+glukoz(en az)	60	45	45
Suda çözünmeyen madde (en fazla)	0.1	0.1	0.1
Serbest asitlik (en fazla, meq/kg)	50	50	50
Diastaz (en az)	8	8	8
HMF(en fazla, ppm)	40	40	40
Prolin(en az, ppm)	300	300	300

Balın kalitesinin ve özelliklerinin belirlenmesinde önemli olan parametreler aşağıda özetlenmiştir:

- Şeker oranı: Balda en çok bulunan ve önemli bir bileşen olan şekerler, balın elde edildiği bitkisel veya salgısal kaynaklara göre değişmektedir. Balın çiçek veya salgı balı olduğunu ayırt etmek için balda bulunan bazı disakkarit ve trisakkarit şeker çeşitleri incelenmektedir. Bu bağlamda, bazı ballar üreticiler tarafından, çiçeklerin fazla olmadığı alanlarda kovanların çevresine ek kaynak olarak şerbet gibi tatlı maddelerin konulmasıyla üretilmekte olup, bu ballar doğal içeriğini yitirmekte ve içerdikleri sakkaroz miktarı da fazla olmaktadır [Bogdanov et al., 2002].

- Protein içeriği: Yaklaşık %5 protein içeriğine sahip olan baldaki proteinler, balın floral kaynağının bir kimyasal parametresi olarak belirtilmektedir. Bu, bal arısının proteinlerinin ve aminoasitlerinin hemen hemen bütün bal çeşitlerinde aynı olabilmesinden kaynaklanmaktadır. Balın içeriğinde; lizin, histidin, aspartik asit, serin ve prolin gibi birçok çeşit aminoasit bulunmasının yanı sıra, prolin analizlerde ve bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan aminoasit içeriğidir. Prolin, balın türüne ve çeşitliliğine göre farklılık gösterse de balın içeriğinde fazla bulunmaktadır ve kalite değeri, balın olgunlul düzeyi gibi kriterlerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [Bogdanov et al., 2002].
- Enzim içeriği: Bal, birçok enzim içeriğine sahip olmasının yanı sıra, temel olarak invertaz, glukoz oksidaz ve diastaz enzimlerini içermektedir. Balın asit üretimi ve antibiyotik etkisinin oluşmasını sağlayan glukoz oksidaz enzimiye, arıların topladıkları nektarın bala kimyasal olarak dönüşmesini sağlayan enzim de invertaz olarak belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, baldaki nişastanın parçalanması ve vizkozitenin azalmasından sorumlu amilaz enziminin aktivitesi, diastaz ile ölçülebilmektedir [Babacan ve Rand, 2002;2005]. Balın enzim içeriğindeki azalma, bala uygulanan ısıtma ve depolama aşamalarının uygun bir şekilde gerçekleştirilmediğinin bir göstergesidir [Huidobro et al., 1995].
- Asit içeriği: Bal içeriği sebebiyle asidik bir besin kaynağıdır ve bu asitlik balın içerisinde mikroorganizmaların üremesini ve gelişmesini engelleyen bir özelliktir. Eğer bir balda, yüksek asit içeriği gözlemlenirse, bu durum balda fermentasyon gerçekleştiğini ve fermentasyon sonucu oluşan alkolün asetik asite dönüşmesiyle açıklanmaktadır [Erdoğan, 2008].
- Hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği: Balın içeriğinde bulunan karbonhidratların ısıtma işlemi sonucu oluşan HMF; yüksek ısı ve yüksek asidite sonucu miktarca daha da artmaktadır. HMF sadece yüksek sıcaklıklarda değil, düşük sıcaklıklarda da maillard reaksiyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda HMF, balın kalitesini ve tazeliğini belirleyen önemli bir indikatördür [Gökmen, 2007].
- Nem içeriği: Balın olgunlaştığını ve hasat edilmesini gösteren önemli bir kriter olan nem oranı, belirli bir nem oranına ulaşıldığında balın hasat edilmesi gerektiğini

göstermektedir. Hasat edilen balın, depolama koşulları da nem oranı açısından yaklaşık % 60 olarak uygun kapalı bir ortamda olmalıdır [Doğaroğlu, 2004]. Balın nem oranını etkileyen su içeriği, çeşitli koşullara (iklimsel faktörler vs.) göre değişkenlik gösterebilmektedir [Finola et al., 2007].

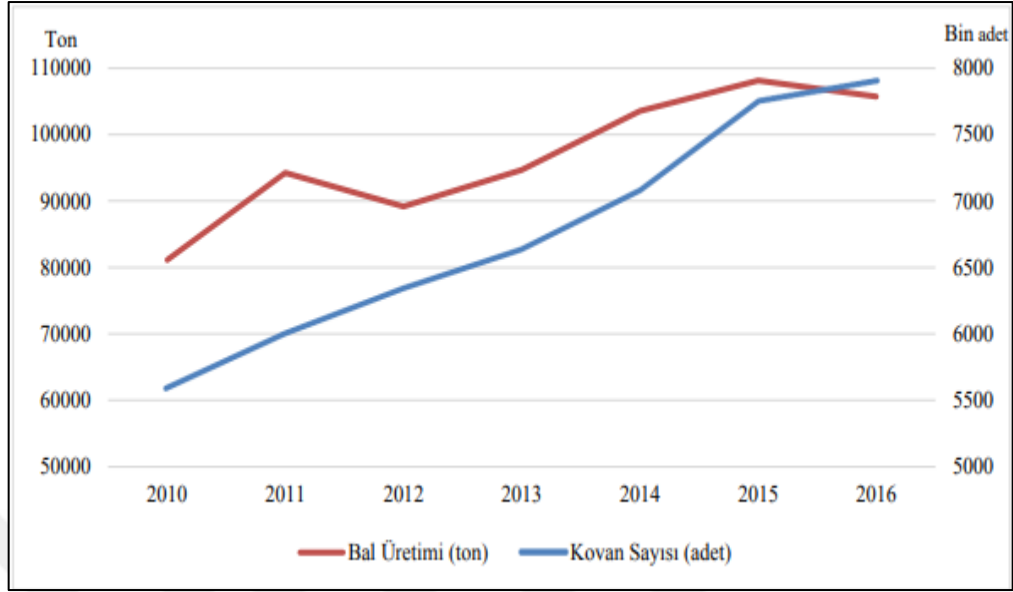
- Antioksidan içeriği: Vücutta substrat maddenin her türlü madde ile reaksiyonu sonucu oksitlenmeye büyük ölçüde engel olan veya oksitlenmeyi geciktiren ve böylece vücuttaki toksik etkiyi ortadan kaldıran maddeler olarak tanımlanan antioksidanlar, balın içeriğinde daha çok bitki kaynaklı olup oksijen yoğunluğu fazla olan polifenoller olarak fazla miktarda bulunmaktadır [Young and Woodside, 2001].

2.3. Türkiye’de Bal Üretimi

Bal ve diğer arı ürünleri sağlıklı insan gelişimi açısından önem arz etmektedir. Balın antimikrobiyal, antioksidan ve terapatik olarak kullanımı mevcuttur. Türkiye bal üretimi konusunda coğrafi konumu ve iklimsel koşulları nedeniyle avantajlı bir durumdadır. Arıların nektar kaynağı olarak kullandığı; köknar, çam, ıhlamur, akça ağaç ve kestane gibi bitki türleri açısından zengin bir ekosisteme sahiptir. Türkiye’de yılın 3 mevisimi bal üretimi gerçekleştirilebilir. Türkiye dünya genelindeki yıllık bal üretiminin %6,9’luk payına sahiptir ve 104 bin ton üretimle 2. sıradadır. Bunun dışında kovan miktarına bakıldığında Türkiye, dünya genelindeki ilk üç ülke içerisinde yer alarak dünya genelindeki kovanların %8,5’lik oranını içerir [Burucu ve Bal, 2017]. Bingöl ilinde yapılan istatistiksel çalışmalara göre 1991-2013 yılları arasında Bingöl’de bulunan kovan sayısı %207,2 oranında ve toplam bal üretiminin %56,2 oranında arttığı görülmüştür. Buna karşılık 2011-2013 yılları arasında ise kovan sayısında %150,0 oranda artış olmasına rağmen bal üretiminin %13,3 azaldığı görülmüştür. Yapılan analizlere göre Bingöl ilinin arıcılık için uygun floraya sahip olduğu ancak arıcılık faaliyetlerinin ticari olarak arttırılması, modern tekniklerin uygulanmaya başlanması ve yetiştiricinin bilinçlendirilmesi gerektiği bulunmuştur [Karakaya ve Kızıloğlu, 2015]. Bal içerik olarak %98-95 oranında karbonhidratlardan (fruktoz ve glikoz) oluşur ancak %5-2’lik kısmı sekonder metabolitler ve minerallerden oluşur. Balın kalitesi ölçülürken içerisindeki

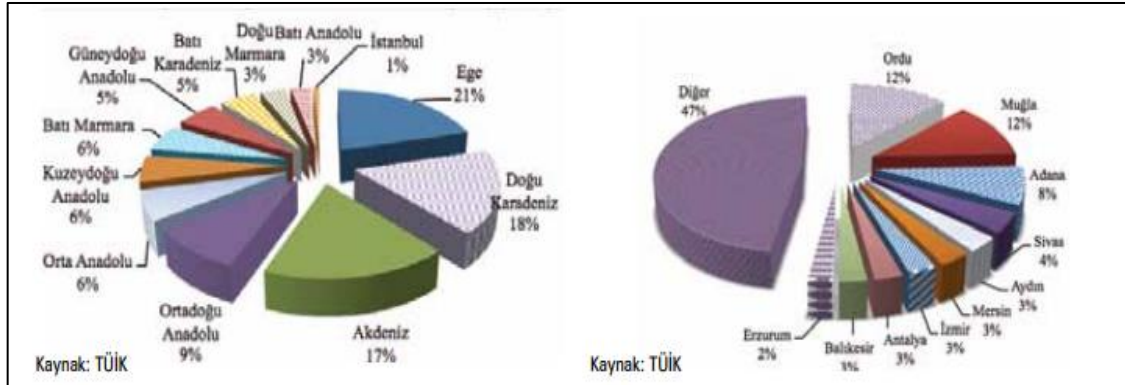
biyoaktif materyallerin kompozisyonuna bakılır ve bu biyoaktif materyaller balın üretildiği coğrafi konum ile floraya göre değişim gösterir. Yapılan araştırmalarda balın antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin fenolik içeriği (fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler ve prosiyanidinler) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Türkiye coğrafi yapısı nedeniyle birçok farklı flora ekosistemine sahiptir. Bu nedenle çok çeşitli içeriklere sahip balların üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Buna bağlı olarak Türkiye'nin farklı illerinden farklı nektar kaynakları ile üretilen ballar karşılaştırıldığında antioksidan seviyesi, pigmentasyon seviyesi ve fenolik içerik gibi fizikokimyasal parametreler açısından çeşitlilik gözlemlenmiştir [Can et al., 015]. Yapılan araştırmalarda 32 farklı bal örneğinin içeriği UPLC-ESI-MS/MS analizi kullanılarak incelendiğinde yaygın olarak; Ferulik, homojentisik, jentisik, siringik, 3,4-dihidroksibenzoik, kafeik, vanillik, *p*-koumarik, 4-hidroksi benzoik, ve trans-2-hidroksi sinamik asitler gözlemlenmiştir [Kıvrak ve Kıvrak 2017]. Balın reolojik özellikleri de üretimi ve depolanması açısından önem arz etmektedir. Balın viskozitesi ürün kalitesini önemli ölçüde etkiler. Balın viskozitesi; sıcaklık, nem ve kolloidal oluşumlar tarafından etkilenir. Türkiye'de üretilen bal örnekleri nem oranı göz önünde bulundurularak incelendiğinde Newtonian akış modeli gösterdikleri gözlemlenmiştir [Kayacier ve Karaman, 2008].

Arıcılık faaliyetleri ve bal üretiminde sahip olduğu elverişli iklim şartları, coğrafi özellikler ve bitki örtüsü çeşitliliği ve özellikle dünyada bulunan tatlı bitki türlerinin %75'ine sahip olması ile Türkiye, bal üretiminde önemli bir pozisyona sahiptir [Sıralı, 2010]. Şekil 2.1'de 2016 yılında Türkiye'nin mevcut kovan sayısı (yaklaşık 7.9 milyon) ve bal üretimi gösterilmektedir [Burucu ve Bal, 2017; TÜİK, 2017].



Şekil 2.1: Türkiye Kovan Sayısı ve Bal Üretimi.

Türkiye’de bölgelere ve illere göre bal üretimi Şekil 2.2’de gösterilmektedir [TÜİK, 2017].



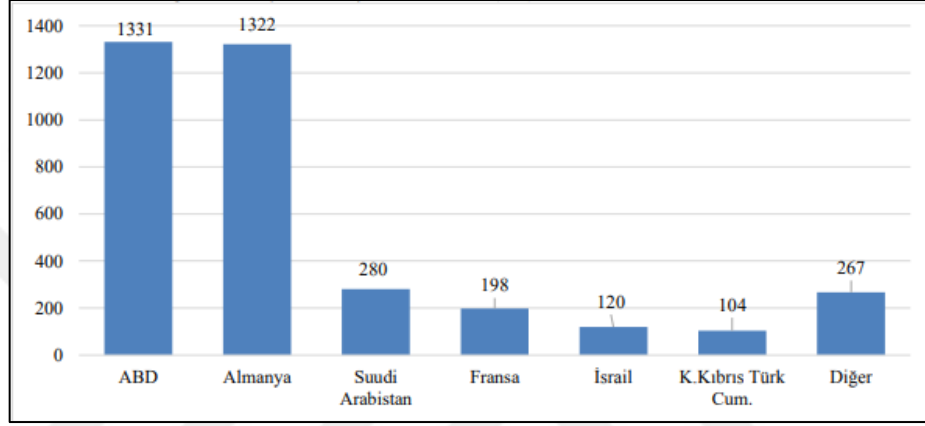
Şekil 2.2: Türkiye’de Bölgelere ve İllere Göre Bal Üretimi.

2.3.1. Türkiye’de Bal İthalatı ve İhracatı

Türkiye’de üretilen balın yaklaşık olarak %98’i yurt içinde tüketilip, geriye kalan %2’lik kısmı ise yurt dışına satılmaktadır [Engindeniz et al., 2015].

Ülkelere göre 2016 yılı Türkiye bal ihracatı Şekil 2.3’de gösterilmektedir. Türkiye, bal ticaretinde ihracatçı ülkeler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda; 2015 yılı bal

ihracatı verileri incelendiğinde, 7192 ton ile en yüksek düzeye çıkan bal ihracatının 2016 yılında yarı yarıya azaldığı görülmektedir. Bu azalmanın temel sebebi, bal ithalatında Türkiye’den önde gelen ABD’nin 2016 yılı bal ithalatını yarı yarıya oranda azaltması olarak ifade edilebilir [Burucu ve Bal, 2017]. Şekil 2.3’te ülkelere göre 2016 yılı Türkiye bal ihracatı gösterilmektedir [TÜİK, 2017].



Şekil 2.3: Ü ülkelere göre 2016 yılı Türkiye bal ihracatı (ton).

Türkiye, bal ticaretinde ihracatçı bir ülke konumunda olsa da üretilen balın sadece %1,5’ini ihraç etmektedir. Türkiye’nin üretilen balın ihracatının bu kadar az olmasının sebebi; bal kalitesinin dış pazarın talebini karşılayacak bir kalitede olmaması, etkili bir reklamın olmaması, üretilen balın pazara etkili bir şekilde sunulamaması ve gelir düzeyinin artmasıyla ortaya çıkan ülke içi tüketim ihtiyacı olabilmektedir [Kan, 2013]. Türkiye’nin bal ticareti verileri değerlendirildiğinde, bal ithalatının oldukça az olduğu belirtilmektedir.

2.4. Bingöl Balı ve Üretimi

Dünyada ve ülkemizde geçmişten günümüze kadar süregelen arıcılık uygulamaları kapsamında, birçok bilimsel araştırma yapılmaktadır ve bu çalışmalar arıcılık faaliyetleri sahip olduğu coğrafi konum ve bitki florası açısından Bingöl ilinde de yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Bingöl ilinin İran-Turan bölgesi kapsamında yer alması, bitki florası ve çeşitliliği açısından bal üretimi için uygun koşullar sağlamaktadır [Kan, 2013]. Bingöl Üniversitesi, Pilot Üniversite Koordinasyon Merkez Birimi tarafından yürütülen PİKOM-

Ar1.2019.003 Numaralı projemiz ile Bingöl balının fizikokimyasal içeriği ortaya çıkartılmış ve Tablo 2.2’de sunulmuştur. Parantez içindeki değerler Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2020/7)’ye göre istenen en fazla ve en az değerleri kapsamaktadır.

Tablo 2.2. Bingöl İli ve İlçelerinde PİKOM Projesi Kapsamında 2018-2020 Yıllarında Üretilen Bingöl Balına ait Ortalama (3 Yıllık) Bazı Önemli Fizikokimyasal Değerler.

Parametreler (TGK’ye göre*)	Değerler
Nem (En fazla %20)	15,7
<u>Sakkaroz (En fazla 5 g/100g)</u>	-
Fruktoz+Glukoz (En az 69g/100g)	70,4
F/G (0,9-1,4 Arası)	1,3
Maltoz (En fazla 4g/100g)	2,0
<u>Prolin miktarı (En az 300mg/kg)</u>	700,9
<u>Diastaz Sayısı (En az 8)</u>	24,5
Hidroksimetil Furfural (En fazla 40mg/kg)	3,73
Bal δ^{13} değeri (-23 ve daha negatif)	-26,3
Balda protein ve ham bal delta C13 değerleri arasındaki fark (-1 veya daha pozitif)	-0,02
Balda protein ve bal δ^{13} C değerlerinden hesaplanan C4 şekerleri oranı (En fazla %7)	0,14

Bingöl’de arıcılık faaliyetleri ve bal üretimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Dağların yükseltisi, yağış oranı, nem oranı ve su kaynakları, iklim koşulları bitki çeşitliliğini ve dolayısıyla bal üretimini etkileyen faktörlerdendir. Bölgedeki en önemli dağlar, Bingöl, Şerafettin, Şeytan ve Karagöl Dağları’dır ve bazı dağların yükseltisi 2900 metreyi geçmektedir. Bal üretiminde kullanılan alanlar kapsamında yükseltinin 780-2950 metre arasında değişkenlik göstermesi (Şekil 2.4) ve topografik açıdan farklılıklar görülmesi; sıcaklık koşullarını, bitki florasını, bitki çeşitliliğini, çiçeklenme dönemlerini ve süreçlerini değiştirerek bal üretimini olumlu olarak etkilemektedir [Kan, 2013]. Örneğin; yüksekliğin artmasıyla sıcaklığın azalması arıcılık uygulamaları ve bal üretimini alan ve süreç bazında sınırlandırıp olumsuz bir etkiye sebep olabilmektedir. Bölgenin iklim koşulları değerlendirildiğinde, vejetasyon,

karşılayıp, aynı zamanda arıların yararlandığı bitkisel kaynakların gelişimini ve çeşitliliğini de arttırmaktadır [Günek, 2006].

Bingöl'de bal üretimi, bal verimliliği için gerekli, yörenin iklim ve topografik koşullarına daha kolay adapte olabilmesi açısından uygun bir arı ırkı olan Kafkas ırkı (*A.m.caucasica*) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu arı ırkının kullanımı; kışın bölgedeki soğuk hava koşullarına dayanıklı olması, yaz mevsiminde diğer ırklara kıyasla daha yüksek bir bal verimi sağlaması, bitki kaynaklarının derinliklerinde bile nektarlara ulaşabilmesi ve üreme koşullarının ve veriminin yüksek olması gibi avantajlara sahip olmasından kaynaklanmaktadır [Kan, 2013].

Türkiye'de bal üretiminde Bingöl ilinin katkısı değerlendirildiğinde; ülke genelindeki toplam kovan sayısının ve bal üretiminin % 1,5'inin Bingöl ilinden sağlandığı belirtilmektedir. Bu bağlamda, Bingöl ili ve çevresi de dahil olmak üzere bal üretiminin geçmişten günümüze bir artış gösterdiği ve bölgede arıcılık faaliyetlerinin geliştiği, bir geçim kaynağı olduğu sonucuna varılmaktadır [Bingöl Arıcılık Raporu, 2011]. Bingöl ilinde yıllar içerisindeki kovan sayısı ve bal üretimindeki değişimler Şekil 2.2'de gösterilmektedir [Kan, 2013].



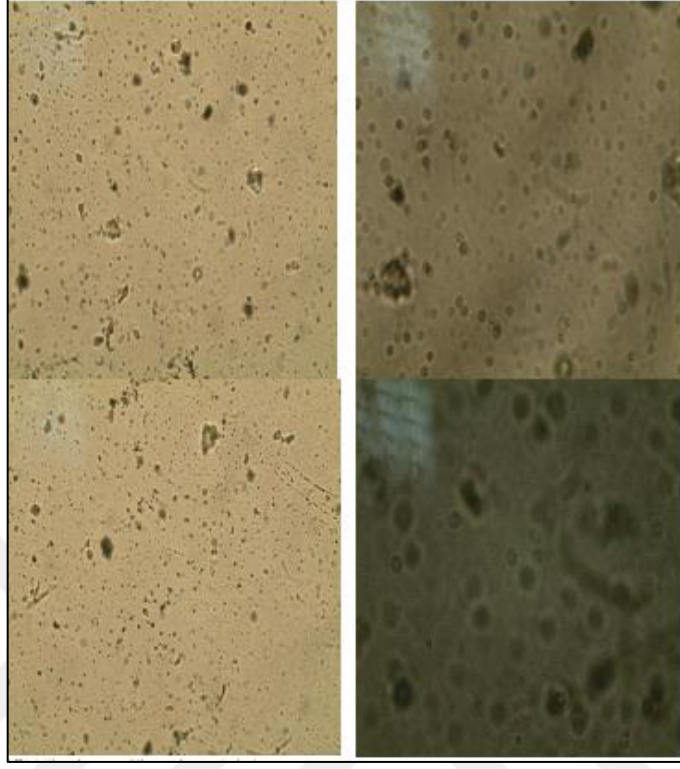
Şekil 2.5: Bingöl İli Kovan Sayısı ve Bal Üretimindeki Gelişmeler.

Şekil 2.5'te görüldüğü üzere, bal üretiminde zaman zaman görülen dalgalanmalar; bitki çeşitliliğine, iklim koşullarına ve arı hastalıklarına bağlı değişimlerin yanı sıra devlet desteğinin etkileriyle de açıklanabilmektedir. Örneğin; 2007 yılı bal üretimi

incelendiğinde, kovan sayısı ve bal üretiminin artmasında bir önceki yıl yapılan devlet destekleri etkili olmuştur. Sonrasında 2008 yılındaki azalmalar, devlet desteğinden güç alarak arıcılık faaliyetlerine yönelen insanların bir süre sonra arıcılığı yürütememeleri ve bırakmaları sonucunda gözlemlenmiştir. 2009 yılında bal üretiminde gözlemlenen azalmada ise, kuraklığa bağlı olarak arı hastalıklarının artması ve dolayısıyla arı ölümlerinin artması etkili olmuştur. Bu bağlamda, Bingöl ilinde belirli zamanlarda yaşanan bu dalgalanmalara rağmen, kovan sayısı ve bal üretiminde günden güne bir gelişme ve artış gözlemlenmektedir [Bingöl Arıcılık Raporu, 2011]. Bu gelişmelerde ve artışlardaki en önemli etkenler; Bingöl ilinin konumunun, doğal şartlarının ve üretim değerlerinin arıcılık faaliyetleri ve bal üretimi için uygun ve elverişli olmasıdır. İran-Turan flora bölgesinde yer alması, Bingöl ilinin bitki florasında ve bitkilerin çiçeklenme süreçlerinde çeşitlilik sağladığı için, ülkemizde bal üretiminde önemli bir potansiyele sahiptir [Avcı, 1993].

Ülkemizde yapılan çalışmalara ve elde edilen verilere göre, Türkiye koloni, kovan sayısı ve toplam bal üretimi açısından arıcılık faaliyetlerinde ön plana çıkan ülkeler arasında yer almaktadır. Bu hususta, 2012 yılı verilerine göre; Bingöl’de 94.952 arı kolonisinin bulunduğu ve toplam 1800 ton bal üretimi gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır [Anonim, 2011]. Buna göre, Bingöl ilinin arıcılık faaliyetleri ile koloni açısından % 1,58, bal üretimi açısından ise % 1,9 bir katkısının olduğu gözlemlenmiştir. Ortalama bal verimi açısından ise, Bingöl ilinin, Türkiye toplam verimliliğinden %20,25 daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır [Bakoğlu vd., 2014].

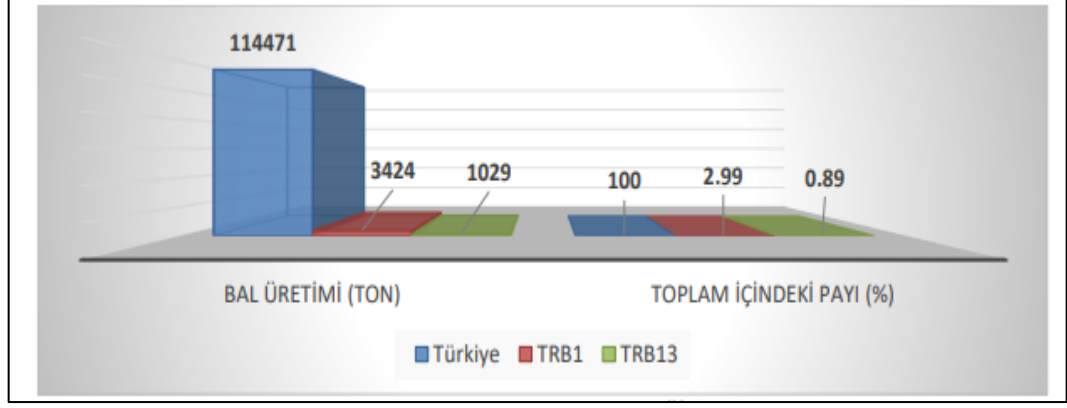
Bingöl’deki arıcılık faaliyetlerine ve bal üretimine yönelik, ilin belirli ilçelerinde yapılan bir çalışmada; Bingöl’ün Karlıova ilçesinin Kalencik bölgesindeki polenler üzerine incelemeler yapılmış olup, en yüksek kekik poleni elde edilmiştir. Kekik bitkisi haricinde, geven, çarık dikenli, ekinezya ve balıcağ bitkilerinin de polenleri elde edilmiştir. Adaklı ilçesinde ise en yüksek geven bitkisinin polenleri elde edilmiştir. Şekil 2.6’da elde edilen bazı polenlerin mikroskopik görüntüsü gösterilmektedir [Bakoğlu vd., 2014].



Şekil 2.6: Polenlerin Mikroskopik Görüntüleri.

Çalışmadan elde edilen verilere göre; Bingöl ilinin bal üretiminde verimli olduğu, özellikle ilin doğu kısmında yer alan bölgelerde geven bitki türünün hakim olduğu ve bu bitki türünün polenlerinin fazla miktarda Bingöl balında bulunduğu sonucuna varılmıştır [Bakoğlu vd., 2014].

Yapılan başka bir çalışmada ise, TRB1 Bölgesi olarak Bingöl, Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinin ve TRB13 olarak sadece Bingöl ilinin bal üretimindeki katkısı incelenmiştir. Şekil 2.7’de Türkiye, TRB1 ve Bingöl iline ait bal üretimi gösterilmektedir [Söğüt vd., 2019].



Şekil 2.7: Türkiye, TRB1 Bölgesi ve Bingöl İline ait Bal Üretimi.

Çalışmaya göre; TRB1 Bölgesinin bal üretiminde Türkiye’de bal üretiminin ortalama %3’ünü, Bingöl ilinin ise % 0,8’ini oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bingöl ilinin TRB1 Bölgesi kapsamında bal üretimine katkısı ise %30 olarak belirtilmiştir. Bu bağlamda, Bingöl ilinde arıcılık faaliyetlerinin geçim kaynağı olarak benimsendiği ve arıcılık faaliyet süreçlerinin diğer çalışmalara ve geçim kaynaklarına kıyasla daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır [Söğüt vd., 2019].

2.5. Dünyada Bal Üretimi

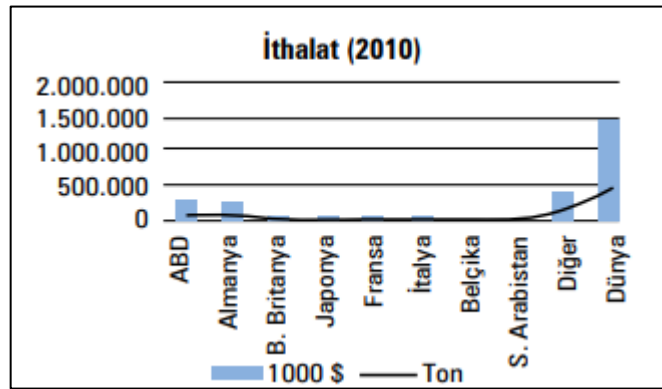
Geçmişten günümüze arıcılık faaliyetleri ve bal üretimi dünya genelinde yaygın olarak gerçekleştirilen faaliyetlerden birisi olmuştur. Dünyada mevcut koloni sayısının 2005’ten 2010 yılına kadarki beş yıllık süreçte bile % 6 oranında arttığı gözlemlenmiştir. 2010 yılı FAO verileri değerlendirildiğinde; dünyada mevcut arı koloni sayısının % 13,66’sının Hindistan’a, % 11,31’inin Çin’e, % 7,22’sinin Türkiye’ye ve % 6,61’inin Etiyopya’ya ait olduğu görülmektedir. Bu oranlar zamanla daha da yükselerek, dünyada arıcılık faaliyetlerinin ve bal üretiminin de zaman itibarıyla geliştiğinin ve arttığının bir göstergesi olmaktadır [Sancak vd., 2013].

Dünya genelinde bal üretimi yine 2005’ten 2010 yılına kadarki beş yıllık süreç kapsamında % 9 oranında bir artış göstermiştir. 2010 yılı FAO verileri kapsamında, dünya geneli bal üretiminde, % 25,84’lük en yüksek oranla Çin öne çıkarken, ardından % 5,27’lik oranla Türkiye ve % 5,18’lik oranla ABD gelmektedir [Sancak vd., 2013].

2010 yılından bu yana, dünya geneli kovan sayısının ve dolayısıyla arı kolonilerinin sayısının artış göstererek 62 milyon gibi bir veriye ulaştığı tahmin edilmektedir. Ülkeler bazında en yüksek kovan ve koloni sayısına sahip ülke Çin olurken, peşinden 5.339.224 adet koloni sayısı ile Türkiye gelmektedir. Bal üretim miktarları değerlendirildiğinde, dünyada üretilen balın dörtte birinin ticaret kapsamına dahil olduğu görülmektedir. Üretilen bal miktarlarından elde edilen verilere göre, Çin yine birinci sırada yer alırken, peşinden gelen ülkelerin Türkiye, ABD ve Ukrayna olduğu belirtilmektedir. Dünya geneli bal ticareti incelendiğinde ise, ihracatta Arjantin, ithalatta da Almanya ilk sırada yer alırken, Türkiye'nin bu bal ticaretinde ve dış pazardaki payının çok az olduğu görülmektedir [Soysal, 2007].

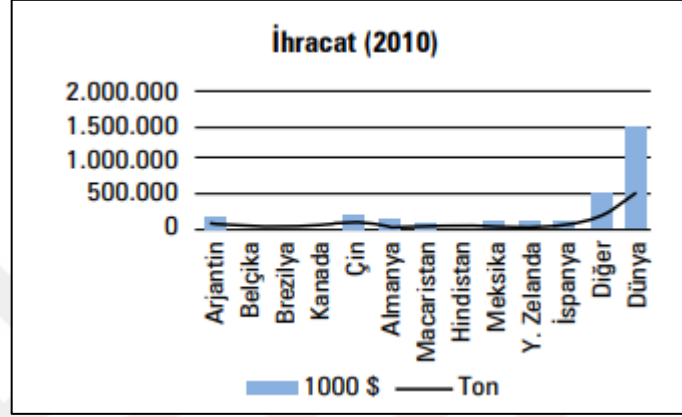
2.5.1. Dünyada Bal İthalatı ve İhracatı

Dünyadaki bal ithalatı geçmişten günümüze kadar süregelen bir artış göstermektedir. 2005'ten 2010 yılına kadarki süreçte ithalatta % 17 oranında bir artış gözlenlenmiş olup; 2010 yılı dünya bal ithalatında % 20'lik oranla ABD, % 19'luk oranla Almanya, % 7'lik oranla B. Britanya ve % 6'lık oranla Fransa öne çıkmıştır (Sancak vd., 2013). Şekil 2.8'de ve 2.9'da bazı ülkelerin yıllar içerisindeki bal ihracat ve ithalat miktarları ve değerleri gösterilmektedir [Sancak vd., 2013].



Şekil 2.8: Bazı Ülkelerin Bal İthalat Miktarı ve Değerleri.

Dünya geneli bal ihracatı da geçmişten günümüze artış göstermiş olup, 2005'ten 2010 yılına kadarki süreç kapsamında ihracat oranında % 14'lük bir artış görülmüştür. Bu bağlamda; 2010 yılı dünya bal ihracatında % 13'lük oranla Çin, % 12'lik oranla Arjantin, % 7'lik oranla Almanya ve % 6'lık oranla Meksika öne çıkmıştır [Sancak vd., 2013].



Şekil 2.9: Bazı Ülkelerin Bal İhracat Miktarı ve Değerleri.

2.6. Balın Analizinde Kullanılan Yöntemler

2.6.1. Melissopalinolojik Analizler

Melissopalinoloji, bitki türlerinin yayılımını, arıların beslenme alışkanlıklarını ve polenlerin dağılımını incelemek amacıyla kullanılan, arıların hangi tür bitkilerle etkileşimde olduklarını ve bu etkileşimler sonucu polenlerin nasıl analiz edileceğini analiz eden bir yöntemdir. Bal örneklerinin floral çeşitliliğinin ve kaynaklarının belirlenmesinde kullanılmasının yanı sıra, ışık mikroskobu altında, balın içeriğindeki polen çeşitliliğini ve miktarını belirlemede de kullanılmaktadır [Çelemlı vd., 2018].

Balın içeriğindeki polenlerin ve dolayısıyla balın kalitesi polenin botanik kökenine bağlı olduğu için, polenlerin hangi bitki kaynaklarından elde edildiğini ve kaynakların çeşitliliğini belirlemek, koloni sağlığı ve balın kalitesi açısından çok önemlidir. Bu bağlamda, melissopalinolojik analizler ile çevresel değişimlerin bitkilerle arılar arasındaki etkileşimleri nasıl etkilediğini inceleyebilmek ve tarımsal faaliyetler kapsamında uygun

ve verimli bitki kaynaklarını seçebilmek ve kullanımını arttırabilmek mümkündür [Hornby et al., 2022].

Melissopalinojik analizler; balın botanik kökeninin ve dolayısıyla içeriğindeki polen türlerinin belirlenmesini sağlamasının yanı sıra; sporlar, mantarlar, hif,algler, bitki ve böcek kılları, silika yapıları, nişasta ve balmumu gibi diğer yapısal bileşenleri ve elementleri de inceleme ve araştırma fırsatı sunmaktadır [Barth, 2004]. Balın piyasa değerini ve tüketim özellikleri, balın karakteristiklerine bağlı şekillendiği için, botanik kökeni ve balın içeriği büyük önem arz etmektedir. Bu aşamada, balın metagenomik çalışmalarda, polen analizi olarak melissopalinojik analizlerde sadece piyasa değerini büyük ölçüde belirleyen bitki içeriğinin analizi için değil, güvenli tüketim amacıyla herhangi bir parazit veya patojen mikroorganizma varlığı tayini için eDNA kaynağı olarak kullanılmaktadır [Balkanska et al., 2020; Ribani et al., 2020].

2.6.2. Çevresel DNA (eDNA)

Ekosistemler üzerinde yapılan analizlerde geleneksel olarak kullanılan yöntemler genelde fiziksel tanımlama üzerine kuruludur. Bu tür yöntemler yaklaşık popülasyon değeri ve popülasyon dağılımı hakkında yeterli bir sonuç sağlasa da taksonomik hatalar veya örnek alımında yapılan hatalar nedeniyle tam olarak kesin bir sonuç vermeyebilirler. Buna benzer sorunlar nedeniyle son zamanlarda, geçmişten günümüze gelişen sekanslama teknikleri sayesinde DNA dizilimine bağlı analiz teknikleri tercih edilebilir duruma gelmiştir. Doğada bulunan organizma miktarı ve dolaylı olarak incelenebilecek DNA örneği miktarı bolluktur. Çevresel DNA'nın (eDNA) kullanılması ile yapılan araştırmalar doğal ortamlarında bulunan canlılardan alınan DNA örnekleri sayesinde daha önceki tekniklerin elde edemediği verilere ulaşımı sağlar. Bunun dışında eDNA yöntemlerinin güvenilir filogenetik veri sağlaması, düşük uygulama bedeline sahip olması ve uygulaması basit yöntemler olması gibi avantajları vardır [Garlapati et al., 2019].

eDNA uygulamaları, bir ekosistemdeki istenilen spesifik bir türün varlığını belirleyebilir ve bu sayede biyoçeşitliliğin araştırılmasına katkıda bulunabilir. eDNA uygulamalarında canlılar sayesinde ortamda var olan mitokondrial DNA ya da nükleer DNA baz alınır. Kullanılan DNA örnekleri genelde 500 baz çifti içeren kısa dizilerden

oluşur. Örnekler; buz katmanlarından, su kütlelerinden ve toprağın alt katmanlarından elde edilebilir. eDNA örnekleri elde edildikten sonra; eDNA izolasyonu, PCR uygulaması, biyoinformatik analiz ve istatistiksel analiz gibi süreçlerden geçerek veri eldesi sağlanır [Sahu et al., 2022].

eDNA yöntemleri barkodlama ve metabarkodlama olarak ikiye ayrılabilir. Barkodlama yöntemlerinde tek bir tür içerisindeki bireyler arası spesifik bir uygulama gerçekleştirilebilir. Metabarkodlama yöntemlerinde ise istenilen farklı ekosistemlerdeki birçok tür aynı anda incelenebilir ve bu sayede komünite dinamikleri detaylı olarak anlaşılabilir. eDNA metabarkodlamada kullanılan analiz tekniklerinden biri olan yüksek-çıkıtlı sekanslama (HTS), ekosistemde bulunan türlerin kompozisyonunu belirleyerek uzun zamanlı izlemede ve paleoekolojik araştırmalarda veri elde edilmesinde kullanılabilir. eDNA analizlerinde birtakım problemler de mevcuttur. Eğer ortamda hedef mikroorganizma olmamasına rağmen hedef DNA bulunursa bu yanlış pozitif hata olarak adlandırılır. Eğer ortamda hedef organizma bulunmasına rağmen hedef DNA bulunmuyorsa bu yanlış negatif hata olarak adlandırılır. Yanlış negatif hatalar özellikle nadir veya soyu-tükenmekte olan türlerin belirlenmesinde analiz sonuçlarını önemli ölçüde değiştirebilirler. Bunun dışında eDNA'nın çevresel ortamlarda bulunması nedeniyle eDNA'lar çeşitli doğal yollarla farklı ortamlara taşınabilir. Amazon nehrinde bulunan bir eDNA 1 ay içerisinde 1500 km'lik bir yol kat edebilir, bu da eDNA analizi yapılırken birtakım karışıklıklara yol açabilir. Bu anlamda eDNA analizi yapılırken özenli deneysel düzeneklerin kurulması önemlidir. eDNA kullanımı günümüzde geleneksel metotlardan daha yüksek bir bedel gerektirse de baz dizileme yöntemlerinin gelişmesi ve kolaylaşması sayesinde eDNA'nın özellikle metagenomik araştırmalarda büyük önem arz edeceği düşünülmektedir [Garlapati et al., 2019].

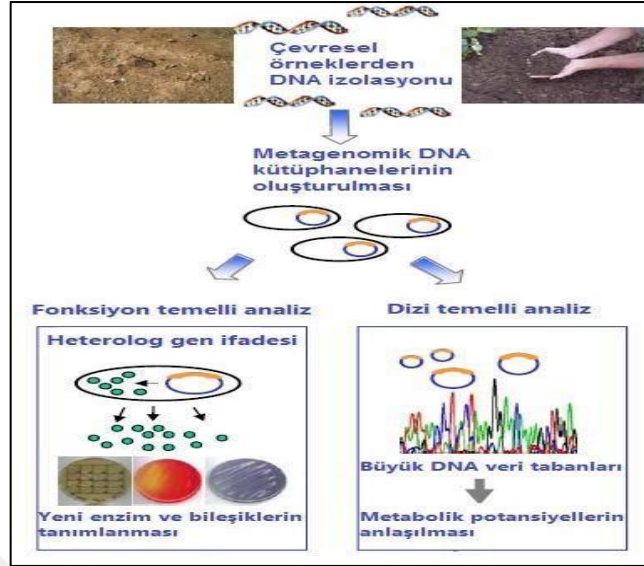
Doğada bulunan çoğu mikroorganizma izole edilmeye ve laboratuvar koşullarında kültüre edilmeye uygun değildir. Genom çalışmaları çoğunlukla saf kültür şeklinde elde edilebilen organizmalar ile yapılmıştır. Günümüze kadar çok sayıda yapılmış olan genom haritalama çalışmaları sayesinde veri kütüphaneleri oluşturulmuş, DNA saflaştırma protokolleri çoğu organizma için bilinir hale gelmiş ve DNA sekanslamanın ekonomik bedeli bir hayli azalmıştır. Tüm bu gelişmelere karşılık olarak zorunlu patojenler ya da

simbiyotlar gibi bazı canlıların uygun çevre koşulları dışında yaşayamaması nedeniyle bu tür organizmalarda yapılan genomik çalışmalar kısıtlıdır. Bu anlamda son yıllarda doğal ortamından elde edilen örnekleri kullanarak DNA analizi gerçekleştirebilmek önem kazanmıştır [Tringe and Rubin, 2005].

2.6.3. Metagenomik Analizler

Metagenomik yöntemler, türler içi genomik çeşitlilikler sebebiyle türlerin sınıflandırılmasının yanı sıra genomlara göre sahip oldukları işlevlere de açıklık getirmektedir. Bu bağlamda metagenomik yaklaşımlar, mevcut genlerin potansiyel biyokimyasal aktiviteleri, fiziksel veya biyolojik olarak değişimlerini ve hücreler arasındaki karmaşık etkileşimlerin ve bağlantıların belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Metagenomik yöntemler aracılığıyla çevreden direk elde edilen DNA bilgisi ile çevresel genetik kaynaklara ve çözümlemelere %100 bir şekilde erişim sağlanabilmektedir [Karen, 2007].

Saf kültür üzerinden organizma genom analizi yapıldığında doğal ortamda meydana gelen türler arası etkileşimler veya seçim mekanizmaları gibi komünite dinamikleri göz ardı edilmiş olur ve elde edilen veriler sınırlı bir gen havuzunu kapsar. Metagenomik, çevresel örneklerdeki mikrobiyal genetik çeşitliliğin organizmaların kültüre edilebilirliğinden bağımsız olarak incelenebilmesi sağlar. Metagenomik analizde alınan çevresel örnek birçok mikroorganizmayı kapsadığı için heterojen içerikteki bir gen havuzu elde edilir. Metagenomik çalışmalar; eDNA'nın izolasyonu, izole edilen DNA'nın uygun vektöre klonlanması, vektörlerin uygun bakteriye transformasyonu ve transforme bakterilerin incelenmesi süreçlerini içerir [Karen, 2007]. Metagenomik yöntemlerin uygulama süreci Şekil 2.10'da gösterilmektedir [Schmeisser et al., 2007].



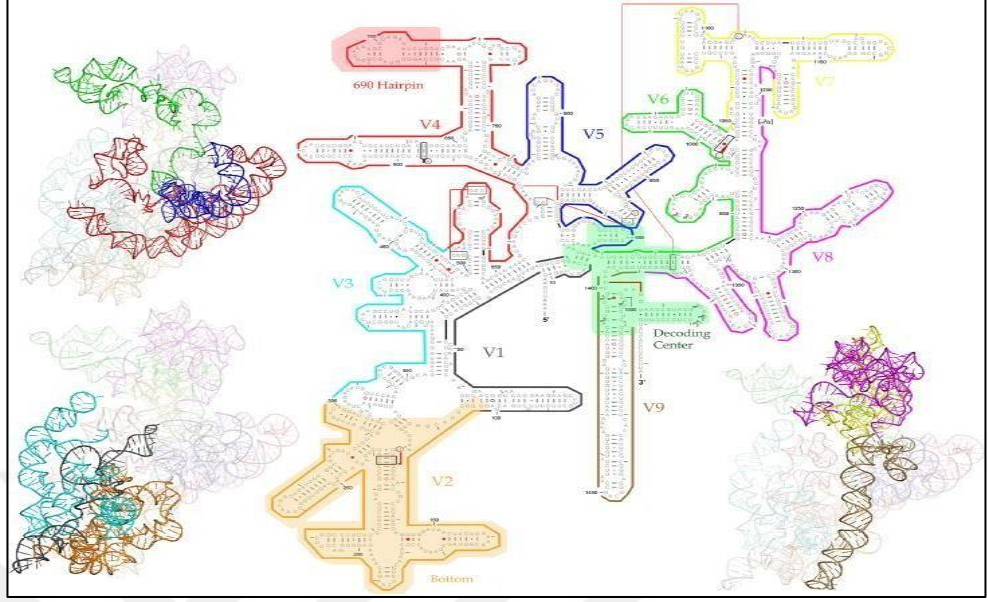
Şekil 2.10: Metagenomik Analiz Basamakları.

Metagenomik çalışmalardaki ilk süreç DNA izolasyonudur. DNA izolasyonu iki şekilde yapılabilir. Hücre lizizi aracılığıyla yapılan doğrudan DNA izolasyonunda DNA'nın saflaştırılması için elektroforez düzeneği kullanılabilir. DNA negatif yüklü olduğundan düzenekte katoda doğru hareket ederken, istenmeyen pozitif yüklü bileşikler anoda doğru hareket eder. Bunun dışında kromatografi teknikleri ya da sonikasyon yöntemi de DNA saflaştırılmasında kullanılabilir [Nazir, 2016]. Doğrudan izolasyon yönteminin birtakım problemleri mevcuttur. Çevresel örnekten alınan istenmeyen virüs partikülleri ve ölü hücrelerin DNA içerikleri de gen havuzuna karışabilir. Tekniğin bir diğer problemi de gram pozitif bakteriler gibi lizizi zor olan hücreler üzerinde yapıldığında DNA hasarına sebep olabilmesi ya da elde edilen solüsyondaki DNA kompozisyonunun normalinden fazla veya az olmasına sebep olabilmesidir [Tringe and Rubin, 2005]. Bir diğer yöntem türü olan dolaylı DNA izolasyonunda örnekler; 100mM Tris-HCl, 100mM of SDS ve 0.1 % CTAB gibi kimyasallar içeren çözeltiler kullanılarak tekrarlı santrifüjler aracılığıyla saflaştırılır. Bu aşamaların sonunda bakteriyal hücreler toplanılır ve hücre lizizi gerçekleştirilir. Dolaylı DNA izolasyon yönteminde doğrudan DNA izolasyonundan farklı olarak daha çok zaman harcanır ancak elde edilen örneklerde istenmeyen madde içeriği daha az olur ve daha spesifik prokaryotik DNA hedeflendiği için de elde edilen DNA içeriği daha az miktarda olur. Elde edilen DNA örnekleri uygun vektöre ve bakteriye yerleştirildikten sonra ilgili incelemeler yapılırken 16S rRNA gibi korunmuş bölgelerin

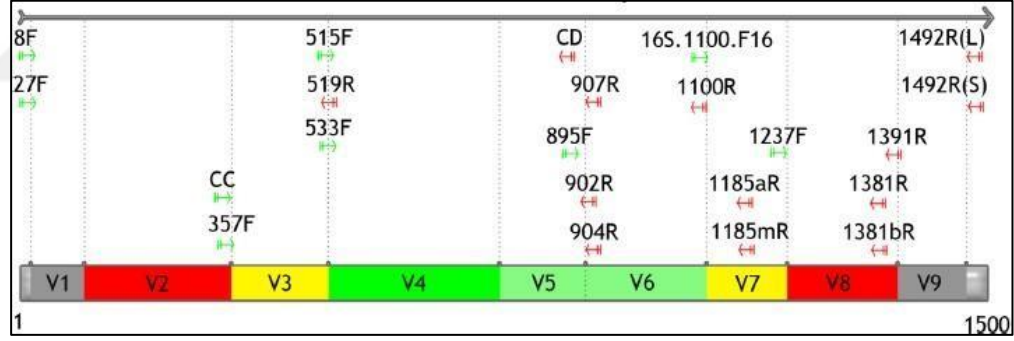
filogenetik işaretleyicileri kullanılarak PCR yöntemi ile genetik analizler uygulanır ya da antibiyotik üretimi ve enzimatik aktiviteler gibi spesifik fizyolojik özellikler incelenebilir. Metabolik yaklaşımlar çevresel mikrobiyal gen havuzundaki eksprese edilen ve eksprese edilmeyen genler arasında bir ayırım yapamadığından, eksprese edilen genlerin metabolik aktivitesi hakkında bilgi vermek konusunda yetersiz kalır. Metabolik aktiviteyi analiz etmek için hedef genin dizisi hakkında bilgiye sahip olduğumuz durumlarda (Genin sekansı, gerekli primerleri tasarlamak için) gereklidir. RT-PCR kullanılarak ortamdaki transkript düzeyleri incelenebilir. Bunun dışında tasarlanan çevresel mikroarray teknolojileri ve cDNA klonları da mikrobiyal komünitelerde gen ekspresyonunu anlamak için önemli katkıda bulunabilir [Nazir, 2016].

Metagenomik çalışmalar, spesifik bir türü tanımlamaktan büyük bir komünitenin ilişki dinamiklerini incelemeye kadar birçok alanda uygulanabilir. Bu anlamda: belirli bir substratın metabolik sürecinin gerçekleşmesini sağlayan organizma gruplarında kararlı izotop probu (SIP), organizmaların membran proteinleri ya da SSU rRNA dizilerine bağlı olarak ayrılmasını sağlayan akım sitometrisi, organizmaların hücre duvarı veya ekstrasellüler karakteristiklerine göre ayırımını sağlayan saflaştırma uygulamaları, diferansiyel santrifüj, diferansiyel liziz, restriksiyon enzimlerinin seçici kullanımı ve jel elektroforezi gibi yöntemler kullanılabilir. Diğer yöntemlerle elde edilemeyecek verilerin elde edilmesini sağlayan metagenomik çalışmalar organizmalar arası etkileşimleri genomik düzeyde incelememizi mümkün kılarak elde ettiğimiz genom havuzu veri tabanlarını büyük oranda genişletebilir [Tringe and Rubin, 2005].

Metagenomik yaklaşımlar ile karmaşık filogenetik ve fonksiyonel kavramlar, yeni nesil teknolojilerin de entegrasyonu ile analizlerde kolaylık sağlamaktadır. Metagenomdan türetilen; evrensel olarak prokaryotik ve ökaryotik türlerde bulunan ve türler hakkında geniş kapsamlı bir bilgi veren küçük altbirimler olarak 16S rRNA ve 18S rRNA genleri ile yapılan metagenomik teknikler, türleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan etkin yöntemler olarak ifade edilmektedirler. Bu bağlamda, metagenomik çalışmalara yeni nesil dizileme teknolojilerinin de entegrasyonu önemli bir rol oynamaktadır. Şekil 2.11’de 16S rRNA geninin 2 boyutlu ve 3 boyutlu şekli ve şekil 2.12’de 16S rRNA geninin primer haritası gösterilmektedir [Yang et al., 2016].



Şekil 2.11: 16S rRNA Geninin 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Gösterimi.



Şekil 2.12: 16S rRNA Primer Haritası.

En yaygın kullanılan teknolojiler, ligasyon vasıtasıyla dizileme (SOLID-Applied Biosciences/Life Technologies), sentezleyerek dizileme (Solexa, Illumina), yarı iletken çip taraması (Ion Torrent/Life Technologies), pirosekanslama (454/ROCHE) ve tek molekül dizileme (Oxford Nanopore Technologies, SMRT-Pasific Bioscience) tekniklerini kapsamaktadır. Yeni nesil bu teknolojilerin mevcut olması ve kullanılmasının yanı sıra, en doğru taksonomik analizlerin ve sınıflandırmaların metagenomik DNA'nın direk dizilenmesi ile elde edilebileceği belirtilmektedir [Li et al., 2018].

2.6.4. Shotgun Analizi

Yüksek verimli dizileme yöntemleri ideal olarak, yalnızca kültür için uygun olanların değil, bir numunedeki tüm mikroorganizmaların genomik profilinin çıkarılmasını sağlar. Böyle bir yaklaşım, bir numunede bulunan tüm mikrobiyal genomların hedeflenmemiş dizilimini içermektedir. Shotgun metagenomik dizileme, bu sınırlamaları ortadan kaldırarak, kültürlenmemiş mikrobiyotaya çalışmasına alternatif bir yaklaşımdır. Bu dizileme yöntemi, mikrobiyal toplulukların taksonomik bileşimini ve fonksiyonel potansiyelini analiz etmek ve tüm genom dizilerini kurtarmak için kullanılabilir. İlk kullanılmaya başlanmasından bu yana geçen 15 yıl içinde, metagenomik, karmaşık mikrobiyotalar üzerinde büyük ölçekli çalışmalara olanak sağlamıştır [Oh, 2014].

Tipik bir shotgun metagenomik çalışması, ilk çalışma tasarımı sonrası beş adımdan oluşur: (i) örneklerin toplanması, işlenmesi ve sıralanması; (ii) okumaların dizilenmesinin ön işlenmesi; (iii) taksonomiye karakterize etmek için dizi analizi, “Fonksiyonel ve genomik karakterizasyon”; (iv) istatistiksel ve biyolojik işlem sonrası analiz ve (v) doğrulama. Her adımı gerçekleştirmek için birçok deneysel ve hesaplamalı yöntem mevcuttur, bu da araştırmacıların göz korkutucu seçeneklerle karşı karşıya olduğu anlamına gelir. Shotgun metagenomiklerin görünürdeki basitliğine rağmen, potansiyel deneysel önyargı ve hesaplamalı analiz ve yorumlamanın karmaşıklığından kaynaklanan sınırlamaları vardır [Quince et al., 2017]. Mikrobiyal içerik, aynı ortamdan alınan numuneler arasında değişiklik gösterebilir, bu da küçük numune grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve biyolojik olarak anlamlı farklılıkların saptanmasını zorlaştırır. Bu nedenle, özellikle etki büyüklüğü küçükse, çalışmaların farklılıkları saptamak için yeterince güçlü olduğunu belirlemek önemlidir [Kuczynski et al., 2010]. Yararlı bir strateji olarak, güç hesaplamaları yapabilmek için rehber veriler oluşturmak olabilir. Örnek olarak, 16S rRNA gen dizilimi gibi daha ucuz mikrobiyal araştırmalarla önceden taranan numunelerin bir alt kümesi üzerinde shotgun metagenomiklerinin gerçekleştirildiği iki katmanlı bir yaklaşım benimsenebilir [La Rosa et al., 2012]. Özellikle karmaşık ortamlardan alınan numuneler için kontrollerin elde edilmesi zor olabilir. Yerleşik mikrobiyotom konak genotipi, yaş, diyet ve çevre gibi birçok faktörden

etkilenebileceğinden, bu özellikle insan mikrobiyomunu inceleyen kişiler için önemlidir. Mümkün olduğunda, iki örnek setinin 'anlık görüntülerini' karşılaştıran basit kesitsel araştırmalar yerine, aynı habitatın alınan örneklerin boylamsal çalışmaları yapılabilir [Knight et al., 2012]. Daha da önemlisi, boylamsal araştırmalar, temsili olmayan bir aykırı değer olabilecek tek bir örneklemeden elde edilen sonuçlara dayanmazlar. Numuneler hayvan modellerinden, özellikle birlikte barınan kemirgenlerden geliyorsa, hayvan yaşının, barınak ortamının ve hatta hayvanlarla ilgilenen kişinin cinsiyetinin mikrobiyal topluluk profilleri üzerindeki potansiyel etkileri dikkate alınmalıdır [McCafferty et al., 2013; Lees et al., 2014].

Bal arıları, kapsamlı yiyecek arama faaliyetleri ve çevresel keşifleri nedeniyle benzersiz büyük ölçekli izleme araçlarıdır. Arılar yaşadıkları çevre ile direkt temas halinde olup onları kovana getirirler, bunun sonucunda bal, çevre kirleticileri ve eser elementler haline gelirler. Böylece, arıların faaliyetleri ürettikleri balın çeşitli özelliklerini tanımlayabilir ve bu kovan ürününü ilginç bir eDNA imzası toplayıcısı haline getirir. Bal, kovan mikrobiyal ortamını ve arının tüm genomunu karakterize eden polen, böcekler (bunu üreten arılar dahil), virüsler, mantarlar ve bakterilerden eser miktarda eDNA içerir. Bu bilgiler balı tanımlamak ve entomolojik, botanik ve coğrafi kökenini belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca bu DNA, arıların patolojik döngüsü hakkında bilgi elde etmek için kullanılabilir [Shokralla et al., 2012].

2.6.5. Balın Metagenomiği, Bal Arılarının Metagenomik Analizleri ve Mikrobiyotaları

Avrupa bal arısı (*Apis mellifera*), tozlaşma ve gıda üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bal arısı popülasyonlarının sağlığı, çevrenin, konakçının genetiğinin ve ilişkili mikropların kompleks bir ürünüdür. Diğer tozlayıcılar gibi, bal arısı popülasyonları da birden fazla tehditle karşı karşıyadır [Mommott et al., 2007]. Sağlığı etkileyen bu faktörlerin daha iyi anlaşılması, arı sağlığına yönelik modern zorlukların, karşı karşıya kalınan tehditlerin yönetilmesine yardımcı olacaktır. Tozlayıcılardaki verimin düşüşü, tek bir faktörden kaynaklandığı düşünülmemektedir, ancak habitat parçalanması, tarımsal yoğunlaştırma, pestisit kalıntısı birikimi, yeni bal arısı zararlıları ve hastalıkları ve yetersiz

arıcılık uygulamalarının bir kombinasyonundan kaynaklanabilir [Ricketts, 2008]. Bal arısı popülasyonlarının genetik yapısı, yalnızca üretim özelliklerini ve daha az elverişli koşullar altında hayatta kalma yeteneğini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hastalık direncinde hayati bir rol oynar [Tarpy and Seeley, 2006]. Aynı zamanda, enfekte arılar genellikle belirgin semptomlar göstermese de, ağır enfeksiyonlar çok çeşitli zararlı etkilere neden olabilir. Örnek olarak, Asya bal arısının (*Apis cerana*) doğal bir paraziti olan *N. ceranae*, 1990'dan önce Uruguay'dan alınan Avrupa bal arısı (*Apis mellifera*) örneklerinde tespit edilmiştir [Fries, 2010]. Bal arılarının immüniteleri ve temel besin sağlanarak yaşamlarına ek olarak mikrobiyal metabolizma, bal arılarının büyümesini, davranışlarını ve hormonal sinyallerini etkiler. Yapılan analiz teknikleri ise bal arılarıyla ilişkili mikrobiyal toplulukları keşfetmemizi sağlamakta ve tarımsal ekosistemlerdeki yeni biyolojik tehditleri belirlemek için verimli metagenomik çalışmalara ışık tutmaktadır. Çoğu ev sahibi türün aksine, bal arısının çekirdek mikrobiyotası nispeten az çeşitliliğe sahiptir. Bal arıları, yiyecek arama ve bal üretim faaliyetlerinden dolayı, bitkiler, virüsler, bakteriler ve diğer kovan zararlıları gibi tüm alanlardaki türlerle karmaşık ilişkiler kurar ve bu sayede arı balını, ekolojik ilişkilerini değerlendirmek için değerli bir biyoizleme aracı haline getirir.

Balda shotgun metagenomik uygulaması, bal arılarının etkileşime girdiği türlerin ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır. Bununla birlikte, shotgun metagenomik araçları ve DNA ekstraksiyon yöntemleri, bal için optimize edilmiş herhangi bir kaynağa gerek duymayan teknolojilerdir [Galanis et al., 2022]. Metagenomik analizler, bal arısı mikrobiyotal taksonlarında, izolatlar arası yüksek genetik çeşitliliği ortaya çıkarmıştır ve bu da ilgili takson kümelerini içerdiğini düşündürmektedir. Ortak mikrobiyom türleri, konakçıları ile mutualist, karşılıklı veya parazitik ilişkilere sahip olabilir ve özellikle, farklı tür kombine mikrobiyota toplulukları, bal arılarının sağlığındaki değişikliklerle de ilişkilendirilebilir, aynı zamanda bal arıların bağırsak koşullarını koruyabilir ve konakçılarına, besinlerin sindirimi ve metabolizmasında, toksinlerin nötralleşmesinde ve parazitlere karşı dirençte yardımcı olabilir [Engel et al., 2012]. Bal numuneleri üzerinde shotgun metagenomiği, invaziv olmaması ve bal arıları ile etkileşime giren birçok türü tespit etme potansiyeli olması nedeniyle ilgi çekici bir yöntemdir.

Bal, yeterli su buharlaşıp viskozitesi sağlanana kadar peteğe yerleştirilen çiçek polenlerinin ters çevrilmesi yoluyla üretilen bir maddedir. Bu işlem boyunca, olgunlaşmamış bal, çeşitli patojenler ve mikroorganizmalarla temas eder ve bu nedenle çalışmalar için örnekler alınan bitkilerden, bal arısı bağırsağı mikrobiyomundan ve bal arıları gibi kovan organizmalarından çevresel DNA (eDNA) olarak adlandırılan DNA elde edilir. Mevcut shotgun metagenomik metodolojileri, saha çalışmasıyla uyumluluklarını sınırlayan, maliyetli ve zaman alıcı olabilir. Ancak shotgun metagenomiklerini daha pratik ve az maliyetli bir yaklaşım haline getirmek için daha fazla optimizasyon gereklidir. Geleneksel olarak, biyoizleme yöntemleri öncelikle, tam olarak tanımlanan ve karakterize edilen, araştırılmakta olan organizmaların çalışmasına ve örneklenmesine dayanmaktadır. Ek olarak, özellikle balla ilgili türlerin tanımlanmasına yönelik taksonomik sınıflandırma araçları olmak üzere, başta biyoinformatik araçların kullanımı zorlukları analiz etmede kullanılmaktadır.

Ekolojik araştırmalar için çevresel izleme, araştırma alanını kapsayacak şekilde uygun şekilde tasarlanmış örnekleme stratejilerine de dayanır [Wolterbeek, 2002]. Bu yöntemler, numuneler ve numune toplama (birçok veri noktası gerekiyorsa) için yüksek lojistik maliyetler, uzak ayarlara ulaşmanın zorluğu ve analiz edilen alandaki organizmaların veya malzemelerin tarafsız ve eksiksiz bir envanterinin elde edilmesi dahil olmak üzere çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Çoğu durumda, bu sınırlamalar, hücre veya doku parçalarından türetilen çevresel veya organizma ile ilişkili matrislerden ekstrakte edilen DNA olarak tanımlanan çevresel DNA (eDNA) dizilimi ile aşılabılır [Taberlet et al., 2012]. Geleneksel yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, eDNA, ortamda bırakılan DNA izlerinden geri kazanılan bilgileri kullanarak, yakalanması zor türler de dahil olmak üzere, fiziksel ve geçici varlıkları olmayan organizmalar hakkında bilgi sağlayabildiğinden, algılama hassasiyetini ve kesinliğini artırmıştır [Bohmann et al., 2014].

eDNA analizlerinde yeni nesil dizileme teknolojilerinin tanıtılması, DNA bilgisinin birçok farklı amaç için doğrudan kullanımını kolaylaştırarak bu araştırma alanında devrim yaratmıştır [Smart et al., 2016]. Bal arıları, çevresel keşif ve yiyecek arama faaliyetleri nedeniyle büyük ölçekli izleme araçları olarak kabul edilir. Kovan ürünlerinin, yani polen

ve bal arısından elde edilen ürünlerin (balmumu, propolis ve bal) analizi, çevresel kirleticilerin ve kirleticilerin seviyesini tespit etmek ve bunların kökenini belirlemek için kullanılmıştır [Bromenshenk et al., 1985]. Bu materyaller ayrıca ilginç eDNA kaynakları olarak kabul edilebilir. Özellikle bal, bal arısı aktivitelerini yansıtır ve eDNA (yani polenden elde edilen) içeren bal, bal arısının yiyecek arama davranışını ve doğrulama için botanik bileşimi değerlendirmek için kullanılmıştır [Bargańska et al., 2016]. Bal arıları, üretici hemipterlerin DNA izlerini bıraktıkları bu tatlı materyali rutin olarak topladıkları için, bal özü üreten bitki emici böceklerden elde edilen bilgiler balda geri kazanılabilir [Utzeri vd., 2018]. Balda bırakılan diğer DNA izleri, onu üreten arı türlerini ve bal arısı alt türlerini tanımlamak için kullanılmıştır [Hawkins et al., 2015].

Baldan izole edilen mantar ve bakteri DNA'sı, adli tıp ve gıda güvenliği analizleri için kullanılmıştır. Baldan çıkarılan DNA, bal arısı patojenlerinden bilgi kurtarmak için de yararlı olabilir. Genel olarak bal DNA'sının analizi, karmaşık bal eDNA kaynaklarının taksonomik bileşimini çözmek için spesifik PCR tabanlı analizler kullanılarak, yeni nesil dizileme ile birleştirilerek ortaya konabilir. Tüm bu yöntemler, tahlillerin tasarımı nedeniyle doğal sınırlamalarla hedeflenen DNA bölgelerinin PCR amplifikasyonuna dayanır. Örneğin, PCR adımı, hedeflenen DNA fragmanını tüm hedeflenen organizmalar arasında eşit olmayan bir şekilde çoğaltabilir veya bazı taksonlar hiç çoğaltılamayabilir ve bu da yanlış biyoçeşitlilik değerlendirmelerine yol açar. Ayrıca, yalnızca çoklu primer setleri kullanılarak (farklı organel veya genom DNA bölgelerini hedefleyerek), balda temsil edilebilecek tüm organizmaları kapsamak mümkün olabilir [Soares et al., 2018].

2.6.6. Balla İlgili Metagenomik Çalışmalar

Bal ile ilgili genomik çalışmalar kapsamında polinatörler konusunda araştırmalar yapılmasının yanı sıra, arı popülasyonundaki genomik analizler ve değişimler, riskli veya dirençli durumlar incelenabilmektedir. Arıcılık ve bal üretimi faaliyetlerine metagenomik analizlerin entegrasyonu; arıların etkileşim içerisinde oldukları bitkisel floraların, kaynakların ve aynı zamanda çeşitli mikroorganizmaların kolayca tespit edilmesini, üretilen balın içeriğinin ve verimliliğinin incelenmesini sağlamaktadır. Ayrıca metagenomik yaklaşımlarla arı kolonilerinin mevcut özelliklerinin daha fazla

geliştirilmesi ve iyileştirilmesi de sağlandığı için verimli bir bal üretimi hususunda efektif genetik modifikasyonların yapılabilmesi de mümkün olmaktadır [Chapman et al., 2008; Maleszka, 2008; Schmehl et al., 2014; Galbraith et al., 2018; Avalos et al., 2020].

Yapılan bazı çalışmalarda, Varroa (arı biti) ile parazitlenmiş arı kolonilerinin dirençli hale getirilmesi ve Varroa'nın yayılmasını önlemeye yönelik incelemeler amaçlanmıştır. Bu bağlamda, tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP'lerin) çevresindeki genomik bölgeler incelenerek, Varroa görülen yavru arıların tespiti ve çıkarılması gerçekleştirilmiştir. Bu genomik bölgelerin analiz edilmesi, varsayılan aday genlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır [Spötter et al., 2016]. Arılardaki farklı hijyenik davranışlara yönelik yürütülen bir başka çalışmada ise, genomik açıdan bal arısı kolonilerinin MDH-1 ve Est-3 lokuslarının allel frekansları, polimorfizm ve heterozigotluk düzeyleri bakımından değişiklikler incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre; bal arılarındaki sonraki çalışmalar için seçilebilecek hijyenik davranışlar ve allel özellikleri arasında bir ilişki olduğuna dair yeni gözlemler ortaya çıkmıştır [Lazarov et al., 2019].

Biyoteknolojik çalışmaların temel hedefleri olan, besin değerlerinin iyileştirilmesine ve dolayısıyla arıların performansının artırılmasına, verimli bir bal üretiminin sağlanmasına yönelik yapılan bazı çalışmalarda ise, arı kolonilerine prebiyotik katkı maddelerinin takviyesiyle, *Apis mellifera* L. arı türünün bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesi, sağlıklı ve daha üretken bir koloni gelişimi amaçlanmıştır. Bu bağlamda; dört haftalık bir süreç içerisinde, açık alana yerleştirilen bir arı kovanının çerçeve kısımlarına arı bağırsağından izole edilen probiyotik bakterilerin (bifidobakteri ve laktobasil) olduğu bir şeker şurubu haftada bir olacak şekilde uygulanmıştır ve kolonilerin gelişimi, balın ve polenlerin verimliliği iki aylık bir süreçte gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre; koloni popülasyonunda % 46.2, polenlerde % 53.4 ve bal üretiminde %59,21 oranında bir artış olduğu görülmüştür [Alberoni et al., 2018]. Aynı konuda yapılan bir başka çalışmada ise; *Lactobacillus salivarius* A3iob ticari ürününün bal üretiminde verimliliğe etkisi araştırılmış olup, floral kaynakların etkisine ek olarak, bu ürünün kullanılması sonucu bal üretiminde ve verimliliğinde artış olduğu gözlemlenmiştir [Fanciotti et al., 2018].

Probiyotik katkı maddelerinin kullanımına ek olarak, arıcılık ve bal üretimi faaliyetlerinde protein ve enerji dengesi sağlanarak kullanılan yemlere yönelik yapılan bazı çalışmalarda; arıların yaşam sürelerinin arttığı, gelişimlerini, davranışlarını ve yaşam sürelerini etkileyen genlerin (AmILP-1, BRP, Vg) ekspresyonlarının da arıların yaşlarına ve farklı besin kaynaklarına göre değişiklik gösterdiği sonucuna varılmıştır [Koru, 2018].

Yine arı kolonilerinde yaşanan hastalıklar ve dolayısıyla bal verimliliğinde meydana gelen problemler sebebiyle, Batı Avustralya’da kapalı bir popülasyondan oluşan bir ıslah programı uygulanmıştır. Uzun süren bu uygulamayla popülasyondaki genetik çeşitliliğin yıllar geçmesine rağmen korunduğu ve bal arılarının kolonilerinin iki alt tür sebebiyle üç farklı mitotip gösterdiği gözlemlenmiştir [Chapman et al., 2008]. Türkiye’de uygulanan benzer bir çalışmaya göre ise, Türkiye bal arısı popülasyonu verilerine göre, 23 popülasyonun 25 mikrosatellit lokus bağlamında tanımlaması yapılarak, yetiştirildikleri coğrafi koşullara göre beş temel bölgede sınıflandırılmıştır [Yıldız vd., 2010].

Bal arısı ve koloni sağlığı açısından, çevresel, genomik ve mikroorganizma faktörlerine göre İngiltere’de yapılan bazı çalışmalarda; bölge farketmeksizin 19 bal arısı kolonisinin genomlarının ve metagenomlarının analizi için DNA dizilimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre; bal arılarıyla etkileşimi olan mikrobiyal topluluklar gözlemlenmiş olup, tarımsal ekosistemlerdeki mevcut veya ortaya çıkabilecek farklı biyolojik tehditlerin tespit edilmesinde veya ortadan kaldırılmasında metagenomik yaklaşımların önemi belirtilmiştir [Topal vd., 2021].

Ek olarak, melissopalinojik (polen) analizlerle balın botanik kökeninin tespit edilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, bitki genomunda bulunan üç plastid bölgesinin (rbcL, trnH-psbA ve matK) ve nükleer gen bölgelerinin (ITS1 ve ITS2) bir barkod olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir [Hawkins et al., 2015]. Plastid bölgelerinden biri olan rbcL bitkiler için uluslararası bir geçerliliği olan, çekirdek DNA barkod belirteçlerinden biri olup, ITS2 ve trnH-psbA gibi diğer gen bölgelerine kıyasla tür sınıflandırmasında daha düşük seviyede bir ayrım gösterirken, evrensellik açısından daha ön planda görülmektedir [Hollingsworth, 2011; Li et al., 2011]. Bu bağlamda balın botanik kökenini belirlemek için yapılan bir çalışmada, DNA metabarkodlama yöntemi ve moleküler belirteç olarak ITS2 ve rbcL kullanılarak, çok fazla sayıda (926) bitki türü tespit edilmiştir.

Bu iki moleküler belirteçten ITS2'nin köken tespitinde daha etkin bir belirteç olduğu ve iki belirtecin kombinasyonunun köken tespitinde daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır [Khansaritoreh et al., 2020]. Balın botanik köken tespitine yönelik yapılan benzer bir çalışmada ise; bitki genomundaki üç gen bölgesi (ITS2, rbcLa ve COI), DNA metabarkodlama yöntemi ile tanımlanarak bir protokol oluşturulmuştur [Prosser and Hebert, 2017]. Ayrıca, Soares et al. (2018)'in çalışmalarına göre, plastidde bulunan matK geninin bal örneklerinde köken tespiti için spesifik bir aday barkod yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.



3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bal Materyali

Tez çalışmasında, Bingöl ilinin Adaklı, Genç, Karlıova, Kığı, Merkez, Solhan, Yayladere ve Yedisu ilçeleri olmak üzere, bu ilçelerin 40 farklı lokasyonundan 2020 yılında hasadı gerçekleştirilmiş 124 bal örneği; Bingöl Üniversitesi, Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi tarafından çalışmada kullanılmak üzere sağlanmıştır. Bal örnekleri, DNA ekstrasyonları gerçekleştirilene kadar güneş ışığından uzak, kapalı bir ortamda ve oda sıcaklığında tutulmuştur. Şekil 3.1’de projede kullanılan bal örneklerinin toplandığı lokasyonlar harita üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 3.1: Bal Örneklerinin Alındığı İlçelerdeki Lokasyonların Harita Üzerinde Gösterimi.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Bal örneklerinin deneysel sürecinde (DNA izolasyonu protokolü) kullanılan kimyasal maddeler ve bu kimyasalların temin edildiği firma adları ve katalog numaraları Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1: DNA İzolasyonu Protokülüne Dahil Kimyasallar.

Kimyasal Materyal	Firma	Katalog No
CTAB	PanReac AppliChem	A0805,0100
NaCl	Sigma	71376
Tris-HCl	AppliChem	A3452,0250
EDTA Disodium	Multicell	625-060-CG
Proteinase K	Hibrigen	MG-PASEK-02
RNase A	Hibrigen	MG-RNAZA-02
Kloroform	Merck	1.07024.2500
1-Oktanol	AppliChem	A3461,1000
İzopropanol	Merck	1.09634.2511
Trisma-Base	Sigma	T1503
6X Jel Yükleme Boyası (Mavi)	Hibrigen	MG-YBM-01
SYBR Safe Jel Boyası	Hibrigen	MG-SSGD-01-1000
Lambda Hind/III DNA Ladder	Hibrigen	MG-LDR-LH3
100 bp DNA Ladder Plus	Hibrigen	MG-LDR-100P
1000 bp DNA Ladder Plus	Hibrigen	MG-LDR-1000P

3.3. Kullanılan Cihazlar

Bal örneklerinin deneysel sürecinde (DNA izolasyonu protokolü) kullanılan cihazlar ve bu cihazların ait marka ve model bilgileri Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2: DNA İzolasyonu Protokülüne Dahil Cihazlar.

Cihaz	Marka	Model
Hassas Terazî	Shimadzu	BL-320H
Otoklav	Hirayama	HV-110L
Etüv	Binder	DIN 12880
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark	H3760-HSE
Derin Dondurucu (-20 °C)	Siemens	GS26DN13NE
Buzdolabı (+4 °C)	Indesit	RG 1380
Sıcak Su Banyosu	Witeg	WB-11
Vorteks	VWR	444-1372 (EU)
Mikrodalga	Samsung	MW71E
Santrifüj	MWP	MWP-150R
Mini Santrifüj	MRC	ECEN-6
Otomatik Pipet	Brand	Transferpette S
pH Metre	Hanna Instrument	pH-209
Jel Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı	Claver Scientific	MP300

3.4. eDNA İzolasyonu

Bingöl'e ait belirlenen Adaklı (ADA2020), Genç (GEB2020), Karlıova (KAB2020), Kığı (KGB2020), Merkez (MEA2020), Solhan (SOC2020) ve Yaylıdere (YAB2020) ilçelerinden toplanan 7 bal örneğinden çevresel DNA (eDNA) izolasyonu Utzeri et al. (2018) tarafından yayınlanan protokole göre yapılmıştır. Protokol aşağıda sunulan aşamalardan oluşmaktadır:

- 40 mL ultra saf su ile her bir numuneden toplam 10 g bal eklendi ve örnekler daha sonra 10 saniye vorteksenerek, ardından 1 dakika boyunca 40 ° C'de inkübasyon edildi. Bu adımlar 10 kez tekrarlandı.
- Daha sonra tüp, 5000 g'de oda sıcaklığında 25 dakika süreyle santrifüjlendi.
- Elde edilen süpernatant atılacak ve pellet 5 mL ultra saf su içinde yeniden

süspanse edildi. Tüp, oda sıcaklığında 5000 dakika boyunca 25 dakika boyunca santrifüjlendi.

- Süpernatant atılacak ve elde edilen pellet, 0.5 mL ultra saf su içinde yeniden süspanse edildi.
- DNA ekstraksiyonu için tüpteki pellet üzerine 1 mL CTAB ekstraksiyon tamponu [% 2 (v / v) setiltrimetil ammoniumbromid; 1.4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA , pH=8], 30 µL proteinaz K (20 mg / mL) ve 5 µL RNase A çözeltisi (10 mg/ mL) eklendi.
- Tüpler 65° C'de 90 dakika boyunca hafifçe karıştırılarak inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında soğutulacak ve 10 dakika boyunca 16,000 g'de santrifüjlendi.
- Tüpten 700 µL süpernatant, 500 µL kloroform / izoamil alkol (24: 1) içeren başka bir tüpte aktarılacak, 30 saniye vortekslendi.
- Daha sonra, oda sıcaklığında 3 dakika boyunca 16.000 g'de santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanttan 600 µL alınarak, 1.5 mL'lik yeni bir tüpte aktarıldı.
- DNA çöktürmesi için izopropanol kullanıldı.
- Tüpteki süpernatant üzerine 1 hacim izopropanol eklenerek, 4°C'da 1 gün bekletildi.
- Ertesi gün, 16.000 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı.
- Pellet üzerinde kalan süpernatant, pelleti kaybetmemeye dikkat ederek dökülerek, 5dk oda sıcaklığında pelletin kuruması beklendi.
- Tüpte kuruyan DNA pelleti, 20µl ddH₂O eklenerek çözülerek ve PZR analizlerine kadar -20 ° C'da saklandı.

3.5. eDNA'nın Miktar ve Saflık Tayini

İzole edilen eDNA agaroz jel elektroforezine yüklenerek, 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Ayrıca NanoDrop Lite Spektrometre, izole edilen eDNA'nın kantitatif ve kalitatif analizleri için kullanıldı. " DsDNA" testi, ana ekrandan seçildi. 1ml nükleaz içermeyen su pipetlenerek cihazın ölçüm kısmına koyuldu. Cihazın kolu dikkatlice indirilerek "BLANK" basıldı. Blank'ın ölçümü tamamlandığında kol kaldırıldı ve

nükleaz içermeyen su, kuru steril bir kağıt mendil kullanılarak silindi. 1ml örnek pipetlenerek ölçüm kısmına koyuldu ve “Measure” seçeneğine basıldı. Konsantrasyon ve saflık oranı (A260/A280) not edildi.

3.6. Metagenomik Analizler

Bu analizin kapsadığı eDNA'nın metagenomik analizleri için gerekli olan yeni nesil dizileme hizmet alımı ile gerçekleşmiştir. Hizmet sağlayıcısından alınan tüm yeni nesil dizileme verileri ilk önce FastQC (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/fastqc/) kullanılarak kalite açısından kontrol edildi. Farklı örneklerden kaynaklanan okumalar, dizileme hizmet sağlayıcısı tarafından her örnek kütüphanesine eklenen örneğe özgü barkod adaptörleri temelinde ayrıldı. Daha sonra Trimmomatic [Bolger et al., 2014] kullanılarak okumalar filtrelendi ve düzeltildi. Bu amaçla i) adaptör diziler silindi, ii) her okumanın sonundaki düşük kaliteli bazlar düzeltildi, iii) ortalama kalite skoru Q<20 okumalar veya düzenleme sonrası 50 nükleotitten kısa olan diziler elimine edildi. Elde edilen dizilerin, mevcut dizi veri tabanları ile benzerlik taramaları BLAST+ programları kullanılarak gerçekleştirildi [Camacho et al., 2009].

Metagenomik analizler Bovo et al. (2018)'a göre yapıldı. Kısaca, NCBI nükleotid veri tabanı ve taksonomi kaynağı referans olarak kullanıldı. Tüm okumalar, BLASTN kullanılarak veri tabanında 30 bp'den fazla hizalama, % 75'ten büyük benzerlik ve 0,01'den küçük e-değeri gerektiren en yakın eşleşmeler ile haritalandı. Eşleştirilen referansların taksonomi kodları daha sonra her bir okumanın organizma grupları (bitkiler, eklembacaklılar, mantarlar, bakteriler ve virüsler) içinde gruplandırılması için kullanıldı ve daha sonra, Cowart et al. (2018) tarafından tanımlanan “En Düşük Ortak Ata” yaklaşımı izlenerek, gruplar varsayılan cins ve türlere ayrıldı. Her bir grupta temsil edilen tür sayısı ve dizi kapsamı ile ilişkileri rarefaksiyon eğrileri kullanılarak tahmin edildi [Colwell et al., 2012].

4. SONUÇLAR

4.1. eDNA İzolasyonu

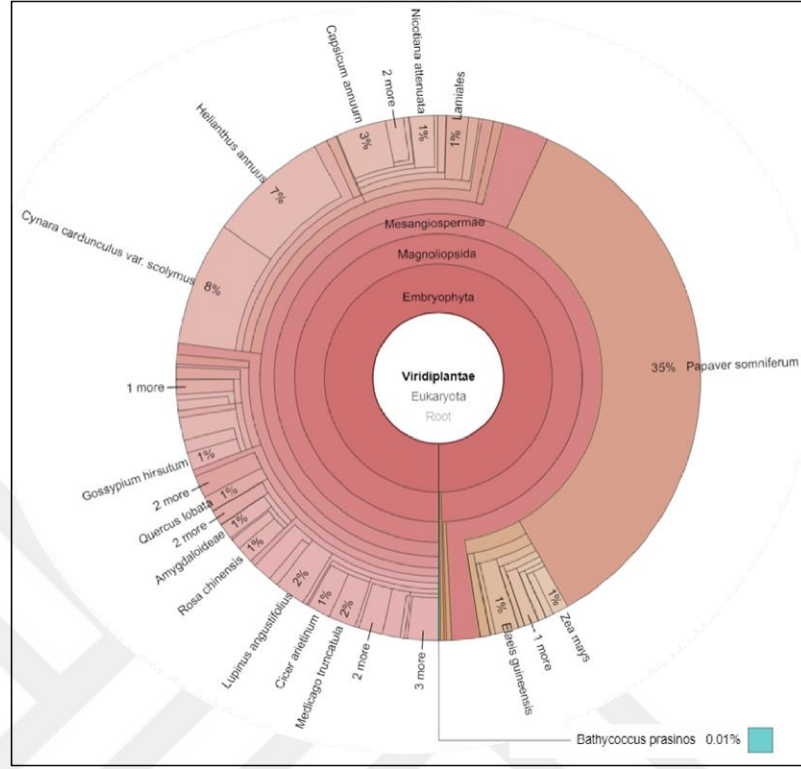
Bal örneklerinin çevresel DNA (eDNA) izolasyonlarına ait miktar ve saflık değerleri Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1: Bal Örneklerinden İzole Edilen eDNA’ların Miktar (ng/μl) ve Saflık (A_{260}/A_{280}) Oranları.

ÖRNEKLER	Miktar (ng/μl)	Saflık (A_{260}/A_{280})
ADA2020	150,3	1,71
GEB2020	161,4	1,85
KAB1	426,1	1,91
KGB2	712,7	1,91
MEB1	100,8	1,94
SOA2	174,9	1,93
YAA1	348,2	1,99

4.2. Metagenomik (Shotgun) Analizler

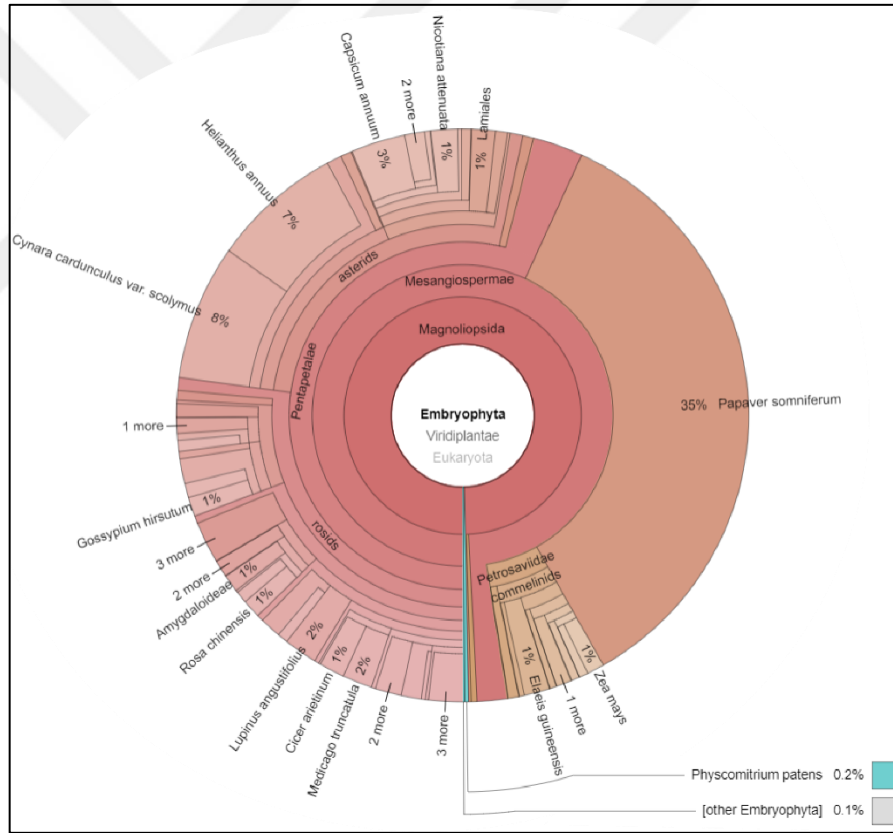
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.1); Viridiplantae sınıflandırmasında (ökaryot kingdomına ait) tespit edilen türler arasında en yaygın görülen *Papaver somniferum* (Haşhaş) (%35), *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* (Enginar) (%8) ve *Helianthus annuus* (Ayçiçeği) (%7) türleri olurken, en az görülen *Bathycoccus prasinus* (Pikoplankton) (%0.01) türü olmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Viridiplantae Sınıflandırılması.

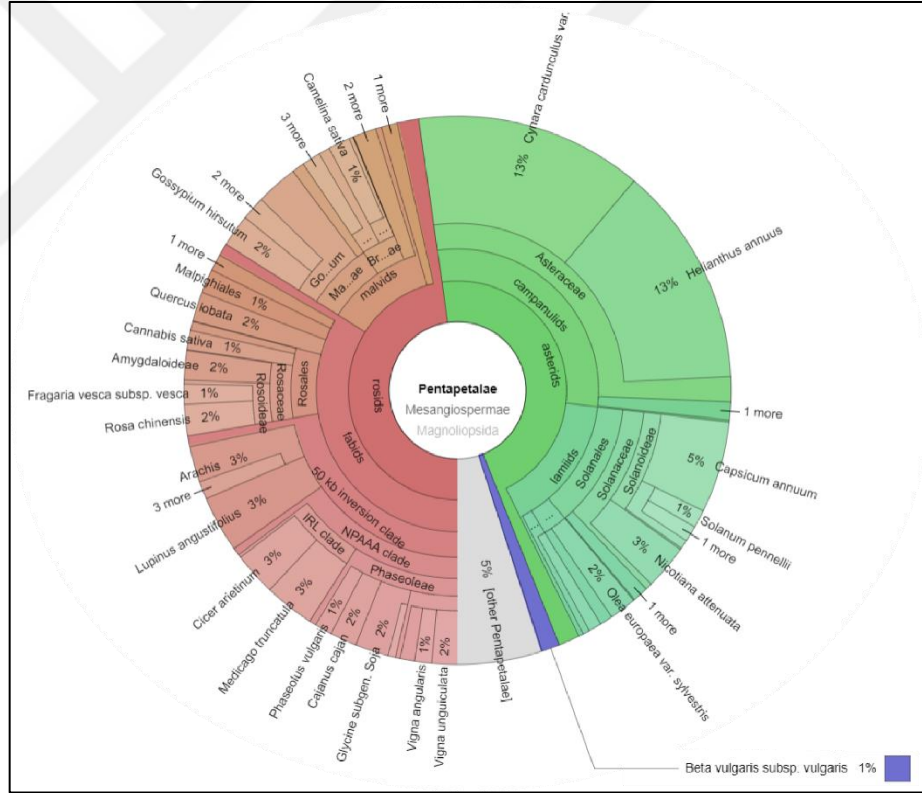
Ayrıca az da olsa %1 oranında *Lamiales* (Ballıbabagiller), *Zea mays* (Mısır), *Elaeis guineensis* (Yağ palmiyesi), *Cicer arietinum* (Nohut), *Rosa chinensis* (Menekşe gülü), *Gossypium hirsutum* (Dağ pamuğu), *Quercus lobata* (Kayıngiller), *Amygdaloideae* (Armut), *Nicotiana attenuata* (Tütün) bitki türleri; %2 oranında *Medicago truncatula* (Varil yoncası), *Lupinus angustifolius* (Mavi acı bakla) bitki türleri ve %3 oranında *Capsicum annuum* (Yıllık biber) bitki türü de tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şeki 4.2); Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen yine *Papaver somniferum* (%35), *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* (%8) ve *Helianthus annuus* (%7) türleri olurken, en az görülen tür *Physcomitrium patens* (%0.2) olmuştur (Şekil 4.2). Ayrıca az da olsa %1 oranında *Lamiales*, *Zea mays*, *Elaeis guineensis*, *Cicer arietinum*, *Rosa chinensis*, *Gossypium hirsutum*, *Amygdaloideae*, *Nicotiana attenuata* bitki türleri; %2 oranında *Medicago truncatula*, *Lupinus angustifolius* bitki türleri ve %3 oranında *Capsicum annuum* bitki türü de tespit edilmiştir.



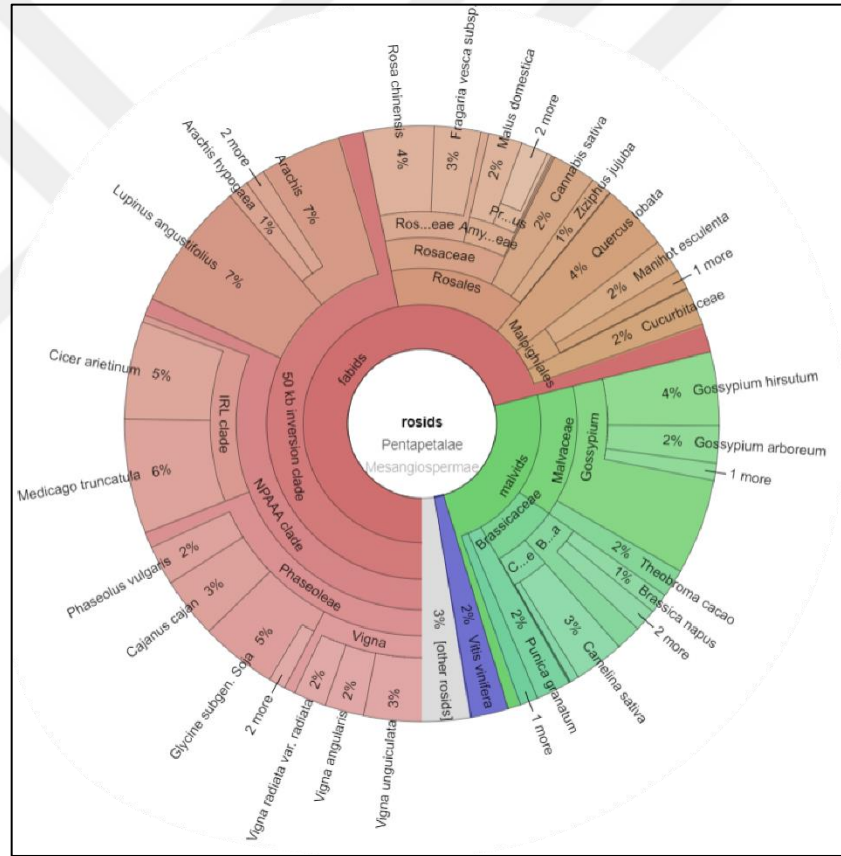
Şekil 4.2: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Embryophyta Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şeki 4.4); Pentapetalae sınıfına ait *Cynara cardunculus* var. *Scolymus*, *Helianthus annuus* (%13) ve *Capsicum annuum* (%5) en yaygın bitki türleri olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca az da olsa %1 oranında *Solanum pennellii*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna angularis*, *Fragaria vesca* subsp. *vesca*, *Camelina sativa* (Ketencik), *Malpighiales* türleri; %2 oranında *Olea europaea* var. *syvestris*, *Vigna unguiculata*, *Glycine* subgen. *Soja*, *Cajanus cajan*, *Rosa chiensis*, *Quercus lobata*, *Amygdaloideae*, *Gossypium hirsutum*; %3 oranında da *Arachis*, *Lupinus angustifolius*, *Cicer arietinum*, *Medicago truncatula* ve *Nicotiana attenuata* türleri gözlemlenmiştir.



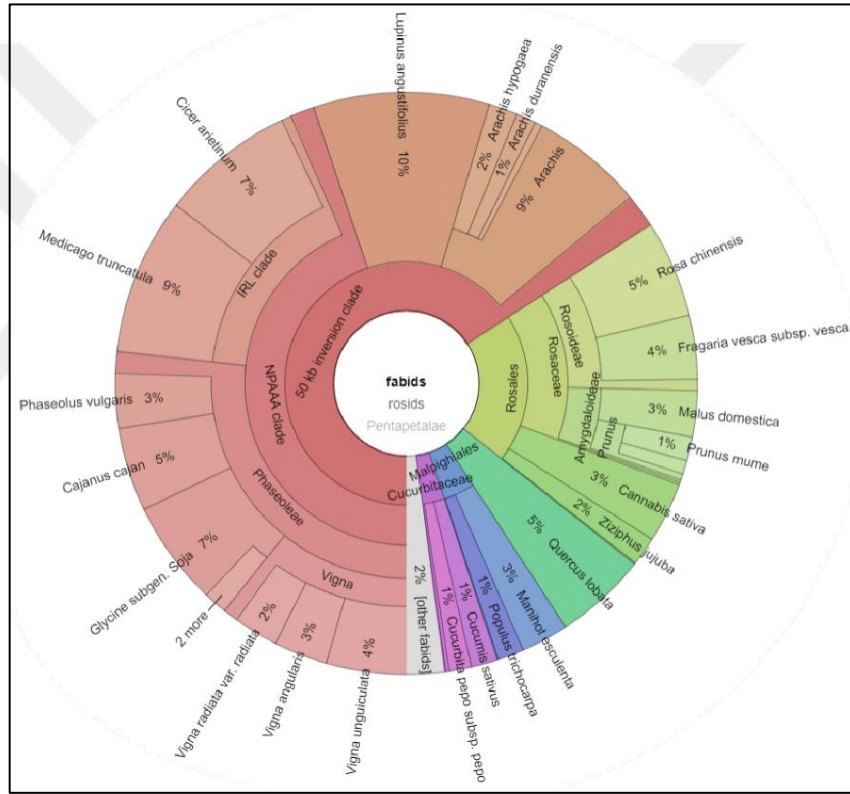
Şekil 4.4: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Pentapetalae Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şekil 4.5); Pentanın alt sınıfı Rosids sonuçlarına göre en yaygın %7 oranında *Arachis* (Yer Fıstığı) ve *Lupinus angustifolius* (Mavi Acı Bakla); %6 oranında *Medicago truncatula* (Varil Yoncası) tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca, önceki sonuçlardan farklı olarak %1 oranında *Ziziphus jujuba*, *Arachis hypogaea*, *Brassica napus* türleri; %2 oranında *Malus domestica*, *Vigna radiata* var. *radiata*, *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Theobroma cacao*, *Gossypium arboreum*, Cucurbitaceae, *Manihot esculenta* bitki türleri de tespit edilmiştir.



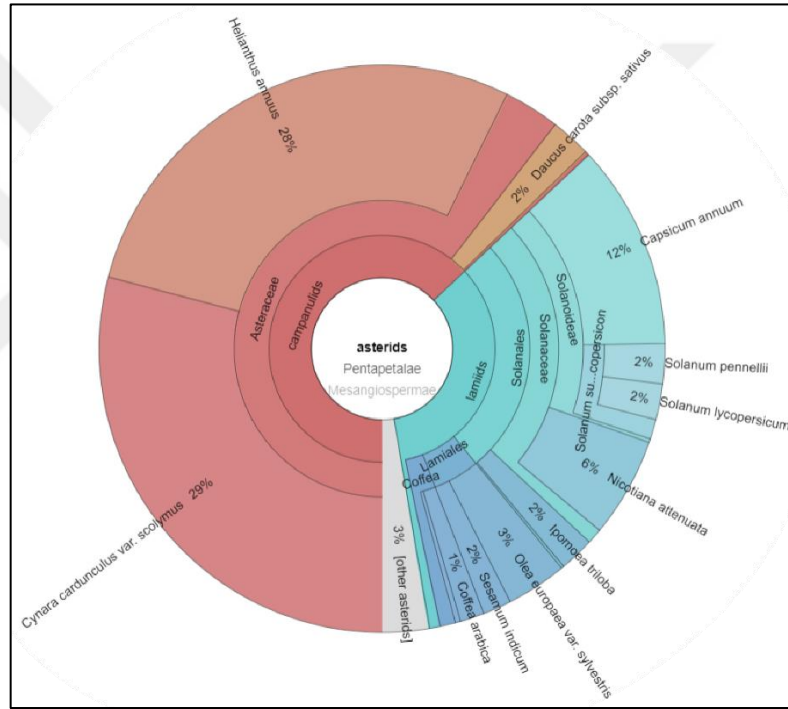
Şekil 4.5: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Rosids Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şekil 4.6); Pentanın alt sınıfı Fabids'te en yaygın %10 *Lupinus angustifolius*, %9 *Arachis* ve *Medicago truncatula* ardından %7 oranında *Cicer arietinum* ve *Glycine subgen. Soja* (Yabani Soya Fasulyesi) türleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Rosids sınıflandırmasından farklı olarak, %1 oranında *Prunus mume*, *Populus trichocarpa*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*, *Arachis duranensis* türleri; %3 oranında *Manihot esculenta* türü gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Fabids Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şekil 4.7); Pentapetalae'nin alt sınıfı Asterids'e ait sonuçlarda; en fazla (%29) *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* ve (%28) *Helianthus annuus* bitki türleri tespit edilirken, en az %1 oranla *Coffea arabica* (Dağ Kahvesi) gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Ayrıca diğer alt sınıflardan farklı olarak, %2 oranında *Daucus carota* subsp. *sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Ipomoea triloba* ve *Sesamum indicum* türleri tespit edilmiştir.



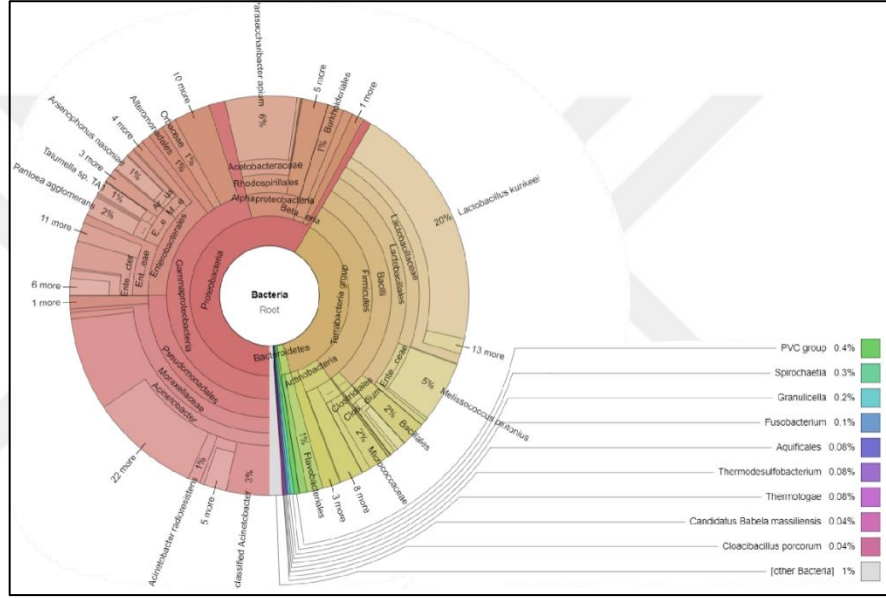
Şekil 4.7: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Asterids Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şekil 4.8); Pentapetalae'nin Malvids alt sınıfında, % 16 *Gossypium hirsutum* ve %11 *Camelina sativa*; en az *Brassica spp.* görülmüştür (%2-4, Şekil 4.8). Ayrıca diğer bitki türlerinden farklı olarak %8 oranında *Punica granatum*, %4 oranında *Gossypium raimondii*, *Citrus sinensis* ve *Arabidopsis thaliana* türleri gözlemlenmiştir.

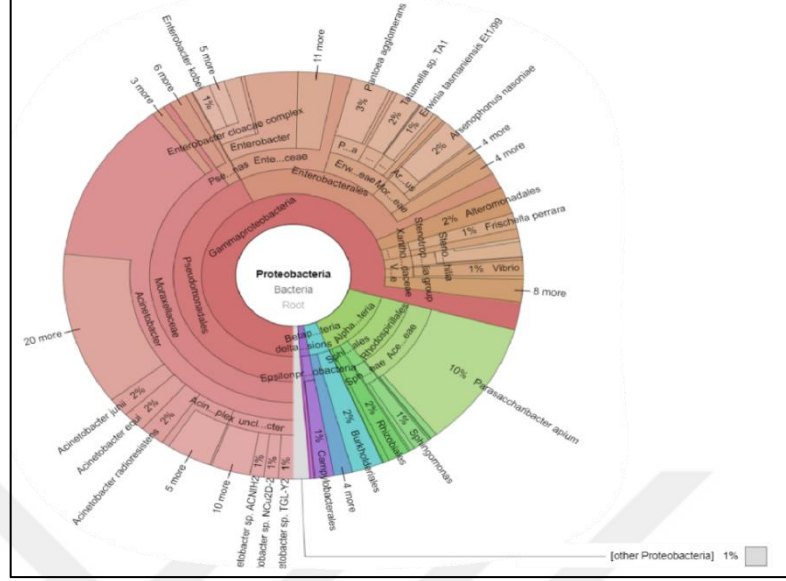


Şekil 4.8: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Metagenom Sonuçlarına göre Malvids Sınıflandırılması.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması incelendiğinde (Şekil 4.9); Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Adaklı bölgesine ait ADA kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domainine göre %20 oranında *Lactobacillus kunkeei* görülmüştür (Şekil 4.9). Proteobacteria kingdoma ait sonuçlarda, en fazla %10 oranla *Parasaccharibacter apium* gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).

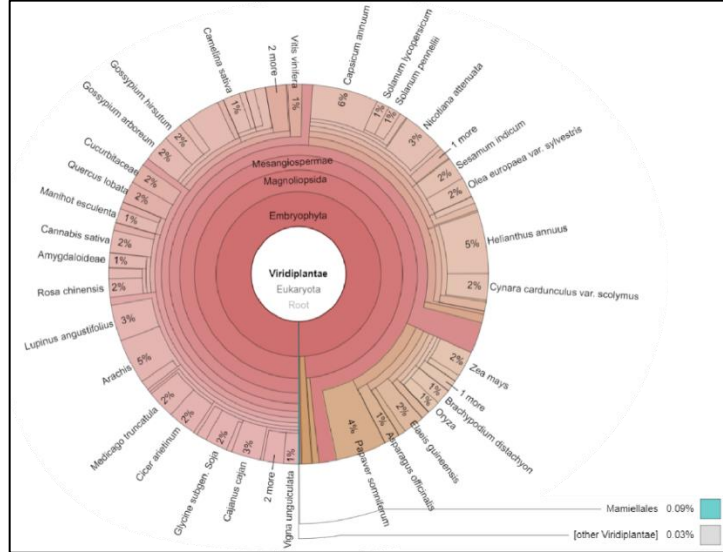


Şekil 4.9: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Bakteri Domaini Sınıflandırılması Sonuçları.



Şekil 4.10: Adaklı İlçesine ait Bal Örneklerinin (ADA 2020) Proteobakteri Sınıflandırılması Sonuçları.

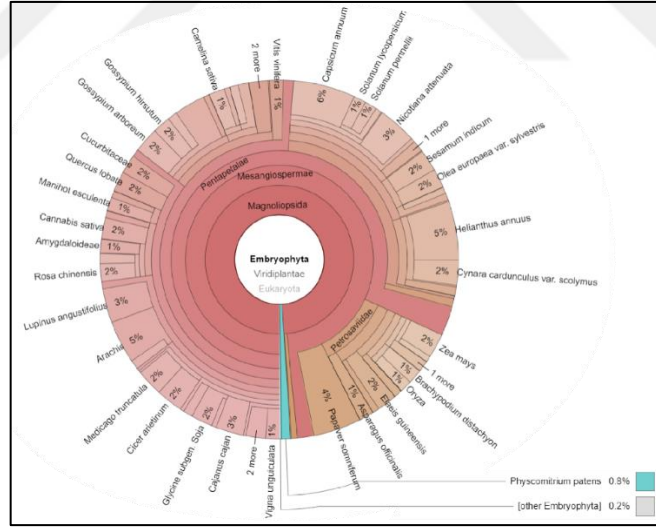
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Genç bölgesine ait GEB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.11); Viridiplantae sınıflandırmasında (ökaryot kingdomna ait) tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %6 *Capsicum annuum*, en az *Mamiellales* %0.09 bitki türleri olmuştur.



Şekil 4.11: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Viridiplantae Sınıflandırılması Sonuçları.

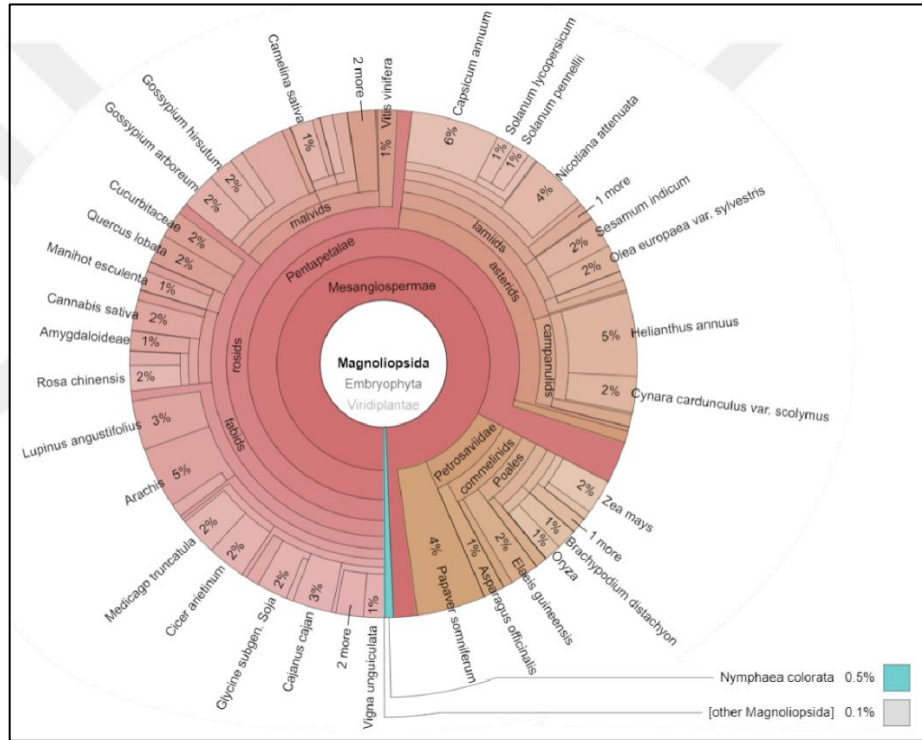
Ayrıca %5 oranında *Helianthus annuus* ve *Arachis*; %4 oranında *Papaver somniferum*; %3 oranında *Nicotiana attenuata*, *Lupinus angustifolius* ve *Cajanus cajan*; %2 oranında *Zea mays*, *Elaeis guineensis*, *Cicer arietinum*, *Rosa chinensis*, *Canabis sativa*, *Gossypium hirsutum*; %1 oranında da ADA bal örneğinden farklı olarak *Oryza*, *Brachypodium distachyon*, *Asparagus officinalis* bitki türleri gözlemlenmiştir. Bu farklı bitki türleri; Genç ilçesine ait bal örneklerini, Adaklı ilçesi örneklerinden ayırt edici bir özellik olarak görülmektedir (Şekil 4.11).

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Genç bölgesine ait GEB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (4.12); Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %6 *Capsicum annuum*, en az görülen tür ise %0.8 *Physcomitrium patens* olmuştur (Şekil 4.12). Ayrıca %5 oranında *Helianthus annuus*, yine %4 oranında *Papaver somniferum*, %2 *Zea mays* ve %1 oranında *Vitis vinifera* türü gözlemlenmiştir.



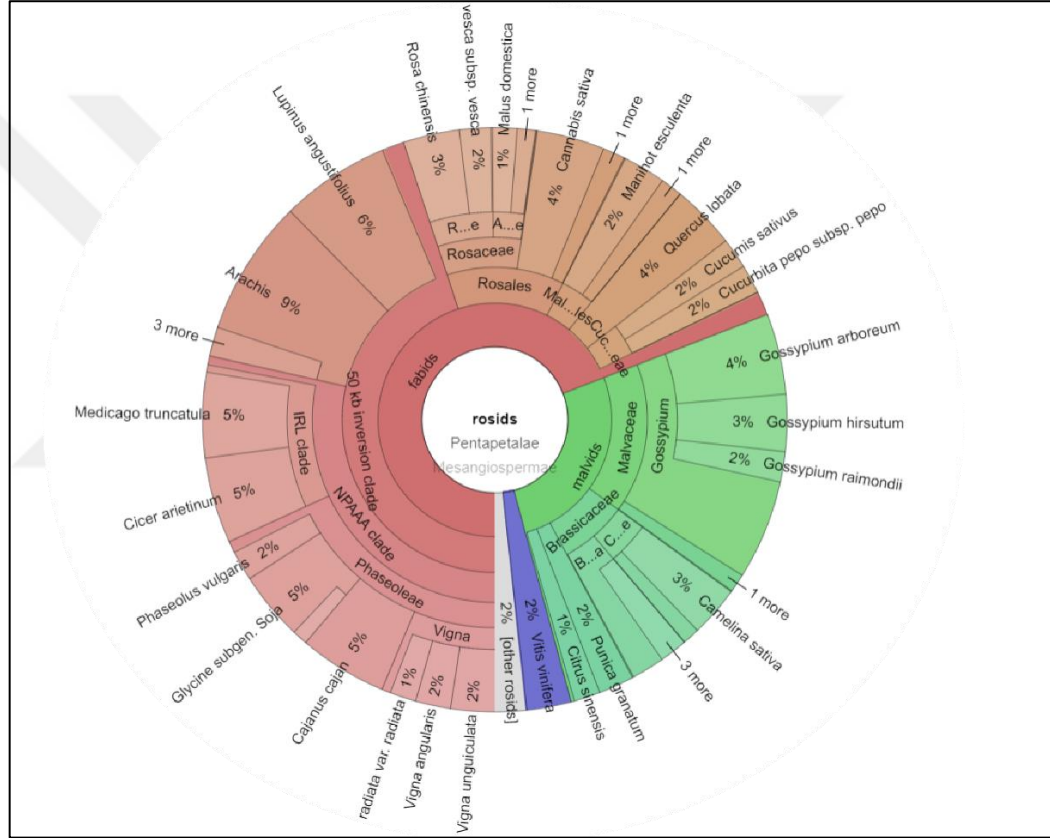
Şekil 4.12: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Embryophyta Sınıflandırılması Sonuçları.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Genç bölgesine ait GEB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (4.13); Magnoliopsida sınıflandırmasında yine en yaygın görülen tür %6 *Capsicum annuum* olurken, en az görülen tür ise %0.5'lik bir oranla *Nymphaea colorata* olmuştur (Şekil 4.13). Ek olarak, %5 oranında *Helianthus annuus* ve *Arachis*, %4 oranında *Nicotiana attenuata* ve *Papaver somniferum* türleri gözlemlenmiştir. %1'lik ve %2'lik oranlara sahip türler Viridiplantae sınıflandırması ile aynı şekilde tespit edilmiştir.



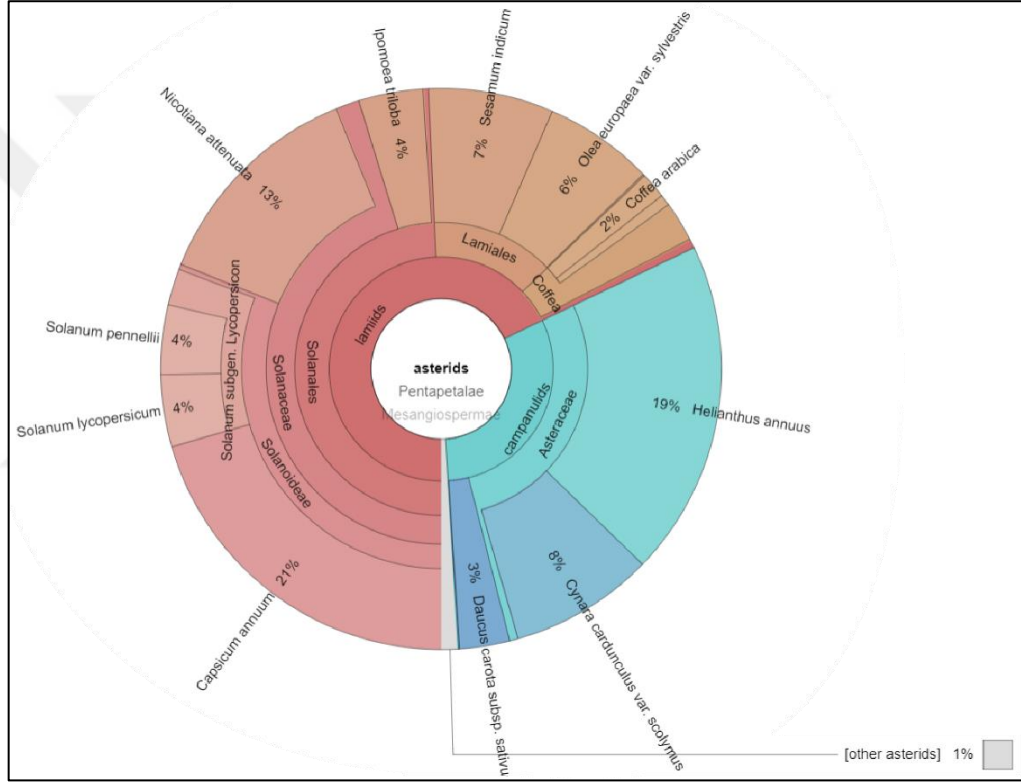
Şekil 4.13: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Magnoliopsida Sınıflandırılması Sonuçları.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Genç bölgesine ait GEB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (4.15); Pentapetalae'nin alt sınıfı Rosids sonuçlarına göre; en yaygın türler %9 *Arachis* sp, %6 *Lupinus angustifolius*; %5 *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum* ve *Glycine* subgen. Soja ve *Cajanus cajan* olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Ayrıca; %2 *Punica granatum* ve *Cucumis sativus* türlerinin gözlemlenmiş olması ayırt edici bitki türleri olduğunu göstermiştir.



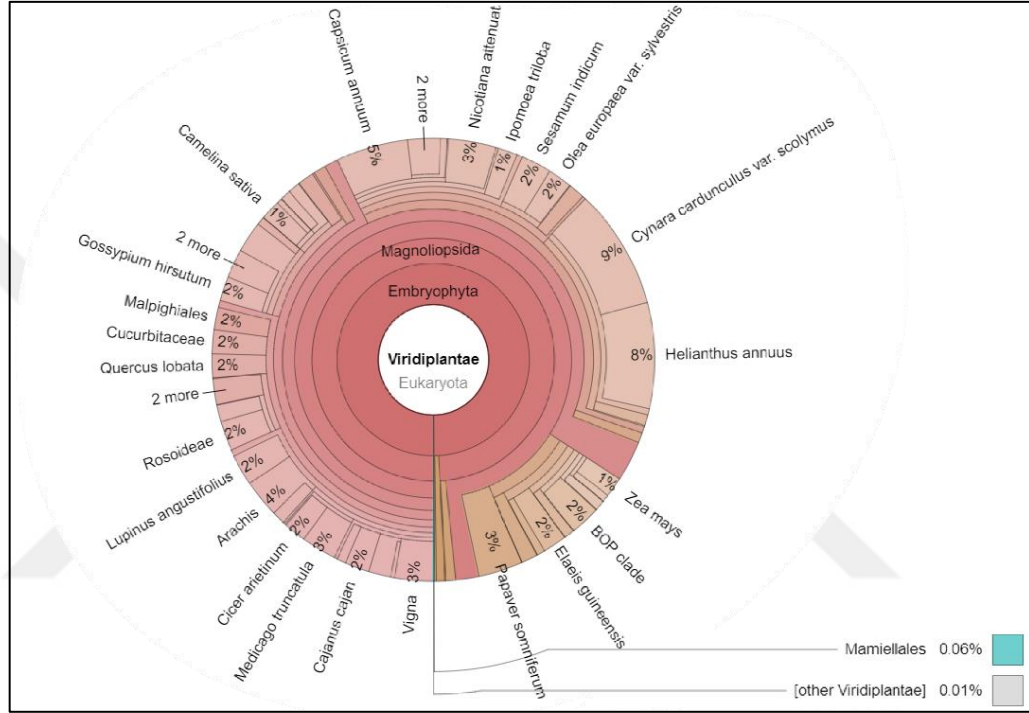
Şekil 4.15: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Rosids Sınıflandırılması Sonuçları.

Bingöl İli sınırları içindeki ilçelerden biri olan Genç bölgesine ait GEB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (4.16); Pentapetalae'nin alt sınıfı Asterids sonuçlarına göre; en yaygın türler %21 *Capsicum annuum*, %19 *Helianthus annuus*, %13 *Nicotiana attenuata* olurken; Malvids sonuçlarına göre en yaygın türler *Gossypium arboreum*, %12 *Gossypium hirsutum*, %10 *Camelina sativa* olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17).



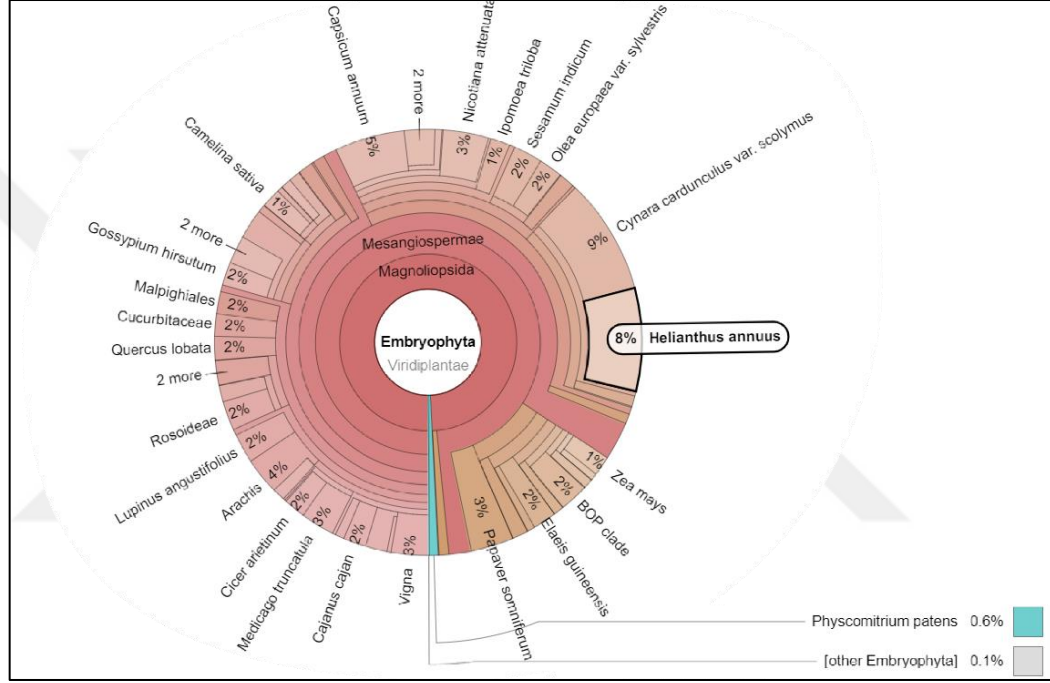
Şekil 4.16: Genç İlçesine ait Bal Örneklerinin (GEB 2020) Asterids Sınıflandırılması Sonuçları.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Karlıova bölgesine ait KAB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.19); Viridiplantae sınıflandırmasında (ökaryot kingdomına ait) tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %9 *Cynara cardunculus* var. *Scolymus*, %8 *Helianthus annuus* türleri olmuştur.



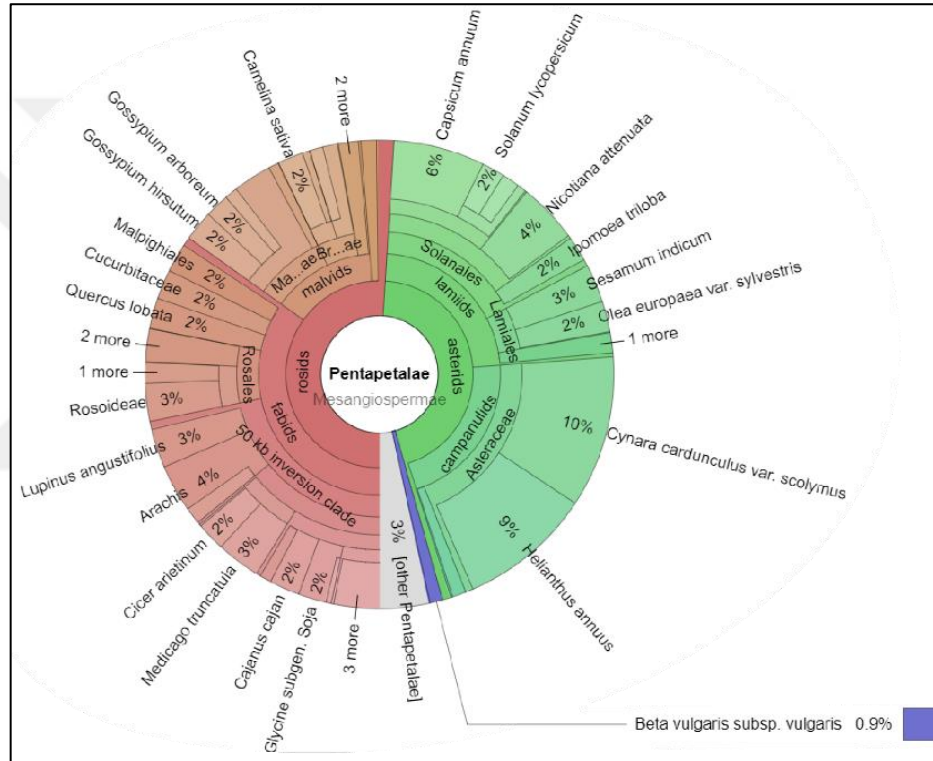
Şekil 4.19: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Viridiplantae Sınıflandırılması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Karlıova bölgesine ait KAB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.20); Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %10 *Cynra cardunculus* var. *scolymus*, %9 *Helianthus annuus* ve %6 *Capsicum annuum* türleri olmuştur (Şekil 4.20). KAB örneğinde %1 *Zea mays* türünün yanı sıra %2 *Rosoideae* türü tespit edilmiştir.

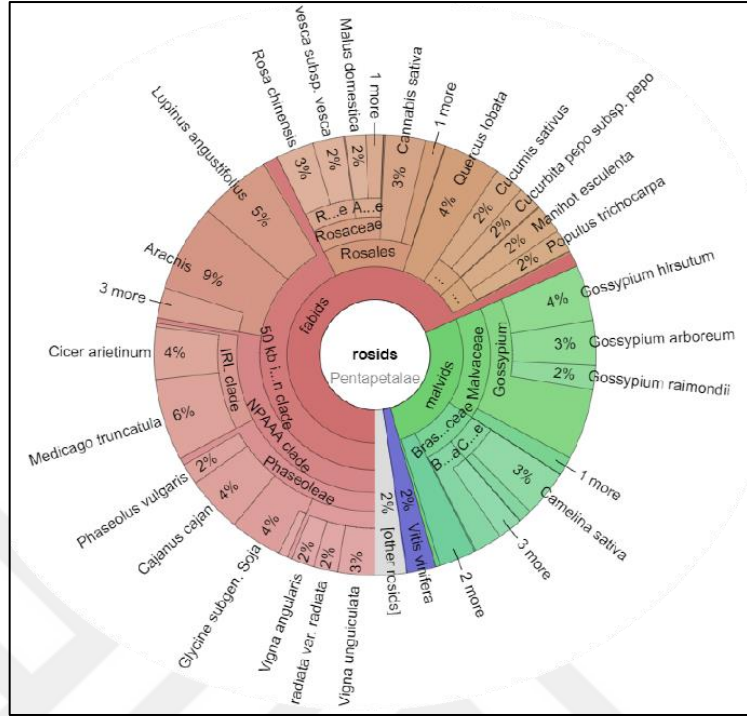


Şekil 4.20: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Embryophyta Sınıflandırılması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Karlıova bölgesine ait KAB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.21); Pentapetalae sınıflandırmasında; en yaygın %10 *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, %9 *Helianthus annuus*, %6 *Capsicum annuum* türleri bulunmuştur. Rosids sonuçlarına göre; %9 *arachis*, %5 *Lupinus angustifolius*; %6 *Medicago truncatula* yaygın olarak görülen türler olmuştur. Ayrıca bu sınıflandırmada %2 *Phaseolus vulgaris* türünde görülmektedir (Şekil 4.22).

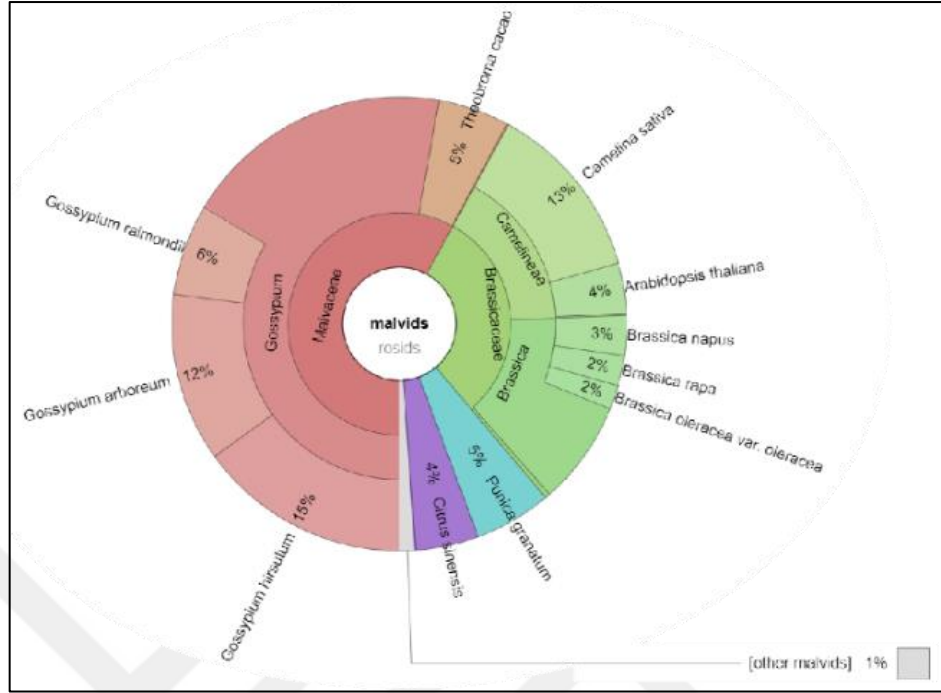


Şekil 4.21: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Pentapetalae Sınıflandırılması.



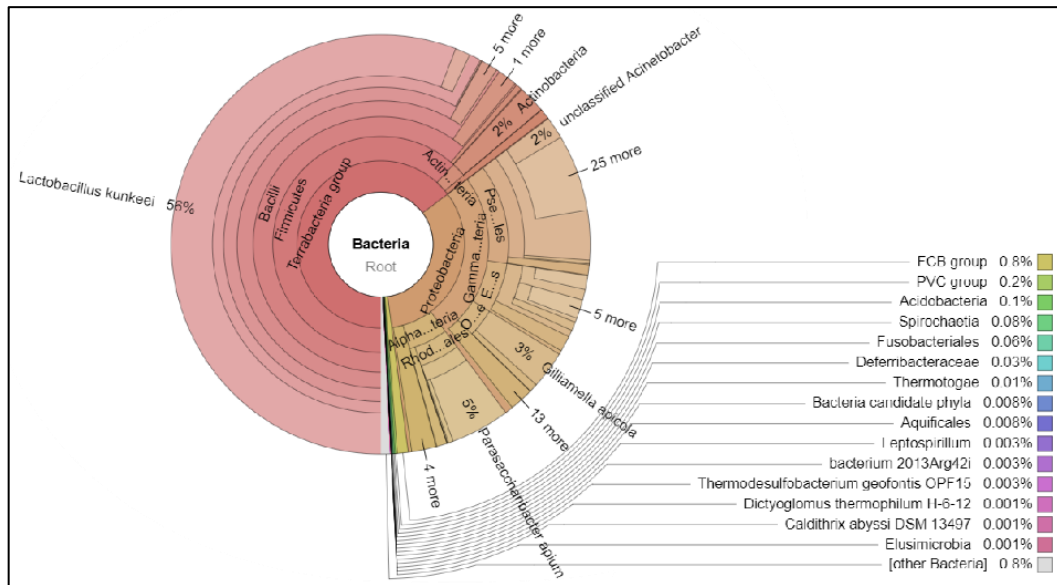
Şekil 4.22: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Rosids Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Karlıova bölgesine ait KAB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde ; Fabids sonuçlarına göre; %13 *Arachis* sp., %8 *Lupinus angustifolius*; %9 *Medicago truncatula*, %7 *Glycine subgen. Soja*, %6 *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan* yaygın görülen türler olurken; diğer sınıflardan farklı olarak yüksek oranda (%6) *Quercus lobata* türü gözlemlenmiştir (Şekil 4.23). Asterids sonuçları kapsamında %23 *Cynara cardunculus* var. *Scolymus*, %21 *Helianthus annuus* yaygın olarak gözlemlenirken (Şekil 4.24); Malvids sonuçlarında ise % 12 *Gossypium arboreum*, %15 *Gossypium hirsutum*, %13 *Camelina sativa* (Şekil 4.25) görülmüştür. Ayrıca Malvids sınıflandırmasında az da olsa *Brassica* spp. gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25: Karlıova İlçesinin Bal Örneklerinin (KAB 2020) Malvids Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Karlıova bölgesine ait KAB kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domaininde en yaygın tür %56 *Lactobacillus kunkei*'dir (Şekil 4.26).

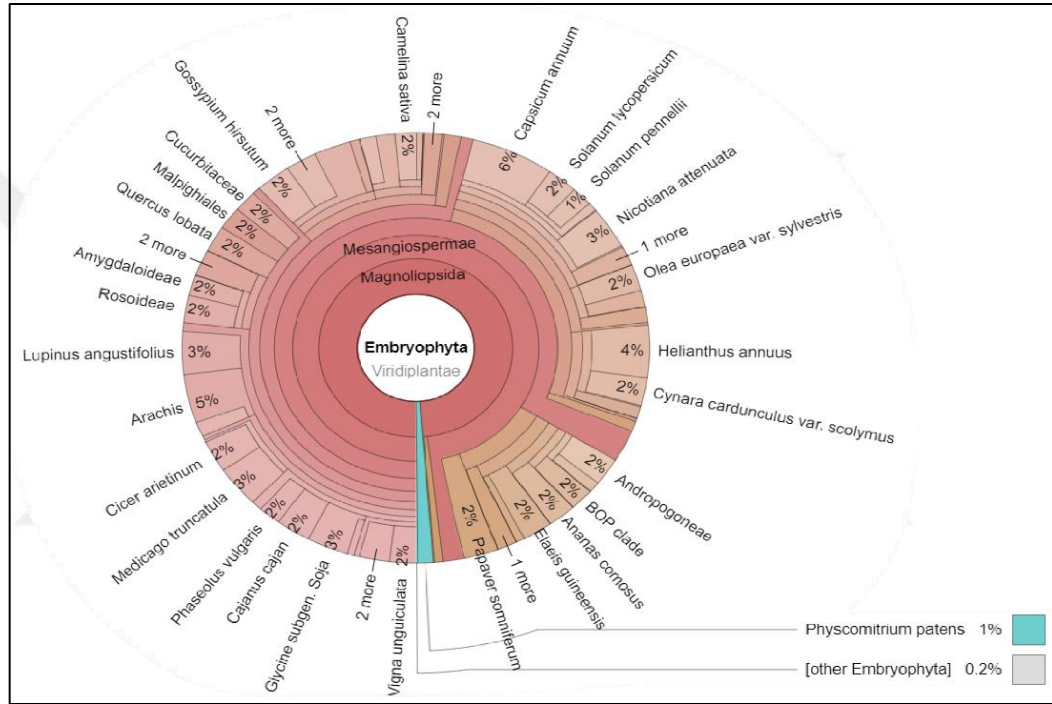


Şekil 4.26: Karlıova İlçesine ait Bal Örneklerinin (KAB 2020) Bakteri Sınıflandırması.

[illegible]

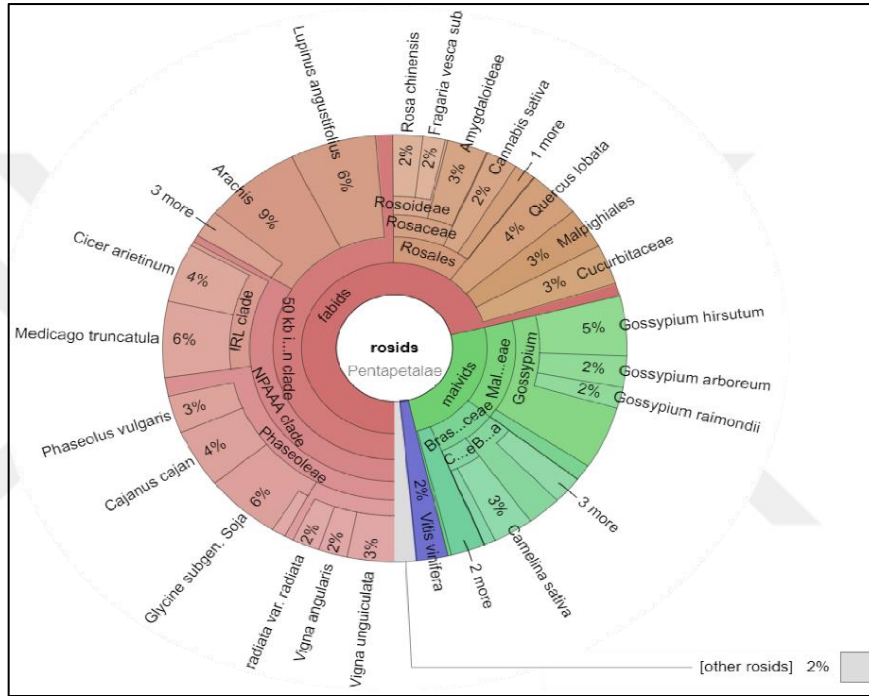
62

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Kığı bölgesine ait KGB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %6 *Capsicum annuum*, %5 *Arachis* sp. ve %4 *Helianthus annuus* türleri olmuştur (Şekil 4.28). KGB örneğinde e %2 *Andropogoneae* ve %2 *Ananas comosus* türleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.28: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Embryophyta Sınıflandırması.

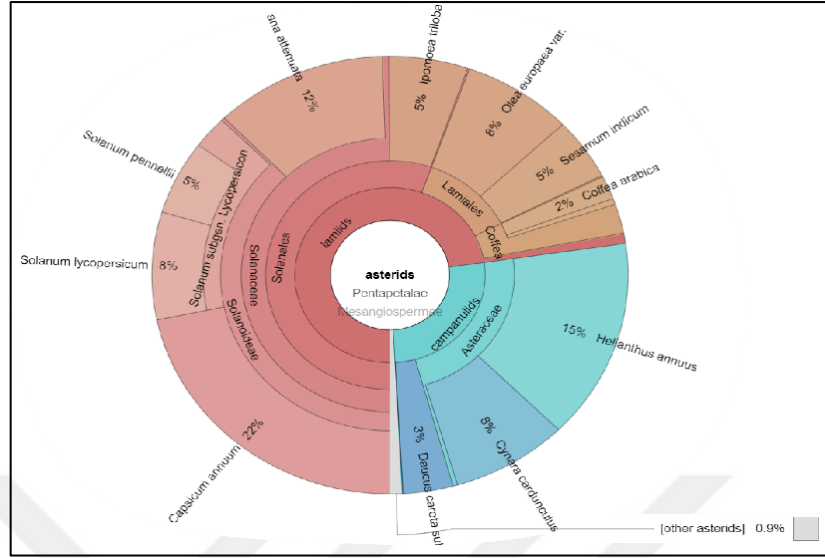
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Kığı bölgesine ait KGB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde Rosids sonuçlarına göre; %9 *Arachis* sp., %6 *Glycine subgen. Soja*, *Lupinus angustifolius* ve *Medicago truncatula* ve %5 *Gossypium* türleri arasında *Gossypium hirsutum* yaygın olarak görülen türler olmuştur (Şekil 4.29).



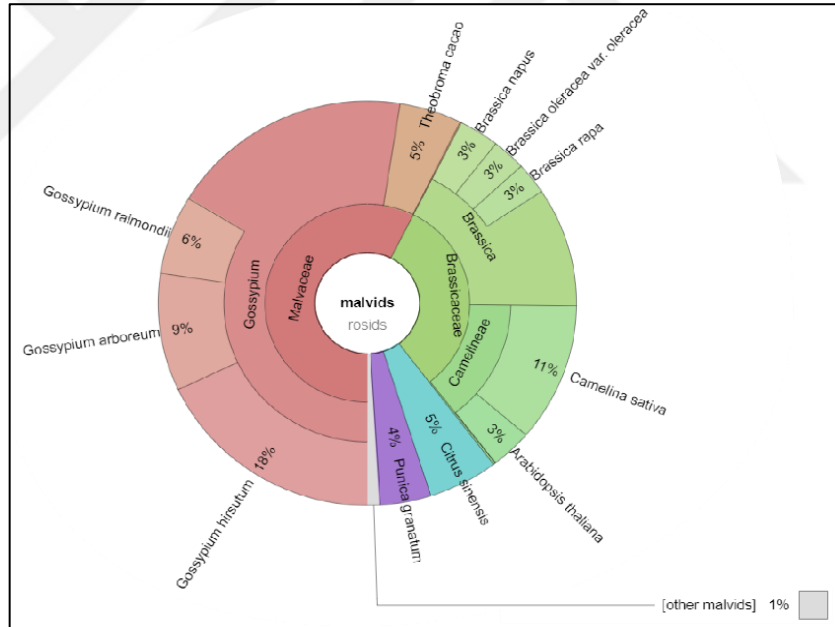
Şekil 4.29: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Rosids Sınıflandırması.

Brassica spp. (%3) ve *Punica granatum* (%4) türü gözlemlenmiştir.

Şekil 4.30: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Fabids Sınıflandırması.

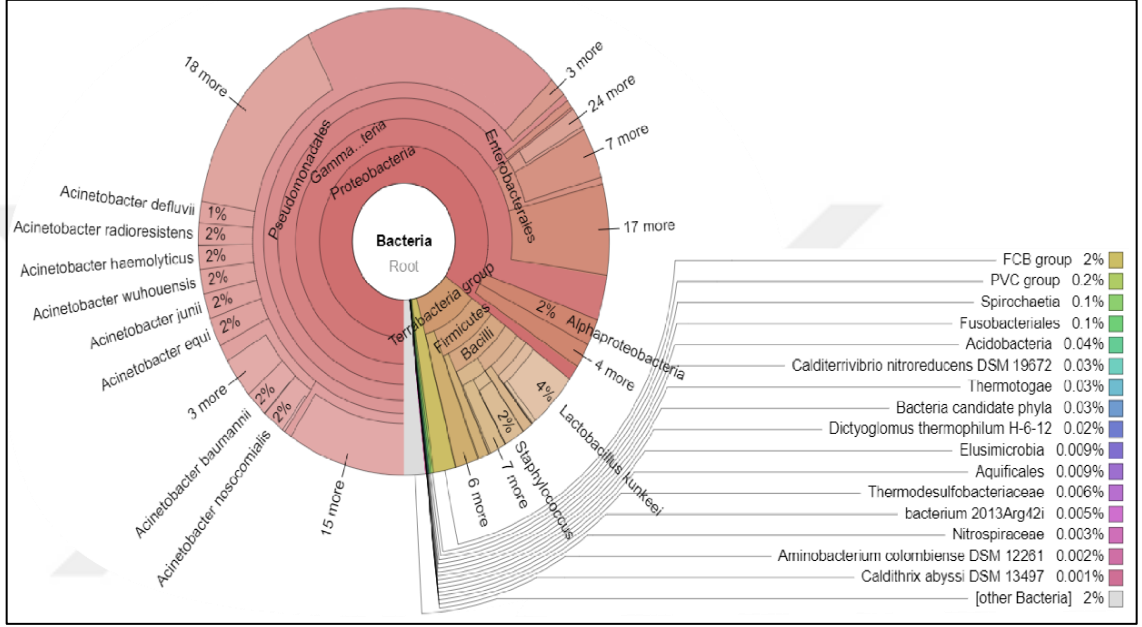


Şekil 4.31: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Asterids Sınıflandırması.



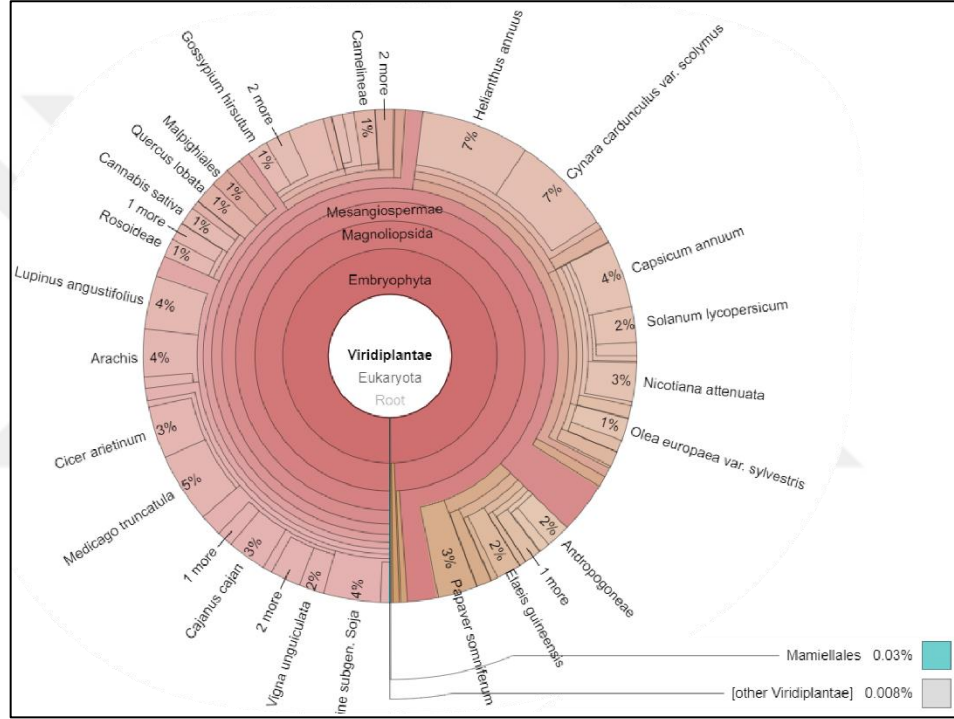
Şekil 4.32: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Malvids Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Kığılı bölgesine ait KGB kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domaininde %4 *Lactobacillus kumkeei*, %2 Alphaproteobacteria, Acinetobacter spp. ve Staphylococcus türleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.33).



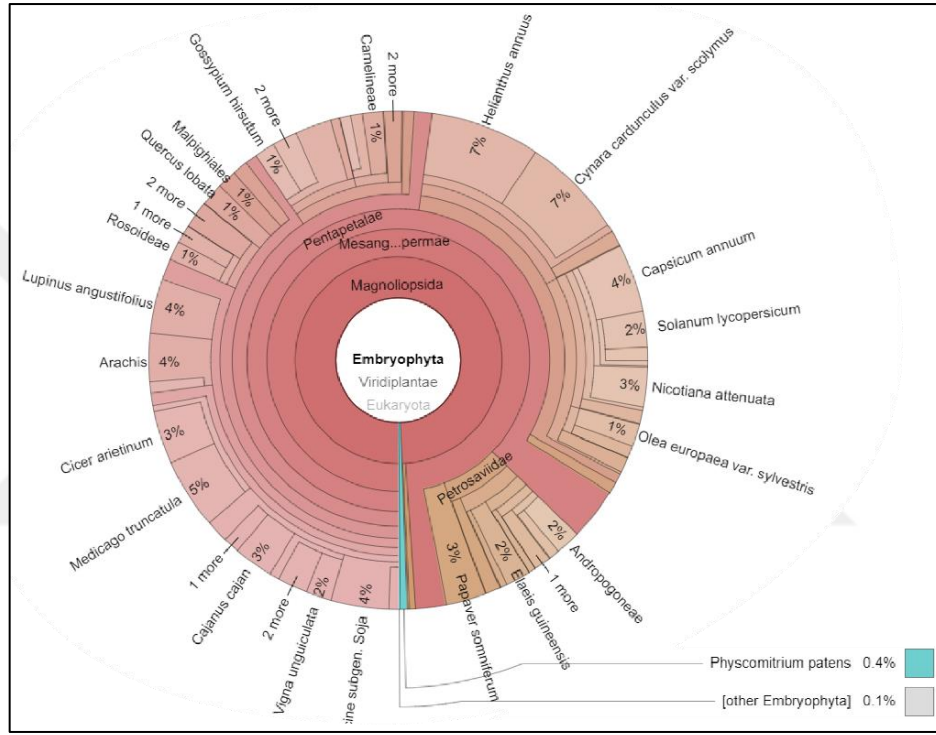
Şekil 4.33: Kığı İlçesine ait Bal Örneklerinin (KGB 2020) Bakteri Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Merkez bölgesine ait MEA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; Viridiplantae sınıflandırmasında (ökaryot kingdomına ait) tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %7 *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* ve *Helianthus annuus* türleri olmuştur (Şekil 4.34). Bu örneklerde de KGB örneğinde olduğu gibi %2 *Andropogoneae* türleri gözlemlenmiştir. Bu tür, Merkez ve Kığı bölgeleri için ayırt edici bir nitelik taşımaktadır.



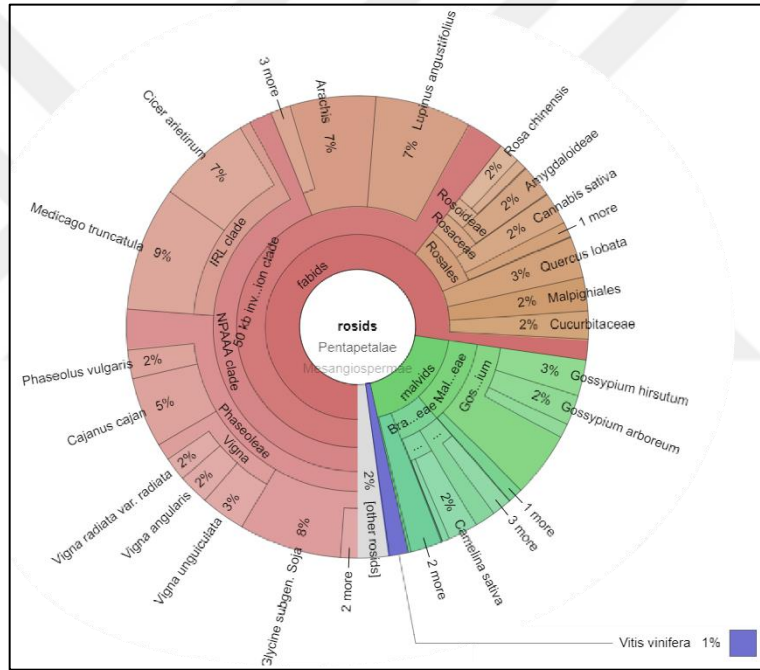
Şekil 4.34: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Viridiplantae Sınıflandırılması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Merkez bölgesine ait MEA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması sonuçları incelendiğinde; Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %7 *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* ve *Helianthus annuus* türleri olmuştur (Şekil 4.35). MEA bal örneklerinde %1 *Camelineae* türünün az da olsa tespit edilmiştir.

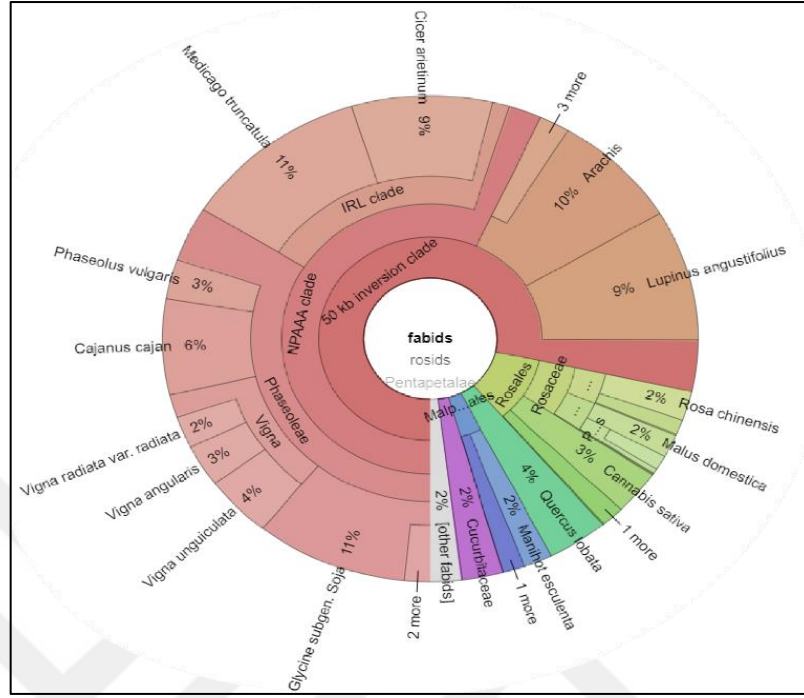


Şekil 4.35: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Embryophyta Sınıflandırması.

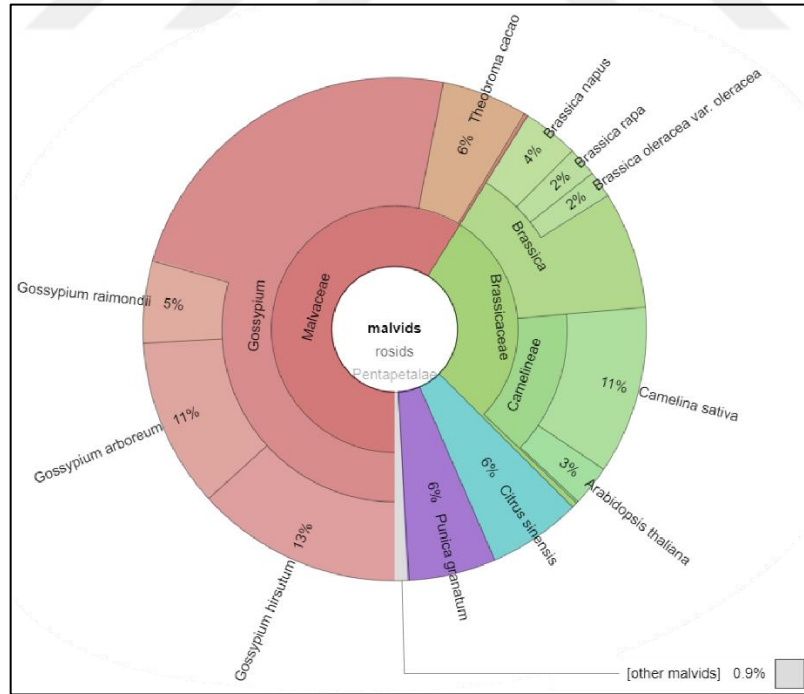
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Merkez bölgesine ait MEA kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırılması sonuçları incelendiğinde; Rosids sonuçlarına göre; %9 *Medicago truncatula*, %8 *Glycine subgen. Soja*, %7 *Lupinus angustifolius*, *Arachis sp.* ve *Cicer arietinum* türleri yaygın olarak görülen türler olmuştur (Şekil 4.36). Fabids sonuçlarına göre; %10 *Arachis sp.*, %9 *Lupinus angustifolius* ve *Cicer arietinum*, %11 *Glycine subgen. Soja* ve *Medicago truncatula* yaygın görülen türler olurken (Şekil 4.37); Malvids sonuçlarında ise % 11 *Gossypium arboreum*, %13 *Gossypium hirsutum*, %11 *Camelina sativa* türleri yaygın olarak görülmüştür. (Şekil 4.38).



Şekil 4.36.: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Rosids Sınıflandırması.

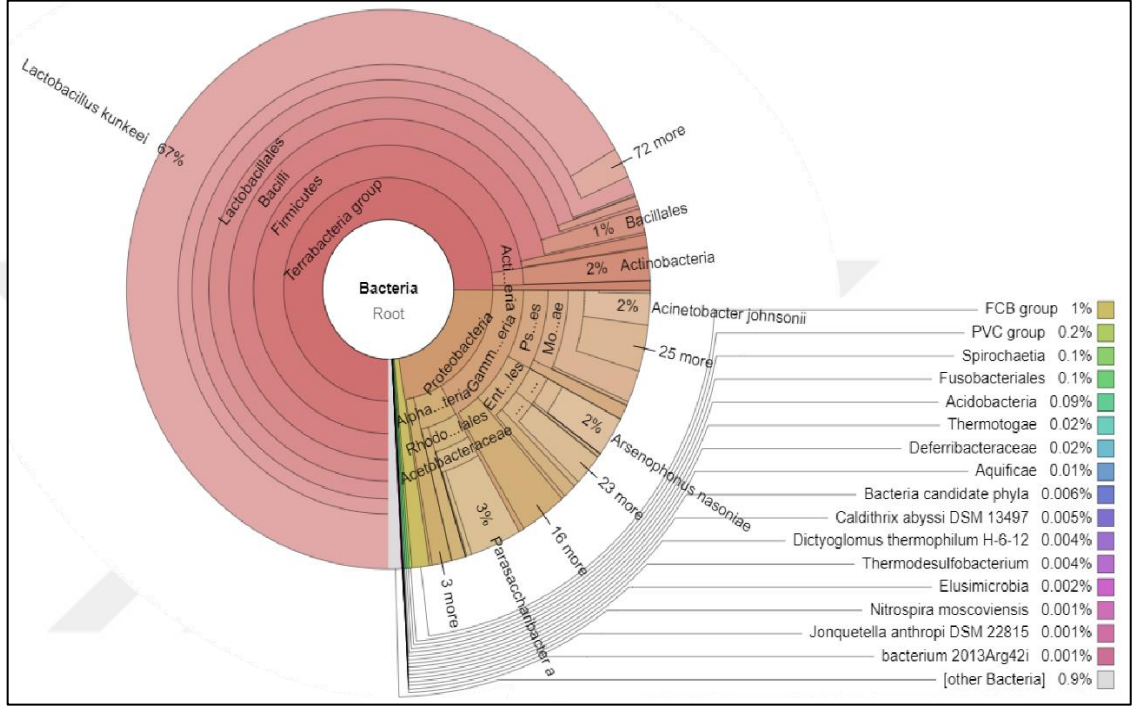


Şekil 4.37.: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Fabids Sınıflandırması.



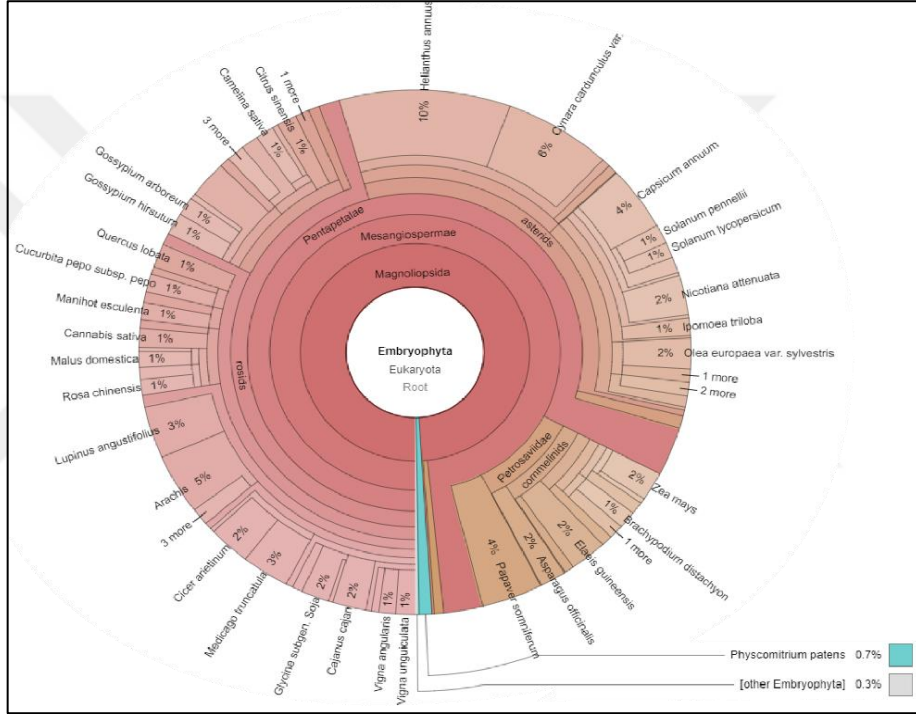
Şekil 4.38.: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Malvids Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Merkez bölgesine ait MEA kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domaininde %67 *Lactobacillus kumkei* türü gözlemlenmiştir (Şekil 4.39.).



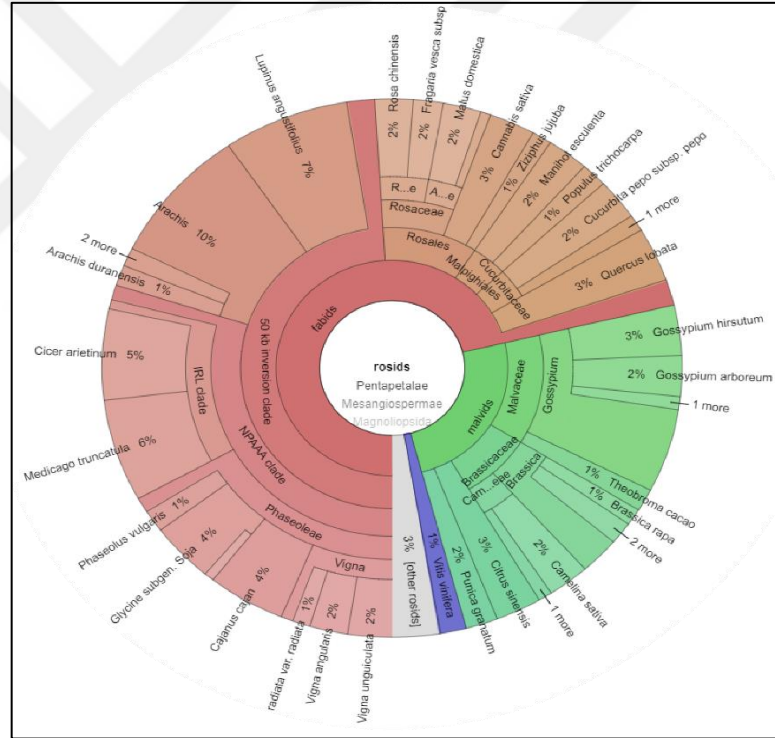
Şekil 4.39: Merkez İlçesine ait Bal Örneklerinin (MEA 2020) Bakteri Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Solhan bölgesine ait SOC kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; Embryophyta sınıflandırmasında tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %6 *Cynara cardunculus* var. *Scolymus* ve %10 *Helianthus annuus* türleri olmuştur (Şekil 4.40). Ayrıca, SOC bal örneklerinde de GEB örneğinde olduğu gibi %1 *Brachypodium distachyon* türünün olması, bu türün GEB ve SOC bölgeleri açısından ayırt edici olduğunu göstermiştir.

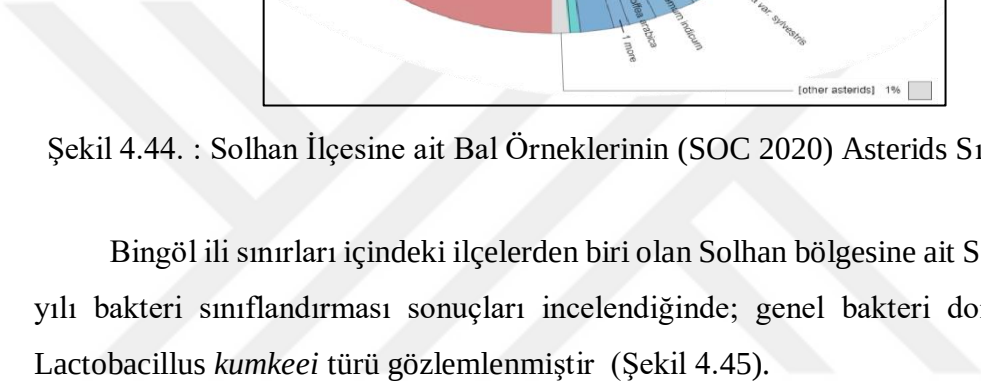


Şekil 4.40: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020) Embryophyta Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Solhan bölgesine ait SOC kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; Rosids sonuçlarına göre; %6 *Medicago truncatula*, %7 *Lupinus angustifolius*, %10 *Arachis* türleri yaygın olarak görülen türler olmuştur (Şekil 4.41). Fabids sonuçlarına göre; %15 *Arachis spp.*, %10 *Lupinus angustifolius* ve %8 *Cicer arietinum*, %9 *Medicago truncatula* yaygın görülen türler olurken (Şekil 4.42); Malvids sonuçlarında % 10 *Gossypium arboreum*, *Camelina sativa* ve *Citrus sinensis*, %12 *Gossypium hirsutum* türleri (Şekil 4.43); Asterids sonuçlarında ise %30 *Helianthus annuus*, %19 *Cynara cardunculus var. scolymus*, %12 *Capsicum annuum* türleri yaygın olarak görülmüştür (Şekil 4.44).



Şekil 4.41: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020) Rosids Sınıflandırması.



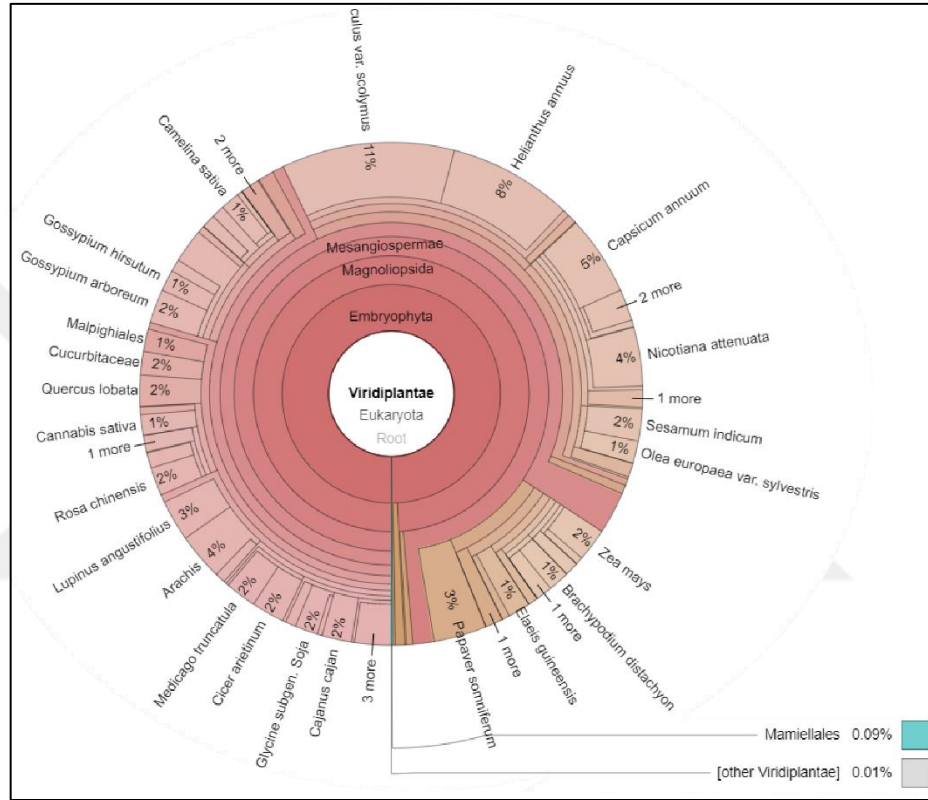
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Solhan bölgesine ait SOC kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domaininde %46 *Lactobacillus kumkeei* türü gözlemlenmiştir (Şekil 4.45).

Şekil 4.45: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020) Bakteri Sınıflandırması.



Şekil 4.45: Solhan İlçesine ait Bal Örneklerinin (SOC 2020) Bakteri Sınıflandırması.

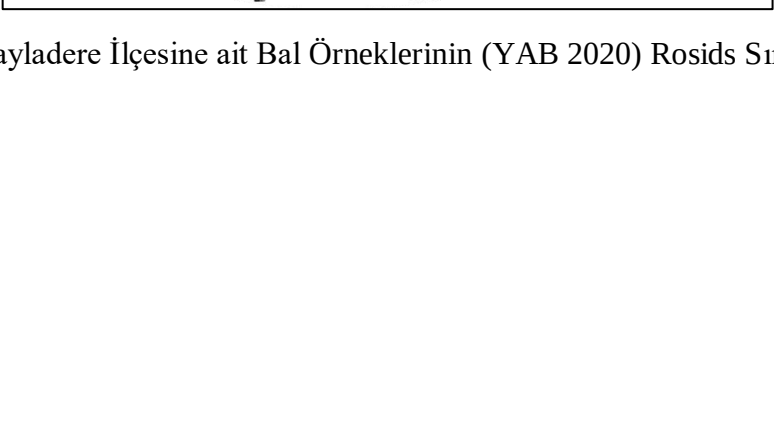
Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Yayladere bölgesine ait YAB kodlu 2020 yılı bitki sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; Viridiplantae sınıflandırmasında (ökaryot kingdomına ait) tespit edilen türler arasında en yaygın görülen %11 *Cynara cardunculus* var. *scolymus* ve %8 *Helianthus annuus* türleri olmuştur (Şekil 4.46).

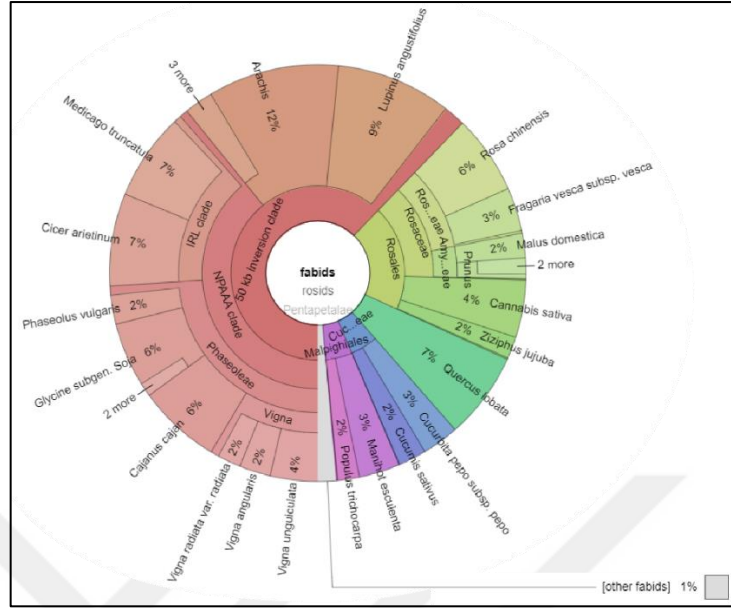


Şekil 4.46: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) Viridiplantae Sınıflandırması.

A pie chart illustrating the distribution of plant families in the studied flora. The chart is divided into 15 segments of various colors, each labeled with a plant family name and its percentage. The segments are: Arachis (9%), Lupinus angustifolius (6%), Rosa chinensis (4%), Rosa vesca subsp. vesca (2%), Malus domestica (1%), Cornus sativa (3%), Quercus lobata (5%), Cucurbita pepo subsp. pepo (2%), Cucumis sativus (2%), Manihot esculenta (1 more), Rosales (2%), Rosaceae (1 more), and Rosaceae (1 more).

Plant Family	Percentage
Arachis	9%
Lupinus angustifolius	6%
Rosa chinensis	4%
Rosa vesca subsp. vesca	2%
Malus domestica	1%
Cornus sativa	3%
Quercus lobata	5%
Cucurbita pepo subsp. pepo	2%
Cucumis sativus	2%
Manihot esculenta	1 more
Rosales	2%
Rosaceae	1 more
Rosaceae	1 more



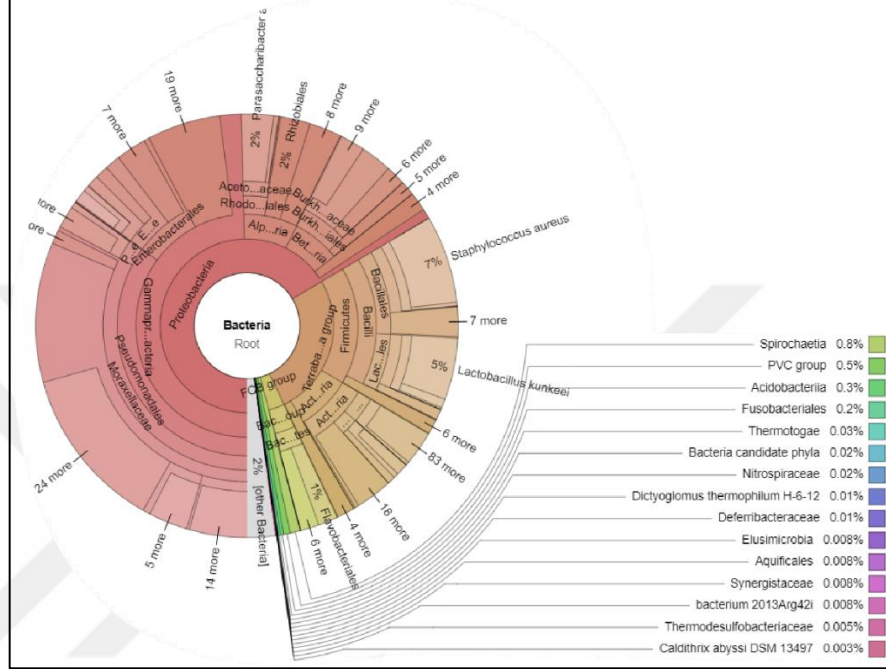


Şekil 4.48: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) Fabids Sınıflandırması.



Şekil 4.49: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) Malvids Sınıflandırması.

Bingöl ili sınırları içindeki ilçelerden biri olan Yayladere bölgesine ait YAB kodlu 2020 yılı bakteri sınıflandırması sonuçları incelendiğinde; genel bakteri domaininde %5 *Lactobacillus kumkei* ve %7 *Staphylococcus aureus* türleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.50).



Şekil 4.50: Yayladere İlçesine ait Bal Örneklerinin (YAB 2020) Bakteri Sınıflandırması.

5. TARTIŞMA

Bingöl ilinin farklı lokasyonlarından toplanmış çiçek balı örneklerinden elde edilen DNA'ların metagenomik analiz yöntemleri kullanılarak, bal örneklerinin içerdikleri bitki ve bakteri türlerinin taksonomik sınıflandırılmasına yönelik yapılan bu tez çalışmasında Shotgun dizileme yöntemi kullanılmıştır ve böylece çevresel bal örneklerinin mikrobiyal çeşitliliği ve taksonomik sınıflandırması yapılmıştır.

Shotgun dizileme yöntemiyle, mikrobiyal toplulukların taksonomik bileşimi ve fonksiyonel potansiyeli profillenmiş olup, tüm genom dizilerini elde etmek için kullanılmıştır. Bu bağlamda, bal örneklerinin eDNA'sı , koloni ekosisteminin ve bal arılarının besinlerini aldıkları yerlerin genel bir analizini elde etmek için kullanılmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar kapsamında; 2020 yılında Bingöl ilinin çoğu ilçesi ve bölgesinden hasadı yapılan bal örneklerinin tek bir bitki türü içermediği böylece elde edilen bal örneklerinin polifloral olduğu ortaya çıkmıştır. Adaklı ilçesinden alınan 2020 ADA bal örneğinin bitki sınıflandırmasına göre *Papaver somniferum* en yaygın bitki türü olurken, en az görülen *Bathycoccus prasinus* türü olmuştur. Bingöl ilinin sadece Adaklı ilçesinden toplanan bal örneklerinde *Papaver somniferum* türüne yüksek oranda rastlanmıştır ve diğer ilçelerden elde edilen örneklerde yüksek oranlarda görülmemiştir. Bu durum bahsi geçen bu ilçelerdeki bitki florası ve çeşitliliğindeki farklılıklar olduğunu göstermektedir ve bu türün sadece Adaklı ilçesinde yaygın gözlemlenmesi, bitkisel flora açısından ayırt edilebilir bir sonuç sunmaktadır. *Helianthus annuus* bitki türü tüm ilçelerden toplanan bal örneklerinde gözlemlenmiş olup, en yaygın olarak Solhan ilçesinden alınan bal örneğinde tespit edilmiş olup, ardından Karlıova, Yayladere ve Merkez (2020 KAB, 2020 YAB ve 2020 MEA) bal örneklerinde de yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Bu tür tespit edildiği Solhan , Karlıova , Yayladere ve Merkez ilçeleri için diğer ilçelere kıyasla ayırt edici bir tür niteliği taşımaktadır. *Cynra cardunculus var. scolymus* bitki türü tüm ilçelerden toplanan bal örneklerinde gözlemlenmiş olsa da 2020 YAB, 2020 KAB ve 2020 MEA örneklerinde yüksek oranlarda tespit edilmiştir ve bu üç ilçe kapsamında da en yaygın Yayladere ilçesinde olduğu gözlemlenmiştir.

Capsicum annuum türü de Genç ve Kığı ilçelerinden toplanan bal örnekleri için bitkisel flora bakımından ayırt edici bir bitki türü olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca, diğer ilçelerden farklı olarak Kığı ilçesinden elde edilen bal örneklerinde *Quercus lobata*, *Vigna unguiculata*, *Gossypium raimondii*, *Citrus sinensis* ve *Theobroma cacao* türlerinin de yaygın olarak görülmesi bitkisel çeşitlilik bakımından bu bölgenin ön plana çıktığını göstermiştir. Bu bağlamda, 2020 yılına ait bal örneklerinden en fazla bitki türü çeşitliliğine (*Capsicum annuum*, *Arachis*, *Helianthus annuus*, *Lupinus angustifolius*, *Medicago truncatula*, *Glycine subgen. soja*, *Nicotiana attenuata*, *Gossypium hirsutum*, *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*, *Gossypium arboreum*, *Camelina sativa*, *Quercus lobata*, *Vigna unguiculata*, *Gossypium raimondii*, *Citrus sinensis* ve *Theobroma cacao*) Kığı ilçesine göre kodlanan 2020 KGB örneğinde rastlanmıştır. Böylece Bingöl ilinin Kığı ilçesi için bitkisel flora açısından daha zengin ve diğer ilçelere kıyasla farklı olduğunu belirtmek mümkündür. 2020 yılı bal örneklerinin sonuçları bitki çeşitliliği açısından değerlendirildiğinde, bu çeşitlilik yağış verilerinin, iklim ve sıcaklık gibi koşulların arıların yaşamı ve bal üretimi açısından uygun olmasıyla açıklanabilmektedir.

Çalışmadan elde edilen mikrobiyal sınıflandırma verilerine göre; fruktozu parçalayarak laktik asit üretimini sağlayan, antibakteriyel ve antifungal özelliği sayesinde kolonilerde zararlı bakterilerin ve mantarların üremesine engel olan *Lactobacillus kunkeei* bakterileri tüm ilçelerden hasat edilen bal örneklerinde gözlemlenmiş olup, en yoğun 2020 MEA örneğinde tespit edilmiştir. Bu bağlamda, Merkez ilçesinden elde edilen bal veriminin ve kalitesinin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür. Bir diğer probiyotik olan *Parasaccharibacter apium* bakterisi tüm ilçelerden alınan bal örneklerinde gözlemlense de en yoğun 2020 GEB ve 2020 SOC örneklerinde tespit edilmiştir. Özellikle arıların üremelerini ve gelişimlerini olumsuz etkileyerek bal verimliliğini ve bal üretimini azaltan, bu bağlamda da arıcılık sektöründe büyük ekonomik kayıplara sebep olabilen Nosema hastalığını önlemesi açısından bal içeriklerinin *Lactobacillus kunkeei* kadar *Parasaccharibacter apium* bakterisini içermesi de büyük önem teşkil etmektedir. Genç ve Solhan ilçelerine ait balların her iki probiyotik bakteriyi yüksek oranda içermesi, diğer bal örneklerine kıyasla bu balların kalitesinin daha fazla olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, 2020 yılına ait bal örneklerinden en fazla mikrobiyel çeşitliliğe (*Lactobacillus kunkeei*, *Parasaccharibacter apium*, *Gilliamella apicola*, *Kosakonia cowanii*,

Alphaproteobacteria, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Alteromonadales*, *Arsenophonus nasoniae*, *Acinetobacter johnsonii*) 2020 KAB, 2020 KGB ve 2020 MEA örneklerinde rastlanmıştır.

Ek olarak, elde edilen yöntem ve elde edilen sonuçlar, kolonide bazı bozukluklara yol açabilecek faktörleri anlamak için yararlı olabilecek bal arısı süperorganizma patosferini açıklamak için yeni yollar da sağlamıştır. Bu çalışmada kullanılan Shotgun metagenomik yaklaşım, bir şekilde etkileşime giren veya bal üretim faaliyetlerini ve aşamalarını tanımlayan tüm olası organizmaları tanımlamıştır. Böylece, genellikle sadece bir grup organizma için sekans bilgisi üretmek üzere tasarlanmış metabarkodlama yöntemlerinin uzmanlaşmasının önüne geçebilmektedir. Dizilemenin derinliği, elde edilen tüm dizilere açıklama getirilmesini gerektirecek sınırlayıcı bir faktör olabilmekte olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, düşük yoğunluklu shotgun metagenomik analizi, hem dizileme maliyeti hem de veri analizi adımı dikkate alındığında düşük maliyetli olabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada test edilen yaklaşımın, balda bulunan e-DNA'ya göre, birden fazla amacı olabilen büyük ölçekli deneylerde uygulanabileceği de anlaşılmıştır. Ayrıca, e-DNA'ların metagenomik analizleri yapılarak, balın bitki kökeninin tespiti, hem bölgede üretilen balların özelliklerinin ve kalitesinin belirlenmesi hem de üreticilerin tercih edecekleri nektarlı bitki gruplarının bilinerek daha bilinçli üretim yapılmasına ve bölgesel kalkınmaya katkı sağlanmıştır. Ek olarak, farklı bölgelerde üretilen ballardaki polen çeşitliliği farklılık gösterdiğinden balın botanik kökenlerin belirlenmesi balın üretildiği bölgenin belirlenmesine ve balın markalaşmasına da olumlu etkisinin olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akaya H., (2004), “Arıcılık, Arıcın el kitabı”, Temel Petek Yayınevi, İstanbul.
- Alberoni D., Baffoni L., Gaggia F., Ryan P., Murphy K., Ross R., Di Gioia D., (2018), “Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. Beneficial microbes”, 9(2), 269-278.
- Anklam E., (1998), “A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey”, Food chemistry, 63(4), 549-562.
- Anonim 2012, Gazete T.R., (2012), “Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği”, Tebliğ no: 2012, 58.
- Anonim 2011, Türkiye İstatistik Yıllığı. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yay., Ankara, Bingöl Tarım İl Müdürlüğü Verileri.
- Avalos A., Fang M., Pan H., Ramirez Lluch A., Lipka A., Zhao D., Hudson M., (2020), “Genomic regions influencing aggressive behavior in honey bees are defined by colony allele frequencies”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(29), 17135-17141.
- Avcı M., (1993), “Türkiye'nin flora bölgeleri ve Anadolu Diagonaline coğrafi bir yaklaşım”, Türk Coğrafya Dergisi, (28), 225-248.
- Babacan, S., & Rand, A. G. (2005). Purification of amylase from honey. Journal of food science, 70(6), c413-c418.
- Babacan S., Pivarnik F., Rand G., (2002), “Honey amylase activity and food starch degradation”, Journal of food science, 67(5), 1625-1630.
- Bakoğlu A., KUTLU M., BENGÜ A., (2014), “Bingöl ilinde arıların yoğun olarak konakladıkları alanlarda üretilen ballarda bulunan polenlerin tespiti”, Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1(3), 348-353.

Balkanska R., Stefanova K., Stoikova–Grigorova R., (2020), “Main honey botanical components and techniques for identification: A review”, *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 852-861.

Bargańska Ż., Ślebioda M., Namieśnik J., (2016), “Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination”, *Critical reviews in environmental science and technology*, 46(3), 235-248.

Barth M., (2004), “Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees” *Scientia Agricola*, 61, 342-350.

Bogdanov S., Haldimann M., Luginbühl W., Gallmann P., (2007), “Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects”, *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.

Bogdanov S., Martin P., Lullmann C., (2002), “Harmonised methods of the international honey commission”, *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*, 5, 1-62.

Bohmann K., Evans A., Gilbert P., Carvalho R., Creer S., Knapp M., De Bruyn M., (2014), “Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring”, *Trends in ecology & evolution*, 29(6), 358-367.

Bolger M., Lohse M., Usadel B., (2014), “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data”, *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bovo S., Ribani A., Utzeri J., Schiavo G., Bertolini F., Fontanesi L., (2018), “Shotgun metagenomics of honey DNA: Evaluation of a methodological approach to describe a multi-kingdom honey bee derived environmental DNA signature”, *PLoS One*, 13(10), e0205575.

Bromenshenk J., Carlson R., Simpson C., Thomas M., (1985), “Pollution monitoring of Puget Sound with honey bees”, *Science*, 227(4687), 632-634.

BURUCU V., BAL G., (2017), “Türkiye’de arıcılığın mevcut durumu ve bal üretim öngörüsü”, Tarım ekonomisi araştırmaları dergisi, 3(1), 28-37.

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden L., (2009), “BLAST+: architecture and applications”, BMC bioinformatics, 10, 1-9.

Campos R., Sabatier S., Amiot J., Aubert S., (1990), “Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey”, Planta Medica, 56(06), 580-581.

Can Z., Yildiz O., Sahin H., Turumtay A., Silici S., Kolayli S., (2015), “An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles”, Food chemistry, 180, 133-141.

Chapman C., Lim J., Oldroyd P., (2008), “Population genetics of commercial and feral honey bees in Western Australia”, Journal of economic entomology, 101(2), 272-277.

Colwell K., Chao A., Gotelli J., Lin Y., Mao X., Chazdon L., Longino T., (2012), “Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages”, Journal of plant ecology, 5(1), 3-21.

Cowart A., Murphy R., Cheng C., (2018), “Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula”, Marine Genomics, 37, 148-160.

Crane E., (1975), “flowers honey comes from. Honey: A Comprehensive Survey”, E. Crane, ed.

ÇELEMLİ G., (2014), “Comparing botanical origin and volatile compounds of some Turkish honey samples”, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 42(4), 459-468.

Çetin U., (2004), “Isı değişimlerinin arı kayıplarına etkileri”, Uludağ Arıcılık Dergisi, 4(4), 171-174.

Doğaroğlu M., (2004), “Modern Arıcılık Teknikleri”, 295 sayfa.

Engel P., Martinson G., Moran A., (2012), “Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 11002-11007.

Engindeniz S., Markovic T., Uçar K., Engindeniz D., Kokot Z., (2016), “Recent developments in honey production and marketing of Turkey and Serbia”, 5th Interneational Mugla Beekeeping and Pine Honey Congress, November 1-5, Mugla.

Erdođdu T., (2008), “Türk Gıda Kodeksine Göre Bal”.

Fanciotti N., Tejerina M., Benítez-Ahrendts R., Audisio C., (2018), “Honey yield of different commercial apiaries treated with *Lactobacillus salivarius* A3iob, a new bee-probiotic strain”, *Beneficial microbes*, 9(2), 291-298.

FIRAT KALKINMA AJANSI, (2011), Bingöl Arıcılık Raporu, <http://www.fka.org.tr>.

Finola S., Lasagno C., Marioli M., (2007), “Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina”, *Food chemistry*, 100(4), 1649-1653.

Galanis A., Vardakas P., Reczko M., Harokopos V., Hatzis P., Skoulakis M., Patalano S., (2022), “Bee foraging preferences, microbiota and pathogens revealed by direct shotgun metagenomics of honey”, *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2506-2523.

Galbraith A., Fuller L., Ray M., Brockmann A., Frazier M., Gikungu W., Grozinger M., (2018), “Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics”, *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Garlapati D., Charankumar B., Ramu K., Madeswaran P., Ramana Murthy V., (2019), “A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics”, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18, 389-411.

Gökmen V., (2007), “Analysis of HMF by HPLC”, In *Cost Action* (Vol. 927).

GÜNEK H., (2006), “MURAT NEHRİ HAVZASININ (FIRAT) SU POTANSİYELİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ”, *Doğu Coğrafya Dergisi*, 11(16), 141-163.

Hawkins J., De Vere N., Griffith A., Ford R., Allainguillaume J., Hegarty J., Adams-Groom B., (2015), “Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of

honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences”, PloS one, 10(8), e0134735.

Hollingsworth M., (2011), “Refining the DNA barcode for land plants”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(49), 19451-19452.

Hornby S., Benn J., Vinkenoog R., Goldberg S., Pound J., (2022), “Methods in melissopalynology: colour determination of pollen pellets for colour vision deficient individuals”, Palynology, 46(4), 1-7.

Hoyt M., (1965), “The World of Bees, Coward McCann”, Inc., New York.

Huidobro F., Santana J., Sanchez P., Sancho T., Muniategui S., Simal-Lozano J., (1995), “Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain”, Journal of Apicultural Research, 34(1), 39-44.

Kan C., (2013), “Bingöl İli’nde arıcılık faaliyetleri”, Türk Coğrafya Dergisi, (60), 1-12.

Karakaya E., Kızıloğlu S., (2015), “Bingöl İli bal üretimi”, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 5(2), 25-31.

Karen E., (2007), “Encyclopedia of Metagenomiks: Genes, Genomes and Metagenomes: Basics, Methods, Databases and Tools”, Springer New York Heidelberg Dordrecht London.

Kayacier A., Karaman S., (2008), “Rheological and some physicochemical characteristics of selected Turkish honeys”, Journal of Texture Studies, 39(1), 17-27.

Khansaritoreh E., Salmaki Y., Ramezani E., Azirani A., Keller A., Neumann K., Behling H., (2020), “Employing DNA metabarcoding to determine the geographical origin of honey”, Heliyon, 6(11).

Kıvrak Ş., Kıvrak İ., (2017), “Assessment of phenolic profile of Turkish honeys”, International Journal of Food Properties, 20(4), 864-876.

Knight R., Jansson J., Field D., Fierer N., Desai N., Fuhrman A., Gilbert A., (2012), “Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design”, Nature biotechnology, 30(6), 513-520.

Koru B., (2018), “Bal arılarında (*apis mellifera*) beslenme farklılığının yaşam uzunluğu, gelişme, davranış (AmILP-1, Vg) ve nörotransmitter salınımını düzenleyen (BRP) genlerindeki etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi.

Kuczynski J., Costello K., Nemergut R., Zaneveld J., Lauber L., Knights D., Knight R., (2010), “Direct sequencing of the human microbiome readily reveals community differences”, *Genome biology*, 11, 1-9.

La Rosa S., Brooks P., Deych E., Boone L., Edwards J., Wang Q., Shannon, D., (2012), “Hypothesis testing and power calculations for taxonomic-based human microbiome data” *PloS one*, 7(12), e52078.

Lazarov S., Stoyanov I., Georgieva V., Zhelyazkova I., Ivanova E., (2019), “Aloenzimna genetichna karakteristika na pchelni semeystva *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) ot Bulgaria s razlichno higienno povedenie”, *Journal of Central European Agriculture*, 20(2), 592-597.

Lees H., Swann J., Pouchet M., Nicholson K., Holmes E., Wilson D., Marchesi R., (2014), “Age and microenvironment outweigh genetic influence on the Zucker rat microbiome”, *PloS one*, 9(9), e100916.

Li Z., Gao M., Li T., Wang H., Ge J., Duan W., (2011), “Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641-19646.

Li F., Neves L., Ghoshal B., (2018), “Symposium review: mining metagenomic and metatranscriptomic data for clues about microbial metabolic functions in ruminants”, *Journal of dairy science*, 101(6), 5605-5618.

Liu S., Lang D., Meng G., Hu J., Tang M., Zhou X., (2022), “Tracing the origin of honey products based on metagenomics and machine learning”, *Food Chemistry*, 371, 131066.

Maleszka R., (2008), “Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks”, *Epigenetics*, 3(4), 188-192.

- McCafferty J., Mühlbauer M., Gharaibeh Z., Arthur C., Perez-Chanona E., Sha W., Fodor A., (2013), “Stochastic changes over time and not founder effects drive cage effects in microbial community assembly in a mouse model”, *The ISME journal*, 7(11), 2116-2125.
- Memmott J., Craze G., Waser M., Price V., (2007), “Global warming and the disruption of plant–pollinator interactions”, *Ecology letters*, 10(8), 710-717.
- Nazir A., (2016), “Review on metagenomics and its applications”, *Imp J Intersd Res*, 2(10).
- Oh J., Byrd L., Deming C., Conlan S., Kong H., Segre A., (2014), “Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome”, *Nature*, 514(7520), 59-64.
- Ötleş S., (1995), “Bal ve bal teknolojisi (kimyası ve analizleri)”, *Alaşehir Meslek Yüksekokulu Yayınları*. Manisa, Yayın, (2).
- Prosser W., Hebert D., (2017), “Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding”, *Food Chemistry*, 214, 183-191.
- Quince C., Walker W., Simpson T., Loman J., Segata N., (2017), “Shotgun metagenomics, from sampling to analysis”, *Nature biotechnology*, 35(9), 833-844.
- Ribani A., Utzeri J., Taurisano V., Fontanesi L., (2020), “Honey as a source of environmental DNA for the detection and monitoring of honey bee pathogens and parasites”, *Veterinary Sciences*, 7(3), 113.
- Ricketts H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham A., Kremen C., Bogdanski A., Viana F., (2008), “Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?”, *Ecology letters*, 11(5), 499-515.
- Ruoff K., Luginbühl W., Kilchenmann V., Bosset O., von Der Ohe K., von Der Ohe W., Amadò R., (2007), “Authentication of the botanical origin of honey using profiles of classical measurands and discriminant analysis”, *Apidologie*, 38(5), 438-452.
- Sahu A., Kumar N., Singh P., Singh, M., (2022), “Environmental DNA (eDNA): Powerful Technique for Biodiversity Conservation”, *Journal for Nature Conservation*, 126325.
- Sancak K., Zan Sancak A., Aygören E., (2013), “Dünya ve Türkiye’de arıcılık”, *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 5(10), 7-13.

Schmehl R., Teal E., Frazier L., Grozinger M. (2014), “Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*)”, *Journal of insect physiology*, 71, 177-190.

Schmeisser C., Steele H., Streit R., (2007), “Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes”, *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 955-962.

Shokralla S., Spall L., Gibson F., Hajibabaei M., (2012), “Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research”, *Molecular ecology*, 21(8), 1794-1805.

Sıralı, R. (2010). Arıcılığın Türkiye için önemi. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2(4), 3-4.

Smart S., Weeks R., van Rooyen R., Moore A., McCarthy A., Tingley R., (2016), “Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling”, *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1291-1298.

Soares S., Grazina L., Costa J., Amaral S., Oliveira B., Mafra I., (2018), “Botanical authentication of lavender (*Lavandula* spp.) honey by a novel DNA-barcoding approach coupled to high resolution melting analysis”, *Food Control*, 86, 367-373.

Soares S., Grazina L., Mafra I., Costa J., Pinto A., Duc P., Amaral S., (2018), “Novel diagnostic tools for Asian (*Apis cerana*) and European (*Apis mellifera*) honey authentication”, *Food Research International*, 105, 686-693.

SOYSAL M., (2007), “Türkiye arı yetiştiriciliğinin bal üretimi bakımından durumu”, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(2), 227-236.

SÖĞÜT B., ŞEVİŞ E., KARAKAYA E., Hakan İ., YILMAZ Ş., (2019), “Bingöl İlinde arıcılık faaliyetinin mevcut yapısı üzerine bir araştırma”, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(2), 168-177.

Spötter A., Gupta P., Mayer M., Reinsch N., Bienefeld K., (2016), “Genome-wide association study of a *Varroa*-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*)”, *Journal of Heredity*, 107(3), 220-227.

ŞİŞEK G., ŞİŞEK M., ARIK M., (2007), “Arıcının El Kitabı, Doğu Anadolu Kalkınma Programı Tarım ve Kırsal Kalkınma Bileşeni Kaynarca Köyü Çiftçi Grubu Arıcılığı Geliştirme Projesi”, Varto-Muş.

Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M., Rieseberg H., (2012), “Environmental DNA”, *Molecular Ecology* 21, 1789-1793.

Tarpy R., Seeley D., (2006), “Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens”, *Naturwissenschaften*, 93, 195-199.

TOPAL E., SARIOĞLU A., OSKAY D., BALKANSKA R., GÜNEŞ N., TUNCA İ., (2021), “Arıcılıkta Bazı Biyoteknolojik Gelişmelere Bakış”, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(4), 3308-3323.

Tosi E., Ciappini M., Re E., Lucero H., (2002), “Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content”, *Food chemistry*, 77(1), 71-74.

Tringe G., Rubin M., (2005), “Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples”, *Nature reviews genetics*, 6(11), 805-814.

TUİK, 2017, Hayvansal Üretim İstatistikleri, www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi: 22.02.2017).

Utzeri J., Ribani A., Schiavo G., Bertolini F., Bovo S., Fontanesi L., (2018), “Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey”, *Food Control*, 86, 342-349.

Utzeri J., Schiavo G., Ribani A., Tinarelli S., Bertolini F., Bovo S., Fontanesi L., (2018), “Entomological signatures in honey: an environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plant-sucking insects in agricultural and forest landscapes”, *Scientific Reports*, 8(1), 9996.

Wang J., Li X., (2011), “Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins”, *Advances in food and nutrition research*, 62, 89-137.

Wilcox M., McKelvey S., Young K., Jane F., Lowe H., Whiteley R., Schwartz K., (2013), “Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity”, *PloS one*, 8(3), e59520.

Wolterbeek B., (2002), “Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives”, *Environmental pollution*, 120(1), 11-21.

Yang B., Wang Y., Qian Y., (2016), “Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis”, BMC bioinformatics, 17(1), 1-8.

Yıldız A., Gürel F., Özkan M., (2010), “Türkiye Bal Arısı Populasyonlarının Mikrosatelit DNA Analizi Yöntemiyle Tanımlanması”, Scientific and Technical Research Council of Turkey, Project, (108O200).

Young S., Woodside V., (2001), “Antioxidants in health and disease”, Journal of clinical pathology, 54(3), 176-186.



ÖZGEÇMİŞ

Elif ÖDEMİŞ, 2007 yılında başladığı Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bölümünden 2011 yılında mezun olduktan sonra, aynı yıl Boston Dana Farber Cancer İnstitüsünde çalışmıştır. Akabinde 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.



EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Odemiş E., Unal I., Süzerer V., Çiftçi Özden Y., (2021), “Bingöl Balında Metagenomik Çalışmaları”, 5. Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli, Türkiye, 10 – 11 Haziran.

