



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL VE BİTKİSEL ÜRÜNLER, KOZMETİK ÜRÜNLER
ANABİLİM DALI

**ANZER BALI'NIN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

Zeynep TÜRKER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih
Zeynep TÜRKER
(İmza)

İthaf

*Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmamış
ve her zaman yanımda olmuş canım babama ithaf ediyorum.*



TEŞEKKÜR

Tüm lisans ve lisansüstü eğitim hayatımda her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışkanlığı ve azmi ile örnek olan, maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen, bu uzun akademik yolculukta tutunmamı sağlayan, her daim çözümcü tavrıyla yanımda olan, minnettar kalacağım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim hayatımda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, laboratuvarını kullanmamda her zaman destek olan değerli hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, arazi çalışmalarında bitkilerin toplanmasında, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi'nde hem botanik laboratuvarını kullanmamda ve hem de merkezi laboratuvardaki çalışmalarımı gerçekleştirmemde yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Serdar MAKBUL'a doktora eğitim sürecinde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet YAŞAR ve Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya, bitki teşhisinde tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU'na, moleküler çalışmalarda yardımcı olan Doç. Dr. Murat Erdem GÜZEL'e, ve her konuda bana destek olan, fikirlerini ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Mutlu GÜLTEPE'ye, tez sürecinde istatistiksel analizlerimde bana yardımcı olan, karşılaştığım tüm diğer zorluklarda desteğini esirgemeyen Adil FAROOQ'a, yardımları olan Dr. Öğr. Üyesi Seda OKUR'a, Öğr. Gör. Esra DEMİR KANBUR'a, Suzan KUNDAKÇI'ya, Gözde BOZDAĞ'a, Feyza Demir'e, Esma CEYLAN'a, Nilhan Elif UZUN'a ve Merve Ayşe DOĞANCI'ya, Ayşe Gül KUL'a ve Zeynepnur ALEMDAĞ'a doktora süreci boyunca emeği geçen tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bal örneklerin temini için Anzer (Ballıköy) Tarımsal Kalkınma Kooperatifi Başkanı Osman CİVELEK'e,

TÜBİTAK-BİDEB 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında, doktora eğitimim süresince maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

YÖK 100/2000 öncelikli alanlar doktora burs programı kapsamında sağladığı desteklerden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

Haklarını asla ödeyemeyeceğim, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan değerli aileme ve özellikle yakın zamanda aramızdan ayrılmış olan, bu zorlu yolda hasta halinde bile hep bana moral olan, canım babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
<i>İthaf</i>	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Balın Tarihçesi	4
2.2. Türkiye’de Arıcılık	4
2.3. Balın Tanımı ve Yapısı	7
2.3.1. Karbonhidratlar	8
2.3.2. Proteinler ve Amino Asitler	8
2.3.3. Vitaminler ve Mineraller	9
2.3.4. Uçucu Yağlar	9
2.3.5. Fenolik Bileşikler	10

2.3.6. Diğer Bileşikler	10
2.3.7. Polen, Propolis ve Arı Sütü	11
2.4. Balın Sınıflandırılması	13
2.5. Polen Toplama Süreci	14
2.6. Ballarda Standardizasyon	18
2.7. Anzer Balı	19
2.8. Balın Coğrafik Kökeni ve Botaniksel Özellikleri Belirlemede Kullanılan Yöntemler	25
2.8.1. Melissopalinojoloji	26
2.8.2. Biyokimyasal Yöntemler	28
2.8.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS)	32
2.8.3.1. Sanger Dizileme	45
2.8.3.2. 454 Roche Dizileme	46
2.8.3.3. Ion Torrent	46
2.8.3.4. Illumina Dizileme	47
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Materyal Temini	48
3.2. Bitkilerin Teşhis Edilmesi	62
3.3. Bitkilerden Polen İzolasyonu, Işık (IM) ve Taramalı (SEM) Elektron Mikroskopunda İncelenmesi	62
3.3.1. Polenlerin Işık Mikroskobu'nda Görüntülenmesi	63
3.3.2. Polenlerin Taramalı Elektron Mikroskobu'nda Görüntülenmesi	63
3.4. Ballardan Polen İzolasyonu ve Tayini	64
3.5. Bal Numunelerından Toplam Polen Sayısı (TPS) Hesaplanması ve İncelenmesi	64
3.6. Balın DNA İzolasyonu	66
3.6.1. DNA Konsantrasyonu, Kalitesi ve Saflığı	67

3.6.2. Presipitasyon	68
3.6.3. Genomik DNA'ların AgaroZ Jel Elektroforezde Görüntülenmesi	69
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	69
3.7.1. PCR Ürünlerinin Temizliğı	71
3.7.2. İndeks PCR	71
3.8. Kütüphane Hazırlanması	71
3.9. Yeni Nesil Dizileme (NGS)	72
3.10. Biyoinformatik Analizler	73
3.11. Takson Tespiti	73
3.12. MelissopalinoLoji ve NGS Karşılaştırılması	75
4. BULGULAR	77
4.1. Floristik Veriler	77
4.2. MelissopalinoLojik Veriler	84
4.3. NGS Verileri	89
4.4. Floristik, MelissopalinoLojik ve NGS Sonuçlarının Numerik Analizi	95
4.5. Palinolojik Veriler	98
4.6. MelissopalinoLoji ve NGS Arasındaki İlişki	114
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	125
6. KAYNAKLAR	154
ÖZGEÇMİŞ	185

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 2.1 Ülkelere ait kovan varlığı ve bal üretim miktarı	5
Tablo 2.2 Türkiye'de illere göre kovan sayısı ve bal üretim miktarı	6
Tablo 2.3 NGS platformlarının temel özellikleri ve performansları	34
Tablo 2.4 Polen DNA barkodlama çalışmalarında kullanılan bitki DNA barkodlama belirteçleri hakkında mevcut bilgilerin özeti	39
Tablo 3.1 Arazide toplanan bitki taksonlarına ait toplama bilgileri	49
Tablo 3.2 Çalışılan örneklerdeki toplam polen sayısı ve sıklık değerleri	65
Tablo 3.3 Bal örneklerine ait polen spektrumları	66
Tablo 3.4 Çalışılan bal örneklerine ait DNA konsantrasyonu ve saflık değerleri	68
Tablo 3.5 Çalışılan evrensel ITS primerleri ve eklenen adaptörler	70
Tablo 3.6 Çalışılan bölgelerin PCR şartları	70
Tablo 3.7 Phred kalite skorları ve bir DNA diziliminde baz okumalarının hatalı olma olasılıkları	74
Tablo 4.1 Teşhis edilen taksonların familyalara göre dağılımı.	77
Tablo 4.2 Melissopalinojoloji analiz sonuçları	85
Tablo 4.3 Tez kapsamında incelenen bal örnekleri melissopalinojolojik analiz spektrumu.	86
Tablo 4.4 Illumina sonuçlarının özeti	90
Tablo 4.5 Illumina analizi ile incelenen üç bal örneğindeki tespit edilen bitki taksonları	91
Tablo 4.6 Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren bazı çiçekli bitkilerin palinojolojik özellikleri.	112
Tablo 4.7 İki teknikte tespit edilen taksonların sayısı ve genel benzerlik yüzdesi	115

Tablo 4.8 Bal örneklerin melissopalynoloji (M), ve Illumina (I) analizi ile tespit edilen bitki taksonları	117
Tablo 4.9 İncelenen bal örnekleri arasında Spearman korelasyon katsayı değerleri	120
Tablo 5.1 Bal örneklerine ait Illumina sonuçlar göre okuma sayıları ve kalite değerleri	129
Tablo 5.2 Bal örneklerinde iki teknik verilerine göre, (a, c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b, d) Pielou' Düzenlilik (J') indeks sonuçları	147
Tablo 5.3 Bal örneklerinde Illumina (ITS1/ITS2) ve melissopalinolojik verilerine göre, (a, c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H') ve (b, d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indekslerinin hesaplanması.	148

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1. Balın bazı bileşenleri	8
Şekil 2.2. Balda bulunan seçili bazı uçucu bileşiklerin yapısı	10
Şekil 2.3. Glikoz oksidazın bal içindeki kimyasal reaksiyonu	11
Şekil 2.4. Balların sınıflandırması	14
Şekil 2.5. Uluslararası Bal Komisyonu'nun bal standardizasyon kriterleri	18
Şekil 2.6. Balın coğrafik ve botanik kökeni ayırt etmede kullanılan bazı teknikler	29
Şekil 2.7. Kloroplast ve mitokondiyal ribozomal DNA barkod organizasyonu	39
Şekil 3.1. Rize ili İkizdere ilçesi Anzer (Ballıköy)'de toplanan bitkilerin mahallerini gösteren harita	49
Şekil 3.2. Uçlarına adaptör bağlanmış DNA fragmanı	72
Şekil 3.3. NGS (Illumina) sürecine genel bakış	73
Şekil 4.1. İncelenen bal örneklerine ait toplam polen sayısı	85
Şekil 4.2. Bal örneklerinde tespit edilen polenlerin familya düzeyinde göre dağılımları	88
Şekil 4.3. Melissopalinojik verilere göre tespit edilen polenlerin familya düzeyinde yüzde (%) dağılımı.	89
Şekil 4.4. Illumina verilerinde tespit edilen familyaların bal örneklerine göre dağılım	93
Şekil 4.5. Illumina verilerine göre tespit edilen familyaların bal örneklerine göre % dağılımı.	94
Şekil 4.6. ITS1 ve ITS2 verilerine göre tespit edilen familya sayılarının bal örneklerine göre dağılımı (Venn) diyagramı	95

Şekil 4.7.	İncelenen bal örneklerinde floristik, NGS analizi sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı	96
Şekil 4.8.	İncelenen bal örneklerinde floristik ve melissopalinojik analizi sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı	97
Şekil 4.9.	İncelenen bal örneklerinde floristik, NGS ve melissopalinojik analizi sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı	98
Şekil 4.10.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar.	99
Şekil 4.11.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar.	100
Şekil 4.12.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar.	101
Şekil 4.13.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	102
Şekil 4.14.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	103
Şekil 4.15.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	104
Şekil 4.16.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	105
Şekil 4.17.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	106
Şekil 4.18.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	107
Şekil 4.19.	Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	108

Şekil 4.20. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	109
Şekil 4.21. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	110
Şekil 4.22. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	111
Şekil 4.23. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri.	112
Şekil 4.24. Illumina (I), melissopalinoji (M), her iki tekniğin birleşimi (I M) ve her iki teknikte ortak (I ve M) olarak analiz edildiği üç bal örneğinde her familya içinde tespit edilen taksonların (cins ve tür) sayısı.	116
Şekil 4.25. Yeni nesil dizileme ve melissopalinojik verilere göre tespit edilen familyaların sayıları	119
Şekil 4.26. Bal örneklerinde Illumina (ITS) ve melissopalinojik verilerine göre, (a,c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indekslerinin takson ve familya düzeyinde radar dağılımı.	122
Şekil 4.27. Bal örneklerinde Illumina (ITS1/ITS2) ve melissopalinojik verilerine göre, (a, c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indekslerinin takson ve familya düzeyinde radar dağılımı.	123
Şekil 4.28. R katsayısına göre familyaların fazla veya az temsil edilmelerini gösteren sütun grafiği	124

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ASVs	Amplikon Dizi Varyantları
BOLD	Yaşam Barkod Veritabanı
bp	Baz çifti
CBOL	Yaşam Barkodu Konsorsiyumu
CE	Kapiller Elektroforez
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
CÜTAM	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil olan
E	Ekvatorial Eksen
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ETAAS	Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
F	Forward
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FASTQ	Metin tabanlı bir dosya formatı
FRAP	Demin İndirgeme Antioksidan Gücü
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
GC-MS	Gaz Kromatografisi
GenBank	Sekans Veri Tabanı

H'	Shannon Çeşitlilik İndeksi
HMF	Hidroksimetilfurfural
HTS	Yüksek Verimli DNA Dizileme
I	Illumina
IHC	Uluslararası Bal Komisyonu
IK	İyon Kromatografisi
IM	Işık Mikroskobu
ITS	İçsel Kopyalama Bölgesi
J'	Pielou Evenness İndeksi
kg	Kilogram
m	Metre
M	Molar
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NGS	Yeni Nesil Dizilime
OTU	Operasyonel Taksonomik Ünite
P	Polar Eksen
PalDat	Palinolojik Veritabanı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Potansiyel Hidrojen
QIIME	Mikrobiyal Ekolojiye Kantitatif Bakış
QV	Kalite Skoru
R	Reverse
RNA	Ribonükleik Asit
RNase	Ribonükleaz
RP-HPLC-	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	
rpm	Dakika Başına Devir Sayısı
s	Saniye
SBS	Sentez Yoluyla Dizileme
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
subsp.	Alttür

syn.	Sinonim
TAE	Tris-Asetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TPS	Toplam Polen Sayısı
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
WGS	Tüm Genom Dizileme
var.	Varyete
vd.	Ve diğerleri
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Simgeler	
%	Yüzde
&	Ve
°C	Santigrat derece
ρ	Rho

Formüller

dH₂O	Disitile su
EtOH	Etil alkol
H₂SO₄	Sülfirik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit
MgCl₂	Magnezyum klorür
NEM	N-Etilmaleimid

ÖZET

Anzer Balı'nın Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu

Sahteciliğin en fazla yapıldığı doğal gıdalardan biri olan balın botanik ve coğrafik kökeninin belirlenebilmesi için melissopalinojiden daha basit, daha az zaman alıcı ve daha güvenilir özel yöntemler kullanarak sahteciliğin önüne geçmek mümkün olabilir. Bunun için son yıllarda, polen tanelerinin tanımlanması için yeni nesil dizileme analizi alternatif yaklaşım olarak önerilmiştir. Bu tez çalışmasında Rize iline bağlı Anzer (Ballıköy)'de üretilen üç bal örneği, elde edilen bal metagenomu nrDNA ITS (ITS1 ve ITS2) kullanarak ilk kez analiz edilmiş, melissopalinojik ve palinojik verilerle birlikte değerlendirilmiştir. Öncelikle incelenen üç bal örneğinden melissopalinojik çalışma için polen izolasyonu ve tanımlaması, NGS analizi için de total DNA izolasyonları yapıldı ve kalitesi spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi. Daha sonra her bir bal örneğinden izole edilen metagenoma ait ITS verileri yeni nesil dizileme (NGS) tekniklerinden Illumina Miseq kullanılarak dizilendi ve tez kapsamında hazırlanan referans kütüphanesi ile karşılaştırıldı. NGS analizi ile toplamda üç bal örneğinden ITS1 için 310 745 ve ITS2 için 39 835 filtrelenmiş çift taraflı okuma elde edilmiştir. Toplamda filtrelenmiş ITS1 okumalarının 233 655 (%75.2)'i, ITS2 okumaların 27 230 (%68.4)'ü özel hazırlanmış referans kütüphanedeki veri tabanı ile en az familya düzeyinde olmak üzere cins veya tür düzeyinde eşleşmiştir. NGS analizi sonucunda incelenen bal örneklerinde toplamda 27 familya ve 54 takson belirlenmişken, melissopalinoji ile 20 familya ve 34 bitki taksonu belirlenmiştir. Melissopalinoji analizine göre %63 den daha fazla takson içeren NGS sonuçları, tüm bal örneklerinde familya ve cins düzeyinde melissopalinoji ile birçok ortak takson barındırdığı ve tür düzeyinde daha yüksek çözünürlük sağladığı tespit edilmiştir. Her iki teknikle belirlenen bitkilerde bazı farklılıklar olsa da, tanımlanan baskın floral bileşenler yüksek benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlar NGS'nin Anzer balının kökenini tespit etmede daha güçlü ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Bal, Ballıköy, ITS, Melissopalinoji, Yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Characterization of Anzer Honey Using Molecular Methods

One of the natural foods most commonly subjected to fraud is honey. Analyzing honey using a method that is simpler, more specific, and less time-consuming than melissopalynology, may make it possible to more easily determine both its botanical and geographical origin whilst preventing fraud. In recent years, next-generation sequencing (NGS) analysis has been proposed as an alternative approach for identifying pollen grains. In the present study, three honey samples produced in Anzer (Ballıköy) in the Rize province were analyzed using nrDNA ITS (ITS1 and ITS2) obtained from the honey metagenome for the first time and evaluated alongside melissopalynological and palynological data. First, pollen isolation and identification were conducted for the melissopalynological study from the three honey samples examined, and total DNA isolations were performed for the NGS analysis, with their quality determined by spectrophotometric methods. Then, ITS data belonging to the metagenome isolated from each honey sample were sequenced using the Illumina Miseq, one of the next-generation sequencing (NGS) techniques and compared with the reference library prepared within the scope of the thesis. A total of 310 745 filtered paired-end reads for ITS1 and 39 835 filtered paired-end reads for ITS2 were obtained from the three honey samples through NGS analysis. In total, 233 655 (75.2%) of the filtered ITS1 reads and 27 230 (68.4%) of the ITS2 reads matched at least to the family level, and in some cases to the genus or species level, with the database in the specially prepared reference library. NGS analysis identified a total of 27 families and 54 taxa in the honey samples, while melissopalynology identified 19 families and 34 plant taxa. NGS analysis detected 63% more plant taxa than the melissopalynological method across all honey samples. Moreover, when comparing the data obtained from melissopalynology with the NGS data, a significant number of common plant families and genera were identified, with NGS providing significantly higher resolution at the species level. Although there were some differences in the plants identified by the two techniques, the dominant floral components identified showed high similarity.

Keywords: Ballıköy, Honey, ITS, Melissopalynology, Next-generation sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda, insanların sağlıklı beslenme konusundaki endişesinin artması, doğal gıda ürünlerine olan talebin artmasına neden olmuştur. Özellikle, terapötik (iyileştirici) özelliklere sahip gıdalara karşı artan ilgi, doğal gıdaların değerlerini de arttırdı. Bu da onları ekonomik sahtekarlıklara karşı savunmasız hedef haline getirdi. Bal arısı (*Apis mellifera*) tarafından üretilen doğal bir gıda olan bal, tadı, sağlık açısından faydaları ve pek çok biyolojik özellikleri nedeniyle sahtekarlığın yoğun olarak yaşandığı ürünler arasına girmesine neden olmuştur. Bu nedenle tüketicileri korumak ve üreticiler arasında adil rekabeti teşvik etmek için, özellikle de balın coğrafik kökeninin belirlenmesi balın özgünlüğünü değerlendirilmesi için önemli hale gelmiştir (1). Günümüzde balın coğrafik kökenini belirlemede kullanılan geleneksel yöntem, bal üretimi sırasında arıların ziyaret ettiği bitkileri belirlemek için mikroskobik analizle polen tanımlamasına dayanan melissopalinojidir. Bununla birlikte, bu yöntem zaman alıcıdır, kapsamlı bir polen taneleri koleksiyonunun bulunmasını gerektirir ve polen tanelerini farklı morfolojilerine dayanarak tanımlamak için yeterli beceri ve deneyime sahip uzmanlar tarafından ancak gerçekleştirilebilir olması bu yöntemi dezavantajlı hale getirmektedir (2). Bu nedenle, balın kimlik doğrulaması için bireysel tecrübeden çok fazla etkilenmeyen analitik yöntemler geliştirmek önemlidir. Bu yöntemler arasında kromatografik teknikler kullanılarak yapılan kimyasal analizlerde bulunmaktadır. Bu analizlerde bal örneklerinin botanik kökeninin belirlenmesi için serbest amino asitler, fenolik bileşikler, organik asitler ve kimyasal asitler gibi farklı kimyasal parametreler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, aynı botanik kökenli balların kimyasal bileşimi oldukça farklı olabilir, çünkü bitki fitokimyasalları edafoklimatik faktörler, toprak, çiçek olgunluğu vb. bir çok faktöre bağlı olarak değişebilir. Bu durum balın botanik sınıflandırması için kimyasal analiz yöntemlerini güvenilir olmayan bir yaklaşım haline getirir (3).

Balın kalitesini değerlendirmek için, bal arılarının beslendiği çevredeki bitki örtüsünü incelemek elbette önemlidir. Balda bulunan çiçek örneklerinin ortaya konulması, tıbbi değerin belirlenmesi, bal üretiminin artırılması ve bal arılarının korunması açısından önemlidir (4).

Ülkemiz bal üretimi ve kovan varlığı bakımından dünyada 2. ve 3. sıralarda yer alarak dünyanın önemli ülkeleri arasında bulunmaktadır. Türkiye’de ve Dünya’da birçok değerli bal vardır. Genel olarak çiçek balı, keçiyoynuzu balı, kestane balı ve çam balını

örnek olarak verebiliriz. Farklı bal türlerinin sağlık açısından faydaları bulunmaktadır. Bunlardan biri de Türkiye'nin Kuzeydoğusu'nda Rize ilinin İkizdere ilçesinde yer alan Anzer (Ballıköy)'de üretilen "Anzer Balı"dır. Anzer Balı Mayıs - Ağustos aylarında Anzer (Ballıköy)'de yerleşik farklı arıcılık kooperatifleri tarafından üretilen kendine has hafif aromatik kokusu ve tadı olan, açık renkli tescilli bir baldır. Temel özellikleri bakımından çiçek balı olup, karışık floralı (polifloral) ballar sınıfında değerlendirilir. Tüketicie süzme bal olarak sunulur (5).

Anzer Balı bilimsel olarak kanıtlanmış, sağlık açısından birçok faydası olan ve fonksiyonel bir gıda olarak onaylanan, besin açısından değerli bir ürün olarak kabul edilmektedir. Anzer Balı'nın diğer ballardan sağlık açısından daha faydalı olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle çok yüksek fiyatlara alıcı bulunmaktadır. Anzer Balı'nın şifa özelliğinin Anzer bölgesinin zengin bitki florasından kaynaklandığı düşünülmektedir (6).

Günümüzde her ne kadar Anzer Balı kimyasal ve palinolojik analizler tabi tutulmuş olsa da esas itibari ile palinolojik testlere tabi tutularak tescillenen bir bal olarak piyasaya sürülmektedir. Bu nedenle Anzer Balı'nın coğrafi kökeninin tanımlanması için klasik melissopalinolojik analize alternatif olarak etkili araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda farklı ballarda bulunan bitki türlerinin tanımlanması ve balların coğrafi orijinlerini belirlemek için DNA tabanlı yöntemler de kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu teknikler daha hızlı, hassas ve daha güvenilir olma eğiliminde oldukları için günümüzde tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (7).

Türkiye'de üretilen balların moleküler özellikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. 2010 yılından bu yana, DNA dizileme teknolojisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Birçok çeşitli yüksek verimli dizileme teknolojileri daha az maliyetle ortaya çıkmış ve zaman tasarrufu sağlamıştır. DNA metabarkodlama, balın bitki türü kompozisyonunun belirlenmesi, bal arılarının ziyaret ettiği bitkileri araştırmak için bir yöntem sağlar. Böylece bu yöntem, karmaşık örneklerdeki bilinmeyen türlerin tanımlanmasında kullanılabilir (8). Bu çalışmalar dikkate alındığında daha pratik ve güvenilir yöntem olan yeni nesil dizileme yönteminin Anzer Balı'nın tanımlanmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmanın amacı ülkemizin coğrafi işarete sahip (tescilli) ballarından biri olan "Anzer Balı'nın" yapısına katılan çiçekli bitki taksonlarının yeni nesil dizileme yöntemi ile ortaya çıkarılması, elde edilen verilerin klasik melissopalinolojik bulgularla karşılaştırılması

ve yeni nesil dizilemenin Anzer Balı için alternatif bir tanımlama yöntemi olma potansiyelinin ortaya konmasıdır. Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki hedef çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- Anzer (Ballıköy)'de bal arısı tarafından en fazla ziyaret edilen çiçekli bitkilerin, gerek arazi gözlemi ve gerekse bal üreticileri ile yapılan ön görüşmeler ile belirlenmesi, belirlenen bu bitkilere ait bitki ve çiçek örneklerinin araziden toplanması ve teşhis edilmesi
- Anzer (Ballıköy)'de floristik yapıyı oluşturan çiçekli bitkilere ait nrDNA ITS dizinlerin literatüre dayalı olarak belirlenmesi
- Yeni nesil dizileme sonuçlarını karşılaştırmak için bir dizin kütüphanenin hazırlanması
- Anzer Balı'ndan total DNA'ların izole edilmesi ve yeni nesil dizileme yöntemi ile balda bulunan farklı bitkilere ait DNA dizilerin belirlenmesi
- Belirlenen farklı DNA dizinlerinin hangi taksonlara ait olduğunun belirlenmesi
- Melissopalinojik yöntem ile Anzer Balı'nda bulunan bitkilerin (taksonların) belirlenmesi
- Yeni nesil dizileme ve melissopalinojik yönteme göre Anzer Balı'nda olduğu kesinleşen tür düzeyindeki taksonların ayrıntılı palinojik özelliklerinin belirlenmesi ve fotoğraflanması

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Balın Tarihçesi

Balın tam olarak ne kadar süredir var olduğunu söylemek oldukça zor zira kayıtlara geçen çok eski bir tarihten itibaren var olduğu bilinmektedir. İspanya'da MÖ 7000'den kalma mağara resimleri arıcılığın en eski kayıtlarını göstermekte, ancak bal arısı fosilleri yaklaşık 150 milyon yıl öncesine dayanmaktadır. Bal arıları (*Apis mellifera*), insanlar tarafından tarih boyunca kullanılmıştır. Antik Mısır (MÖ 5500), Çinliler, Yunanlılar ve Romalılar gibi insan medeniyetlerinin hepsinde balın farklı amaçlar için kullanıldığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Doğal bal, tarihsel olarak yaraların ve bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Bal, arı mumu, propolis, polen ve arı sütü hepsi kullanılmıştır. Balın terapötik olarak kullanıldığı eski kayıtlarla belgelenmiştir (9).

Bal, organik ve doğal bir şeker alternatifi olup, uzun raf ömrü nedeniyle eski medeniyetler için önemli bir gıda kaynağıydı (10). Ayrıca hem Hristiyanlık hem de İslamiyette, değerli bir hediye olarak ve sağlık simgesi olarak görülmüştür.

Orta Çağ döneminde (MS 450-1485), alt sınıflar arıları, kişisel kullanımları için yetiştirirken, manastırlar arıcılık ve bal üretim merkezleri olmuştur. Bal tatlandırma amaçlı kullanılmış, arı mumuyla mumlar yapılmış ve bal fermente edilerek bal likörü üretilmiştir. 1485-1700 yıllar arasındaki dönemde neredeyse her küçük çiftlik kendi arılarını beslemiş olup ürettikleri ürünleri kullanmıştır (10).

1700'lerin başında, şeker kamışı İngiltere'ye İngiliz kolonileri tarafından ithal edilmeye başlandı ve en zengin evler bal yerine şeker kullanmaya başladı. Bu tarihten sonraki 80 yıl içinde şeker yaygın olarak kullanılır hale gelmiş ve bal artık en hızlı erişilebilir tatlandırıcı olarak kabul edilmiyordu. 18. yüzyıldan beri, dünyada bal modern tıpta kullanılsa da insan tüketimi için çoğu bal, süpermarket talebini karşılamak için ithal edilmektedir (11).

2.2. Türkiye’de Arıcılık

Arıcılık günümüzde, tüm dünyada yapılan en yaygın tarımsal faaliyetlerden birisidir. Bal üretimi küresel ısınmaya ve iklim değişiklikleri gibi doğal olaylara göre, yıldan yıla değişebilmektedir. TÜİK 2020 (12) verilerine göre dünyadaki arı kovanı sayısı bir önceki yıla göre %0.5 oranında artarak 94 milyon adet olmuştur. Dünyanın en çok kovan varlığına sahip ülkesi Hindistan olup 12.3 milyon kovan ile %13'lük paya sahiptir. Hindistan'ı takip

eden ülkeler sırasıyla 8.2 milyon kovan ile %9.8 paya sahip olan Çin, ardından 8.2 milyon kovan ile %8,7 paya sahip olan Türkiye gelmektedir (Tablo 2.1) (13).

Dünyada bal üretiminde aynı yıla ait verilere göre bu kovanlardan yaklaşık 1.8 milyon ton bal üretimi olup bir önceki yıla göre %0.2 oranında artış göstermiştir. Çin ilk sırada yer alıp 458 bin ton üretimiyle %25.9'luk paya sahiptir. Türkiye ikinci sırada %5.9'luk paya sahip 104 bin ton bal üretmekte, üçüncü sırada ise %4.5'lik pay ile İran 80 bin ton bal üretimine sahiptir (14).

Tablo 2.1. Ülkelere ait kovan varlığı ve bal üretim miktarı (ton, 1000 kg) (Burucu'dan 13).

Ülkeler	Kovan Varlığı					Bal Üretim Miktarı				
	2016	2017	2018	2019	2020	2016	2017	2018	2019	2020
Hindistan	12 055	12 337	12 107	12 166	12 203	61 853	62 138	62 197	62 063	62 132
Çin	9 048	9 144	9 140	9 179	9 216	555 000	542 544	446 879	444 054	458 100
Türkiye*	7 900	7 991	8 108	8 128	8 179	105 727	114 471	107 920	109 330	104 077
İran	7 011	7 134	7 180	7 108	7 141	67 783	67 302	77 388	77 973	79 955
Etiyopya	6 189	6 524	7 075	6 958	6 986	-	-	-	-	-
Rusya	2 952	2 991	2 999	3 020	3 003	69 764	65 167	65 006	63 526	66 368
Arjantin	2 937	2 983	2 974	2 979	2 983	68 123	76 379	79 468	78 844	74 403
Tanzanya	3 425	3 317	3 182	3 094	2 982	-	-	-	-	-
ABD	2 775	2 684	2 828	2 812	2 706	73 429	67 596	69 857	71 179	66 948
Meksika	2 155	2 261	2 139	2 145	2 162	55 358	51 066	64 253	61 986	54 165
Ukrayna	-	-	-	-	-	59 294	66231	71 279	69 937	68 028
Brezilya	-	-	-	-	-	39 677	41 696	42 268	45 801	51 508
Diğer	33 206	34 061	34 787	32 649	32 883	715 390	727 889	764 777	681 727	684 435
Dünya	90 183	91 828	93 677	93 495	94 000	1 871 398	1 882 479	1 851 292	1 766 420	1 770 119

Türkiye'de 2021 verilerine göre kovan varlığı 8.7 milyona ulaşarak bir önceki yıla göre %6.8 oranında artış göstermiştir. Bal üretimi ise 96 bin ton olarak gerçekleşmiştir ve bir önceki yıla oranla %7.4 oranla azalmıştır. Ayrıca aynı yılın verilerinde 96 344 adet arıcılık işletmesi faaliyet gösterir.

FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) 2020 yılındaki verilere göre dünyada ortalama kovan başına verim yaklaşık 18.8 kg olarak gerçekleşmiştir. İlk sırada yer alan Hindistan, kovan başına düşen bal üretim 5.1 iken, Çin'in bal verimi 49.7 kg olup, Türkiye'de ise kovan başına ortalama bal üretimi 12.7 kg olup dünya ortalamasının altındadır.

Ülkemizde 2021 yılı verilerine göre, en fazla arı kovanına sahip ilimiz 949 bin adet arı kovanı ile Muğla olup (%10.9), ikinci sırada 604 bin kovanla Ordu (%6.9), üçüncü sırada ise 482 bin kovan ile Adana (%5.5) yer almıştır.

Ülkemizde 2021 yılı verilerine göre, bal üretimi il bazında incelendiğinde; Adana %12.8’lik pay ile birinci, Ordu %11.8’lik paya sahip ikinci, Sivas ise %6.0’lık pay ile olarak üçüncü sırada yer almıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Türkiye’de illere göre kovan sayısı ve bal üretim miktarı (ton) (Burucu’dan 13).

İller	Kovan Varlığı					Bal Üretim Miktarı				
	2017	2018	2019	2020	2021	2017	2018	2019	2020	2021
Muğla	958 328	935 463	918 116	900 583	949 267	15 867	14 777	14 688	6 104	3 820
Ordu	562 299	568 547	573 358	573 375	604 213	16 799	16 994	17 057	17 213	11 377
Adana	454 768	461 987	469 938	481 557	481 878	10 729	10 941	11 077	12 172	12 336
Antalya	226 592	230 323	217 705	216 423	335 686	-	-	-	-	-
Mersin	273 384	267 251	282 749	290 795	303 120	3 864	2 416	2 352	2 150	3 192
İzmir	215 743	232 009	244 519	273 949	276 918	2 836	2 777	3 007	1 493	3 056
Sivas	215 878	239 575	243 673	256 374	269 709	3 715	5 048	5 029	5 471	5 744
Bitlis	131 484	155 899	168 888	158 976	253 625	-	-	-	-	-
Aydın	280 386	281 060	274 826	257 738	253 606	4 357	4 227	3 693	3 643	3 254
Trabzon	166 191	180 182	172 785	167 246	178 696	-	-	-	-	-
Balıkesir	-	-	-	-	-	3 261	2 618	2 480	2 657	2 656
Siirt	-	-	-	-	-	1 786	711	663	2 401	2 323
Van	-	-	-	-	-	1 928	1 652	1 869	1 942	2 216
Diğer	4 506 019	4 556 128	4 561 803	4 602 069	4 826 676	49 329	45 759	47 413	48 833	46 370
Türkiye	7 991 072	8 108 424	8 128 360	8 179 085	8 733 394	114 471	107 920	109 330	104 077	96 344

Türkiye’de 2021 yılı verilerine göre, Ege Bölgesi kovan varlığı bakımından 17 milyon adet ile ilk sırada yer almaktadır. Çam balının yoğun olarak üretildiği bölge olup arıcılık ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır. Akdeniz Bölgesi 1.5 milyon adet kovan ile %17.2’lik pay ile ikinci sırada yer almakta, Doğu Karadeniz Bölgesi 1.2 milyon adet kovan ile %13.8’lik paya sahip olup üçüncü sırada yer almıştır. Bal üretiminde ise, Akdeniz Bölgesi 21 bin 946 ton üretim ile ilk sırada yer almıştır. Doğu Karadeniz Bölgesi 15 bin 615 ton üretim ile, %16.2’lik pay ile ikinci sırada, Ege Bölgesi ise 11 bin 885 ton üretim ile, %12.3’lük pay ile üçüncü sırada yer almıştır (12, 14).

Türkiye’de bal üretim konusundaki dış ticaret hacmi yıllara göre dalgalanma halindedir. Kimi yıllarda artış görünürken, kimi yıllarda azalış söz konusudur (12).

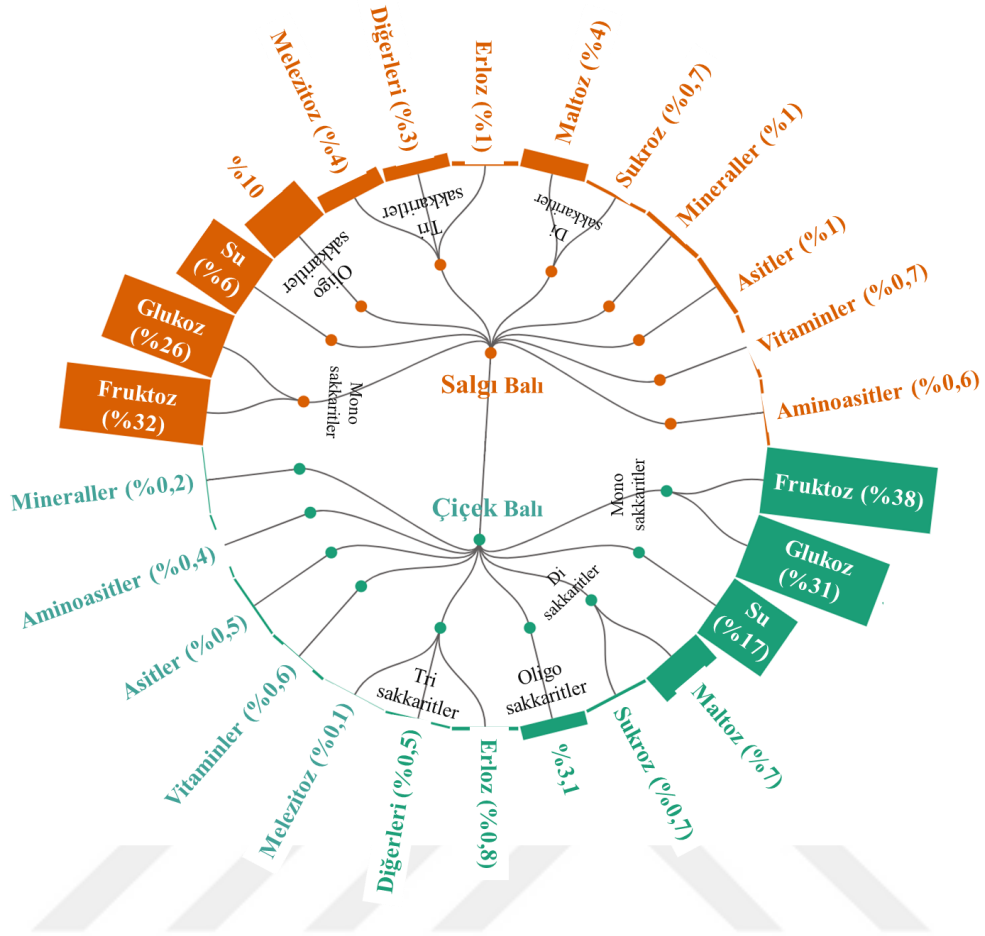
Ülkemizde bal dış ticareti süzme ve petek bal olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Bal ihracatı 2021 (14) yılında 9 bin 976 ton olarak gerçekleşmiş olup aynı yıl verilerinde ithalat 29 341 ton olarak kaydedilmiştir. Balla birlikte, propolis, arı sütü, polen ve balmumu gibi arı ürünleri de dünya ticaretinde kullanılmaktadır (15).

2.3. Balın Tanımı ve Yapısı

Bal, bal arıları tarafından bitkilerin nektarından veya bitkilerin canlı parçalarının salgılarından veya bitkilerin canlı parçalarındaki bitki emici böceklerin salgılarından elde edilen doğal tatlı bir maddedir. Arılar, bu maddeleri toplar, kendi özgün maddeleriyle birleştirerek dönüştürür, peteklere depo eder, kurutur ve olgunlaşması için bal peteklerinde bırakır. Kodeks Alimentarius (CA) standardına göre, satılan balın içerisine başka gıda bileşeni, gıda katkı maddesi veya bal dışında başka eklemeler yapılmamış olmalıdır. Bal, işlenmesi ve saklanması sırasında yabancı maddelerden emilmiş olan rahatsız edici madde, lezzet, aroma veya kirletici madde kokusu taşımamalıdır (16).

Bal, genellikle glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz; su; ve proteinler, organik asitler, amino asitler, vitaminler, flavonoidler ve asetilkolin gibi diğer minör bileşenleri içerir (17). Genel olarak saf bal, polen, balmumu izleri, değişken miktarlarda şeker toleranslı mayalar ve dekstroz hidrat kristalleri gibi yabancı maddeler içerir. %17.1'den az su içeren bal bir yıl içinde fermente olmaz. Çoğu bal, önlem alınmazsa zamanla kristalleşir.

Balın yapısının büyük bir kısmını yaklaşık %80-85 oranında karbonhidratlar ve %17 oranında su oluşturur. Geri kalan kısmı yaklaşık %1-2 oranında çeşitli bileşenler (proteinler, enzimler, aminoasitler, vitaminler, organik asitler, uçucu yağlar, flavonoidler, fenolik asitler, mineraller, küller, iz elementleri, polen) içerir (18). Bu bileşimler, arıların topladığı bitki türlerine, iklim koşullarına, coğrafik özelliklere, üretim biçimine, üretim yapıldığı zamana ve bal arısı türüne göre değişiklik gösterir (19). Balın bileşiminin ortalama değerleri Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Balın bazı bileşenleri (Anklam'dan, 18)

2.3.1. Karbonhidratlar

Şekerler (sakkaritler) balın büyük bölümünü (~%80) oluşturur. Çoğunlukla monosakkarit olan fruktoz ve glikozdan oluşur. Diğer kısmı oligosakkaritlerden oluşmaktadır. Balın içerisinde, invert şurup, konvansiyonel mısır şurubu ve yüksek fruktozlu mısır şurubu da kullanılmaktadır (18). Bal, şekerlerin ve diğer bileşenlerden oluşan bir karışımdır. Karbonhidratlar ayrıca kristalizasyonda da önemli rol oynamaktadır.

2.3.2. Proteinler ve Amino Asitler

Bal yaklaşık olarak %0.4-0.6 oranında protein içerir (20). Balda on sekiz amino asit bulunur; prolin, toplam amino asit profilinin %50-85'ini temsil eder. Arginin, triptofan ve sistin bazı bal türlerinde karakteristik amino asitlerdir (18). Enzimler bu proteinlerin küçük bir kısmını oluşturur. Hem nektardan hem de arılardan kaynaklanan balda bulunan enzimler yaygındır (21). Baskın enzimler, nişastayı daha küçük birimlere ayıran diastazdır (amilaz); glukozu fruktoza dönüştüren invertaz (glukosidaz) ve glukozun glukonolaktone

dönüşümünü katalize ederek glukonik asit ve hidrojen peroksit üretimine neden olan glukoz oksidazdır (22). Katalaz bazı polen tanelerinde doğal olarak bulunur, katalaz hidrojen peroksidi nötralize eder (21, 23).

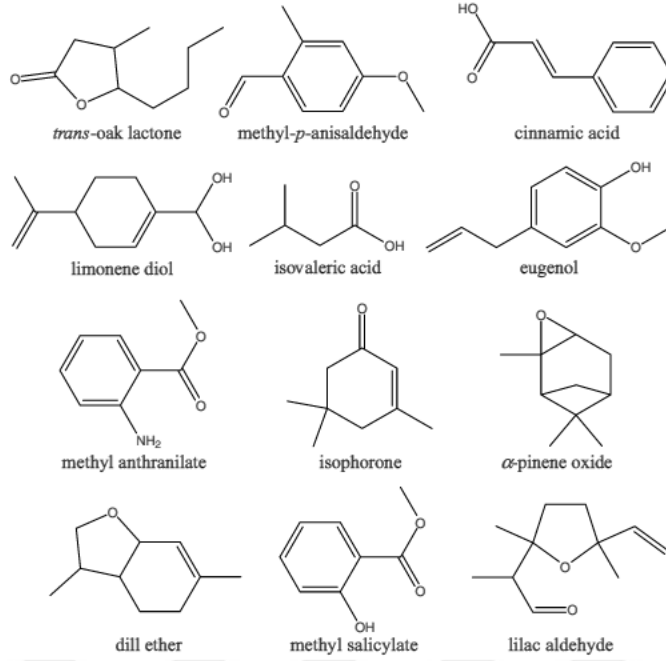
2.3.3. Vitaminler ve Mineraller

Balda eser miktarda B vitaminleri (riboflavin, niasin, folik asit, pantotenik asit ve B6 vitamini) ve C vitaminleri (askorbik asit) bulunur. İşlenmemiş balda birçok farklı mineral (kalsiyum, demir, çinko, potasyum, krom, fosfor, magnezyum ve manganez) bulunmaktadır.

2.3.4. Uçucu Yağlar

Balda 600'den fazla uçucu organik bileşik tanımlanmıştır. Uçucular, standart oda sıcaklığında yüksek buhar basıncına sahip organik kimyasallardır. Daha önce balda yedi ana grup karakterize edilmiştir; aldehytler, ketonlar, asitler, alkoller, esterler, hidrokarbonlar ve siklik bileşikler (24). Baskın uçucular Şekil 2.2' de görülebilir (19).

Bal, düşük konsantrasyonda birçok uçucu yağ içerir ancak uçucu yağlar balın duysal özelliklerini etkiler; tat, aroma, renk ve dokusu, arıların ziyaret ettiği bitki ve çiçek türlerinden etkilenir (24). Bazı uçucu yağlar bitkilerden veya nektar kaynağından kaynaklanırken diğerleri balın işlenmesi veya depolanması sırasında oluşur veya dönüşür (25–27). Bal ısıtıldığında Maillard reaksiyonu meydana gelir; şekerler ile amino asitler arasında bir enzimatik olmayan kahverengileşme reaksiyonu gerçekleşir ve bu da uçucu yağların üretimine veya dönüşümüne neden olur (27). Mikrobiyal ve çevresel kirlilik de uçucu yağların sayısına katkıda bulunabilir (24).



Şekil 2.2. Balda bulunan seçili bazı uçucu bileşiklerin yapısı (Kaşkoniene'den, 19).

2.3.5. Fenolik Bileşikler

Balda tespit edilen ana fenolik bileşikler flavonoidlerdir: kuersetin, pinosembrin, pinobanksin, krisin, galangin, kemferol ve luteolin (19, 28, 29). Aromatik asitler aromatik bir halka ve organik bir asit fonksiyonu (C6-C1 iskeleti) içerir. Fenolik bileşikler, fenolik bir halka ve organik karboksilik asit fonksiyonu içerdiğinden, aromatik asitlerin bir örneğidir. Fenolik asitler birçok bitki türünde bulunabilir (30–32). Flavonoidler bitkilerin özelleşmiş metabolitleridir ve birçok fonksiyonu yerine getirir. Bitki pigmentasyonu, UV filtrasyonu ve simbiyotik azot fiksasyonu için önemlidirler (33). Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunur ve temel moleküler yapıları 2-fenil-1,4-benzopiron'dur. Bitkisel kökenli fenolik asitler arasında benzoik, ferulik, gallik, klorojenik, kafeik, p-kumarik, ellagik ve şirinjik asitler bulunur. Fenolik bileşiklerin antibakteriyel, anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteleri vardır. Fitokimyasal bileşimin balın biyoaktivitesi üzerinde etkisi vardır. Fenolik bileşikler, balın depolanması ve işlenmesi, mikrobiyal veya çevresel kirlilik, coğrafik dağılım, nektar ve polen kaynağı gibi bitkisel kaynaklarından etkilenir (19).

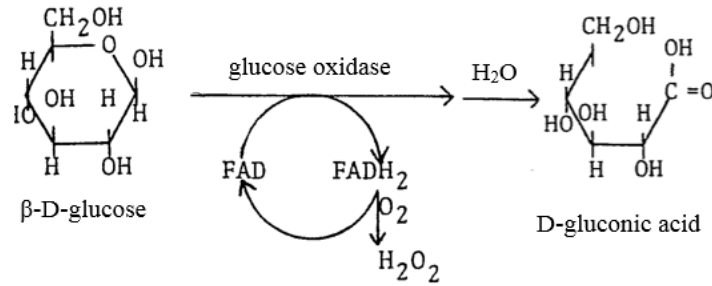
2.3.6. Diğer Bileşikler

Balda asetik, formik, sitrik, laktik, malik ve glukonik asitler dahil organik asitler bulunur (34). Glukozun glukoz oksidaz tarafından parçalanması sonucu glukonik asitin üretilmesiyle glukonik asit de balda bulunur. Ayrıca, basit şekerlerin parçalanması sonucu

doğal olarak hidroksimetilfurfural oluşur (35). Mikroelementler arasında bakır, kadmiyum, manganez ve demir gibi metaller de bulunur (36).

Doğal balda düşük seviyelerde hidrojen peroksit bulunur. Hidrojen peroksit, glukozun glukoz oksidaz enziminin etkisiyle glukonik asit ve hidrojen peroksit dönüştürülmesi sonucu oluşur (37) (Şekil 2.3). Glukoz oksidaz, bal arılarının nektarın olgunlaşma sürecinde hipofarengal bezlerinde üretilir (22). Olgunlaşma süreci, glukoz oksidazın etkinliğini yok eder; bu aktivite, balın seyreltilmesiyle yeniden aktive edilir (37, 38). Konsantre balın daha düşük pH değeri, glukoz oksidazın aktivasyonu için gerekli olan aralığın dışında olduğu öne sürülmüştür (39). Balın tüketilmesi veya yaralara uygulanması sırasında seyreltilince hidrojen peroksit üretilebilir ve balın antibakteriyel etkisi artabilir (40).

Hidrojen peroksit konsantrasyonu, farklı faktörlerin etkisiyle bal türlerine göre değişebilir. Bu faktörler arasında aşırı ısı veya ışık, nektarda bulunan katalaz seviyeleri veya kimyasal tarama aktivitesi gibi etkenler bulunur (21, 39, 41, 42). Bal, glukozidaz aktivitesi seviyelerini etkileyebilen katalaz, peroksidazlar, metilglioksal ve antioksidanların farklı miktarlarını içerir (21, 29, 43).



Şekil 2.3. Glukoz oksidazın bal içindeki kimyasal reaksiyonu (White'den, 39).

2.3.7. Polen, Propolis ve Arı Sütü

Polen, tohumlu bitkilerde genellikle ince bir toz halinde görünen mikrosporların bir kümesidir. Polen, angiospermelerde erkek organ olan anterlerde, gimnospermelerde ise erkek kozalaklarının mikrosporofillerinde meydana gelmektedir (44). Her polen tanesi, çeşitli araçlarla (rüzgar, su, böcekler vb.) dışı üreme yapısına taşınır ve burada döllenme gerçekleşir (45). Polen tanesi dış çeperi olan ekzin, taşıma sırasında polenin zarar görmesini önlemek

için serttir. Ayrıca, ekzin polen tanesi için bazı morfolojik özellikler sağlar ve bitki türünü taksonomik olarak tanımlamak için kullanılır (44). Ekzin süslemelerinin yanı sıra, boyut, şekil, renk ve apertür türü gibi diğer karakterler taksonlar arasındaki ilişkiyi ortaya koyarak, problemlerin çözülmesi ve taksonomik durumların değerlendirmesi için kullanılır. Polen morfolojisi, morfolojik araştırmalar için yardımcı yöntem olarak, türleri sınıflandırmak için taksonomistlerin yararlandığı önemli bir araçtır (46).

Polen, arı larvaları ve genç işçilerin ana protein kaynağıdır; gelişimleri için gerekli olan besin gereksinimlerini sağlar. Proteinlerin yanı sıra, polen ayrıca karbonhidratlar, amino asitler, DNA, nükleik asitler, lipitler, vitaminler, mineraller, fenolik bileşikler ve flavonoidler içerir (47). Polenin kimyasal bileşimi, polenin toplandığı bitki türüne, coğrafik kökene ve mevsime bağlı olarak değişebilir (48).

Polen, çiçeklerin anterlerinde üretilen erkek gametofittir (üreme birimleri). Polen taneleri, bitki kaynağına bağlı olarak farklı boyutlar, şekiller ve renkler sergileyebilir. Polen tanelerini tanımak için dikkate alınması gereken üç temel morfolojik özellik bulunmaktadır: boyut, apertürler ve şekilleridir.

Polen bileşimindeki belirli bileşenlerin yüzdesi, başlıca bitkisel kökenine, üretildiği coğrafik bölgeye, iklim ve işleme koşullarına bağlı olarak değişir (49). Polen, içeriğini oluşturan maddeler nedeniyle insan tüketimi için faydalı bir kovan ürünü olarak kabul edilir (50). Polen, çoğunlukla su (%20-30), karbonhidratlar (fruktoz, glukoz, sakkaroz ve lifler; %13-55), proteinler (%10-40) ve yağlar (%1-13) olmak üzere, ayrıca mineraller ve vitaminler gibi diğer miktarı düşük bileşenleri de içerir (50). Yüksek besin değerine ek olarak, birçok çalışma, polenin ayrıca karotenoidler ve polifenoller gibi biyoaktif bileşikler ve antioksidanlar içerdiğini (fenolik asitler ve flavonoidler) göstermiştir (50, 51). Ayrıca, in vitro çalışmalar polenin anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antikanser, antitümör ve immunomodülatuar gibi çok ilginç terapötik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (52).

Propolis bitki özütlerinden üretilir; arılar reçineli maddeyle kovayı sızdırmaz bir bariyer oluşturarak müdahalecilere karşı koruma sağlarlar (53). Propolis, reçine (%50), balmumu (%30), uçucu yağlar (%10), polen (%5) ve diğer organik bileşikler (%5) içerir (53). Fenolik bileşikler, esterler, flavonoidler, terpenler ve antrakınonlar dahil olmak üzere 300'den fazla bileşik propolis içinde bulunmuştur (54–56). İşçi arıların hipofarenks bezleri tarafından salgılanan proteinli bir sıvı olan arı sütü; yalnızca yetişkin kraliçe arılara özel olarak üretilir ve önemli bir besin kaynağıdır (53). Arı sütünün kuru kütlesinin %50' den

fazlası proteindir ve ana arı sütü proteinleri araştırılmış ve analiz edilmiştir (20). Arı sütü, astım, yüksek kolesterol ve mevsimsel alerjiler dahil birçok hastalığın tedavisinde takviye olarak kullanılmaktadır.

2.4. Balın Sınıflandırılması

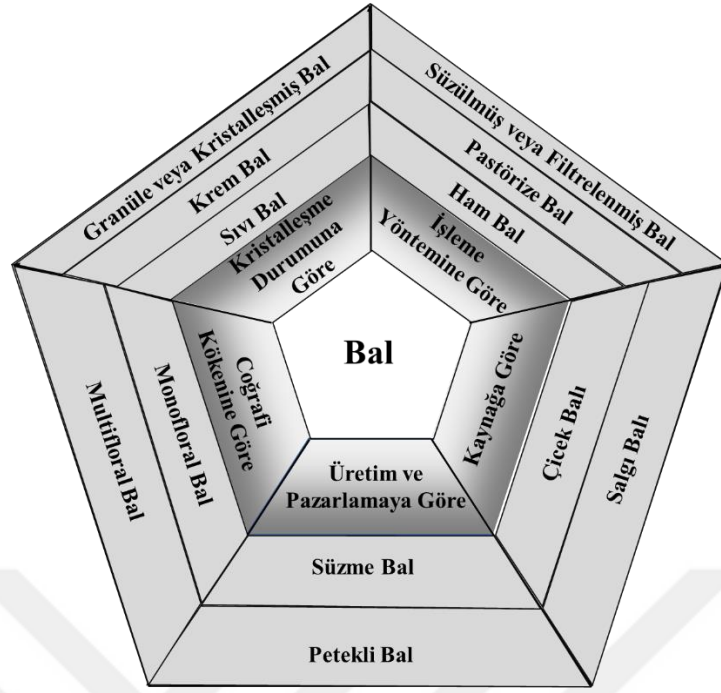
Balın sınıflandırılması genellikle rengi, kokusu, tadı, kaynağı, işleme süreci, kristalleşme durumu ve coğrafik kökeni gibi birçok faktöre bağlıdır (Şekil 2.4).

Kaynağa Göre: Çiçek balı ve salgı balı diye ikiye ayrılır. Çiçek balı, bitki nektarından elde edilmiş baldır, salgı balı (bal özü) ise genellikle yaprak dökmeyen bitkilerde bulunan, ancak yaprak döken ağaçlarda da bulunan kışın yaşayan böceklerin (Hemiptera) salgılarından elde edilmiştir. Bal özü balının bazı örnekleri orman balı ve çam balıdır. Salgı balı genellikle koyu bir renge ve güçlü, acı bir tada sahiptir (57).

İşleme Yöntemine Göre: Ham bal, kovandan çıkarılır ve süzülür, ancak pastörize edilmez veya ısıtılmaz. Bu, balın doğal vitaminlerini, minerallerini ve antioksidanlarını korur. Pastörize bal, fermantasyonu önlemek ve raf ömrünü uzatmak için ısıtılır. Ancak, bu işlem bazen balın besin değerini azaltabilir. Süzölmüş veya filtrelenmiş bal, partikülleri ve hava kabarcıklarını gidermek için bir filtre veya elekten geçirilir. Bu, balın daha berrak ve pürüzsüz görünmesini sağlar (58).

Kristalleşme Durumuna Göre: Sıvı bal, balın en yaygın formudur ve genellikle kahvaltıda veya pişirme sırasında kullanılır. Krem bal, özel bir işlemle kristalleştirilir, bu da onu yayılabilir ve daha yoğun bir kıvama getirir. Bu, genellikle ekmek üzerine sürmek için kullanılır. Granüle veya kristalleşmiş bal, ballar zamanla doğal olarak kristalleşir. Bu, balın soğuk bir yerde saklanmasıyla veya yaşlanmasıyla kaynaklanabilir (59).

Coğrafik Kökenine Göre: Kökene göre balları, monofloral ve multifloral olmak üzere ikiye ayrılır. Bal esas olarak belirli bir botanik kaynağın nektarından elde edilir. Arılar, kendi başlarına hayatta kalamayacakları için kovanın 4 km yarıçapı içinde kalmak gibi doğuştan gelen bir içgüdüye sahiptir. Arıcı, arı kovanlarını, arılarının yalnızca tek bir çiçek veya bitki türüne erişebileceği şekilde yerleştirmektedir. Bu süreci tamamen yönlendirmek imkansızdır, bu nedenle her monofloral bal diğer bitkilerden de nektar almaktadır. Baldaki nektarın en az %50'si tek bir botanik kaynaktan geliyorsa, monofloral baldan söz edilebilir. Multifloral bal ise, arılar tarafından çok çeşitli çiçek ve bitkilerin nektarından meydana gelmektedir (60).



Şekil 2.4. Balların sınıflandırması

2.5. Polen Toplama Süreci

Tüm canlı varlıkların en önemli amacı, nesillerinin devamlılığını sağlamaktır. Bitkiler için bu, yeni bir bitki bireyi oluşturmak için genetik bilgi içeren tohumların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Tohum oluşumuna yol açan süreç döllenme ile başlar. Bu da erkek anterden polen tanelerinin dışı çiçeğin stigma bölgesine aktarılmasını içerir. Su, rüzgar ve hayvanlar gibi birçok doğal aracı, polenin bir çiçekten diğerine taşınmasını sağlar. Tozlayıcılar, tüylü vücutları sayesinde polenin yapışabileceği hayvanların bir kümesidir (63). Böcekler, hayvanlar aleminin en önemli tozlayıcılarıdır ve böcekler dışındaki diğer tozlayıcılar kuşlar ve yarasalardır, bu da tozlayıcı hayvanların sadece %10'unu temsil eder (64). Böcekler (Insecta) sınıfı içinde, birçok çalışma, tozlayıcıların çoğunluğunun arılar olduğunu göstermiştir; bunlar arasında bal arıları, bombus arıları, bahçe arıları, kabak arıları sayılabilir. Arılar tozlaşmada en önemli canlılardır. Bu türler arasında bal arıları, %96 oranında birçok hayvan tozlayıcıya göre üründe verimi artırabilme yeteneği nedeniyle tarımda önemli bir rol oynamaktadır (63).

Bal arıları, *Apis mellifera* L., Apidae familyasına ait Hymenoptera böcekleridir. Hayvan sosyalitesinin yüksek düzeyde örgütlenmesine sahiptirler ve üreme dişisi (ana arı), üremeyen diploit dişilerden oluşan bir grup (işçi arılar) ve haploit erkeklerden (erkek arılar)

oluşan kolonilerde yaşayan işbirlikçi yavrulara bakım yapma özelliğine sahiptirler. İlk üç haftalarında, genç işçi arılar kovan içerisinde çeşitli görevleri yerine getirirler. Larvalara besin verme ve temizleme, petek hücrelerini temizleme, petek inşa etme, koloniyi koruma, ana arıya bakma, toplayıcılardan polen kabul etme, poleni depolama ve paketleme gibi görevlerden sorumludurlar. İşçi arılar yaşlandıkça, larvaların besinini ve balmumu üreten bezler dumura uğrar ve larva yuvasını terk ederek toplayıcı hayatına entegre olmaya başlarlar. Tozlayıcı arılar, çiçeklenme dönemlerinde farklı çiçeklerden su, propolis, nektar ve polen toplarlar (64).

Bal arılarının besin arayışını etkileyen üç ana nektar özelliği bulunmaktadır: şeker bileşimi, nektar yoğunluğu ve nektar hacmi (65–67) dir. Bal arılarının farklı yoğunluklarda nektar topladıkları, glukoz yerine sakkaroz ve fruktozu tercih ettiği, tercihlerinin %30-50 sakkaroz olduğu bulunmuştur (66).

Polen, kolonideki en yaşlı işçi arılar olan toplayıcı arılar tarafından kovanlara getirilir. Toplayıcı arılar çiçekleri ziyaret ettiklerinde, çiçeklerin negatif yükü ile arıların vücudundaki pozitif yük arasında oluşan zayıf elektrostatik alan sayesinde yüzlerce, hatta binlerce polen tanesi arıya yapışır (70). Polen taneleri, toplayıcı arının arka bacaklarındaki taraklar ve kıllar kullanılarak bir araya getirilir. Tükürük salgıları ve nektarla ıslatılan bu polenler, 1.4-4 mm boyutunda polen peletleri haline getirilir. Bu peletler, arının arka bacaklarındaki sepet ya da corbiculae adı verilen bölmede taşınır ve kovanın içindeki yavru arılar ile hemşire arılar (larvaları beslemek ve bakmakla yükümlü genç işçiler) tarafından protein ihtiyacını karşılamak ve besin bezlerinde jöle sentezlemek için kullanılır (69). Sağlıklı bir koloni, günde 50-250 g veya yılda 15-40 kg arasında polen toplayabilir (49). Toplayıcı arılar tarafından taşınan bu polen peletleri, kovanların girişine yerleştirilen bir tuzak yardımıyla toplanabilir.

Arıların topladığı polenlerin taksonomik olarak tanımlanması, bitki-böcek etkileşim dinamikleri, habitat kullanımı, habitat ve yem kalitesi ile ilgili belirli soruları hem ekolojik hem de politika açısından ele alma potansiyeline sahiptir. Bu bilgiler, tozlayıcıların değerlendirilmesi ve geliştirilmesine yönelik kararları etkileyebilir, böylece bitki ve arı popülasyonlarının ve tozlaşma hizmetlerinin gelecekteki güvenliğine katkıda bulunabilir (70). Bal arısı sağlığı, üretkenliği ve hayatta kalması ile yiyecek arama sezonu boyunca belirli çiçek kaynaklarını ilişkilendirmek amacıyla yoğun bir şekilde yönetilen peyzajlarda genel habitat kalitesinin titiz değerlendirmeleri yakın zamanda ele alınmıştır. Örneğin

Requier vd. (2015) (71) ve Smart vd. (2017) (72), bal arılarının yoğun tarımsal ekosistemlerde bulunan gönüllü ve tanıtılmış türlerden çarpıcı derecede yüksek oranda yararlandığını ve bunlara bağımlı olduğunu tespit etmiştir. Bal arısı yemleme kaynaklarını peyzajlar genelinde hızlı, doğru ve verimli bir şekilde ölçebilecek yöntemlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır.

Çiçek ziyareti çalışmaları bitki ya da böcek odaklı olabilir. Tarihi olarak, tozlayıcıların beslenmesi bitkileri ziyaret eden böcekler gözlemlenerek incelenmiştir. Bu, yerleşik habitatlarda (73–75) veya deneysel koşullarda (76) hangi tozlayıcıların bitkileri ziyaret ettiğinin kaydedilmesini içerir. Alternatif olarak, böcekler kendileri gözlemlenebilir ve çiçek ziyareti, boya, plastik etiketler sallanma dansı (77) veya harmonik radar gibi yöntemlerle takip edilebilir (78) ancak elektronik etiketler çiçek kaynaklarının konumu hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirir. Bal arılarında, kaynakların konumu sallanma dansları kullanılarak koloniye iletilir, bu da beslenme tercihlerini ve davranışı aydınlatmak için çözümlenebilen bir iletişim yöntemidir (79).

Yiyecek arayan bal arıları, karmaşık bir iletişim yöntemi olan sallanma danslarını kullanarak kaynakların yerlerini koloniye bildirirler (80). Sallanma dansında kaynağın kovana olan uzaklığı, yönü ve kalitesi yer alır. Yüksek kaliteli yem kaynaklarından dönen toplayıcıların, daha düşük kaliteli yem kaynaklarından dönenlere kıyasla dans etme olasılığı daha yüksektir (83); kaynaklar nektar, polen, su, ağaç reçinesi ve yeni yuva alanlarıdır (84). Geri dönen toplayıcının polen taşıyıp taşımadığı gözlemlenerek, işçinin polen veya nektar kaynağı ile iletişim kurup kurmadığı arasında bir ayrım yapılabilir (83).

Riley vd. (84) toplayıcıların uçuş yollarını sallanma danslarıyla karşılaştırmak için harmonik radar kullanmış ve sallanma dansının oldukça etkili olduğunu ancak yine de uçuşun sonunda koku ve görsel ipuçlarına ihtiyaç duyduğunu bulmuştur. Harmonik radar, bal arılarının yön bulma gezilerini izlemek için de kullanılmıştır; bu geziler, yiyecek arama gezilerinden daha kısadır çünkü yiyecek arayan bal arılarının harmonik radar takibinin 700 m menzilini terk ettikleri bulunmuştur (85).

Yiyecek kaynakları parça boyutu ve kalitesi açısından oldukça değişken olduğunda, bal arılarının katettikleri mesafeler daha büyük olabilir; Beekman ve Ratnieks (86) tarafından kaydedilen ortalama mesafe 6.1 km olarak belirlenmiş, bazı gezilerde ise 10 km'nin üzerine çıkmıştır. Daha az parçalı bir manzara içinde ise (87), yaprak döken bir ormanda ortalama besin arayış mesafesinin 1.7 km olduğunu, besin arayışının %95'inin 6

km içinde gerçekleştiğini bulmuştur. Ortalama besin arayış mesafesi ve alanı aynı zamanda yıllık döngüye göre değişkenlik göstermiştir; ilkbahardan yaz aylarına doğru artışlar gözlenmiş, sonbaharda ise yiyecek kaynaklarının bulunabilirliği ile ilgili olarak azalmıştır (88).

Bitkilerin diğer organizmalardan farklı olarak nasıl işlev gördüğünü tanımlayan en önemli özellik, hareket edememeleridir. Ancak tüm hayvanlar gibi bir eş bulmalı ve erkek gametleri dişi gamete ulaştırmalıdır ve bitkiler bunu yapamadığı için başka birilerini bulmak zorundadırlar. Birçok bitki türü için (özellikle çiçekli bitkiler için) bu rol, polinatörler tarafından gerçekleşir ve arılar, özellikle bal arıları, en önemlileri arasındadır (63). Arıların sağladığı tozlaşma hizmeti sayesinde bitkiler üreyebilir ve hayatta kalabilir, bu nedenle bu organizmaların doğal ve tarım ekosistemlerinin bütünlüğü için önemi büyüktür (89). Arılar karşılığında nektar ve polenle ödüllendirilirler. Doğada en önemli karşılıklı ilişkilerden biri olarak kabul edilir ve arıların kolonilerini beslemesine ve bitkilerin üremesine olanak tanır. Bu nedenle tozlaşma, önemli bir doğal ekosistem hizmetidir. Birçok bitki ve hayvanın var olması için gereklidir, ayrıca insanlara gıda sağlamak için de gereklidir (92). Polen, dünyanın en iyi gıda ürünü olarak kabul edilir ve küresel üretimi yılda yaklaşık 1 500 tona yakındır (91).

Hem bitki hem de böcek odaklı gözlemler kullanılarak bitkiler ve tozlayıcılar arasındaki etkileşimler, bireylerin izlenmesindeki zorluklar nedeniyle (77) genellikle tür düzeyinde karakterize edilir (75). DNA metabarkodlama ve polen mikroskopisi gibi çiçek ziyaretlerini belirlemeye yönelik böcek odaklı yöntemler, gözlemsel yöntemlerle görülemeyen etkileşimleri ortaya çıkarabilir (92–97). Bu yöntemleri kullanılarak bir böceğin vücudundaki polenin tanımlanması, değerli bireysel yiyecek arama tercihlerinin görsel araştırmalara göre daha kolay karakterize edilmesini sağlar (98). Polen mikroskobu ve DNA metabarkodlamayı karşılaştıran birçok araştırmacı, DNA metabarkodlama kullanılarak tespit edilen bitki taksonlarının daha yüksek taksonomik çözünürlüğe sahip olduğunu (7, 99) ve daha fazla sayıda tür tespit edildiğini bulmuşlardır (7, 72, 100, 101).

Polen mikroskopisi ve DNA metabarkodlama, beslenme üzerine değerli bireysel düzeyde bilgi sağlarken, bitki taksonlarının DNA kullanılarak tanımlanması, mikroskop için uzman palinologlara olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Ayrıca zaman alıcı ve başlangıçta maliyetli olmasına rağmen (102), moleküler süreçler kolayca ölçeklendirilebilir (72, 103). Yarı nicel veri kullanımı (metodolojik düşünceler içinde detaylı olarak tartışılmıştır), bitki-

tozlayıcı ilişkilerinin ölçülebilmesine olanak tanır ve sıklıkla karşılaşma frekansına göre beslenme alışkanlıklarının daha hassas bir temsilini sağlayabilir (104).

2.6. Ballarda Standardizasyon

Arılar bal üretimi için çiçekli bitkilerden nektar, polen ayrıca bitkilerin canlı kısımlarından salgı toplarlar, bu nedenle elde edilen numune, arıların ziyaret ettiği bitkilerin yansımasıdır. Bir balın özellikleri, arıların beslenmesindeki floral farklılıklarından dolayı büyük ölçüde değişebilir (105). Renk ve tat, bitki kaynaklı pigmentlerin ve fitokimyasalların varlığına bağlıdır; nektarın daha koyu olması, biyoflavonoid ve mineral içeriğinin daha yüksek olduğunu gösterir.

Bal karakterizasyonu için standart yöntemler, bal analizi için analitik yöntemleri geliştirmek ve kalite ölçütlerini temel almak amacıyla Uluslararası Bal Komisyonu (IHC) tarafından oluşturulmuştur (106). Satışa sunulan balın bitki kaynağının karakterizasyonu için gerekliliktir (107). IHC, rutin bal karakterizasyonu için kullanılmak üzere bir dizi yöntem belirlemiştir (Şekil 2.5). Bu kontroller, bal kalitesinin belirlenmesinde etkili olan tüm özellikleri içerecek şekilde tasarlanmıştır (106).

Nem miktarı	- Genel olarak - %21'den az - Endüstriyel bal - %25'den az
Hidroksimetilfurfural (HMF) miktarı	40 mg/kg'dan (ppm) az
Diastaz aktivitesi	8'den fazla
İnvert şeker	- Çiçek balı - %65'ten fazla - Tatlı bal ve karışımları - %60'tan fazla
Serbest asitlik	%40'tan az
Sükroz içeriği	- Genel olarak-en fazla %5 - Tatlı bal ve karışımları - en fazla %5
Mineral (kül) içeriği	- Genel olarak - %0,6'dan az - Tatlı bal ve karışımları - %1,2'den az
Suda çözünmeyen katı madde içeriği	- Genel olarak - %0,1'den az - Sıkıştırılmış bal - %0,5'ten fazla

Şekil 2.5. Uluslararası Bal Komisyonu'nun bal standardizasyon kriterleri ve değerleri (Hawkins'ten, 8).

2.7. Anzer Balı

Rize'nin İkizdere ilçesi yakınlarında bulunan Anzer (Ballıköy), özel bir coğrafyaya sahiptir. Bu yörede üretilen ballara genel olarak “Anzer Balı” denilmektedir. Anzer Balı'nın üretildiği bu yer, "U" biçiminde bir vadidir ve denizden yüksekliği 1750 ile 3150 metre arasındaki dağlarla çevrili olarak doğal bir ekosistem oluşturmaktadır (5). Yıl boyunca genelde yağışlı olduğundan dolayı yıllık sıcaklık ortalaması düşük ve güneşli gün sayısı sayılıdır. Anzer (Ballıköy) çok sayıda endemik bitkinin de yayılış gösterdiği floristik zenginliği açısından dikkat çeken bir yer olma özelliğindedir (108). Diğer bölgelerden iklimi, zengin bitki çeşitliliği, farklı endemik türlerin yer alması, bitki örtüsünün alpinik olması bakımından farklılaşır. Dünyaca ünlü özel çiçek ballarından biri olan Anzer Balı, bu bölgede farklı kooperatif üyeleri tarafından üretilmektedir. 500 farklı çiçekli bitki nektarından üretilen bu ballar ayrıca birçok endemik türe de ev sahipliği yaptığı için de benzersizdir (109). Anzer Balı'nın sağım zamanında iklim şartları önemli rol oynar. İklim koşullarına bağlı olarak, *Apis mellifera* (bal arıları) balı genel olarak, Temmuz-Ağustos ayları arasında toplamaktadır. Anzer (Ballıköy) iklim şartlarına bağlı olarak Ağustos'un birinci ya da ikinci haftasında Anzer Balı sağım işlemi denilen işlemle Anzer Balları kovanlardan alınır.

Anzer (Ballıköy) çok fazla endemik türü de ihtiva eden, zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir ve bitki örtüsü alpiniktir. Anzer Balı'nın palinolojik olarak ayırt ediciliği, Fabaceae familyası taksonlarının polenleri bakımından dominant olması, Asteraceae, Boraginaceae, Poaceae, Rosaceae, Geraniaceae ve Lamiaceae familyalarının çiçek polenlerinin bulunması ancak kestane (*Castanea sativa* Mill.) ve komar (*Rhododendron ponticum* L.) bitkilerine ait polenlerin kesinlikle bulunmaması ile ortaya konulmasıdır. Anzer Balı'nın temel ayırt edici özelliği ise unutmabeni (*Myosotis*) polenlerinin minör (%3-%15) veya nadir (%3 den az) olarak bulunmasıdır. Anzer Balı'ndan alınan 10 g balda toplam polen sayısı TPS >1 000 000 değerinde olmaz ve katkı polen içermez (5).

Balın insan sağlığı üzerindeki olumlu rolü, balın saflığı ve bileşimi ile oldukça yakından ilişkili olup üretildiği bölgenin coğrafik özellikleri, florası, hasat zamanı ve üretim şekli gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir (110). Anzer Balı'nın yukarıda sayılan özelliklerinin çok farklı olması, vadede yetişen bitkilere ait polenlerin vitamin, mineral ve proteince çok zengin olmasının yanı sıra pek çok hastalıktan koruyucu etkilerinin yüksek olması Anzer Balı'nın tıbbi değerinin çok yüksek olmasına sebep

olmaktadır (6, 111). Bu durum bu bala olan talebi ve dolayısı ile fiyatının çok yüksek olmasına sebep olmaktadır.

Soğuk ortamda kristalize olarak kremi bir hal alan Anzer Balı'nın nem miktarı %20'nin altındadır. Anzer Balı'nda bulunan sakkaroz, fruktoz ve glukoz şekerlerinin toplamı, prolin, fruktoz/glukoz oranı, suda çözünmeyen madde miktarı, serbest asitlik değeri, elektrik iletkenliği, diastaz sayısı, vb. değerler Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen değerleri sağlamaktadır (112).

Türkiye'de Anzer Balı'yla ilgili sınırlı sayıda fiziksel (elektiriksel iletkenlik), kimyasal (fenolik, antioksidan, antimikrobiyal, kromotografik yöntemler, uçucu yağlar vb.) ve palinolojik çalışmalar bulunmakta ancak moleküler özelliklerin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamaktadır (6, 108, 113). Anzer Balı multifloral bir bal olup, her türlü hastalığın tedavisi olarak kabul edilen bir besindir, bu nedenle çalışmamız sadece tüketici değil, aynı zamanda üretici merkezlidir.

Güner vd. (114) 1987'de yaptıkları çalışmanın bir bölümü Rize'de yetiştirilen 26 yöre balının polen analizleri içermektedir. Bal örneklerinden biri Rize İkizdere Çifteköprü'nden alınmıştır. Dominant olarak yonca (*Trifolium* spp.) taksonuna rastlanmıştır. Genel olarak bal örnekleriyle yapılan polen analizinde 17 familyaya ait 33 bitki çeşidi tespit edilmiştir. Polen miktarı az olan bitkiler minor, % 20-50'den arasında olanlara sekonder, % 50'den çok olanlar ise dominant grup olarak kabul edilir. Bu sınıflandırmaya göre, genellikle kestane (*Castanea sativa*) polenleri dominant olarak bulunmuştur. Bal örneklerinde Fabaceae'ye ait polenler sekonder miktarda yer almaktadır.

Sorkun ve Doğan, 1995'de yaptıkları çalışma Anzer (Ballıköy)'de bulunan 10 mahalle olmak üzere toplam 28 bal örneği üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bal örneklerinin palinolojik yöntemlerle ele alıp dominant, sekonder, minör ve nadir bulunan polenler şeklinde sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalara göre, Anzer Balı polenlerinde dominant olarak Fabaceae (baklagiller) familyasına rastlanmış olup, minör miktarda *Myosotis* polenine rastlandığı ve bu polenin balı karakterize ettiği söylenmiştir (115).

Türkiye'deki balların polen analizi ilk olarak 1976 yılında Quistani (118) tarafından Doğu Karadeniz balları üzerinde yapılmıştır. Sorkun ve İnceoğlu, 1979 ile 1981 yılları arasında İç Anadolu Bölgesi'nde 94 balın polen analizini gerçekleştirmişler. Yapılan incelemeler sonucunda *Peganum harmala* L. (überlik), *Brassica oleracea* L. (lahana), *Hedysarum* sp. L. (Batalak), *Xeranthemum* sp. L. (kağıtçiçeği), *Teucrium orientale* L.

(kirveotu), *Centaurea triumfettii* ALL. (deli kapale) ve *Lapsala communis* L. (şebrek) türleri dominant olarak tespit edilmiştir. Sorkun ve arkadaşları (1979, 1981), yurdumuzdaki balları ve diğer arı ürünlerinin melissopalinojisi üzerine araştırmalar yapmaya devam etmektedir (117).

Son yıllarda arılara yüksek şeker şurubu ile beslenmesi sonucu, yapay bal veya şeker balı üretimi başlamıştır. Bazı üreticiler bal üretimlerini artırmak ve daha fazla kar elde etmek istedikleri için, nektar akışının yoğun olduğu dönemlerde arıları aşırı şeker şurubu ile beslemekte ve böylece doğal bal gibi pazarladıkları yapay bal üretmektedirler. Bu nedenle, daha kolay ve ucuz yöntemlerle ürettikleri bu yapay balı piyasaya sunmaları sonucunda haksız rekabet ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle mevcut bal standardı ile doğal bal ve yapay balı ayırt etmek zor olduğundan, Türkiye'nin farklı bölgelerinde kontrol koşullarında üretilen 127 doğal bal ve 44 yapay bal örneği elde edilmiştir. Bu örnekler üzerinde polen analizleri yapılarak doğal bal ile yapay bal arasındaki farkları belirlemek için net kriterler bulunmaya çalışılmıştır. İlgili çalışmada, 10 g doğal bal ve yapay bal içindeki TPS (10 g balda bulunan toplam polen sayısı) incelenmiş ve bir ayırımın mümkün olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçlar, polen türlerinin toplam sayısının doğal bal ile yapay balı ayırt etmede önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (118).

Gümüş vd. (119) 1999'da Türkiye ballarında üretilen 127 doğal çiçek, 44 katkılı çiçek, 36 doğal salgı ve 23 katkılı salgı balı örneği olmak üzere toplam 227 bal örneğinde fiziksel, kimyasal ve palinolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğal çiçek ballarının, katkılı çiçek ballarından potasyum, prolin, sakkaroz ve TPS 'nin belirgin ayırt edici faktör olduğunu, fruktoz ve glikoz miktarlarının da yardımcı kriterler olduğu ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, doğal salgı ballarının, katkılı salgı ballarından ayıran en önemli kriterler ise sodyum, potasyum, K/ Na oranı ve prolin miktarı olduğu, sakkaroz ve TPS'nin yardımcı unsurlar olduğu saptanmıştır.

Anzer Balı'nın sınırlı sayıda antioksidan özellikleriyle ilgili araştırma mevcuttur (108, 120, 121). Anzer Balı'nın sıçan midesini etanolün neden olduğu artmış vasküler geçirgenliğe karşı koruduğu ve bunun da askorbik asit içeriğiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (122). Korkmaz ve arkadaşları (123) (2009), Anzer Balı'nın etkili bir N-etilmaleimid NEM (endojen sülfidrilleri alkilleyerek vücuttaki sülfidril bağımlı antioksidan sistemi bozan bir sülfidril engelleyicisidir.) yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve sıçanlarda hepatik hasara karşı belirgin bir koruyucu etki sergilediği bildirilmiştir.

Türkiye’deki farklı çiçek ballarında antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş, sonuç olarak, fenolik bileşiklerin içeriği ile antioksidan aktivitenin bal örnekleri için çok iyi korelasyon gösterdiğini doğrulamaktadır (108, 113, 124). Anzer Ballarının uygulanan tüm yöntemlerde önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktiviteye ve diğer çiçek ballarına göre daha yüksek polifenol içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite olarak Anzer florasından ve Kars florasından elde edilen çiçek ballarının *Enterococcus faecalis*’e karşı standartla karşılaştırıldığında orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, tüm örnekler *Escherichia coli*’ye (koli basili) karşı çok düşük aktivite göstermiştir (6).

Literatüre bakıldığında Anzer yöresine ait bal ve polenlerin biyolojik etkinliğinden sorumlu ajanların neler olduğu konusunda bilimsel araştırmalar oldukça sınırlıdır. Anzer yöresine ait bal örneklerinin, diğer yörelere ait çiçek ballarından ve tek floralı ballardan fenolik bileşiklerin çeşitliliği, toplam miktarları ve aynı zamanda antioksidanca zengin bir doğal ürün olduğu belirlenmiştir. Anzer polenlerin fenolik madde içeriğinin ballardan yaklaşık 10-20 kat daha zengin olduğu bulundu (6). Geliştirilen RP-HPLC-UV metodu ile 50 dk. içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılması sağlanmıştır. Anzer yöresine ait bal ve polen örneklerinin benzoik asit bakımından çok zengin olduğu ortaya konulmuştur (108).

Demir vd. (125) 2013’de yaptıkları çalışmada Ayder-Rize’den 41 ve Kedmeç lokasyonundan 21 olmak üzere toplam 62 bal örneği incelemiştir. Bu araştırma ile Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Ericaceae, Fabaceae, Fagaceae, Gentianaceae familyalarına ait taksonların polenleri tespit edilmiştir, Kedmeç lokasyonuna ait bal örneklerinde Geraniaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Malvaceae, Polygonaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Salicaceae, Scrophulariaceae familyalarına ait polenlere rastlanmıştır.

Anzer Balı ve polenin antioksidan kapasiteleri ve enzim inhibisyonu üzerine etkileri araştırılmıştır (6, 113). İnsan sağlığı için önem arz eden üreaz ve hyaluronidaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği, insan sağlığını korumada, antiülseratif, antibakteriyal ve antienflamatuar etkileri olduğu, besin maddesi olarak düzenli tüketilmesinin insan sağlığını korumada önemli biyoaktivitelere sahip olduğu göstermiştir. Ayrıca, antioksidan özellikleri bitkilerde farklı çeşitlerde antioksidanlar mevcut olduğundan ve dolayısıyla her bir antioksidan bileşeni tek tek belirlemek oldukça çok zor olduğu birkaç test uygulanarak anlaşılmıştır. Anzer Balı’nın saflığının belirlenmesi için fiziksel ve

kimyasal analizler yapılmıştır. Türk Gıda Kodeksi'nde göre balda nem içeriği çiçek ve salgı balında en fazla %20 olmalıdır. Bu çalışmada kullanılan Anzer ballarının nem içeriği % 17.90-20.27 arasında olduğu tespit edilmiştir. Anzer ballarının elektriksel iletkenlik değerleri 370-574 mikro siemens/cm arasında değişim göstermektedir. Ballarda ölçülen pH değerleri 3.48-3.95 arasındadır. Prolin değeri 808-1139 mg/kg arasında bulunmuştur. Ayrıca Anzer yöresine ait polenlerin 702-836 mgGAE/100 g (Toplam Fenolik Madde Miktarı) numune arasında olup, orta derecede fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir. Toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, FRAP (Ferrik İndirgeme Antioksidan Gücü) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) arasında yüksek korelasyon olduğu tespit edilmiştir (113).

Türkiye'de balın moleküler özellikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Muğla ve ilçelerinden alınan 12 çam balı örneği mikroskop altında incelenip ardından farklı DNA izolasyon teknikleri yapılarak *rbcL* ve *trnL* genlerinin standart PCR ve Real-Time PCR analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda, Muğla çam balından DNA izolasyonu için en verimli tekniğin DNeasy plant kit olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu tekniklerin DNA saflığı ve kalitesi bakımından karşılaştırılmıştır (126).

Hepsağ vd. (120) 2019'da yaptığı çalışmada, yirmi bir Anzer Balı örneğini birçok fizikokimyasal özellikleri (fruktoz, glukoz bileşimi, elektriksel iletkenlik, pH ve HMF...) açısından incelenmiştir. Sonuçlara göre, bal örneğinin kalitesini ve nitelikleri ortaya konulmuştur. Ayrıca yirmi bal örneğinin toplam antioksidan içerik ve toplam fenolik içerik ile karakterize edildiğini göstermektedir. Bu araştırmada alınan bal örneklerinin toplam fenolik madde içeriği 802.6-1352.6 µg GAE/g bal arasında bulmuştur.

Hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği balın tazeliği ve aşırı ısınması için bir belirteçdir. Kodex Alimentarius (127) (2001) ve Türk Gıda Kodeksi Bal Yönetmeliği'ne (112) (2020) göre, HMF için izin verilen değer maksimum 40 ppm'dir. Yapılan araştırmalarda HMF değerleri findık balı için 9.28 ± 7.13 ppm, 1.66ppm ve Rize'den toplanan bal örneklerinde 9.19 ± 1.12 ppm, Türkiye'nin farklı bal örneklerinde 8.86 ± 0.38 ppm olarak bulunmuştur.

Anzer Balı'nın biyoaktif özelliklerinden sorumlu polifenolik profilinin belirlendiği 11 Anzer Balı örneğinin melissopalınolojik analiz, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam antioksidan aktivitelerinin tespit edildiği ilk detaylı araştırmadır. Antioksidan aktivite, demir (III) indirgeyici antioksidan güç testi (FRAP) ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali temizleme testi ve yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC-UV) analizi yapılmıştır. Anzer balının toplam ortalama fenolik içeriğini 26.92 mg GAE/100 g olarak bulmuştur. Polifenoller balda bulunan en önemli sekonder metabolitler olup bu çalışmada Anzer Balı'nın polifenollerini araştırılmıştır. Sonuç olarak bu balın polifenoller bakımından zengin bir çiçek balı olduğu ortaya konulmuştur. Bunun nedeni olarak Anzer (Ballıköy)'in bitki florası açısından zengin olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Balda majör miktarda krisin, pinosembirin, hesperidin gibi flavonoid yapılı doğal bileşiklerin büyük ölçüde biyolojik aktivitelerinin bulunması balın tıbbi değerini artırmaktadır (121).

Çakır vd. (124) 2020'de yaptıkları çalışmada Türkiye'de üretilen bazı bal örneklerinin antimikrobiyal, polen analizi ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Rize (Anzer), Gümüşhane ve Sivas (Zara) illerinden gelen bal örneklerinin bazı patojenler üzerindeki etkileri antimikrobiyal test ile araştırılmıştır. Yapılan analizlere göre, tüm bal örnekleri *Staphylococcus aureus* ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde etkili olduğu, sadece Anzer bölgesinden gelen bal örneğinde *Escherichia coli* üzerinde etkili olduğu ve hiçbir bal örneğinde *Listeria monocytogenes* ve *Candida albicans* üzerinde aktivite göstermediği ortaya konulmuştur. Bal örneklerinde kimyasal bileşenleri GC-MS analizi ile belirlenmiştir. GC-MS sonuçları, tüm bal örneklerinin antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu gösterdi. Bal örneklerinin yapı tipleri FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi ile belirlendi.

Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nden toplanan bal örneklerinin invert şekeri ile ilgili yapılan araştırmada; Rize balı için 72.874 ± 2.12 , kestane balı için 38.44 ± 2.72 fruktoz bulunmuştur: 38.44 ± 2.72 , fındık balının glukoza 19.35 ± 3 Kedmeç-Ayder balının fruktozu $16.31-65.28$, glukoza $17.23-64.47$ olarak bulunmuştur.

Türkiye'de Ayder (Rize)'den alınan yirmi bal örneğinin melissopalynolojik ve fizikokimyasal analizleri Çelemler ve arkadaşları (2021) (128) tarafından yapılmıştır. Melissopalynolojik analize göre, incelenen örneklerinin 22 familyaya ait 40 takson tespit edilmiştir. İncelenen balların dokuzu monofloral olduğu diğerlerinin ise multifloral olduğu bulunmuştur. Palinolojik verilere göre, incelenen örneklerin bazılarında kestane (*Castanea sativa*) taksonuna ait polenler baskın oranlarda bulunurken, diğer bazı bal örneklerinde *C. sativa*, *Trifolium repens* L. (ak üçgül), *Lotus corniculatus* L. (su sepiği), *Coronilla orientalis* Mill. (Ala körigen) taksonlarına ait polenler sekonder olarak bulunmuştur. Örneklerin 10 g baldaki toplam polen sayısı (TPS 10) değerleri melissopalynolojik analiz ile 7 732 ile 167

147 arasında bulunmuştur. Fizikokimyasal analizin ilk basamağı nem analizi olup, değerler %15.8 ile %18.8 arasında bulunmuştur. Fruktoz/glikoz analizi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. Glukoz ve fruktoz değerleri de hesaplanmıştır.

Cimil (Rize)'de üretilen farklı yükselti ve lokaliteden temin edilmiş 8 farklı balın ilk kez melissopalınolojik ve fiziko-kimyasal (nem, fruktoz, glukoz değerleri, prolin, diastaz ve HMF) özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Melissopalynolojik çalışmalar polenlerin Asteraceae, Brassicaceae, Campanulaceae, Caprifoliaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae, Ericaceae, Fabaceae, Fagaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Onagraceae, Poaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rosaceae ve Tiliaceae familyalarına ait olduğunu göstermiştir. Örneklerin nem içeriği %16.9-19.1, prolin içeriği ise 568-758 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Şeker analizinde fruktoz 35.36-51.4 g/100 g ve glukoz 21.35-65.78 g/100 g olarak tespit edilmiştir. Sonuçların Avrupa Birliği Standartları ve Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne uygun olduğu ortaya koyulmuştur (129).

2.8. Balın Coğrafik Kökenini ve Botaniksel Özelliklerini Belirlemekte Kullanılan Yöntemler

Balın bileşimi, botanik ve coğrafik kökeni ile güçlü bir ilişki içindedir. Bal arılarının kovan çevresindeki habitatlarda hangi bitki türlerini besin kaynağı olarak kullandıklarını belirlemek, tozlayıcı odaklı bitki araştırmaları için bir yöntem sağlayabilir (130). Ticari balın içerisinde bulunan çiçek kaynaklarını ve balın kökenini doğrulamak için kullanılabilir (19). Monofloral ballar, tek bir bitki türünden toplanan nektar ve polenin baskınlığıyla çok çiçekli ballardan farklılık gösterir; Louveaux ve arkadaşları (1978) (131) balın %45'ten fazlası bir türden polen içeriyorsa balları monofloral olarak sınıflandırır. Ancak bazı istisnalar vardır. Örneğin, lavanta balı gibi polen tanesi oranı düşük olan ballar, botanik açıdan monofloral bal olarak sınıflandırılabilmesi için sadece %15 polen tanesi içermeleri yeterlidir. Diğer yandan, okaliptüs ve kestane balları gibi belirgin polen oranlarına sahip ballar, %70 ile %90 arasında polen frekansı gösterebilir (132).

Monofloral ballar, daha yüksek ticari değerlere sahiptir ve bu nedenle sahtecilik, hileli karışımlar ve yanlış etiketleme gibi riskler taşımaktadır (107). Gıda güvenliği ve kalitesi de endişe vericidir, zehirli bitkilerden örneğin Güzel avrat otu (*Atropa belladonna* L.) (133) ve Ormangülü (*Rhododendron spp.*) (134)'den gelen polenler bazen balın içinde bulunabilir. Arılar Boraginaceae (Hodangiller) familyasındaki bitkilerden polen topladıktan sonra ballarda hepatotoksik pirrolizidin alkaloidleri (PA'lar) tespit edilmiştir. Bu maddeler,

özellikle karaciğer için zararlı olan toksinlerdir. Pirrolizidin alkaloidleri, bazı bitkiler tarafından üretilen doğal bileşiklerdir ve uzun süreli tüketimlerinde karaciğer hasarına neden olabilirler. Arılar, bu tür bitkilerden nektar topladığında, bu toksinler bala geçebilir ve böylece balda insan sağlığına zararlı olabilecek PA'lar birikebilir. (135). Bitki profili, balın bileşimini incelerken ürünlerin tüketiciler için güvenli olmasını sağlamak için kullanılabilir (136). Ayrıca, bitkisel kökenli antimikrobiyal bileşenlerin kaynağını karakterize etmek için bitki profili kullanılabilir ve bu bileşenler balın terapötik uygulamalarına katkıda bulunur.

Balın yapısına katılan bitkileri araştırmak için birçok yöntem kullanılmaktadır. Geleneksel yaklaşım melissopalinoji, polenlerin ışık mikroskobu altında morfolojik incelenmesini içerir (131). Kimyasal yöntemler arasında serbest amino asitler, organik asitler, fenolikler ve aromatiklerin analizi yer alır. Fenolik asitler ve flavonoidlerin karışımı, balın kimyasal bileşimine katkıda bulunur (137). Son yıllarda bitkisel sınıflandırmada DNA temelli yöntemlerin kullanımı da ilgi çekmektedir. Bitki DNA moleküllerinin balda bulunduğu gerçeğini göz önünde bulundurarak ve bu DNA moleküllerinin çevresel ve üretim koşullarında yüksek stabiliteye sahip olduğu dikkate alındığında, DNA tabanlı yöntemler, bal içindeki polenin kökenini araştırmak için güvenilir ve doğru araçlar olarak düşünülebilir (138, 139). Bu yöntemler, analiz süresini kısaltmaya ve tür ayırma seviyesini artırmaya olanak tanır, böylece botanik ve coğrafik bal tanımlamaları için uygun alternatifler sunar (100). Balın coğrafik kökenini ve botaniksel özelliklerin belirlemede kullanılan yöntemleri üç ana başlık altında toplanabilir.

2.8.1. Melissopalinoji

Polen tanımlamada kullanılan geleneksel yöntemler arasında, arıların nektar toplama davranışlarının doğrudan gözlemlenmesi ve daha sonra arılardan toplanan polen yüklerinin ışık mikroskobunda morfolojik özelliklerinin belirlenmesi yer alır. Bu yöntem, melissopalinoji olarak bilinir ve polen ile sporların incelenmesiyle ilgilenen bir bilim dalıdır. Ancak doğrudan gözlem yöntemi zaman alıcıdır çünkü yiyecek arayan bir arının bir çiçekten diğerine geçişini takip etmek zordur. Bu nedenle, gözlemciler genellikle bir arının yalnızca bir ya da iki çiçek ziyaretini kaydedebilir, bu da sınırlı veri sağlayarak tahminlere neden olabilir. (140).

Işık mikroskobuyla yapılan palinolojik analiz, polen tanımlaması için en yaygın kullanılan yöntem olup, karışık bir polen örneğinde polen taksonlarının nispi bolluklarının güvenilir tahminlerini sağlama avantajına sahiptir. Ancak, bu yöntemin de bazı

dezavantajları vardır; zaman alıcıdır, uzman bilgisini gerektirir, birçok bitki taksonu için düşük taksonomik çözünürlük sağlar, birçok bitki türü sadece familya düzeyinde tanımlanabilir ve nadir türleri tespit etmek zordur (1). Bu sınırlamalardan dolayı, polen analizi için yeni güvenilir tekniklerin geliştirilmesi gereklilik haline gelmektedir (101).

Özellikle balda bulunan poleni inceleyen palinoloji dalına da melissopalinoloji denir. Melissopalinoloji (polen tanımlama), balın çiçek kaynağını belirlemek için uzun yıllardır kullanılan standart bir yöntemdir (141). Elektronik, boyut tabanlı parçacık sayacı ve hematometreler, polen taneleri sayısının tespiti ve tanelerin sayısı ve boyutu hakkında tahminler yapmak için kullanılabilir (142). İşçi arıların ürettiği balda bulunan bitkiler, mikroskop analizi yoluyla tanımlanabilir (141) ancak bu teknik zaman alıcıdır ve iyi eğitilmiş bir uzman gerektirir (105, 133). Mikroskop analizinin sınırlı özgüllüğünden dolayı, birçok takson sadece aile düzeyinde, bazı polen taneleri en fazla cins düzeyinde tanımlanabilmektedir (143).

Bal arıları tarafından toplanan polenin tanımlanması, hem tozlayıcıların yiyecek arama davranışını içeren çalışmalarda hem de arı kovanı ürünlerinin doğrulanmasında önemli bir araçtır. Melissapolinoloji, polen analizlerinin en yaygın uygulaması olmasının yanı sıra, karışık polen örneklerinin botaniksel kökeninin belirlenmesi, bitki-böcek etkileşimlerinin, bal arısı beslenme biyolojisinin, tozlayıcıların yiyecek arama davranışının incelenmesi gibi çalışmalar için de gereklidir.

Bitkilerle ve tozlayıcılar arasındaki ilişkiyi analiz etmek için geleneksel yöntemler, bireysel etkileşimin zaman alıcı gözlemine dayanır (144). Balın bitkisel ve coğrafik kökenini belirlemek için önerilen birkaç yöntem bulunmaktadır. Aroma bileşikleri, serbest amino asitler veya mineraller ve iz elementlere dayanan diğer yaygın kimyasal yöntemler de geliştirilmiştir ancak pahalı cihazlar gerektirir (18, 145, 146). Dahası, tüm bu yöntemler yalnızca bal örneklerinin bitki bileşimi hakkında sınırlı bilgi sağlar. Balın entomolojik kaynaklarını belirlemek ve protokoller geliştirmek için bazı çabalar gösterilmiş olsa da (147), çoğu bitki kökenini belirlemeye odaklanmıştır. Geçmişte yapılan çalışmalar genellikle tanısal fitokimyasallara (148) veya bal içindeki polenlerin incelenmesine (melissopalinoloji) dayanmıştır (149). Ancak bu ikinci yaklaşım önemli bir uzmanlık gerektirir ve birçok bitki türünü ayırt edemez (19), özellikle diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında güçlü bir teşhis aracıdır (100). Ancak düşük değerli balın kaynak polenini

ıkarmak ve istenen monofloradan polenle karıştırıldığı durumlarda melissopalino­loji etkisizdir (19).

Yukarıdaki protokollerden hiçbirisi, 'bilinmeyen' bir balın bitki kaynağını güvenilir bir şekilde belirleyemez (19, 150). Ancak, bu belirsizlik sıklıkla bal içerisinde izole edilen hedeflenen gen bölgelerinin moleküler analizi ile çözülebilir. "Metabarkodlama" olarak adlandırılan bu yaklaşım, diğer analitik yöntemlerin birçok sınırlamasını ortadan kaldırır (147) ve yüksek verimli dizileme platformlarına artan erişim sayesinde güç kazanmaktadır. Bal, polen, nektar ve arı ürünlerini içerse de, önceki genetik çalışmaların çoğu yalnızca poleni incelemiştir (100, 101, 143).

Klasik yöntemlerin birçok sınırlamasını aşmak için, polen analizi için yeni güvenilir tekniklerin geliştirilmesi kaçınılmaz bir ihtiyaç haline gelmiştir (103). Güvenilir ve verimli bir alternatif, özellikle bal arıları tarafından yaygın olarak toplanan büyük ve taksonomik olarak çeşitli polen örneklerinin analizini gerektiren birçok melissopalino­j­ik uygulama için büyük değeri taşıyacaktır (96). Yeni nesil dizileme (NGS) kullanarak DNA metabarkodlama uygulaması, mikroskopik analizlere alternatif olarak umut verici ve verimli bir seçenek sunmaktadır. Yazarlar, yöntemin hızlı, basit, sağlam ve başarılı botanik tanımlaması olduğunu bulmuşlardır (151).

2.8.2. Biyokimyasal Yöntemler

Bal, arılar tarafından bitkilerin nektar ve poleninden üretilen doğal ve besleyici bir gıdadır. İçeriğinde genellikle glikoz, fruktoz, maltoz ve sakaroz gibi şekerler; su, proteinler, organik asitler, amino asitler, vitaminler, flavonoidler ve asetilkolin gibi çeşitli minör bileşenler bulunur. Bu zengin bileşimi sayesinde bal, hem enerji kaynağı hem de sağlık açısından faydalı bir besin olarak bilinir (17).

Bal içerisindeki birçok kimyasal madde, coğrafi­k veya botaniksel kökenini ayırt etmek için kullanılabilir. Botaniksel ve coğrafi­k kökenlerin ayrımı için farklı kimyasal kompozisyonlar ve analitik yöntemler kullanılmaktadır. Şekil 2.6'da balın coğrafi­k ve botaniksel kökenlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan kimyasal belirteçler ve bileşenleri ile ilişkili analitik teknikleri göstermektedir.

asitlerin coğrafik ve botanik kökenleri ile değiştiği, bu değişikliklerde botanik kökenin coğrafik kökenden daha belirgin olduğunu saptamıştır. Prolin balda özgündür ve genellikle arılardan gelmektedir. Prolin içeriği, şeker ve glukoz oksidaz aktiviteleri gibi diğer bileşenlerle entegre edildiğinde, balın olgunluğunun ve sahteciliğinin bir göstergesi olarak önerilmiştir (155). Serbest amino asitlerin GC (Gaz kromatografisi) analizleri, İngiltere, Arjantin, Avustralya ve Kanada'dan gelen bal örnekleri ile karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar göstermiştir (156). Pawlowska vd. (157) (1994) prolin, lösin ve fenilalanini ve bunların enantiyomerik oranlarını HPLC kullanarak balda belirlemiştir. Lösin analiz edilen bal örneklerinde en değişken amino asittir. Pirini ve Conte (158) (1992), akasya, narenciye, kestane, orman gülü, biberiye ve limon gibi farklı bitkisel kaynaklardan gelen bal örneklerinde amino asitleri analiz etmek için GC kullanmıştır. Arjinin, triptofan ve sistin gibi amino asitlerin varlığı, bazı bal türlerine özgüdür.

Amino asitlerin ve proteinlerin konsantrasyonu arasındaki oranların bitkilerin bal kökenini karakterize etmek için kullanılabileceği önerilmiştir (18, 159). Polenden kaynaklanan bal proteinlerinin immüno blot testleri kimlik doğrulaması için yapılabilir (160). Daha yakın zamanda, protein izlenimleri ve gelişmiş kütle spektroskopisi teknikleri kullanılarak barkodlama, doğrulama ve coğrafik köken tespiti için kullanılmıştır (161).

Bal içindeki uçucu bileşiklerin konsantrasyonları çok düşüktür. Bal içindeki uçucu bileşenleri analiz etmek için öncelikle şekerlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Uçucu bileşikler izole etmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Örneğin aynı anda buharlaştırma ve ekstraksiyon (162), dinamik baş uzayı ekstraksiyonu (Dynamic Headspace Extraction) (163–165), ultrason destekli ekstraksiyon, hidrodistilasyon (166), çözücü ekstraksiyonu (167) ve katı fazlı mikroekstraksiyondur (168). Tüm bu tekniklerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. İzolasyon süresi gereksinimi, özellikle büyük bir numune sayısı analiz edilecekse önemli bir konudur. Çözücülerin kullanımı, çözücü uzaklaştırılması sırasında uçucu bileşiklerin kaybıyla ilişkilidir.

Baldaki karbonhidrat bileşenlerinin bilinmesi, balın orijinalliğini ayırt etmek için yararlı bir indekstir. Sakkaritler, fiziksel ve kimyasal özelliklerine (169–172) ve enzimatik analizlere göre belirlenebilir. Kromatograf yöntemleri arasında ince tabaka kromatografisi (TLC) (173), GC (174), iyon kromatografisi-amperometrik darbeli algılama (177) ve HPLC (176, 177) bulunmaktadır. Zunin vd. (178) (1987), GC kullanarak otantik İtalyan bal örneklerindeki şeker bileşenlerini analiz etmiştir. Calcagno vd. (179)(1987) HPLC

kullanarak hakiki balları yapay olarak beslenen arılar tarafından üretilen ballardan ve sakkaroz eklenmiş ballardan ayırt etmiştir. Anyon değişimli sıvı kromatografisi oligosakkarit analizi için uygun bir araçtır (180). İnvert şeker şurubu ve yüksek fruktozlu mısır şurubu oligosakkaritlerin karmaşık karışımlarıdır ve genellikle kimyasal ve enzimatik işlemlerle üretilirler.

Enzim aktivite, nektar akışının yoğunluğu, nektarın konsantrasyonu ve bileşimi ve bal arıları ile ilişkilidir. Amilaz aktivitesi, genellikle balın önemli bir kalite parametresi olarak kullanılır (181). Diastaz (amilaz karışımı) balın tazeliğini ve ısıl işlemini değerlendirmek için kullanılır. Diastaz aktivitesi önceki yıllarda geleneksel olarak Schade yöntemine göre belirlenmiştir (182). Yakın zamanda geliştirilen bir prosedürde çözünmeyen, boyanmış bir nişasta substratı kullanılmaktadır (183). Bu substrat α -amilaz tarafından hidrolize edilirken, çözünebilir boyalı nişasta parçaları çözeltiye salınır. Reaksiyon sonlandırıldıktan ve çözünmeyen substrat santrifüjleme yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra, süpernatant çözeltinin absorbansı (620 nm'de) ölçülür. Absorbans, diastaz aktivitesi ile orantılıdır. Bu prosedür, ticari olarak temin edilebilen bir substratın uygunluğu ve basit test formatı nedeniyle bal endüstrisinde yaygın olarak benimsenmiştir.

Bitki özlerinde bulunan fenolik bileşikler, polifenoller dahil, bitkilerin en önemli bileşik gruplarından birini oluşturur ve bilinen 8000'den fazla yapı içerir (184). Bal ve propoliste polifenol analizi için birçok yöntem geliştirilmiştir, bunlar arasında renk testleri, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller elektroforez (CE) bulunur.

Baldaki flavonoidleri HPLC kullanarak tespit etmek için basit ve hızlı bir ekstraksiyon tekniği geliştirilmiştir (185). Misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) kullanılarak, flavonoid modelleri ile çeşitli İspanya bal örneklerinin botanik kökeni arasında korelasyonlar kurulmuştur (186). Aynı analitik yöntemler lavanta, biberiye, narenciye ve funda çiçeklerinden elde edilen bal örneklerine de uygulanmıştır. HPLC'ye ek olarak, kapiller elektroforez (CE), flavonoid analizi için alternatif bir yöntemdir (187). Bazı karakteristik flavonoid desenleri balın coğrafik kökeninin belirlenmesinde kullanılabilir.

Fenolik bileşikler ve flavonoidlerin bileşimi, çiçek kaynağına bağlıdır ve sonrasında çiçeksel belirteçler olarak kullanılır. Kuersetin, ayçiçeği balı için bir belirteç olarak önerilmiştir (188), hesperitin narenciye balı için (189) ve naringenin lavanta balı için (190)

belirteç olarak önerilmiştir. Diğer organik bileşikler (alifatik) ve mikroelementler, çiçeksel işaretleyiciler olarak tanımlanmıştır (19).

Bal ürünlerindeki mineral ve iz element içeriği, çevresel kirliliğin bir göstergesi ve balın coğrafik kökeninin dolaylı bir göstergesi olarak kullanılabilir. Sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, bakır, demir, mangan, fosfor, klor, silikon, kül, kurşun ve kadmiyum gibi iz elementleri ve mineraller incelenmiştir (18). Perez-Cerrada vd. (1989) (191), İspanyol balında klorür, hidrojen fosfat ve sülfat gibi inorganik anyonları belirlemek için iyon kromatografik (İK) teknikleri uygulanmıştır. Pietra ve arkadaşları (1993), (192) İtalya kökenli funda balı örneklerinde iz elementlerini önayırma nötron aktivasyon analizi kullanarak belirlenmiştir. Aynı yöntem, karışık çiçek, ayçiçeği, kekik ve narenciye çiçeği gibi farklı çiçek kökenli Türk balı örneklerinde iz elementleri belirlemek için kullanılmıştır (193). Kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve manganez (Mn) gibi diğer iz elementlerinin farklı mevsimlerde üretilen bal örneklerinde belirlenmesi, grafit fırın atomik absorpsiyon spektrometrisi (ETAAS) ile yapılmıştır (194). Enzimler, karbonhidratlar (şekerler) ve stabil izotoplar, balın botanik ve coğrafi karakterizasyonu için incelenmiştir. Doğru bir karakterizasyon sağlamak için farklı bileşiklerin bir arada analiz edilmesi gerekmektedir.

2.8.3. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

Balda bulunan polenlerin hangi bitki taksonuna ait olduğu bugüne kadar geleneksel olarak ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerle belirlenmiştir. Son zamanlarda, yeni nesil dizileme teknolojisi olarak adlandırılan yöntem, balda bulunan polenlerin hangi taksona ait olabileceğinin belirlenmesinde uygun maliyetli alternatif bir araç olarak kullanılsa da mekansal veya zamansal olarak henüz yeterli sayıda polen örneği üzerinde test edilmemiştir. Bu yöntem melissopalinoji için gereken yüksek düzeyde taksonomik uzmanlığa ihtiyaç duymadan tür ayırım seviyesini artırmaktadır. Bitki türlerini NGS ile tespit ederek, bal içindeki poleni kesin olarak karakterize etmek mümkündür (133, 143, 147, 195). Yapılan araştırmalarda tüm taksonomik seviyelerde, DNA dizilemenin, ışık mikroskobuna göre daha fazla taksonu ayırt edebildiği ve özellikle nadiren tespit edilen taksonların tanımlanmasında bile yararlı olabileceği gösterilmiştir. Daha da önemlisi, her iki teknik kullanılarak yaygın olarak tespit edilen taksonlar için yüksek oranda örtüşme meydana gelmiştir (72).

NGS, güçlü biyoinformatik yaklaşımlarla birleşerek birçok alanda devrim yaratmaktadır. NGS, kısa ve uzun dizileme okumaları sağlayan hem büyük ölçüde paralel dizilemeyi (aynı anda birden çok DNA veya RNA parçasını paralel olarak dizilemesi) hem

de tek moleküllü dizilemeyi (amplifikasyon) ihtiyacı olmadan bireysel DNA veya RNA moleküllerinin dizilenmesi) kapsamaktadır. Kısa okumalı dizileme, yüksek doğrulukta olup 100-300 bp okuma uzunlukları üretmektedir. Bu diziler daha sonra tamamlanmamış veya taslak genomlar olarak adlandırılan genomlara birleştirilir. Tekrarlayan bölgeler, insersiyonlar, delesyonlar ve inversiyonlar nedeniyle, tek bir dizileme çalışmasıyla elde edilen kısa okumalardan tüm genomları tam olarak oluşturmak mümkün değildir. Karşılaştırmalı genomik ve filogeni dahil olmak üzere birçok uygulama için bu bir sorun olmasa da tüm genomların gerekli olduğu yerlerde ve karmaşık genomik bölgelerin belirlenmesi için daha uzun okumalar gerekmektedir. Uzun okumalı dizileme ise 10 ile 50 kb uzunluğunda okumalar üretir ancak daha yüksek hata oranlarına sahiptir (196).

NGS; büyük ölçekli uygulamalar için derin, yüksek verimli ve masif paralel DNA dizileme içeren tüm teknolojileri kapsar (197). Bu yöntem, 1977'de geliştirilen Sanger dizileme yönteminin keşfinden birkaç on yıl sonra ortaya çıkmıştır. NGS teknolojileri, Sanger dizileme yönteminden farklı olarak çok yüksek verimli dizileme imkanı sağlayan masif paralel analiz sunar ve bu da maliyeti düşürerek birden fazla kompleks örneğin yoğun dizilemesine olanak tanır (197). İkinci nesil dizileme yöntemleri; dizileme öncesi dizileme kütüphanelerinin hazırlanması ve amplifikasyonunu içerirken, bazı üçüncü nesil dizileme yöntemleri zaman alıcı ve maliyetli kütüphane oluşturulmasını gerektirmeksizin tek molekül dizileme gerçekleştirir (197). NGS, gigabaz boyutunda diziler oluşturmak için gereken süreyi yıllardan günlere veya saatlere indirmiştir ve buna önemli bir fiyat düşüşü eşlik etmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. NGS platformlarının temel özellikleri ve performansları (Kulski'den, 197)

NGS /firma/her çalışmadaki maks. değer	Okuma Uzunluğu (bp)	Okuma Sayısı	Zaman	Ham Hata Oranı (%)	Platform Maliyeti (yaklaşık USD)	Kimyası
Birinci Nesil Dizileme						
Sanger/Life Technologies/84 kb	800	1	2 sa	0.3	95 000	Didoksi Sonlandırıcı
İkinci Nesil Dizileme						
454 GS FLX+/Roche/0.7 Gb	700	1×10 ⁶	24-48 sa	1	500 000	Pirosekanslama
GS Junior/Roche/70 Mb	500	1×10 ⁵	18 sa		100 000	Pirosekanslama
HiSeq/Illumina/1500 Gb	2x150	5×10 ⁹	27-240 sa	0.8	750 000	Tersinir sonlandırıcı
MiSeq/Illumina/15 Gb	2x300	3×10 ⁸	27 sa	0.8	125 000	Tersinir Sonlandırıcı
SOLiD/Life Technologies/120 Gb	50	1×10 ⁹	14 gün	0.01	350 000	Ligasyon
Retrovolocity/BGI/3000 Gb	50	1×10 ⁹	14 gün	0.01	12×10 ⁶	Nanoball/Ligasyon
Ion Proton/Life Technologies/100 Gb	200	6×10 ⁷	2-5 sa	1.7	215 000	Proton Algılama
Ion PGM/Life Technologies/2 Gb	200	5×10 ⁶	2-5 sa	1.7	80 000	Proton Algılama
Üçüncü Nesil Dizileme						
SMRT/Pac Bio/1 Gb	>10 000	1×10 ⁶	1-2 sa	12,9	750.000	Real-time SMS
Heliscope/Helicos/25 Gb	35	7×10 ⁹	8 gün	0,2	1. 5×10 ⁶	Real-time SMS
Nanopore/Oxford Nanopore Technologies/1 Gb	>5000	6×10 ⁴	48-72 sa	34	1000	Real-time SMS

NGS, tek bir DNA parçasını binlerce paralel parçaya böler ve bu işlem dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; 1) kütüphane hazırlığı, 2) küme oluşumu, 3) dizileme, 4) hizalama ve veri analizi (198) şeklindedir. Karışık polen örneklerinin NGS ile analizinin avantajlarından bahsetmek gerekirse; daha hızlı işlem süresinin olması, elle yapılan işlerin olmaması, tüm polen tanelerinin işleme dahil edilmesi, daha standartlaştırılmış ve bilinen tekniklerin kullanılıyor olması, yüksek taksonomik hassasiyete sahip olması, yeni taksonların tanımlanmasına imkan sağlaması ve daha öngörülebilir maliyetler sunması vb. şeklinde sayılabilir. Bunların dışında; NGS'in tam referans kütüphanelerinin eksikliği, kontaminasyon ve yanlış tanımlama olasılığı ve primer çarpıtmasına bağlı olarak nadir türlerin amplifikasyonunun potansiyel azalması gibi dezavantajları da vardır (151).

Yeni nesil dizileme teknolojisinin ilerlemesiyle, balın bitkisel ve coğrafi kökeninin incelenmesi hızlı, kesin ve güvenilir bir şekilde daha kolay hale gelmiştir. NGS yöntemleri arasında metabarkodlama, çevresel bir örnek içerisinde bulunan tüm türlerin tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, farklı taksonomik seviyelerdeki organizmaların belirlenmesine ve numuneler arasında takson kompozisyonunun karşılaştırılmasına, önceden numune ayırma adımına gerek kalmadan izin verir. Bitki türlerinin tanımlanmasında mikroskopik polen analizine göre daha yüksek duyarlılık ve çözünürlüğe sahiptir.

DNA metabarkodlama, DNA barkodlama ve yüksek verimli DNA dizileme (HTS) olmak üzere iki teknolojiyi birleştirir (103). HTS teknolojileri, karışık DNA örneklerinin karakterizasyonu için ortaya çıkan ve yaygın olarak benimsenen bir araçtır. Tek bir deneyden elde edilen örnek ve sekans okuma sayısı, modern kapiler elektroforez tabanlı Sanger sekanslayıcılarla elde edilenden çok daha fazladır (199). Son zamanlarda metabarkodlamada, Roche 454, Ion Torrent gibi NGS teknolojileri ve Illumina dizileme platformları kullanılmaktadır (200–203). HTS işlem süresini kısaltır, tür ayrımı düzeyini artırır ve melissopalnoloji için gereken yüksek düzeyde taksonomik uzmanlık gerektirmez (133, 143, 147, 195). Ion Torrent platformu havada bulunan polenin nicelendirilmesinde DNA barkodlama teknolojisini değerlendirmek için kullanılmıştır (204). Ayrıca pirosekanslamayla, bal örneklerinden polen analizi yapmak için de başarıyla kullanılmıştır (7, 103). 454 dizileme, pirosekanslama ve yağ emülsiyonu PCR'a dayanan bir teknolojidir. Adaptörle bağlanmış DNA parçaları boncuklara bağlanır ve PCR reaktifleri içeren bir yağ damlacığı içinde süspanse edilir. PCR amplifikasyonu, daha sonra 454 Genom Dizileme FLX cihazında (Roche Uygulamalı Bilim) dizilenebilen benzersiz bir DNA şablonunun milyonlarca kopyasını taşıyan DNA kaplı boncuklarla sonuçlanır. Tamamlayıcı nükleotidler eklendiğinde, cihazdaki CCD kamera tarafından yakalanan her başarılı baz eşleşmesinde ışık sinyalleri üretilir (205).

Illumina platformu, Roche 454 platformuna kıyasla önemli ölçüde artırılmış derinlik ve kapsama alanı sunar. Illumina sekanslama, 454 sekanslamaya göre daha düşük maliyetle daha yüksek verim sağlar (206). Sentez yoluyla Illumina dizileme yaklaşımı da baz başına hata oranını düşürür ve dizi kalitesini artırır. Illumina DNA dizilemesinde tek DNA parçaları içi boş bir akış hücresi kanal lamı üzerinde yoğun kümeler halinde çoğaltılır. Katı faz köprü amplifikasyonu, birkaç milyon yoğun çift sarmallı DNA kümesi oluşturur. Amplifikasyon

ve eksitasyondan (uyarılmış duruma getirme) sonra, her kümeden yayılan floresan yakalanır ve ilk baz tanımlanır (205). Bu işlem tekrarlanır ve her seferinde bir baz olmak üzere parçadaki bazların dizisi belirlenir. Bu yöntemler DNA parçalarının klonlanmasını gerektirmez, bu da herhangi bir önyargıyı ortadan kaldırır ve işçilik maliyetini önemli ölçüde azaltır (100).

DNA metabarkodlama ile tür kompozisyonunun tanımlanması, total DNA ekstraksiyonu işlemiyle başlayan bir dizi süreçle sağlanır. Bu süreç, elde edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılmasıyla devam eder. Evrensel PCR primerleri, organizmaların toplu koleksiyonlarından veya çevresel DNA örneklerinden DNA barkodlarını kitlesel olarak çoğaltmak için kullanılır. Bu primerler, farklı organizmalardan veya türlerden gelen DNA parçalarını belirli bir genetik hedefi hızlı ve etkili bir şekilde çoğaltmak için tasarlanmıştır. PCR ürünleri HTS'ye tabi tutulur ve sonuç olarak örnekte bulunan türlerin doğrudan değerlendirilmesine olanak tanıyan bir dizi DNA dizisi elde edilir (1).

Polen DNA metabarkodlama yönteminde başarılı olmak için dört unsura ihtiyaç vardır: 1) Güvenilir bir DNA izolasyon yöntemi kritik bir öneme sahiptir. 2) Karışık polen örneklerinden çoğaltılabilen ve sıralandığında çok sayıda türü doğru bir şekilde ayırt eden bir dizi genetik belirteç kullanılmaktadır. 3) Çalışmaya uygun bir dizileme platformu seçilerek, HTS veya DNA barkodu çok sayıda okuma sağlayan yeni nesil dizilemeyi içerir. 4) Mümkün olduğunca çok sayıda bitki türünü kapsayan, tercih edilen barkodların DNA dizilerini içeren kapsamlı bir referans kütüphanesi gerekmektedir.

Bal içindeki polenlerden DNA ekstraksiyonu, sonraki işlemler için yeterli saflıkta ve yüksek verimde DNA elde etmek amacıyla yakın zamanların araştırma konusudur. Guertler vd. (207), DNA verim ve kalitesini artıran ancak yüksek maliyetli cihazların kullanımını gerektiren otomatik bir DNA ekstraksiyon yöntemi oluşturmuştur. Soares vd., (2) bal numunesi ön işlemlerini ve ticari DNA ekstraksiyon kitlerini araştırmış ve mekanik parçalama ve Wizard DNA ekstraksiyon kiti kombinasyonunun en iyi sonuçları verdiğini bulmuştur. Wizard, CTAB ve DNeasy kitleri (Qiagen) balda DNA ekstraksiyonu için uygun olduğu belirtilmiştir (2, 195, 208). Bal DNA analizini etkileyebilecek çoğunlukla farklı şekerler ve organik asitler, polifenoller, pigmentler, enzimler ve balmumları gibi çeşitli maddelerden oluşmaktadır. Ayrıca, balda, polen miktarı çok düşük seviyelerde olduğundan, hedef DNA'nın sadece düşük miktarları izole edilebilir (2). Bu nedenle, uygun bir DNA ekstraksiyon protokolünün seçimi kritik bir adımdır. Bu adım güvenilir ve tekrarlanabilir bir

analiz yapabilmek için yeterli miktarda ve PCR'ı engelleyen maddelerden arınmış DNA sağlamak için optimize edilmelidir (207, 209). Bu nedenle, bazı araştırmacılar, DNA ekstraksiyonundan önce polen partiküllerini izole ederken şekerler ve flavonoidler gibi istenmeyen bileşenleri ortadan kaldırmak için örnek hazırlama ön adımını önermişlerdir (2, 138, 150). Soares vd., farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri ile birleştirilen çeşitli örnek ön işleme yöntemlerini karşılaştırmıştır. Sonuçlar, test edilen kombinasyonlar için farklı verimler ve saflıklar göstermiştir ancak mekanik bir polen parçalama adımını içeren işlem en iyi DNA verimlerini sağlamıştır.

DNA metabarkodlama için kullanılan belirteçler için temel düşünceler şunlardır: 1) Ön primerler, karışımdaki tüm türlerin amplifikasyonunu sağlamak için evrensel olmalıdır. 2) Seçilmiş olan nükleer veya plastit bölge, uygun bir ayırım seviyesine sahip olmalıdır. 3) Doğru tanımlama, bilinmeyen örneklerin karşılaştırıldığı referans kütüphanesinin kalitesine ve kapsamlılığına dayanmaktadır (210).

Taksonomik tanımlama, bir veya birkaç plastit bölgesine dayanabilir (örneğin, protein kodlayıcı *rbcL* ve *matK*, ve kodlamayan boşluk *trnH-psbA*) ve nükleer ribozomal DNA'nın ITS bölgelerine ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kullanılır (211). Nükleer ribozomal boşluk ITS2 bitkiler için en yaygın olarak kullanılan DNA belirteçlerinden biri olup (102) tür düzeyinde 6600 örneğin %92.7'sinin başarılı tanımlanmasını sağlamıştır (212). Ayrıca, HTS ile dizilenen polen karışımlarının güvenilir sınıflandırması için kritik bir bileşen olan kapsamlı bir ITS2 veritabanı bulunmaktadır (213).

Barkod belirteçleri türlerin parmak izi olarak kabul edilir. Taksonomide kullanılırlar ve evrimsel araştırmalarda türlerin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Amplifikasyon için belirlenen belirteçler herhangi bir çalışma için büyük önem taşımaktadır. Hayvanlar için mitokondriyal sitokrom c oksidaz I geni (COI) tercih edilen DNA barkodlama belirtecidir (214). COI kullanışlılığı, mutasyon oranının diğerlerine kıyasla daha yavaş olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerde tür içi çeşitlilik çok azdır. Bununla birlikte, COI dizisinin kullanımı bitkilerde daha yavaş bir hızda gerçekleştiği için uygun değildir. Sitokrom c oksidaz I gen evrimi, bitkilerde hayvanlardan daha fazladır.

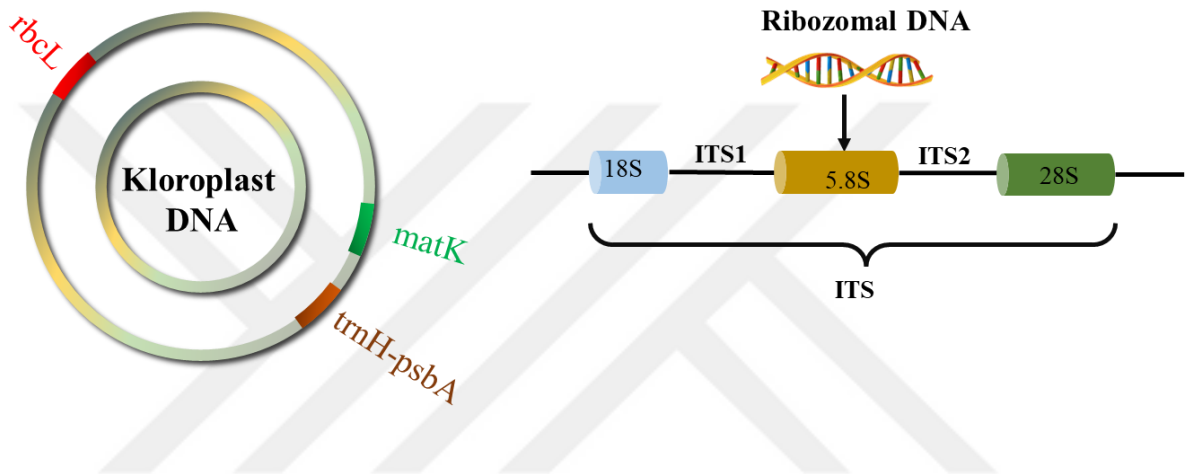
Bitkilerde olduğu gibi, hayvanlar için de başarılı bir barkod belirtecinin temel gereksinimleri, düşük tür içi değişkenlikle yüksek türler arası farklılık içermesidir. Yaşam Barkodu Bitki Çalışma Grubu Konsorsiyumu (The Consortium for the Barcode of Life) (CBOL)) tarafından belirtildiğine göre, ideal bir DNA barkodu, düzenli olarak tek bir primer

çiftiyle elde edilebilmeli, çift yönlü dizileme sağlamalı ve çoğu türün ayırt edilmesini mümkün kılmalıdır. CBOL Bitki Çalışma Grubu tarafından değerlendirmeye önerilen yedi kloroplast genom bölgesi (*rbcL*, *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *trnH-psbA* ve *psbK-psbI*), ayrı ayrı veya bir arada kullanılmak üzere önerilmiştir (215).

Evrensellik, dizi kalitesi ve tür ayırımı seviyeleri kriterlerine dayalı olarak, her bir lokus ayrı ayrı değerlendirilmiştir; 1) *rpoC1* ve *rpoB*'nin evrensellik ve/veya dizi kalitesi açısından başarılı olduğu, ancak her ikisinin de düşük ayırt edici güce sahip olduğu görülmüştür; 2) *atpF-atpH* yüksek kaliteli çift yönlü diziler sunmasına rağmen, evrensellik düşüklüğü nedeniyle bitkiler arasında rutin olarak dizilenememektedir; 3) *psbK-psbI*, 397 örneğin 69 tür ayırma yeteneği göstermiş, ancak en düşük dizi kalitesine sahiptir. Tüm bu kriterleri göz önüne alarak, *rpoC1*, *rpoB*, *atpF-atpH* ve *psbK-psbI* ideal barkodlar olarak kabul edilemez (216). Bunun aksine, *trnH-psbA*, *rbcL* ve *matK*, bitki DNA barkodu sisteminde oldukça istenen normları karşılayan lokuslardır ancak hiçbirisi ideal DNA barkod işaretini mükemmel bir şekilde karşılamamaktadır. Bu nedenle, bitki türlerine uygun evrensel bir barkodun arayışı, kloroplast genom bölgeleri dışında diğer nükleer bölgeler de dahil olmak üzere birçok araştırmacı tarafından sürdürülmüştür. Ancak tüm durumlar için yeterli tek bir lokus gösterilmemiştir ve bu nedenle genellikle birden fazla lokusun kombinasyonu gereklidir (216). Bitkilerde bulunan kloroplast genom bölgelerinin yanı sıra nükleer fragmentler (örneğin, ribozomal ITS2 bölgesi) de bitkilerde uygun DNA belirteçleri haline gelmiştir (215). Şekil 2.7'de, karışık polen örnekleriyle yapılan çalışmalarda tür tanımlaması için literatürde tanımlanan farklı DNA barkodlarını göstermektedir (Tablo 2.4).

Diğer bitki barkodlarının aksine, ITS2 ampikon parçasının küçük boyutu (163-311 bp) HTS ile uyumludur ve eşleştirilmiş uç birleştirme için yeterli örtüşmeye izin verir. Ayrıca, bu belirteç cins ve tür düzeyinde yüksek ayırt edici özellik göstermiştir (7, 101, 212), 4 800 türe ait 6 600 örnekte tür düzeyinde %92.7 başarılı tanımlama (212) ve kalitatif analiz için geleneksel mikroskobik tanımlamadan daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır (7, 101). Bununla birlikte, ITS2'nin fungal ko-amplifikasyon potansiyeli, barkod olarak seçiminde bir sınırlama olarak düşünülebilir (217). Fungal ko-amplifikasyon, Sanger dizileme kullanıldığında dizileme başarısızlığına yol açabilirken, bu yöntem yalnızca bir türden bir DNA ekstraktını dizilemek ve tanımlamak için kullanılabildiğinden, birçok kez kopyalanacak olan hedef DNA, bitki DNA'sı ile gerçekten eşleşmeyecektir. Bununla birlikte, HTS DNA metabarkodlama kullanılarak, bitki taksonlarının yanı sıra mantar

kontaminasyonu da dizilenecektir (217). Bu, bitki türlerinin dizilenmesini ve tanımlanmasını engellemeyecektir ancak numune başına gereken okuma sayısı artacak, dolayısıyla analiz edilebilecek numune sayısı sınırlı olacaktır (1). Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, sadece bitkiye özgü amplifikasyona sahip yeni tasarlanmış primerler, fungal ko-amplifikasyonu önlemek için alternatif olarak önerilmektedir. Yeni tasarlanan ITS2 primerlerinin etkinliği Cheng vd. (217) tarafından kanıtlanırken, yeni primer çiftleri yaygın olarak kullanılanlara kıyasla %30'a varan PCR iyileştirmeleri sağlamıştır.



Şekil 2.7. Kloroplast ve mitokondiyal ribozomal DNA barkod organizasyonu (Kress'ten 218).

Tablo 2.4. Polen DNA barkodlama çalışmalarında kullanılan bitki DNA barkodlama belirteçleri hakkında mevcut bilgilerin özeti

Lokus	Hücredeki Yeri	Karakteristik	Uzunluğu (bp)	Referans
<i>rbcL</i>	Kloroplast	Kodlanan gen	702-883	(10, 135)
<i>matK</i>	Kloroplast	Kodlanan gen	656-861	(206)
<i>trnH-psbA</i>	Kloroplast	Kodlanmayan gen	103-1025	(135, 221)
ITS2	Nukleus	Kodlanmayan gen	163-311	(105, 206)

Karışık örneklerin tür kompozisyonunu belirlemek için NGS kullanımına yönelik sınırlamalar arasında örnek canlılığı, DNA ekstraksiyon verimliliği, PCR amplifikasyonu ve sekanslama hataları yer almaktadır (220–222). Karışık örneklerin karakterizasyonu için önemli olan şey, elde edilen dizilerin karşılaştırıldığı referans veri tabanının kapsamlılığı ve evrenselliğidir (200). Arılar tarafından ziyaret edilen bitkiler, NGS ve metabarkodlama teknikleri kullanılarak karakterize edilebilmektedir (100).

DNA barkodlama ve metabarkodlama, biyolojik sistemleri araştırmak için yeni olanaklar sunar. Ancak bu teknikler, iyi düzenlenmiş referans kütüphanelerine olan ihtiyaca dayanır. Bunun için, dünya genelinde araştırmacılar, evrensel bir veritabanı oluşturmak amacıyla benzersiz ve ayırt edici kısa bir DNA bölgesini tanımlamak için bir projeye dahil olmuşlardır. Canlıların Barkodlama Konsorsiyumu'nun (CBOL) Bitki Çalışma Grubu (PWG), plastit DNA bölgelerini, dizi kalitesi ve tür ayırma düzeylerini karşılaştırmıştır. Bu çalışma, bitki DNA sınıflandırması için işaretleyici gen bölgelerini ve protokolleri standartlaştırmak amacıyla küresel bir DNA barkodlama girişimine yol açmıştır. Grup, evrensel barkodlar olarak hizmet verecek şekilde kloroplasttaki *matK* ve *rbcL* adlı iki gen bölgesini seçmiştir. Ancak bazı bitki türleri için ek işaretleyicilerin gerekebileceğini kabul etmiştir (223). Bilinmeyen bitki DNA'sının bal içinde tanımlanması, Yaşam Barkod Veritabanı (BOLD) ve GenBank® gibi uluslararası açık erişim veritabanlarının kullanılabilir olduğu durumlarda oldukça kolaylaşır. Bu benzersiz DNA dizileri BOLD ve GenBank® standart veritabanlarına eklenir ve biyolojik tür tanımlama aracı olarak kullanılır, bu süreç DNA barkodlama olarak adlandırılır.

DNA barkodlamayla takson sınıflandırması, filogenetik analiz yoluyla yapılabilir (224). Takson sınıflandırılması GenBank'ta BLAST dizi-benzerlik araması ile (227) belirli referans dizileri kullanarak çift yönlü hizalamalarla (212) veya diğer nükleotid veritabanları ile gerçekleştirilebilir. Her durumda, veritabanlarından temsil edilen türlerin az bir miktarının hatalı tür tanımlamaya yol açabileceği unutulmamalıdır (7).

DNA barkodlama ve DNA metabarkodlama tekniklerinin uygulama alanları (DNA barkodlamanın çok tür içeren örnekleri yüksek verimli dizileme ile birleştirildiğinde) geniş bir yelpazeyi kapsar ve farklı DNA kaynaklarının tür kompozisyonunun hızlı bir şekilde belirlenmesi potansiyeline sahiptir (211, 226). DNA barkodlama kaynakları kullanılarak, ekolojik sistemler ve topluluk yapısıyla ilgili sorular yanıtlanabilir. Çevresel DNA metabarkodlama, nadir bir türün varlığının tespitinde kullanılmıştır (227), böceklerin ziyaret

ettikleri çiçeklerden elde edilen böcek DNA'sı ile tozlaşıcı topluluklar ortaya çıkartılabilir (228). Aynı zamanda otçullarda besin paylaşımını (229) veya yarasaların beslenme durumunu incelemek için beslenme analizinde de kullanılır (230). Ayrıca ticari uygulamalar, bitki bazlı ürünleri değerlendirmek, örneğin bitkisel ilaçların iddia edilen kimliğini onaylamak (231), balın coğrafik kökenini doğrulamak (133) veya çaydaki türlerin yasallığını kontrol etmek (232, 233) için de DNA barkodlama kullanılmaktadır.

Pek çok çalışma da, polen DNA metabarkodlamasının kullanımını araştırılmıştır. Laube vd. (150), balda bulunması muhtemel bitki türleri hakkında önceden bilgi sahibi olduğunda, bal örneğindeki bitkileri karakterize etmek için PCR tekniğinin kullanılabileceğini göstermiştir (150). DNA metabarkodlama, standart, uluslararası kabul görmüş belirteçler kullandığından, karışık örneklerin tanımlanması için yararlı bir araçtır. Polende bulunan bitkiye özgü DNA belirteçleri hedeflenir ve DNA barkodlama karışık örneklerde bilinmeyen türlerin tanımlanması için kullanılabilir.

Valentini vd. (143) ilk olarak iki bal örneğinde daha önce bilinmeyen bitkileri tanımlamak için *trnL* plastid bölgesine ve yeni nesil dizilemeye (NGS) dayalı bir DNA metabarkodlama yaklaşımı kullanmıştır (143).

Bruni vd. (133) İtalyan Alplerinden gelen balın çiçek kompozisyonunu belirlemek için *rbcL* ve *trnH-psbA* plastid belirteçlerini çoğaltmıştır. Kuzey İtalya Alpleri'nde floristik olarak zengin bir bölgede üretilen dört çeşitli çiçekli bal, *rbcL* ve *trnH-psbA* plastid bölgelerini barkod belirteçleri kullanılarak incelenmiştir. Dört multifloral bal örneğinde toplamda 39 bitki türü tespit edilmiştir. Yerel floraya ait geniş referans kütüphanesi oluşturulmuştur.

Keller vd. (2015) yaptığı çalışmada karışık polen örneklerinden nüklear ribozomal DNA'nın yüksek değişken bölgesi olan ITS2'den elde edilen ampikonları NGS ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, elde edilen yüksek verimli verileri analiz etmek için yeni oluşturulan bir referans veritabanıyla biyoenformatik iş akışı geliştirilmiştir. Uygulanabilirliği değerlendirmek amacıyla aynı örneklerden elde edilen ışık mikroskobu tabanlı klasik tanımlama sonuçları ile dizileme sonuçları karşılaştırılmıştır. Toplamda 16 karışık polen örneği değerlendirilmiş olup, bunların 14'ü bal arıları kolonilerinden ikisi de yalnız arı yuvalarından elde edilmiştir. Dizileme verilerinden elde edilen nispi bolluk tahminleri, ışık mikroskobu aracılığıyla sayılan polenler ile anlamlı bir şekilde korele olmuştur. Takson spesifikliğı ve duyarlılığı üzerine yapılan simulasyon analizleri,

veritabanında bulunan taksonların %96'sının cins ve %70'inin tür düzeyinde tanımlanabilir olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, yeni nesil dizileme, özel bir palinoloji uzmanlık bilgisine ihtiyaç duymadan poleni cins ve tür düzeyinde tanımlamak için kullanışlı ve etkili bir iş akışı sunmaktadır (7).

Richardson vd. (2015) yaptığı çalışmada, bal arılarının polen toplama davranışını incelemek için moleküler bir yöntem kullanılarak melissopalinojiye alternatif bir yaklaşım geliştirilmiştir. Polenler, ABD'nin farklı eyaletlerinden arı kolonilerinden bahar mevsimi ortalarına denk gelen dönemde iki haftalık bir süre boyunca toplanmış olup, mikroskopik yöntemler ve ITS2 metabarkodlama kullanılarak tanımlanmıştır. Metabarkodlama yaklaşımının, uygulama kolaylığını ve mikroskop ile tanımlanmanın zor olduğu ayrıca nadir olan polenleri tespit etme yeteneği açısından avantajlar göstermiştir (101).

Richardson vd. (2015) aynı yılda yaptıkları bir diğer çalışmada, *Apis mellifera* türü bal arıları tarafından toplanan altı polen örneğini karakterize etmek amacıyla ITS2, *matK* ve *rbcL* lokuslarına hedeflenen metabarkodlamayı uygulamıştır. Sonuç olarak, ribozomal lokusa karşı plastit lokuslarından elde edilen metabarkodlama verilerinin, polen topluluklarının nicel karakterizasyonu için daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu yöntem, tek bir gen bölgesinin kullanılmasından daha fazla genetik bilgi sağlar ve özellikle karmaşık örneklerin, örneğin polen karışımlarının, ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesine olanak tanır. Çok bölgeli metabarkodlama, biyolojik çeşitlilik araştırmalarında ve ekolojik incelemelerde kullanılan bir tekniktir (234).

Hawkins vd. (2015) yaptığı çalışmada bal arısı polen toplama davranışını incelemek için DNA metabarkodlama kullanma potansiyelini değerlendirilmiştir. *rbcL* DNA barkod belirteciyle, Illumina, 454 pirosekanslama ve mikroskopik analiz ile karşılaştırmıştır, çalışmada kullanılan dokuz bal örneği, Galler ve İngiltere'deki yerel arı yetiştiricilerinden (İngiltere) sağlanmıştır (100).

Prosser ve Hebert 2017'de yaptıkları araştırmada yedi bal örneğini (açık renkli, orta koyu renkli, karışık, pastörize edilmiş, kremalı ve meliponine) botanik ve entomolojik kökenlerini tanımlamak için üç gen bölgesinden (ITS2, *rbcL* ve COI), DNA metabarkodlama kullanarak uygun maliyetli bir protokol geliştirdiler. Sonuç olarak beş bal örneğinde hem bitki hem de böcek kaynaklarını tanımlamışlar (235).

Laha vd. (2017) yaptığı çalışmada, Kuzeydoğu Hindistan (Mizoram)'da, 20 örnekten elde edilen iki kompozit bal metagenomunu üç gen lokusu (*rbcL*, *matK* ve ITS2) ile

karşılaştırılmışlardır. Bu gen lokusları, bir NGS platformu (Illumina Miseq) kullanılarak dizilenmiştir. Ayrıca, NGS yaklaşımını değerlendirmek için 20 örnek için klasik bir palinoloji çalışması yapılmıştır. NGS tabanlı yaklaşım ve polen mikroskopik çalışmalar, balın en baskın çiçek bileşenlerini tespit edebilmiştir. Her iki teknikten elde edilen sonuçları inceleyerek bal arıları tarafından sıkça kullanılan bitkiler belirlenmiştir (4).

Smart vd. (2017) (72) yaptıkları çalışmada, Kuzey Büyük Ovalar (Kuzey Amerika)'daki yoğun tarım alanlarında bulunan bal arıları kolonilerinden toplanan örneklerle elde edilen polen tanımlama sonuçlarını ışık mikroskopu ve DNA dizileme teknikleriyle karşılaştırmışlardır. Tüm taksonomik seviyelerde, DNA dizileme daha fazla taksonu ayırt etme yeteneğine sahip ve özellikle nadir tespit edilen türlerin tanımlanmasında çok faydalı veriler sunduğu görülmüştür. Her iki teknikle de sıkça tespit edilen taksonlar için önemli bir fenolojik örtüşme meydana gelmiştir. Bu da DNA dizilemenin tarım alanlarında bulunan bal arıları tarafından toplanan polen türlerinin genişliğini doğru bir şekilde yakalamak için uygun ve geliştirici bir teknik olduğunu göstermiştir.

Lucek vd. (2019) yaptığı çalışmada, kentsel ve kentsel olmayan alanlarda bal arıları tarafından ziyaret edilen bitki türlerini karşılaştırılmıştır ve bal örneklerindeki poleni tanımlamak için metabarkodlama kullanılmıştır. Toplamda 262 bitki cinsi tanımlanmış, bunlardan 15'i önemli ölçüde yaygın olarak bulunmuştur. Örnekler, bitki kompozisyonu, yabancı cinslerin sayısı ve tarım bitkisi cinslerinin sayısı açısından büyük farklılıklar göstermiştir. Kentsel ve kentsel olmayan alanlar arasında arazi örtüsü farklı olsa da, bal içindeki bitki çeşitliliği değişmemiştir (236).

Balkanska vd. (2020) yaptığı çalışmada üç polifloral bal örneği kullanılmıştır. *trnH-psbA* barkodu, bal örneklerinin bitki kökeninin belirlenmesinde yüksek düzeyde güvenle kullanılabilen etkili bir belirteç olarak bulunmuştur. *trnH-psbA* belirtecinin bitki tanımlanması için bir DNA barkodu olarak verimliliği değerlendirilmiş ve polifloral bal örneklerini *rbcL* belirteci ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmıştır. Fakat Bulgaristan'a özgü veritabanında temsil edilen bitki türleri için dizilenmiş *trnH-psbA* spacer bölgelerinin eksik olduğu görülmüştür (3).

Khansaritoreh vd. yaptığı çalışmada, balın coğrafik kökenini belirlemek için kullanılan moleküler belirteçlerin (ITS2 ve *rbcL*) incelenen örneklerde 926 bitki türünün tanımlanmasına olanak tanımıştır. 34 önemli tür belirlenmiş ve bu önemli türlerin genellikle

balda çok küçük miktarlarda bulunması geleneksel palinolojinin bunları tespit edemeyebileceğini göstermektedir (237).

Chiara vd. 2021’de yaptıkları çalışmada 111 farklı kökene sahip bal örneğinin DNA barkodlama analizinde kloroplast *trnL*-UAA kullanmışlardır. Bu yöntem bitki genomunun yüksek derecede korunmuş olmasına bağlı bazı sınırlamalarına rağmen, bitki gruplarının tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve çözünürlük sağlamaktadır. Botanik kompozisyon hakkında bilgiler tüm örnekler için elde edilmiş ve olası yanlış etiketleme durumlarını tespit etmeye olanak tanınmıştır. Ayrıca aynı çalışmada birden fazla numunenin analiz edilmesi NGS analizinin maliyetini düşürmüştür (238).

Milla vd. (2021) yaptığı araştırmada doğu ve batı Avustralya’da altı farklı vejetasyon bölgesinden temin edilen 15 bal örneğini kullanarak, polen metabarkodlama ile bal arılarının çiçek kaynaklarını ve beslenme arayışını belirlemişlerdir. İki bitki metabarkodlama belirteci (ITS2 ve *trnL*) kullanılmıştır. Her iki belirteç verileri bir araya getirildiğinde toplamda 55 bitki familyası, 67 cins ve 43 tür belirlenmiştir. Sonuçlar polen DNA metabarkodlamanın balın kökenini tespit etmek ve bal arılarının beslenme davranışını incelemek için güçlü ve sağlam bir yöntem olduğunu göstermiştir (239).

Özkök vd. (2023) yaptıkları çalışmada Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan bal örnekleri (çoğunlukla monofloral ballar) *rbcL* ve *trnH-psbA* lokusları kullanılarak barkodlanmıştır ve melissopalynoloji ve NGS teknikleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, her iki yöntemi karşılaştırırken >%20 nispi bolluğa sahip 53 familyanın bulunduğunu göstermektedir. Bu familyalardan 29 takson her iki yöntem kullanılarak bulunmuş, DNA barkodlama verileri ile mikroskop verileri arasında %55 oranında uyum sağlanmıştır (240).

Bal arıları tarafından toplanan polenler genellikle farklı türlerin polenlerinden oluşur, bu da geleneksel Sanger tabanlı dizilemenin bu tür örneklerin botanik tanımlaması için uygun bir seçim olmadığı anlamına gelir çünkü tek tek polen tanelerinin izole edilmesini ve dizilenmesini gerektirir (102, 105). Bu nedenle, Sanger tabanlı dizilemenin birçok karışık polen örneğinin analizini içeren uygulamalar için pratik olmadığı görülür (1). Bu kısıtlama HTS ile çözülebilmekte, bu da metabarkodlama yoluyla tek bir örneğin tüm topluluklarının değerlendirilmesine izin veren binlerce okuma üreten bir teknik sayesinde mümkün olmaktadır. HTS, DNA barkodlama belirteçleri kümesinin bir örneğinden eşzamanlı olarak birden fazla türün tanımlanmasına izin veren binlerce okuma oluşturur (1, 101).

NGS platformları, araştırmacıların herhangi bir organizmanın genomu, transkriptomu veya epigenomu ile ilgili hemen hemen her soruyu sormasına izin vererek çok çeşitli yöntemler sağlar. Dizileme yöntemleri, öncelikle DNA veya RNA örneklerinin nasıl elde edildiğine (ör. organizma, doku tipi, normale karşı etkilenen, deneysel koşullar, vb.) ve kullanılan veri analizi seçeneklerine göre farklılık gösterir. Dizi kütüphaneleri hazırlandıktan sonra, yöntemden bağımsız olarak gerçek dizileme aşaması temelde aynı kalır. Tüm genom dizileme (WGS), RNA dizileme (RNA-Seq), hedeflenen dizileme (ekzom dizileme veya 16S dizileme gibi), özel seçilmiş bölgeler, protein bağlama bölgeleri için protokoller sunan çeşitli standart kitaplık hazırlama kitleri vardır (1). NGS yöntemlerinin sayısı sürekli artsa da aşağıda en yaygın yöntemlerden bahsedilmektedir.

2.8.3.1. Sanger Dizileme

Frederick Sanger'ın adıyla anılan "Sanger" dizileme, geliştirilen ilk dizileme teknolojilerinden biridir. Kullanım kolaylığı ve güvenilirliği nedeniyle, Sanger dizileme kısa sürede dizileme teknolojilerinin altın standardı haline gelmiştir. Sanger dizileme metodu 3 temel aşamada gerçekleşir: ilgili kalıp DNA dizisinin terminasyon nükleotitleriyle PCR reaksiyonu, jel elektroforezi ile dizilerin ayrılması ve DNA dizisinin belirlenmesidir (241).

Geleneksel Sanger dizileme yöntemi kullanılarak DNA barkodlama, polen tanımlama için alternatif bir yaklaşım olarak önerilmiştir. Ancak, bu teknik karışık polen tanımlaması için işlevsel değildir. Karışımlardan tek tek polen tanelerinin izole edilmesi ve dizilenmesi veya klonlama tekniklerinin kullanılması gerekmektedir. Bu, emek yoğun ve hatalara neden olabilen bir işlemdir. Karışık tür tanımlama sorununu ele almak ve bu engeli aşmak açısından DNA metabarkodlama, hem geleneksel ışık mikroskopuyla polen tanımlama hem de Sanger temelli dizileme ile barkodlama için uygun bir alternatif olarak potansiyelini göstermiştir (102).

Sonuç olarak, yeni nesil dizileme teknolojileri, Sanger dizilemenin birçok dezavantajını aşmıştır. Bunlar arasında baz başına daha ucuz dizileme maliyeti, önemli ölçüde daha yüksek verimlilik, daha basit kütüphane hazırlığı ve klonlama adımının olmaması yer almaktadır. Ancak, yeni nesil dizileme verileriyle çalışmak kendine has zorlukları vardır. Her yeni teknolojinin farklı bir hata modeli ve önyargıları vardır ve deney tasarımı ve dizileme analizi sırasında dikkate alınması gerekmektedir.

2.8.3.2. 454 Roche Dizileme

454 Roche dizileme, sentezleme yöntemini uygulayan bir DNA dizileme teknolojisidir ve 2005 yılında piyasaya sürülmüştür. DNA segmenti, mikrotaneciklere sabitlenir ve emülsiyon PCR kullanılarak çoğaltılır. Daha sonra, tanecikler ayrı ayrı pikolitre boyutlu pirodizileme reaktörlerine dağıtılır. Baz üniteleri belirli bir sırayla yüzey üzerine akıtılır ve baz inkorporasyonu, pirofosfatın salınmasıyla işaretlenir. Genel olarak 454 dizileme kullanılarak genom, dört adımda veri haline dönüştürülür: örnek hazırlama, Emülsiyon PCR, Dizileme ve veri analizidir.

Bu platform tarafından üretilen diziler, Illumina dizilerinden çok daha uzundur ve Roche'un en son pirodizileme cihazı (GS FLX+), 800 bp uzunluğunda diziler üretebilmektedir. Hata oranları da Illumina dizilerinde gözlemlenenlere göre çok daha düşüktür (%0.49-1) (244, 245). Bu hataların çoğu, dizilerde ekleme, silme ve yerine koyma hatalarına neden olan homopolimer dizilerinin belirli bağlamlarına (yani dizinin geri kalanına) bağlı olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Kalite skorları, Sanger için üretilenlerle aynı değildir, çünkü bu skorlar o bazda homopolimer uzunluğunun doğru olma olasılığını değerlendirir. Homopolimerin doğru olup olmadığına bakılmaksızın, kalite skorları azalır (242). Bu, genom dizisi hakkında herhangi bir önceden bilgi olmadan kalite eşiklerinin belirlenmesini zorlaştırır. Bu orta boy diziler, yeniden dizileme (244), de novo montaj (245), transkriptomik (246) ve metagenomik (247) gibi birçok uygulamada uygun olabilir. 454 Roche Dizileme çalışmasından elde edilen verim, Illumina'dan daha düşüktür ve bu nedenle ultra derin kapsama dayalı uygulamalar için daha az uygundur. Ancak, "pirotag" dizilemesi olarak yaygın bir şekilde anılan korunmuş işaret geni etiketlerinin dizilmesinde çok popüler bir araç haline gelmiştir (248). Örneğe özgü etiketlerin kullanımı, bir çalışmada yüzlerce örneğin multiplex (birden fazla DNA örneğinin tek bir dizileme reaksiyonunda birlikte analiz edilmesi) edilmesini kolaylaştırmaktadır.

2.8.3.3. Ion Torrent

Ion Torrent teknolojisi, 454 Roche Dizileme dizilemenin mucitleri tarafından geliştirmiştir ve iki önemi değişiklik getirmiştir (249). İlk olarak, nükleotid dizileri, çevresel çözeltinin pH değerindeki değişikliklere bağlı olarak elektronik olarak algılanır ve optik bileşenlerin üretimi ve algılanması yerine eklenen nükleotid sayısına orantılı olarak gerçekleştirilir. İkinci olarak, dizileme reaksiyonu, akış hücreleri ve her hücrenin altındaki

elektronik sensörlerle birleştirilmiş bir mikroçip içinde gerçekleştirilir. Eklenen nükleotid, elektronik sensörler tarafından algılanan bir elektronik sinyale dönüştürülür (250).

Bu dizileme teknolojinin başlıca dezavantajları homopolimer uzantılarının ve tekrarlarının okuma sorunlarıdır. Başlıca avantajlar ise nispeten daha uzun okumaları, esnek iş akışı, kısa sürede sonuç vermesi ve diğer platformlar tarafından sunulan fiyattan daha düşük maliyete sahip olmasıdır. Ayrıca tahmini hata oranının %1 ile %1.7 arasında olduğudur (197).

2.8.3.4. Illumina Dizileme

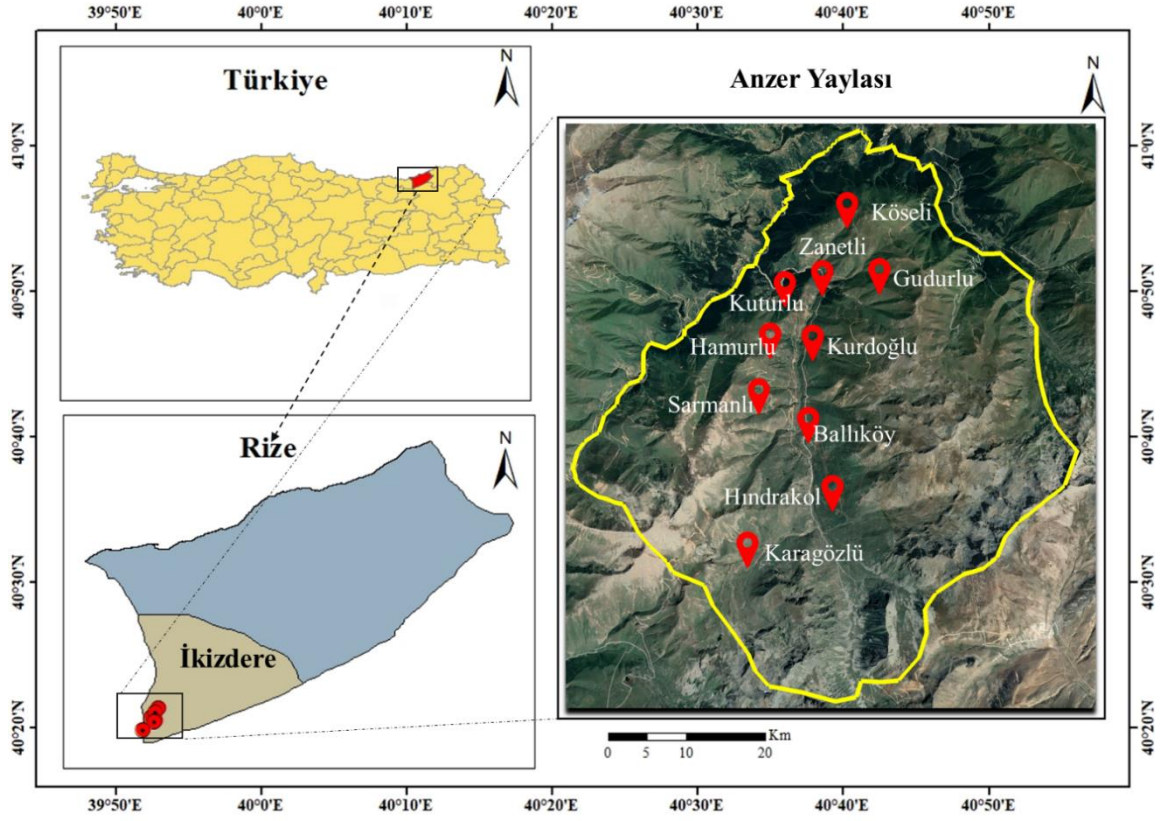
Illumina sekanslama protokolü, kalıp DNA'nın bir adaptör dizisi üzerine ligasyonu ve daha sonra cam akış hücresine (flow cell) yerleştirilmesi ile başlar. Kalıp DNA köprü amplifikasyonuna tabi tutulur ve her bir kalıp yaklaşık 1000 kopyaya çıkarılır. İzotermal polimeraz ve 3' inaktive floresan nükleotidler kullanarak her seferinde yalnızca bir baz ekleyebilmektedir. Her baz ekleme işlemi, floresan etiketi okuyan bir görüntüleme adımıyla takip edilir. Tek nükleotid ekleme, homopolimerler tarafından neden olan bağlamaya özgü hatalardan kaçınarak, tekrarlayan ve düşük kompleks bölümlerin kolayca dizilimlenmesinden dolayı büyük bir avantaj sağlar. Oluşturulan dizi başına ortalama hata oranı yaklaşık olarak %1-2 arasındadır. Bu oran, Sanger sekanslamasının en az on katıdır (251)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal Temini

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde gerekli olan bal örnekleri Rize ili İkizdere ilçesine bağlı Ballıköy (Anzer)'de faaliyet gösteren S.S. Anzer Ballıköy Tarımsal Kalkınma Kooperatifinden temin edilmiştir. Kooperatiften temin edilen balların ikisi (AB_ZT1, AB_ZT2) farklı üyelerin ürettiği balların karışımından oluşurken, biri yalnızca tek bir üyeye ait şahıs balından (AB_ZT3) oluşmuştur. Temin edilen bal örnekleri melisopalinolojik ve NGS analiz çalışmalarında kullanılmak üzere ısı, ışık ve nem açısından uygun koşullar altında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Arş. Laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde gerekli olan bitki materyali gerek Anzer (Ballıköy) 'de yapılan kişisel gözlemler gerekse Anzer'de bal ile uğraşan kişilerden elde edilen bilgilere göre Mayıs-Eylül tarihleri arasında toplanmıştır. Toplama bilgileri Tablo 3.1'de verilmiştir. Toplanan bitki örnekleri Anzer'in çeşitli bölgelerinden (Ballıköy, Gudurlu, Hamurlu, Hındrakol, Karagözlü, Köseli, Kurdoğlu, Kuturlu, Sarmanlı, Zanetli) elde edilmiştir (Şekil 3.1). Arazi çalışmaları sırasında toplanan her bir örnekten herbaryum örneği, ayrıca moleküler çalışmalar için sağlıklı yaprak örnekleri ve palinolojik çalışmalar için çiçek temin edilmiştir. Ayrıca toplanan her bir örneğin fotoğrafları çekilmiş ve gerekli olan tanımlayıcı tüm bilgiler arazi defterine (tarih, toplayıcı no, habitat, koordinat vb.) kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Rize ili İkizdere ilçesi Anzer (Ballıköy)'de toplanan bitkilerin mahallerini gösteren harita

Tablo 3.1. Arazide toplanan bitki taksonlarına ait toplama bilgileri

Örnek No.	Toplam bilgileri
ZT1	A8 Rize; İkizdere, Anzer, yol kenarı, 1227 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 01 (KTUB), N40° 40' 51.5, E40° 35' 7.90
ZT2	A8 Rize; İkizdere, Anzer, yol kenarı, 1541 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 02 (KTUB), N40° 38' 8.01, E40° 32' 11.0
ZT3	A8 Rize; İkizdere, Anzer, yol kenarı, 1559 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 03 (KTUB), N40° 40' 48.7, E40° 31' 9.26
ZT4	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 04 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2
ZT5	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 05 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2
ZT6	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 06 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2
ZT7	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 07 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2
ZT8	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 08 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2
ZT9	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagöz, yol kenarı, 2412 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 09 (KTUB), N40° 33' 39.2 , E40° 30' 57.2

Tablo 3.1. (Devam)

ZT10	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 10 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT11	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 11 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT12	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 12 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT13	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 13 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT14	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 14 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT15	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 15 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT16	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 16 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT17	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 17 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT18	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2221 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 18 (KTUB), N 40° 34' 8.18, E40° 30' 7.70
ZT19	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 19 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT20	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 20 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT21	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 21 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT22	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 22 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT23	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 23 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT24	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 24 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT25	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 25 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT26	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2108 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 26 (KTUB), N40°37'16.86 E40°31'49.34
ZT27	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 27 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT28	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 28 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT29	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 29 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT30	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 30 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT31	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 31 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT32	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 32 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7

Tablo 3.1. (Devam)

ZT33	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 33 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT34	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Zanetli, yol kenarı, 1800 m, 26 v 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 34 (KTUB), N40° 37' 8.59, E40° 32' 51.7
ZT35	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2435 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 35 (KTUB), N40° 33' 16.2, E40° 30' 34.6
ZT36	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2435 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 36 (KTUB), N40° 33' 16.2, E40° 30' 34.6
ZT37	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 37 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT38	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 38 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT39	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 39 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT40	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 40 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT41	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 41 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT42	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 42 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT43	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 43 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT44	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 44 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT45	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 45 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT46	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 46 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT47	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 47 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT48	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 48 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT49	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 49 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT50	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 50 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT51	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, yol kenarı 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 51 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT52	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 52 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT53	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 53 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT54	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 54 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT55	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 55 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4

Tablo 3.1. (Devam)

[illegible]

Tablo 3.1. (Devam)

ZT79	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 79 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT80	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 80 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT81	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 81 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT83	A8 Rize; İkizdere, Anzer, yol kenarı, 1787 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 83 (KTUB), N40° 37' 52.6, E40° 32' 16.0
ZT84	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, yol kenarı, 2265 m, 20 vi 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 84 (KTUB), N40° 34' 36.3, E40° 31' 06.4
ZT85	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 85 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT86	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 86 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT87	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 87 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT88	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 88 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT89	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 89 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT90	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2513 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 90 (KTUB), N40°36'39.0, E40°30'43.0
ZT91	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 91 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT92	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2626 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 92 (KTUB), N40° 31' 9.31, E40° 30' 31.4
ZT93	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 93 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT94	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 94 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT95	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 95 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT96	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 96 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT97	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 97 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT98	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 98 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT99	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2096 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 99 (KTUB), N40°36'15.96, E40°31'30.32
ZT100	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 100 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT101	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 101 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT102	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 102 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3

Tablo 3.1. (Devam)

ZT103	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 103 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT104	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 104 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT105	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 105 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT106	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 106 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT107	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 107 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT108	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 108 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT109	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 109 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT110	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 110 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT111	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 111 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT112	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 112 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT113	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 113 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT114	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 114 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT115	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 115 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT116	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 116 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT117	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 117 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT118	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 118 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT119	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, nemli kayalar, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 119 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT120	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2190 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 120 (KTUB), N40° 34' 57.8, E40° 30' 57.3
ZT121	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 121 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT122	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 122 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT123	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 123 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT125	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 125 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT126	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 126 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76

Tablo 3.1. (Devam)

ZT127	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Köseli, alpin çayırı, 1933 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 127 (KTUB), N40° 37' 38.9, E40° 32' 53.4
ZT128	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Köseli, alpin çayırı, 1933 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 128 (KTUB), N40° 37' 38.9, E40° 32' 53.4
ZT129	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Köseli, alpin çayırı, 1933 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 129 (KTUB), N40° 37' 38.9, E40° 32' 53.4
ZT130	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Köseli, yol kenarı, 1933 m, 06 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 130 (KTUB), N40° 37' 38.9, E40° 32' 53.4
ZT131	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 131 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT132	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 132 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT133	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 133 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT134	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 134 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT135	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 135 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT136	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2460 m, 06 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 136 (KTUB), N40°34'18.40, E 40°29'48.78
ZT137	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 137 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT138	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hamurlu, alpin çayırı, 2455 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 138 (KTUB), N40°36'34.18, E40°30'52.76
ZT139	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 139 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT140	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 140 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT141	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 141 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT142	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 142 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT143	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 143 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT144	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 144 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT145	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 145 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT146	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 146 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT147	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 147 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT148	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 148 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT149	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 149 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19

Tablo 3.1. (Devam)

ZT150	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 150 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT151	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 151 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT152	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 152 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT153	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 153 (KTUB), N40°33'42.48, E 40°30'58.19
ZT154	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 154 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT155	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 155 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT156	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 156 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT157	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 157 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT158	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 158 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT159	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, dere kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 159 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT160	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 160 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT162	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 162 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT163	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 163 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT164	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 164 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT165	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 136 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 165 (KTUB), N40°35'35.43, E40°30'50.79
ZT166	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 166 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT167	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 167 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT168	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 168 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT169	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 169 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT170	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 170 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT171	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 171 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT172	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 172 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8
ZT173	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2416 m, 19 vii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 173 (KTUB), N40° 36' 31.4, E40° 30' 19.8

Tablo 3.1. (Devam)

ZT174	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 174 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT175	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 175 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT176	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 176 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT177	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 177 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT178	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 178 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT179	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, dere kenarı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 179 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT180	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 180 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT181	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 181 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT182	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, dere kenarı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 182 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT183	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, dere kenarı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 183 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT184	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 184 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT185	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 185 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT186	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2238 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 186 (KTUB), N40° 34' 17.2, E40° 30' 37.8
ZT187	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2115 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 187 (KTUB), N40° 35' 18.4, E40° 31' 00
ZT188	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2115 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 188 (KTUB), N40° 35' 18.4, E40° 31' 00
ZT189	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2115 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 189 (KTUB), N40° 35' 18.4, E40° 31' 00
ZT190	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2115 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 190 (KTUB), N40° 35' 18.4, E40° 31' 00
ZT191	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2115 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 191 (KTUB), N40° 35' 18.4, E40° 31' 00
ZT192	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 192 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44
ZT193	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 193 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44
ZT194	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 194 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44
ZT195	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 195 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44
ZT196	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 01 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 196 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44

Tablo 3.1. (Devam)

ZT197	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 197 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT198	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 198 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT199	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 199 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT200	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 200 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.7
ZT201	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 201 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT202	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, taşlık alan, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 202 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT203	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, dere kenarı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 203 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT204	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 204 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT205	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 205 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT206	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, taşlık alan, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 206 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT207	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, sulak alan, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 207 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT208	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 208 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT209	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, taşlık alan, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 209 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT210	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 210 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT211	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 211 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT212	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 212 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT213	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2239 m, 24 viii 2012, Coşkunçelebi & Z.Türker 213 (KTUB), N40° 33' 59.2, E40° 30' 53.6
ZT214	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 214 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT215	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, dere kenarı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 215 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT216	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 216 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT217	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 217 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT218	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 218 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT219	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hindrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 219 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26

Tablo 3.1. (Devam)

ZT220	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 220 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT221	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 221 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT222	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 222 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT223	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 223 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT224	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 224 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT225	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 225 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT226	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 226 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT227	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 227 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT228	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 228 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT229	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 229 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT230	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, taşlık alan, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 230 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT231	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 231 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT232	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 232 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT233	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2587 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 233 (KTUB), N40° 31' 55, E40° 30' 26
ZT234	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 05 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 234 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT235	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 235 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT236	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 236 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT237	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 237 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT238	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, dere kenarı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 238 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT239	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 239 (KTUB), N 40°34'17.96, E 40°29'56.00
ZT240	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, alpin çayırı, 2487 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 240 (KTUB), N40° 34' 10, E40° 30' 1.7
ZT241	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Karagözlü, dere kenarı, 2448 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 241 (KTUB), N 40°34'18.63, E 40°29'55.16
ZT242	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 242 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7

Tablo 3.1. (Devam)

ZT243	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, yol kenarı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 243 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT244	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 244 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT245	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 245 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT246	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 246 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT247	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, taşlık alan, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 247 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT248	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 248 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT249	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 249 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT250	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2518 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 250 (KTUB), N40° 36' 3.2, E40° 30' 3.7
ZT251	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2280 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 251 (KTUB), N40° 34' 58, E40° 31' 28
ZT252	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2280 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 252 (KTUB), N40° 34' 58, E40° 31' 28
ZT253	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2280 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 253 (KTUB), N40° 34' 58, E40° 31' 28
ZT254	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2280 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 254 (KTUB), N40° 34' 58, E40° 31' 28
ZT255	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kuturlu, alpin çayırı, 2420 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 255 (KTUB), N40° 37' 5.85, E40° 31' 5.44
ZT256	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Gudurlu, alpin çayırı, 2349 m, 06 viii 2021, Gültepe & Z.Türker 256 (KTUB), N40° 36' 40, E40° 32' 33
ZT257	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Gudurlu, alpin çayırı, 2487 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 257 (KTUB), N40°37'4.53, E 40°32'5.57
ZT258	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2487 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 258 (KTUB), N4 40°36'40.88, E40°36'40.88
ZT259	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Kurdoğlu, alpin çayırı, 2487 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 259 (KTUB), N4 40°36'40.88, E40°36'40.88
ZT260	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2618 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 260 (KTUB), N40°31'57.57, E40°30'16.97
ZT261	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2618 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 261 (KTUB), N40°31'57.57, E40°30'16.97
ZT262	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2618 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 262 (KTUB), N40°31'57.57, E40°30'16.97
ZT263	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2618 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 263 (KTUB), N40°31'57.57, E40°30'16.97
ZT264	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, taşlık alan, 2650 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 264 (KTUB), N40°32'7.01, E 40°30'21.33
ZT265	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2852 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 265 (KTUB), N40°31'54.95, E40°30'39.66

Tablo 3.1. (Devam)

ZT266	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2784 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 266 (KTUB), N40°31'54.61, E40°30'32.69
ZT267	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2706 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 267 (KTUB), N40°32'17.80, E40°30'23.70
ZT268	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2700 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 268 (KTUB), N40°32'17.80, E40°30'23.70
ZT269	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2700 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 269 (KTUB), N40°32'17.80, E40°30'23.70
ZT270	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2567 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 270 (KTUB), N40°32'16.00, E40°30'5.49
ZT271	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2401 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 271 (KTUB), N40°33'29.05, E40°30'35.40
ZT272	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2536 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 272 (KTUB), N40°32'36.26, E40°30'10.59
ZT273	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, yol kenarı, 2341 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 273 (KTUB), N40°33'37.74, E40°30'46.04
ZT274	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, yol kenarı, 2341 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 274 (KTUB), N40°33'37.74, E40°30'46.04
ZT275	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, yol kenarı, 2341 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 275 (KTUB), N40°33'37.74, E40°30'46.04
ZT276	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2248 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 276 (KTUB), N40°34'41.97, E40°30'51.62
ZT277	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2248 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 277 (KTUB), N40°34'41.97, E40°30'51.62
ZT278	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2176 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 278 (KTUB), N40°35'4.27, E40°30'56.67
ZT279	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2176 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 279 (KTUB), N40°35'4.27, E40°30'56.67
ZT280	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2248 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 280 (KTUB), N40°34'41.97, E40°30'51.62
ZT281	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Hındrakol, alpin çayırı, 2248 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 281 (KTUB), N40°34'41.97, E40°30'51.62
ZT282	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2156 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 282 (KTUB), N40°35'13.93, E40°30'55.63
ZT283	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, yol kenarı, 2156 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 283 (KTUB), N40°35'13.93, E40°30'55.63
ZT284	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2148 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 284 (KTUB), N40°35'38.23 , E40°30'50.79
ZT285	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Ballıköy, alpin çayırı, 2169 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 285 (KTUB), N40°35'40.43, E40°30'49.63
ZT286	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, yol kenarı, 2293 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 286 (KTUB), N40°36'12.99, E40°30'46.86
ZT287	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2316 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 287 (KTUB), N40°36'9.96, E40°30'46.13
ZT288	A8 Rize; İkizdere, Anzer, Sarmanlı, alpin çayırı, 2317 m, 05 viii 2022, Gültepe & Z.Türker 288 (KTUB), N40°36'9.45, E40°30'46.63

3.2. Bitkilerin Teşhis Edilmesi

Mayıs-Eylül tarihleri arasında yapılan arazi çalışmalarında toplanıp Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Botanik laboratuvarına getirilen örnekler +4°C bir hafta bekletilerek böcek ve haşerelerden arındırılmıştır. Böcek ve diğer haşerelerden arındırılan örnekler başta Türkiye Florası (252) ekleri (253, 254) olmak üzere, Rize Florası, Vegetasyonu ve Yöre Ballarının Polen Analizi (255), Of-İkizdere-Anzer Vadisi Florası (256), Türkiye Bitkileri Listesi (257), Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Rize İli Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme Proje Raporu (258) faydalanılarak stereo mikroskopla (Olympus, Japonya) teşhis edilmiştir. Teşhis edilmiş tüm örnekler standart tekniklere göre herbaryum örneğine dönüştürülerek KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'na (KTUB) yerleştirilmiştir.

3.3. Bitkilerden Polen İzolasyonu, Polenlerin Işık (IM) ve Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) İncelenmesi

Palinolojik incelemeler için kullanılan polenler, arazi çalışmalarında kese kağıtları içerisine koyulup kurutulan çiçeklerden Asetoliz (259) yöntemi kullanarak izolasyonları gerçekleştirilmiştir. NGS ile geleneksel yöntem (melissopalinoji) göre Anzer Balı'nda ortak olarak belirlenmiş taksonların ayrıntılı palinolojik özelliklerinin ortaya konulması için, asetoliz yöntemine göre belirlenen bu polenler bir kısmı gliserin-jelatin ile daimi preparat haline getirilerek ışık mikroskobunda (IM) incelemeye hazır hale getirilmiştir. Geriye kalan polenler ise % 96'luk etil alkole alınarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) çalışmalarında kullanılmıştır.

Asetoliz metoduna (261) göre, arazide temin edilen çiçeklerden polen izolasyonu için anterler 10 ml'lik tüplere konulmuştur. Anterlerin üzerine tamamen kapatacak şekilde % 10'luk Potasyum Hidroksit (KOH) ilave edilerek 20 dk. cam bagetle ezilmiştir. Ezme işleminden sonra, delikleri 250 µm olan tel süzgeçten (filtre) geçirilerek huni yardımıyla polenler, çiçeğin diğer kısımlarından ayrılmalari sağlanmıştır. Miktarları eşitlendikten sonra, tüpler 3500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra pastör pipet yardımıyla supernatant atılmıştır ve üzerine distile su eklenerek aynı hız ve dakikada tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tekrar pastör pipetle supernatant alınmıştır ve polenlerin üzerine asetoliz karışımı (1 kısım derişik Sülfirik Asit (H₂SO₄), 9 kısım Asit Anhidrit veya Glacial Asetik Asit) dökülerek, tüpler behere yerleştirilmiştir. Daha sonra yaklaşık 45 dk çeker ocakta kaynatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kaynatma işleminden

sonra biraz soğumaya bırakılarak miktarları eşitlenmiştir. Tekrardan tüpler 3500 rpm de 15 dk. santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı dökülmüştür. Tüplere %70'lik etil alkol konularak aynı hız ve dakikada tekrar santrifüj edilerek supernatant alınmıştır. Son olarak, tüplerde bulunan polenlerin üzerine % 50'lik gliserin (50 ml gliserin + 50 ml distile su) konularak 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı kısım atılmıştır ve çok az miktarda gliserin-jelatin kullanılarak tüpün içindeki polenle muamele edilmiştir. Lam üzerine konularak erittikten sonra lamelle kapatılıp preparatlar hazırlanmıştır. Preparatlar ters çevrilerek, konulup 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Cam tüpte kalan örnekleri muhafaza etmek için üzerlerine % 96'lık etil alkol konularak ependorfa aktarılıp daimi preparat haline getirilmiştir.

3.3.1. Polenlerin Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Polen tanelerinin incelenmesi ve ölçümleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan ışık mikroskobuyla (Leica S6D, Almanya) yapılmıştır. Polen taneleri gözlemlenmiş ve x40 ve x100 arasında değişen büyütmelerde hem polar hem ekvatorial düşüşlerinin mikrografları elde edilmiştir. Ayrıca IM çalışmalarında polar eksen ekvatorial çap, P/E oranı, polen tipi, polen şekli, yüzey ornemantasyonu gibi palinolojik karakterler ölçülmüştür.

Ayrıca polenlerin tipi belirlenirken Halbritter ve arkadaşlarının (2018) (260) resimli polen terminolojisi kitabı dikkate alınmıştır. Burada ifade edilen P/E oranı, iki kutup arasındaki polar eksen uzunluğunun (P) ekvatorial çapla (E) karşılaştırmasını ifade eder. İzodiametrik (sferoidal) polende polar eksen, ekvatorial çap ile yaklaşık olarak eşittir. Prolat polende polar eksen, ekvatorial çapından uzundur. Oblat polende ise polar eksen, ekvatorial çapından kısadır. Ayrıca diğer palinolojik özellikler ve görüntüler için resimli polen terminolojisi kitabından faydalanılmıştır.

3.3.2. Polenlerin Taramalı Elektron Mikroskobu'nda Görüntülenmesi

SEM çalışmaları %96'lık EtOH'da saklanan polenler üzerinden gerçekleştirilmiştir. SEM analizi için, polen taneleri çift taraflı yapışkan bant ile doğrudan staplara yerleştirilmiş ve SC502 Sputter Coater altın kaplama aparatı kullanılarak altın ile kaplanmıştır. Polen tanelerinin polar ve ekvatorial görünüşlerini, ekzin süslemelerini belirlemek için JEOL JSM-6610 marka taramalı elektron mikroskobu kullanılarak $\times 3000$ ve $\times 5000$ arasında değişen büyütmelerde mikrograflar elde edilmiştir. SEM analizleri Recep Tayyip Erdoğan

Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan SEM (JEOL JSM-6610, Tokyo) kullanılarak 5-15 kV altında yürütülmüştür.

3.4. Ballardan Polen İzolasyonu ve Tayini

Bu çalışmada uluslararası bir metod olarak kabul edilmiş olan 10 g bal içindeki polenlerden preparat yapılması yöntemi kullanılmıştır (261). Preparatlar, Wodehouse yöntemine (262) göre daimi preparat haline getirilmiştir. Bu ortak metoda göre, kavanozlara konulan bal örnekleri cam bagetle iyice karıştırılarak homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. Kristalleşmiş ve soğuktan katılaşmış olan ballar bir müddet su banyosunda (40-45°C) tutularak erimesi sağlandı. İyice karıştırılarak homojen hale gelmiş olan bal örneklerinden 10 'ar gram tartılarak 20 ml' lik tüplere konuldu. Üzerine 5 mL distile su ilave edilerek tüpler tıpa ile kapatılmıştır. Balın su içinde çözünmesini sağlamak için tüpler 40-45 °C'lik su banyosunda yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Su banyosundan alınan tüpler çalkalanarak balın su içinde erimesi sağlanmıştır. Daha sonra tüpler 3500 rpm'de 45 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı dökülmüştür ve kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek bir süre bekletilmiştir. İğne ucuna alınan bir miktar gliserin-jelatin tüp dibindeki çökeltiye bulaştırılarak, çökeltinin tümü lam üzerine aktarılmıştır. Lam üzerine konulan çökeltiye bulaştırılmış gliserin-jelatinin hot-plate üzerinde ısıtılarak erimesi sağlanıp üzeri 45 derece açıyla lamelle kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar ters çevrilerek kuruması için bir gece bekletilerek mikroskopta incelenecek duruma getirilmiştir.

İncelenen preparatlardaki polen teşhisleri için, ışık mikroskobunda x10 ve x40 ve x100'lük objektifler kullanılmıştır. Polen terminolojisi için referans preparatlardan, PalDat (Palynological Database) (263), Pollen-Wiki ve Türkiye'nin nektarlı bitkileri, polenleri ve balları kitabından (261) faydalanılmıştır.

3.5. Bal Numunelerinden Toplam Polen Sayısı (TPS) Hesaplanması ve İncelenmesi

TPS sayısının hesaplanması için 10 g baldan hazırlanan preparatlar aşağıda verilen metoda göre sırasıyla uygulanmıştır.

- Stok ballardan temin edilen 10 g bal steril cam baget yardımıyla iyice karıştırıldı.
- Üzerine 20 mL distile su ilave edilip 9666 adet *Lycopodium* sp. sporu bulunan tablet de karışımın içine ilave edildi.

- Tüpler, 45 C°'lik su banyosunda 10-15 dk bekletildi. Tablet, karışım içinde eridikten sonra polenlerin ve sporların boyanmasını için birkaç damla bazik fuksin ilave edildi.
- Tüpler karıştırıcıda homojen şekilde karıştırılıp alt üst edildikten sonra 3500 rpm'de 45 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüplerin süpernatantları döküldü.
- Tüplerin içine 0.1 mL kadar %50'lik gliserin ilave edilerek pelletin gliserinle karışımı sağlandı. Daha sonra karışımdan 0.01 mL alınarak son hacim %50'lik gliserinle 1 mL'ye tamamlandı (264).
- Tüpten 0,01 mL alınarak preparat hazırlanıp mikroskopta incelendi.
- Her preparat mikroskopta sol üst köşeden incelenmeye başlandı ve 18x18 mm²'lik alan tamamen taranarak bu alanda bulunan tüm polenler nicelik olarak tespit edildi.
- Daha sonra preparat tekrar sol üst köşeden başlanarak tamamen tarandı ve ilk önce *Lycopodium* sp. sporları ayrı ayrı sayıldı. Polen sayımı için x10 oküler ve x40'lik objektif kullanıldı. İncelenen ballar TPS'ye göre 4 ana grupta değerlendirilmiştir (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Çalışılan örneklerdeki toplam polen sayısı ve sıklık değerleri (Sorkun'dan, 261)

No	Toplam Polen Sayısı (TPS)	Sıklık Değeri
1.	<20 000	Düşük
2.	20 000-100 000	Normal
3.	100 000-500 000	Zengin
4.	500 000-1 000 000	Çok zengin

Bulunan değerler aşağıda gösterilen “Eşitlik 1”de uygulanmıştır (267).

$$TPS - 10g = \frac{\text{Toplam Polen Sayısı} \times 9666*}{\text{Toplam Spor Sayısı}} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

* Bir *Lycopodium* tabletindeki spor tanelerinin sayısı

Taksonların, polen ortalamaları ve polen %'leri belirlenmiştir. Bu taksonlara ait polenlerin, çalışılan ballardaki katkıları saptanmıştır. Sonrasında tüm preparat tarandıktan sonra balda bulunan bütün polenler teşhis edilmiştir.

İncelenen ballarda polenler, polen spektrumlarına göre 4 ana gruba ayrılır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Bal örneklerine ait polen spektrumları (Sorkun'dan, 261)

No.	Polen Miktarı (%)	Polen Spektrumu
1.	> % 45	Dominant
2.	% 16- % 45	Sekonder
3.	% 3- % 15	Minor
4.	<%3	Eser

3.6. Baldan DNA İzolasyonu

Bal örneklerinden total DNA izolasyonu için klasik CTAB yöntemi (Doyle ve Doyle, 1987) (266) aşağıdaki şekilde modifiye ve optimize edilerek kullanılmıştır.

Bal örneklerinde bulunan polenlerin homojen şekilde dağılması için önce steril cam bagetle iyice karıştırıldı. Her bir bal örneğinden toplamda 50 g olacak şekilde, 4 adet 50 ml'lik falkon tüplere ayrı ayrı 12.5 g bal koyulup, steril distile su ile 45 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler alt üst edildikten sonra 65°C'de su banyosunda 4-5 saat inkübe (Allsheng, Çin) edilmiştir. Homojen hale getirildikten sonra hassas terazide (Okauş, Çin) tartılmıştır. Ardından tüpler, 14 000 g'de 20 dk. santrifüj (Sigma, Almanya) edilmiş ve supernatant kısmı dökülmüştür. Pelletlerin üzerine 20 ml distile su eklenerek, iyice çözölmüş ve tekrar 14 000 g'de 10 dk. santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında, tek tüpe toplanan pelletler steril distile su eklenerek son hacim 5 ml olacak şekilde tartılmıştır. 14 000 g'de 5 dk. santrifüj edilen tüplerin supernatant kısımları dökülmüştür. Pelletler, 2 ml steril distile suda çözöldükten sonra 2 ml hacimdeki ependorf tüplerine aktararak DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Hazırlanan ependorf tüpleri bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün 15 dk., 14 000 g'de santrifüj edilen örneklerin süpernantantları boşaltılıp 30 dk kurutulmaya bırakıldı. Tüplere en az 4'er adet 0.5 cm steril cam boncuk ve steril cam tozu eklenerek, sıvı azotta 15 dk. bekletilmiştir. Daha sonra

homojenizatörde (Allsheng, Çin) 10 dk öğütölmeye bırakılmıştır. Bu işlemlerden sonra, oda sıcaklığında bekletilen tüplerden cam boncuklar çıkartılmıştır. Kalan pelletler üzerine ise 500 µl CTAB solüsyonu [20 µl EDTA, 50 µl Tris, 140 µl NaCl, 100 µl CTAB, 190 µl H₂O] eklenmiştir. Bu haldeki ekstrakta her bir örnek için 0.02 gr PVPP (polyvinylpolypropodylene), 30 µl proteinaz K, 2.5 µl RNaz ve 2.5 µl β-merkaptoetanol ilave edilmiştir. Karışım bir pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra 65°C’de 4 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak 1 dk soğumaya bırakıldıktan sonra, oda sıcaklığında örnekler 16 000 g’de 1dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilmiş örnekler üzerine 500 µl kloroform eklendikten sonra ve tüpler homojen olana kadar alt üst edilmiştir. Ardından aynı hızda 5 dk. santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant kısım alınıp yeni tüplere aktararak, üzerine yeniden 500 µl kloroform ilavesi gerçekleştirildikten sonra tüpler 3-5 kez alt üst edilmiş ve aynı hızda 5 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısım alınarak bir önceki aşama aynen tekrarlanmış, daha sonra süpernatant alınarak yeni bir ependorf tüpüne transfer edilmiştir. Tüplerden hacmi en fazla olanın kapasitesi belirlenmiş ve bu hacim baz alınarak diğer tüplere eşit oranda hacmin %8’i kadar her tüpe 7.5 M’lik amonyum asetat ilavesi yapılmıştır. Tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra oluşan hacmin %54’ü kadar izopropanol ilavesi edilmiş ve süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra +4°C’de bir gece bekletilmiştir. Bir gece +4 °C’de bekletilen örnekler 5 dk, 16.000g’de santrifüj edilmiş, süpernatant kısım atıldıktan sonra, şeffaf pellet üzerine 1ml %70’lik soğuk etanol ilavesi yapılmıştır. Alkol ilave edilmiş tüpler birkaç defa alt üst edilerek 5 dk 16.000g’de santrifüj edilmiş, süpernatant döküldükten sonra bu işlem bir kez daha tekrar edilmiş, tüm alkolün DNA’dan uzaklaştırılması için tüpler kapakları açık şekilde 15 dk 37°C’de (ya da oda sıcaklığında 30-45 dk.) kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra tüplerde bulunan DNA pelleti, 50 µl TE ilavesi ile çözülmüştür. Pelletin tamamen çözülmesi için örnekler, 15 dk 65°C’de ısıtıcı blokta tutulmuştur.

3.6.1. DNA Konsantrasyonu, Kalitesi ve Saflığı

İzole edilen total DNA’ların kalitesi ve saflığı Nanodrop spektrofotometre (ThermoFisher Scientific, Kanada) ile yapılan absorbans 260 nm ve absorbans 280 nm ölçümlerinin karşılaştırılmasından hesaplanmıştır (267). Ölçme işlemi öncesinde, nanodrop cihazı açılmış ve DNA örneklerinin yerleştirileceği elmas kısım, saf su ve steril kurutma kağıdı ile silinmiştir. Programda nükleik asit seçeneğine tıklanmıştır. Daha sonra DNA

izolasyon kısmının son aşamasında, DNA'nın çözüldüğü tampondan, 1 µl alınarak, cihazın ölçüm yapan elmas kısmına konulmuş ve cihazın “blank” sekmesi seçilmiştir. Bu işlem, DNA ölçümü öncesi, cihazı sıfırlamak için yapılmıştır. Sıfırlama işleminden sonra, elmas ünitesi tekrar açılmış ve elmas kısmında kalan tampon steril kurutma kağıdı ile iyice temizlenmiştir. Daha sonra, genomik DNA örneklerinden 1 µl alınarak, cihazın ölçüm yapan elmas kısmına konulmuş ve “sample measuring (dsDNA)” sekmesi seçilmiştir. Her DNA ölçümünden sonra elmas, dH₂O ve steril kurutma kağıdı ile silinmiştir. Bu işlemden sonra, diğer DNA örneklerinin de ölçme işlemi yapılmıştır. Kontaminantların varlığını belirlemek için, protein kontaminasyonu için, absorbans 260 nm ve absorbans 280 nm oranları (A₂₆₀/A₂₈₀) ve fenolik kontaminasyonu için, absorbans 260 nm ve absorbans 230 nm oranları hesaplanmıştır (A₂₆₀/A₂₃₀). Saflık dereceleri A₂₆₀/A₂₈₀=1.8 ile 2.00 arasında, A₂₆₀/A₂₃₀=2.00 ile 2.20 arasında olan DNA örnekleri sonraki aşamalar için +4°C’de saklanmıştır. Nanodrop cihazında A₂₃₀, A₂₆₀ ve A₂₈₀ nm dalga boylarında ölçümler yapılmış ve elde edilen veriler Tablo 3.4’te yer almıştır.

Tablo 3.4. Çalışılan bal örneklerine ait DNA konsantrasyonu ve saflık değerleri

Örnekler	İzolasyon Tekniği	Konsantrasyon (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
AB_ZT1	CTAB	230.3	1.92	2.00
AB_ZT2	CTAB	106.2	1.93	2.10
AB_ZT3	CTAB	100.2	1.81	2.01

3.6.2. Presipitasyon

Fenol presipitasyonu için, izole edilen DNA solüsyonundan ve elution buffer’dan 150 µl alındı. Üzerine 150 µl fenol-kloroform (1:1) eklenir. 20 s vorteks (Wisemix, Kore) de 30 s buzda bekletildi. Bu işlem art arda 5 kez tekrarlandı. 5 dk 16 000g’de santrifüj edilerek, süpernant kısmı alındı (150 µl). Tekrar 150 µl fenol-kloroform (1:1) eklendi. Ardından Solüsyon 30 s vorteks, 30 s buz da bekletildi. Bu işlem art arda 5 kez tekrarlandı. 5 dk 16 000g’de santrifüj edilerek, süpernant kısmı alındı (150 µl). Ardındandan alkol prespitasyonu ile işleme devam edilmiştir.

Alkol presipitasyonu için, son hacmin 10:1'i kadar 3M sodyum sülfat eklendi. Son hacmin 2.5 katı kadar %96'lık etil alkol ilave edilip, elle çözüldü. 1 gece -20 °C'de bekletildi. 16 000g'de 15 dk. santrifüj edilip, süpernatant döküldü. Pellet üzerine 500 µl %96'lık etil alkol koyulup, elle çözüldü. Aynı hızda 5 dk. santrifüj edilip süpernatant kısmı döküldü. Pellet üzerine 500 µl %70'lik etil alkol koyulup, elle çözüldü. Tekrar aynı hızda 5 dk santrifüj edilip süpernatant kısmı döküldü. Pellet etüvde kurutuldu. 25 µl elution buffer' da çözüldü.

3.6.3. Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezde Görüntülenmesi

İzole edilen DNA'lar, UV altında görüntülenmiştir. Bunun için ilk olarak %0,8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 0.4 gr agaroz (Sigma-Aldrich) tartılmış ve üzerine 50 ml 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu eklenerek, hafifçe karıştırılmış ve mikrodalga fırında 1.5 dk'ya kadar ısıtılmıştır. Oda sıcaklığında soğutulan karışıma, 2.5 µl etidyüm bromür (EtBr) eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan jel, elektroforez tankına aktarılmış, taraklar yerleştirilmiş ve donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra, DNA'lardan 5 µl alınarak, 2 µl 6X Loading Dye (Thermo-Scientific) ile karıştırılarak, kuyucuklara yüklenmiştir. Yüklenen DNA örnekleri elektroforezde (Bio-Rad, USA) koşturulmuştur. Bu işlem sonrasında jel, DNA görüntülerinin alınması için, jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad, USA) UV altında görüntülenmiştir.

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR işlemleri genomik DNA üzerinde yer alan hedef belirteçleri (ITS1 ve ITS2) Illumina alt yapısı ile uyumlu şekilde çoğaltmak maksadıyla iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada PCR için evrensel ITS primerlerine adaptörler takılarak, hizmet alımı yöntemiyle adaptörlü primerler sentezlenmiştir. Evrensel ITS primerleri ve eklenen adaptörler Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan evrensel ITS primerleri ve eklenen adaptörler (evrensel ITS primerlerine eklenen adaptörler koyu olarak gösterilmiştir.)

	Primer	Yönü	Baz Sırası
Adaptör+ITS1	ITS5N	F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA GGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS2N	R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA GGCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
Adaptör+ITS2	ITS3N	F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
	ITS4N	R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA GTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

PCR ürünlerinden daha iyi bantlar elde etmek için optimizasyon için farklı denemeler gerçekleştirilmiştir. Örneğin farklı enzimler (GoTaq® ve Taq DNA Polimeraz gibi.) denenmiş olup, en iyi enzimin Phusion™ olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca jelatin, BSA (Bovine Serum Albümin) gibi maddeler farklı konsantrasyonlarda denendi ve en uygun konsantrasyon bulunmuştur. Ayrıca silik bant görülen PCR örnekleri için aynı şartlar altında PCR ürünü kalıp olarak kullanılarak tekrar PCR yapılmıştır. PCR'da kullanılan karışım, son hacmi 50 µl olacak şekilde 10 µl 10x Buffer, 3.5 µl MgCl₂ (2.5 mM), 20 µl dNTP (0.25 mM), 1+1 µl primer (50 ng/µl), 0.3 µl Taq phusion, 2 µl DNA, 3 µl jelatin, 9.7 µl dH₂O (distile su)'dan oluşmaktadır. Çalışılan bölgeler Tablo 3.6'da yer alan şartlar altında çoğaltılmıştır. PCR (Bio-Rad, Singapur) ile hedef bölgeler adaptörlü primerlerle çoğaltılmıştır.

Tablo 3.6. Çalışılan bölgelerin PCR şartları

Uygulanan İşlem	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	150 sn	1
DNA Denatürasyon	94	60 sn	1
Primerlerin bağlanması	55	50 sn	36
DNA Sentezi	72	540 sn	1
Son Uzatma	72	600 sn	1

Çoğaltma işlemi sonrasında ürünlerin görüntülenmesi amacıyla, agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. PCR ürünlerinden 8 µl alınarak, 2 µl 6X Loading Dye (Thermo-Scientific) ile karıştırılıp jele yüklenmiştir. PCR ürünleri %0.8'lik jelde yürütülmüştür. Bu işlem sonrasında jel, PCR ürünlerinin görüntülenmesi için jel görüntüleme cihazında UV altında görüntüleme yapılmış ve resimler kaydedilmiştir.

3.7.1. PCR Ürünlerinin Temizliği

PCR sonrasında kırık DNA parçalarını ve olası dimerleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla birinci PCR ürünleri temizlendi. Bu işlem AMPure XP Beads kiti (Sigma-Aldrich) protokolü takip edilerek Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (CÜTAM)'den hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi.

Bu temizleme işlemi iki aşamada gerçekleştirildi. Her örneğe 20 µl AMPure XP manyetik boncuk eklenip pipetlenerek DNA'ların boncuklara tutunması sağlandı. İstenilen PCR ürünlerinin manyetik boncuklara tutunması, örneklerin manyetik tabaka üzerine yerleştirildikten sonra, oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Kirliliği önlemek için, manyetik boncuk bağlı örnekler, 200 µl %80'lik etanol ile 2'şer kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra saf PCR ürünü, 50 mikrolitre 10 mM pH 8.5 Tris solüsyonunda saklandı.

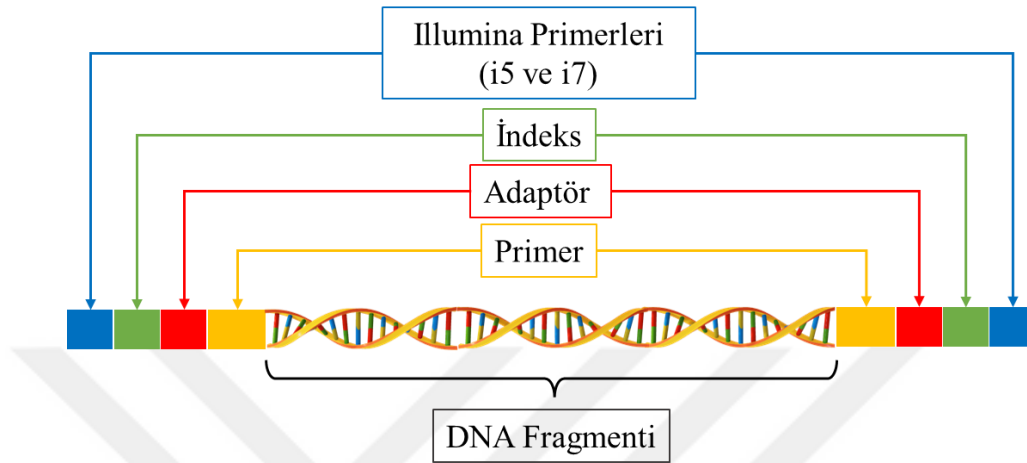
3.7.2. İndeks PCR

Bu aşamada, PCR aşamasında adaptörlü olarak elde edilen ve temizlenen amplikonlar kalıp olarak kullanıldı. Adaptörlü amplikonların akış hücresi (flowcell) üzerinde yer alan oligolara bağlanabilmesi, birden fazla örnekten tek okumada sonuç alınabilmesi ve yeni nesil dizileme okuması esnasında farklı örneklerin ayırt edilebilmesi amacıyla indeks barkod görevi gören özel baz dizileri eklendi. Bir önceki aşamada belirtilen PCR temizleme aşaması tekrarlandı. Daha sonra örnekler manyetik standart ayrılarak üzerlerine 20 µl elüsyon solüsyonu eklendi ve boncuklardan ayrılan DNA'lar ayrı bir tüpte toplandı.

3.8. Kütüphane Hazırlanması

Illumina MiSeq cihazında yüksek kalitede veri elde edebilmek için, cihazdaki akış hücresi üzerinde optimum kümelenmeyi sağlamak gerekmektedir. Bu durum ise akış hücresinin büyüklüğüne, çalışılacak örnek sayısına ve derinliğine göre nihai PCR ürünlerinin yoğunluğunu eşit orana getirmeyi gerektirmektedir. Bu amaçla nihai PCR ürünlerinin konsantrasyonları Qubit 3.0 Florometre kullanılarak CÜTAM'da belirlenmiştir.

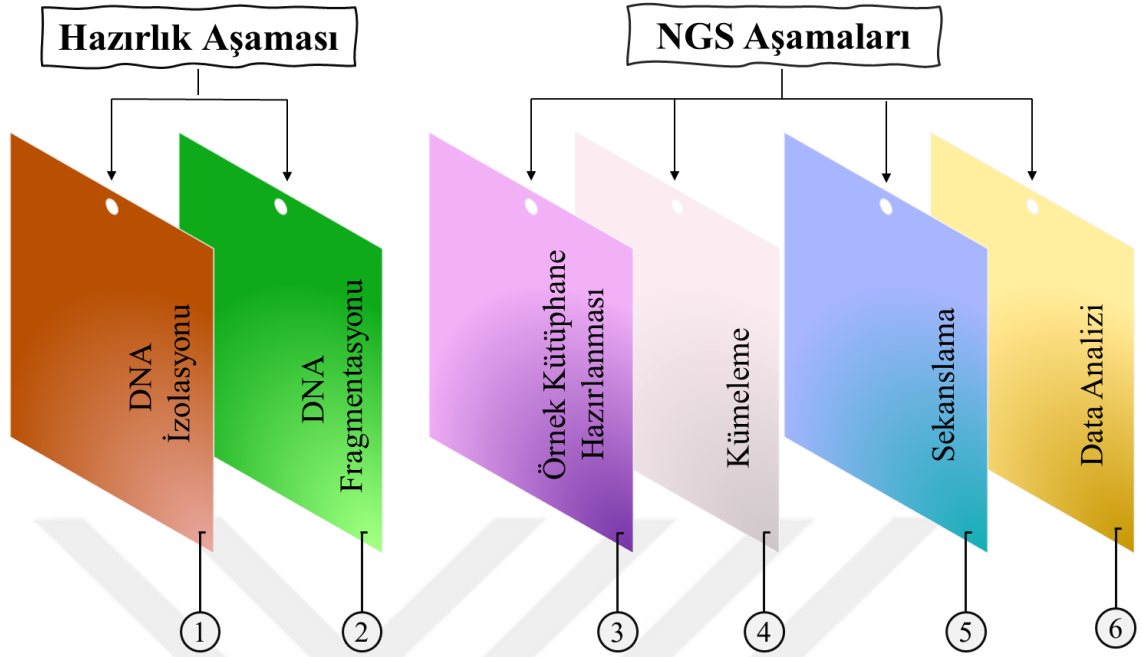
Sonrasında kütüphane oluşturmak için hesaplamalar bu değerler üzerinden yapılmış ve örnekler tek bir havuzda birleştirilmiştir. Tüm aşamalar sonucunda DNA fragmentine takılmış olan kuyruklar aşağıdaki Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Uçlarına adaptör bağlanmış DNA fragmanı

3.9. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

Bal örneklerinden elde edilen DNA’lar, tekrar tekrar ekstrakte edilmiş ve farklı adaptörler kullanılarak çoğaltılmıştır. Oluşturulan kütüphane Illumina (MiSeq) kullanılarak 2×251 bp baz çiftlik paired-end dizileme işlemi ile başlangıçta örnek başına 200 000 okumayla dizilenmiştir. Ancak, Illumina yaklaşımı kullanılarak ITS1 ve ITS2 etiketli dizilerle ilişkilendirilebilen 251 bp uzunluğundaki her bir örneğe ait farklı okuma dizisi bulunmaktadır. Dizileme iş akışının bir parçası olan küme oluşumu için kitaplık, parçaların kitaplık adaptörlerini tamamlayıcı bir yüzeye bağlı oligolar dizisi üzerinde yakaladığı bir akış hücresine yüklenir. Her parça daha sonra köprü amplifikasyonu yoluyla farklı klonal kümeler halinde yükseltilir. Küme oluşturma işlemi tamamlandığında, örnekler dizilemeye hazırdır. Illumina SBS teknolojisi (Sentez ile dizilme), DNA kalıp ipliklerine dahil edildiklerinde tek bazları saptayan, tescilli bir tersine çevrilebilir sonlandırıcı tabanlı yöntemden istifade eder. Dört aşamalı ve tersine çevrilebilir sonlandırıcıya bağlı dNTP’ler her sıralama döngüsünde mevcut olduğundan, doğal rekabet, birleştirme sapmasını en aza indirir ve diğer teknolojilere kıyasla ham hata oranlarını büyük ölçüde azaltır. Sonuç, tekrarlayan dizi bölgeleri ve homopolimerler içinde bile dizi bağlamına özgü hataları neredeyse tamamen ortadan kaldıran son derece doğru, baz baz ilerleyen bir dizilemedir (268). Hazırlık ve NGS aşamaları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. NGS (Illumina) sürecine genel bakış

3.10. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik iş akışı Linux/Unix tabanlı işletim sisteminin terminali ile gerçekleştirilmiştir. MiSeq cihazından “.fastq” formatında çıkan dizilerin kalite kontrolü ve ana istatistikler FastQC ile kontrol edilmiştir. Biyoinformatik analizler için QIIME 2 platformu Linux tabanlı olarak kullanıldı. Adaptörlerin kesilmiş olduğu ham veriler QIIME 2 platformuna tanıtıldı. Kalite filtrelemesi, ileri ve geri yönlü okumaların birleştirilmesi, kimeriklik tespiti ve filtrelemesi ile gürültü azaltma işlemi q2-dada2 ile gerçekleştirilerek Amplicon Sequence Variants (ASVs) elde edildi. Ayrıca tüm istatistiksel analizler, istatistik programı R Studio kullanılarak gerçekleştirildi (269).

3.11. Takson Tespiti

Yerel bir ITS dizileri referans veritabanı, GenBank'ta bulunan tüm ITS dizilerin indirilerek oluşturuldu. Yalnızca Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen özellikle Rize florasında kayıtlı olan taksonları içerecek şekilde filtrelenerek, ayrıca Türkiye'de yerli, yabancı veya bahçe tarımı veya tarım gibi alanlarda bulunan bitkilere de kütüphanede yer verilmiştir.

Bal örneklerinden gelen her dizi, Megablast kullanılarak referans veritabanıyla karşılaştırılmıştır. Her dizi için en güçlü benzerliğe sahip türler saklanmıştır. Eğer birden fazla en iyi sonuç aynı cinsin türlerine aitse, sonuç cinse verilmiştir. En iyi sonuçlar aynı aile içinde birden fazla cinse aitse, aile düzeyinde bir tanımlama yapılmıştır. Birden fazla aileye karşılık gelen diziler ise bilinmeyen olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen verilerin güvenilir olup olmadığını tespit etmek için her bir bal örneğinde kalite skorları hesaplanmıştır. Kalite değeri, bir DNA dizindeki baz okumaların güvenilirliğini veya hata olma olasılığını tanımlamak için kullanılır. Bu iki değer ters ilişkilidir ve toplamı 1 olmalıdır. Illumina okumaları genellikle baz başına maximum %99,99 güven veya 1/10.000 hata olasılığı belirlemektedir. Kalite değerlerin güven aralıkları Tablo 3.7’de verilmiştir. Phred Kalite Skoru (Q) “Eşitlik 2” şu şekilde hesaplanır:

$$Q = -10 \log_{10}(P) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Burada:

- P = Hata olasılığı
- Q = Phred kalite skoru

Tablo 3.7. Phred kalite skorları ve bir DNA diziliminde baz okumalarının hatalı olma olasılıkları Zymo’dan, (270)

Phred Kalite Skoru	Baz diziliminin hata olasılığı	Doğru olma olasılığı (%)
Q10	1/10	%90
Q20	1/100	%99
Q30	1/1000	%99.90
Q40	1/10 000	%99.99

Örneğin, Phred kalite skorunu Q30 olduğunu varsayarsak, ilgili dizideki baz diziliminin güvenilirliğinin %99.9, yani hata olasılığının 1/1000 olduğunu anlayabiliriz.

3.12. Melissopalinojoloji ve NGS Karşılaştırılması

Mikroskopi ve DNA tabanlı yöntemler, balın polen içeriğini karakterize etmek için etkili yöntemlerdir. Melissopalinojoloji ve Illumina sonuçları arasında bazı parametreler dikkate alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Her teknikle elde edilen sonuçlar arasında benzerlik ve farklılıklar çeşitli yöntemlerle ortaya konulmuştur.

İki değişken arasındaki lineer ilişkinin gücünü ve yönünü belirlemek için korelasyon analizi kullanılmaktadır. İlk önce korelasyon analizi için ya Pearson ya da Spearman korelasyonu uygulanmasına karar verilmiştir. Verilerimiz normal dağılım olmadığına karar verildikten sonra parametrik olmayan bir korelasyon yöntemi Spearman tercih edilmiştir. Spearman korelasyonu, parametrik varsayımları gerektirmediği için parametrik olmayan durumlar için uygundur. Bu, özellikle veri normal dağılım göstermediğinde veya parametrik korelasyon için diğer varsayımlar karşılanmadığında yararlıdır. Spearman korelasyonunda veriler sıralı olmalı, iki değişken arasında monotonik bir ilişki olmalıdır. Bu, bir değişkenin artmasıyla diğer değişkenin de düzenli olarak artması veya azalması anlamına gelir. İlişki doğrusal olmak zorunda değildir, ancak monotonik olmalıdır. Veri setindeki gözlemler birbirinden bağımsız olmalıdır.

NGS (Illumina) verilerinden yola çıkarak farklı polen türlerinin sıralama bolluğunu çıkarma yeteneğini test etmek için, eşleştirilmiş okuma hizalamalarının sayısı ile her bitki ailesine düşen polen tanesi sayısı arasındaki ilişkiyi, ayrıca her bir lokus için ayrı ayrı ITS1 ve ITS2 verilerin ortalaması için, Spearman sıralama tabanlı korelasyonunu gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bal örneklerdeki bulunan bitki pollenlerin çeşitliliğini, zenginliğini ve benzerliğini ölçmek için Shannon-Weiner çeşitlilik indeksini “Eşitlik 3” ve türler arasındaki eşitliği ölçmek için Pielou's eşitliğini “Eşitlik 4” kullanılmaktadır (273). Ayrıca Shannon çeşitlilik indeksinin mutlak bir üst sınırı yoktur çünkü hem tür sayısına hem de türlerin dağılımının dengeli olmasına bağlıdır. Ancak, belirli bir tür sayısı S için H maksimum değeri, tüm türlerin eşit bollukta olduğu durumlarda gerçekleşir.

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln (P_i) \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Burada:

- H' = Shannon indeksi
- S = Toplam tür sayısı
- P_i = i numaralı türün tüm türler içindeki oranı
- $\ln$ = doğal logaritma işlemi

$$J' = \frac{H'}{H_{\max}} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Burada:

- J' = Pielou Evenness İndeksi
- H' = Shannon indeksi
- $H_{\max} = \ln(S)$ = Maksimum eşitlik koşulları altında tür çeşitliliği

Pielou Evenness komünite içerisinde bulunan türlerin nispi yoğunluğudur. Evenness derecesi yüksek olan komünitede çeşitlilik daha fazladır. Bu iki indeks değeri birbirini destekler nitelikte sonuçlar vermektedir. Pielou'nun düzgünlük (homojenlik) indeksi ise sayısal olarak eşitliği temsil eder. Eğer J değeri tüm taksonlar eşit sayıda temsil edilirse, bu indeks maksimum değere sahip olur (1'e yaklaşır) (272).

Bal örneklerinde tespit edilen aileler için metabarkodlama ve mikroskopi analizine göre, hangi ailelerin dominant olarak temsil edildiğini veya temsil edilmediğini belirlemek için R katsayılarını hesaplanmıştır. R katsayısı balın kaynağını doğrulamada kullanılır (273). R katsayısı, belirli bir takson için, metabarkodlama ile göreceli bolluk okuma sayısının yüzdeleri ile mikroskopi ile çıkarılan göreceli bolluğun yüzdelere bölümüdür.

$$R = \frac{I}{M} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Burada:

- I = Illumina'da tanımlanan okuma sayılarının yüzdesi
- M = Mikroskopi'deki polen tanelerinin yüzdesi

4. BULGULAR

Anzer (Ballıköy)'in farklı mahallerinde üretilen üç farklı balın melissopalınolojik ve yeni nesil sekanslama yöntemleriyle incelemesi sonucu elde edilen veriler ile bal üretiminin yapıldığı alanlardan tez kapsamında toplanıp teşhis edilen bitkilere ait palinolojik veriler aşağıdaki ana başlıklar altında toplanmıştır.

4.1. Floristik Veriler

Tez kapsamında yapılan arazi çalışmaları sonucu Anzer (Ballıköy)'in 10 farklı mahallesinde (Ballıköy, Gudurlu, Hamurlu, Hındrakol, Karagözlü, Köseli, Kurdoğlu, Kuturlu, Sarmanlı, Zaneli) yayılış gösteren 285 bitki örneği toplanmıştır. Toplanan bu örneklerin ilgili kaynaklardan yararlanarak yapılan teşhisleri 48 aileye ve 216 taksona ait olduklarını göstermiştir. Bu taksonların familyalara göre dağılımları (harf sırasına göre) Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Teşhis edilen taksonların familyalara göre dağılımı. * Bitkilere ait toplama bilgileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Familya	Tür Adı	Örnek No *
Adoxaceae	<i>Viburnum lantana</i> L.	ZT51, ZT279
Amaryllidaceae	<i>Allium djimilense</i> Boiss. ex Regel	ZT204
Apiaceae	<i>Astrantia maxima</i> subsp. <i>maxima</i> Pall	ZT210
Apiaceae	<i>Bunium microcarpum</i> (Boiss.) Freyn & Bornm. ex Freyn	ZT111
Apiaceae	<i>Chaerophyllum angelicifolium</i> M.Bieb.	ZT66
Apiaceae	<i>Eryngium giganteum</i> M.Bieb.	ZT177, ZT285
Apiaceae	<i>Heracleum apiifolium</i> Boiss.	ZT262
Apiaceae	<i>Heracleum platytaenium</i> Boiss.	ZT81
Apiaceae	<i>Pimpinella corymbosa</i> Boiss.	ZT195
Apiaceae	<i>Pimpinella rhodantha</i> Boiss.	ZT189
Apocynaceae	<i>Vincetoxicum scandens</i> Sommier & Levier	ZT83
Asparagaceae	<i>Muscari neglectum</i> Guss. ex Ten.	ZT8
Asparagaceae	<i>Ornithogalum oligophyllum</i> E.D.Clarke	ZT11, ZT120
Asparagaceae	<i>Scilla bifolia</i> L.	ZT31
Asteraceae	<i>Achillea latiloba</i> Ledeb. ex. Nordm.	ZT117
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L.	ZT147

Tablo 4.1. (Devam)

Asteraceae	<i>Antennaria dioica</i> (L.) Gaertn.	ZT167
Astreceae	<i>Archanthemis marschalliana</i> (Willd.) Lo Presti & Oberpr. (<i>Anthemis marschalliana</i> Willd.)	ZT97, ZT143
Asteraceae	<i>Aster alpinus</i> L.	ZT267
Astreceae	<i>Carduus adpressus</i> C.A.Mey.	ZT109, ZT156
Asteraceae	<i>Caucasalia macrophylla</i> (M.Bieb.) B.Nord. (<i>Senecio platyphyllus</i> DC.)	ZT241
Asteraceae	<i>Centaurea helenioides</i> Boiss.	ZT258
Asteraceae	<i>Centaurea macrocephala</i> Puschk. ex Willd.	ZT163
Asteraceae	<i>Cirsium echinus</i> (M.Bieb.) Hand.-Mazz.	ZT165
Asteraceae	<i>Cirsium pseudopersonata</i> subsp. <i>pseudopersonata</i> Boiss. & Balansa ex Boiss.	ZT151
Asteraceae	<i>Cirsium simplex</i> subsp. <i>armenum</i> (DC.) Petr.	ZT263
Asteraceae	<i>Cota melanoloma</i> (Trautv.) Holub (<i>Anthemis melanoloma</i> Trautv.)	ZT221
Asteraceae	<i>Crepis bupleurifolia</i> (Boiss.) Freyn & Sint.	ZT192
Asteraceae	<i>Crepis conyzifolia</i> subsp. <i>dshimilensis</i> (K.Koch) Lamond	ZT145, ZT254
Asteraceae	<i>Cyanus nigrifimbrius</i> (K.Koch) Soják	ZT232, ZT266
Asteraceae	<i>Doronicum macrolepis</i> Freyn & Sint.	ZT153, ZT237
Asteraceae	<i>Erigeron caucasicus</i> Steven	ZT212, ZT229
Asteraceae	<i>Helichrysum pallasii</i> (Spreng.) Ledeb.	ZT209
Asteraceae	<i>Hieracium medianiforme</i> (Litv. & Zahn) Üksip	ZT159
Asteraceae	<i>Hieracium prenanthoides</i> Vill.	ZT213
Asteraceae	<i>Inula orientalis</i> Lam.	ZT95
Asteraceae	<i>Kemulariella colchica</i> (Albov.) Tamamsch. (<i>Aster colchicus</i> Albov.)	ZT113
Asteraceae	<i>Lactuca racemosa</i> Willd. (<i>Cicerbita racemosa</i> (Willd.) Beauverd)	ZT71, ZT158
Astreceae	<i>Lapsana communis</i> subsp. <i>intermedia</i> (M.Bieb.) Hayek	ZT108
Asteraceae	<i>Petasites albus</i> (L.) P.Gaertn.	ZT27
Asteraceae	<i>Pilosella caespitosa</i> (Dumort.) P.D.Sell & C.West	ZT149
Asteraceae	<i>Pilosella hoppeana</i> subsp. <i>testimonialis</i> (Naegli ex Peter) P.D.Sell & C.West (<i>Pilosella hoppeana</i> (Schultes) C. H. Et F. W. Schultz subsp. <i>pilisquama</i> (NP.) Sell Et West)	ZT205
Asteraceae	<i>Psephellus appendicigerus</i> (K.Koch) Wagenitz (<i>Centaurea appendicigera</i> K. Koch.)	ZT265
Astreceae	<i>Psephellus pulcherrimus</i> (Willd.) Wagenitz	ZT47, ZT114
Asteraceae	<i>Scorzonera cana</i> var. <i>jacquiniana</i> (W.Koch) D.F.Chamb.	ZT141

Tablo 4.1. (Devam)

Asteraceae	<i>Scorzonera cana</i> var. <i>radicosa</i> (Boiss.) D.F.Chamb.	ZT45
Asteraceae	<i>Scorzonera laciniata</i> subsp. <i>laciniata</i> L.	ZT99
Asteraceae	<i>Senecio pseudo-orientalis</i> Schischk.	ZT116
Asteraceae	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>alpestris</i> (Waldst. & Kit.) Gaudin	ZT140, ZT211, ZT224, ZT256
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch.Bip.	ZT194
Asteraceae	<i>Taraxacum serotinum</i> (Waldst. & Kit.) Poir.	ZT13
Asteraceae	<i>Telekia speciosa</i> (Schreb.) Baumg.	ZT196
Asteraceae	<i>Tragopogon dshimilensis</i> K.Koch	ZT34
Asteraceae	<i>Tripleurospermum monticolum</i> (Boiss. & A.Huet) Bomm	ZT35
Asteraceae	<i>Tripleurospermum transcaucasicum</i> (Manden.) Pobed.	ZT62
Asteraceae	<i>Turanecio pandurifolius</i> (K.Koch) Hamzaoğlu (<i>Senecio pandurifolius</i> K. Koch)	ZT1, ZT162
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i> L.	ZT84
Boraginaceae	<i>Buglossoides arvensis</i> (L.) I. M. Johnst	ZT29
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i> L.	ZT79, ZT286
Boraginaceae	<i>Huynhia pulchra</i> (Roem. & Schult.) Greuter & Burdet (<i>Arnebia pulchra</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Edm.)	ZT23
Boraginaceae	<i>Nonea versicolor</i> (Steven) Sweet	ZT73
Boraginaceae	<i>Onosma taurica</i> Willd. (<i>Onosma tauricum</i> Pallas Ex Willd.)	ZT49
Boraginaceae	<i>Symphytum asperum</i> Lepech.	ZT2
Brassicaceae	<i>Arabis hirsuta</i> (L.) Scop.	ZT38
Brassicaceae	<i>Bunias orientalis</i> L.	ZT60, ZT131
Brassicaceae	<i>Cardamine raphanifolia</i> Pourr.	ZT25
Brassicaceae	<i>Draba sibirica</i> (Pall.) Thellung	ZT28
Brassicaceae	<i>Erysimum kotschyanum</i> J.Gay	ZT17
Brassicaceae	<i>Erysimum pulchellum</i> (Willd.) J.Gay	ZT39
Brassicaceae	<i>Hesperis bicuspidata</i> (Willd.) Poir.	ZT18
Campanulaceae	<i>Asyneuma amplexicaule</i> (Willd.) Hand.-Mazz.	ZT226
Campanulaceae	<i>Campanula alliariifolia</i> Willd.	ZT137
Campanulaceae	<i>Campanula aucheri</i> A.DC.	ZT90
Campanulaceae	<i>Campanula glomerata</i> L.	ZT138
Campanulaceae	<i>Campanula lactiflora</i> M.Bieb.	ZT172, ZT188

Tablo 4.1. (Devam)

Campanulaceae	<i>Campanula olympica</i> Boiss.	ZT129
Campanulaceae	<i>Jasione montana</i> L.	ZT166
Campanulaceae	<i>Jasione supina</i> Sieber ex Spreng.	ZT247
Caprifoliaceae	<i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov	ZT157, ZT185, ZT246
Caprifoliaceae	<i>Knautia involucrata</i> Sommier & Levier	ZT80, ZT144, ZT220
Caprifoliaceae	<i>Lonicera caucasica</i> Pall.	ZT130
Caprifoliaceae	<i>Scabiosa caucasica</i> M.Bieb.	ZT154, ZT231
Caprifoliaceae	<i>Scabiosa columbaria</i> L.	ZT178, ZT191
Caprifoliaceae	<i>Valeriana alliariifolia</i> Adams	ZT190
Caryophyllaceae	<i>Cerastium armeniacum</i> Gren.	ZT37
Caryophyllaceae	<i>Dianthus carmelitarum</i> Reut. ex Boiss.	ZT132
Caryophyllaceae	<i>Gypsophila silenoides</i> Rupr.	ZT245
Caryophyllaceae	<i>Holosteum umbellatum</i> L.	ZT93
Caryophyllaceae	<i>Minuartia aizoides</i> (Boiss.) Bornm.	ZT7, ZT227
Caryophyllaceae	<i>Minuartia verna</i> (L.) Hiern	ZT41
Caryophyllaceae	<i>Moehringia trinervia</i> (L.) Clairv.	ZT160
Caryophyllaceae	<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	ZT118
Caryophyllaceae	<i>Silene compacta</i> Fisch. ex Hornem.	ZT133, ZT193
Caryophyllaceae	<i>Silene saxatilis</i> Sims	ZT103
Caryophyllaceae	<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke var. <i>vulgaris</i>	ZT64
Celastraceae	<i>Parnassia palustris</i> L.	ZT207, ZT216
Cistaceae	<i>Helianthemum nummularium</i> (L.) Mill.	ZT253
Colchicaceae	<i>Colchicum speciosum</i> Steven	ZT197
Convolvulaceae	<i>Calystegia sepium</i> (L.) R.Br.	ZT184
Cyperaceae	<i>Carex brevicollis</i> DC.	ZT9
Crassulaceae	<i>Phedimus spurius</i> (M.Bieb.) t Hart (<i>Sedum spurium</i> M.Bieb.)	ZT176, ZT230
Crassulaceae	<i>Prometheum pilosum</i> (M.Bieb.) H.Ohba (<i>Sedum pilosum</i> M.Bieb.)	ZT104
Crassulaceae	<i>Sedum pallidum</i> M.Bieb.	ZT128
Cyperaceae	<i>Carex caucasica</i> Steven	ZT152
Ericaceae	<i>Rhododendron caucasicum</i> Pall.	ZT85, ZT218, ZT261
Ericaceae	<i>Rhododendron luteum</i> Sweet	ZT33
Ericaceae	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	ZT44

Tablo 4.1. (Devam)

Euphorbiaceae	<i>Euphorbia herniariifolia</i> var. <i>glaberrima</i> Halácsy	ZT10
Fabaceae	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	ZT70, ZT288
Fabaceae	<i>Anthyllis vulneraria</i> subsp. <i>boissieri</i> (Sagorski) Bornm.	ZT150
Fabaceae	<i>Astragalus fricki</i> Bunge	ZT19
Fabaceae	<i>Astragalus shelkovnikovi</i> Grossh.	ZT92
Fabaceae	<i>Genista albida</i> Willd.	ZT284
Fabaceae	<i>Hedysarum hedysaroides</i> (L.) Schinz & Thell.	ZT264
Fabaceae	<i>Lathyrus roseus</i> Steven	ZT282
Fabaceae	<i>Lathyrus rotundifolius</i> Willd.	ZT59
Fabaceae	<i>Lathyrus tukhtensis</i> Czechtz	ZT68
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>alpinus</i> Ser.	ZT236
Fabaceae	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Desr.	ZT283
Fabaceae	<i>Onobrychis altissima</i> Grossh.	ZT273
Fabaceae	<i>Onobrychis lasistanica</i> Širj.	ZT69
Fabaceae	<i>Oxytropis lazica</i> Boiss.	ZT91
Fabaceae	<i>Securigera libanotica</i> (Boiss.) Lassen	ZT271
Fabaceae	<i>Securigera orientalis</i> (Mill.) Lassen subsp. <i>orientalis</i> (<i>Coronilla orientalis</i> Mill.)	ZT42, ZT259
Fabaceae	<i>Securigera varia</i> (L.) Lassen (<i>Coronilla varia</i> L.)	ZT170, ZT242, ZT287
Fabaceae	<i>Trifolium ambiguum</i> M.Bieb.	ZT56, ZT275
Fabaceae	<i>Trifolium canescens</i> Willd.	ZT67, ZT244
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i> L.	ZT248
Fabaceae	<i>Trifolium spadiceum</i> L.	ZT110
Fabaceae	<i>Vicia balansae</i> Boiss.	ZT54
Fabaceae	<i>Vicia cracca</i> subsp. <i>cracca</i> L.	ZT187
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> Mill.	ZT135
Gentianaceae	<i>Gentiana cruciata</i> L.	ZT202, ZT217
Gentianaceae	<i>Gentiana verna</i> L.	ZT15
Gentianaceae	<i>Gentianella caucasea</i> (Lodd. ex Sims) Holub	ZT201, ZT225
Gentianaceae	<i>Swertia iberica</i> Fisch. ex C.A.Mey	ZT203, ZT215
Geraniaceae	<i>Geranium sylvaticum</i> L.	ZT53

Tablo 4.1. (Devam)

Geraniaceae	<i>Geranium collinum</i> Stephan ex Willd.	ZT127
Geraniaceae	<i>Geranium ibericum</i> subsp. <i>jubatum</i> (Hand.-Mazz.) P.H.Davis	ZT77
Geraniaceae	<i>Geranium ponticum</i> (P.H.Davis & J.Roberts) Aedo (<i>Geranium cinereum</i> Cav. subsp. <i>subcaulescens</i> (L'Herit. Ex Dc.) Hayek var. <i>ponticum</i> Davis Et Roberts)	ZT87
Geraniaceae	<i>Geranium pyrenaicum</i> Burm.f.	ZT63, ZT125
Hypericaceae	<i>Hypericum linarioides</i> Bosse	ZT100
Hypericaceae	<i>Hypericum perforatum</i> L.	ZT134
Hypericaceae	<i>Hypericum venustum</i> Fenzl	ZT206, ZT240
Iridaceae	<i>Crocus scharojanii</i> Rupr.	ZT199, ZT233
Iridaceae	<i>Crocus vallicola</i> Herb.	ZT198
Lamiaceae	<i>Ajuga orientalis</i> L.	ZT270
Lamiaceae	<i>Lamium album</i> L.	ZT36, ZT75
Lamiaceae	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	ZT180, ZT239
Lamiaceae	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>albiflora</i> (Boiss.) Gams	ZT223
Lamiaceae	<i>Nepeta racemosa</i> Lam.	ZT222
Lamiaceae	<i>Prunella vulgaris</i> L.	ZT112, ZT234, ZT274
Lamiaceae	<i>Salvia verticillata</i> L.	ZT181, ZT249
Lamiaceae	<i>Stachys annua</i> subsp. <i>annua</i> (L.) L.	ZT72, ZT122
Lamiaceae	<i>Stachys macrantha</i> (K.Koch) Stearn	ZT48, ZT96, ZT269
Lamiaceae	<i>Stachys officinalis</i> (L.) Trevis.	ZT146
Lamiaceae	<i>Stachys sylvatica</i> L.	ZT164
Lamiaceae	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	ZT182
Lamiaceae	<i>Thymus praecox</i> Opiz	ZT40, ZT105, ZT171
Liliaceae	<i>Fritillaria latifolia</i> Willd.	ZT14
Liliaceae	<i>Lilium ponticum</i> K. Koch. (<i>Lilium carniolicum</i> subsp. <i>ponticum</i> (K. Koch.) P. H. Davis & D. M. Hend.)	ZT98
Linaceae	<i>Linum hypericifolium</i> Salisb.	ZT173
Melanthiaceae	<i>Veratrum album</i> L.	ZT250
Onagraceae	<i>Epilobium angustifolium</i> L.	ZT179
Orchidaceae	<i>Dactylorhiza euxina</i> (Nevski) H. Baumann & Künkele subsp. <i>euxina</i> var. <i>markowitschii</i> (Soó) Renz & Taubenheim	ZT24, ZT88
Orchidaceae	<i>Dactylorhiza urvilleana</i> (Steudel) Baumann & Künkele	ZT115, ZT168

Tablo 4.1. (Devam)

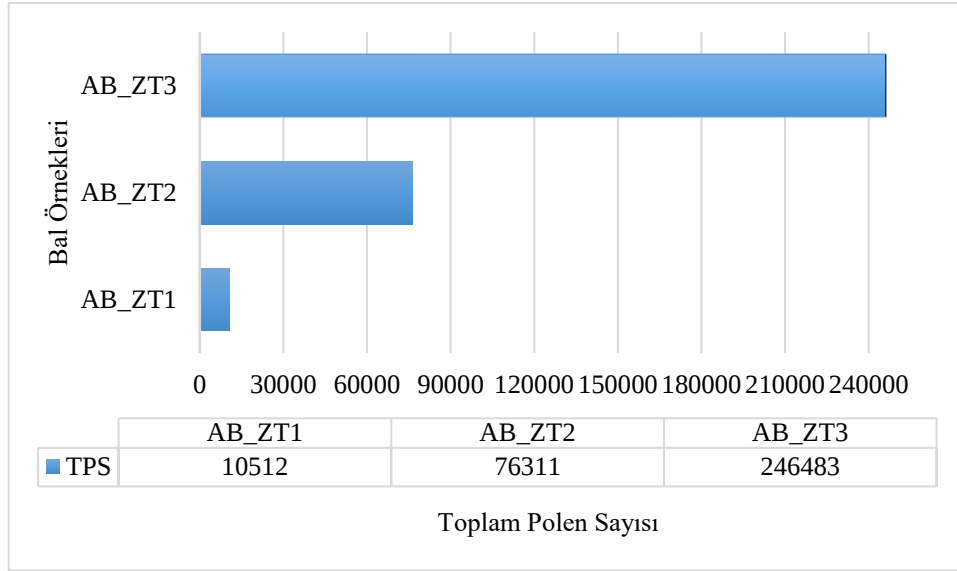
Orchidaceae	<i>Traunsteinera sphaerica</i> (M.Bieb.) Schltr.	ZT106
Orobanchaceae	<i>Euphrasia minima</i> subsp. <i>davisii</i> Yeo	ZT214
Orobanchaceae	<i>Euphrasia petiolaris</i> Wettst.	ZT200
Orobanchaceae	<i>Pedicularis comosa</i> var. <i>sibthorpii</i> (Boiss.) Boiss.	ZT76
Orobanchaceae	<i>Pedicularis pontica</i> Boiss.	ZT89
Orobanchaceae	<i>Rhinanthus angustifolius</i> C.C.Gmel	ZT78
Orobanchaceae	<i>Rhynchosyris orientalis</i> (L.) Benth.	ZT252
Papaveraceae	<i>Corydalis alpestris</i> C.A.Mey.	ZT12
Papaveraceae	<i>Fumaria schleicheri</i> Soy.-Will.	ZT123
Papaveraceae	<i>Papaver lateritium</i> K.Koch	ZT74, ZT272
Plantaginaceae	<i>Digitalis ferruginea</i> L.	ZT235
Plantaginaceae	<i>Linaria genistifolia</i> (L.) Mill.	ZT208
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	ZT243
Plantaginaceae	<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.	ZT46
Plantaginaceae	<i>Veronica balansae</i> Stroh	ZT5
Plantaginaceae	<i>Veronica gentianoides</i> Vahl	ZT4
Polygonaceae	<i>Polygonum alpinum</i> All.	ZT50, ZT228, ZT260
Polygonaceae	<i>Polygonum bistorta</i> subsp. <i>carneum</i> (K.Koch) Coode & Cullen	ZT52, ZT219
Polygonaceae	<i>Rumex acetosella</i> L.	ZT148
Polygonaceae	<i>Rumex alpinus</i> L.	ZT61, ZT94
Primulaceae	<i>Primula auriculata</i> Lam.,Tabl.	ZT26
Primulaceae	<i>Primula veris</i> subsp. <i>columnae</i> (Ten.) Lüdi, Hegi	ZT3, ZT30
Ranunculaceae	<i>Anemone narcissiflora</i> L.	ZT22
Ranunculaceae	<i>Caltha palustris</i> L.	ZT21
Ranunculaceae	<i>Delphinium formosum</i> Boiss. & A.Huet	ZT183, ZT238, ZT255
Ranunculaceae	<i>Ranunculus constantinopolitanus</i> (DC.) d'Urv.	ZT55
Ranunculaceae	<i>Thalictrum minus</i> var. <i>minus</i> L.	ZT107, ZT155
Ranunculaceae	<i>Trollius ranunculinus</i> (Sm.) Stearn	ZT58
Rosaceae	<i>Alchemilla sericata</i> Rchb.	ZT57
Rosaceae	<i>Geum aleppicum</i> Jacq.	ZT281
Rosaceae	<i>Geum coccineum</i> Sibth. & Sm.	ZT86
Rosaceae	<i>Potentilla crantzii</i> (Crantz) Fritsch	ZT6

Tablo 4.1. (Devam)

Rosaceae	<i>Prunus divaricata</i> Ledeb.	ZT20
Rosaceae	<i>Prunus domestica</i> L.	ZT276, ZT280
Rosaceae	<i>Rosa boissieri</i> Crép. (<i>Rosa montana</i> subsp. <i>woronowii</i> (Lonacz) O. Nilsson)	ZT142
Rosaceae	<i>Rosa canina</i> L.	ZT102
Rosaceae	<i>Rubus idaeus</i> L.	ZT101, ZT277
Rubiaceae	<i>Galium verum</i> L.	ZT139, ZT175, ZT186, ZT251
Salicaceae	<i>Salix cinerea</i> L.	ZT268
Sapindaceae	<i>Acer cappadocicum</i> subsp. <i>cappadocicum</i> Gleditsch	ZT278
Sapindaceae	<i>Acer platanoides</i> L.	ZT257
Saxifragaceae	<i>Saxifraga rotundifolia</i> L.	ZT119, ZT126
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia nodosa</i> L.	ZT121
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia scopolii</i> Hoppe ex Pers.	ZT65
Scrophulariaceae	<i>Verbascum oreophilum</i> K.Koch	ZT169
Scrophulariaceae	<i>Verbascum songaricum</i> Schrenk ex Fisch.	ZT174
Solanaeae	<i>Atropa belladonna</i> L.	ZT136
Thymelaeaceae	<i>Daphne glomerata</i> Lam.	ZT43
Violaceae	<i>Viola altaica</i> Ker.-Gawl.	ZT16
Violaceae	<i>Viola odorata</i> L.	ZT32

4.2. Melissopalinojik Veriler

Bu başlık altında tez kapsamında incelenen balların toplam polen sayıları ile polenlerin taksonlara göre dağılımları hakkında bilgilere yer verilmiştir. Tez kapsamında incelenen AB_ZT1 balında 10 512, AB_ZT2 balında 76 311 ve AB_ZT3 balında ise 246 483 adet polen sayılmıştır (Şekil 4.1). Buna göre incelenen üç bal örneğinden en yüksek polen tanesi sayısı, AB_ZT3 de kaydedilmiştir. TPS10 değeri dikkate alındığında incelenen ballardan AB_ZT1 düşük, AB_ZT2 normal, AB_ZT3 örneğinin zengin grupta yer aldığı belirlenmiştir. Bununla beraber incelenen bal örneklerinde en düşük TPS10 değeri 10 512 (AB_ZT1), en yüksek TPS10 değeri 246 483 (AB_ZT3) ve ortalama TPS10 değeri ise 111 102 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. İncelenen bal örneklerine ait toplam polen sayısı

İncelenen üç bal örneği üzerinde gerçekleştirilen klasik melissopalinojistik analizler sonucu farklı taksonomik düzeylere ait ortalama 130 çiçekli bitki taksonu poleni tanımlanmıştır. Polen tanelerinin çoğunluğu (%94-100) tür, cins veya familya düzeyinde karakterize edilmiştir (Tablo 4.2). Bal örneklerinde tanımlanan farklı takson sayısı 14 ile 29 arasında değişmektedir.

Mikroskopik analizde, tek bir polen tanesi tarafından temsil edilen taksonlar her üç bal örneklerinde tespit edilmiştir. Mikroskop analizi sırasında tek polen tanelerinin düzenli olarak ortaya çıkması genellikle yüksek çeşitlilik düzeylerinden kaynaklanabilmektedir. Sonuçlara göre, AB_ZT2 örneğinde takson çeşitliliğinin %31'i tekil polen taksonlar temsil etmektedir.

Tablo 4.2. Melissopalinojistik analiz sonuçları

Bal örneği no	Tanımlanan toplam polen sayısı		Tanımlanamayan toplam polen sayısı		Taksonlara göre dağılımı					
	Sayı	%	Sayı	%	Familya	%	Cins	%	Tekil	%
AB_ZT1	129	94.2	8	5.8	11	73.3	8	53.3	1	7
AB_ZT2	132	100.0	0	0	19	65.5	20	69.0	9	31.0
AB_ZT3	127	99.2	1	0.8	11	78.6	8	57.1	5	6

Mikroskopik gözlemler sonucu üç bal örneğinde 20 bitki familyasına ait toplam 34 bitki taksonu kaydedilmiştir (Tablo 4.3). Üç balda ortak olan familyalar Asteraceae, Apiaceae, Fabaceae, Cistaceae olmuştur. Bal örneklerinden AB_ZT1’de en çok bulunan familya Asteraceae (%35.6) iken, AB_ZT2 ve AB_ZT3 örneklerinde ise Fabaceae ailesi öne çıkmıştır. Tüm bal örneklerinde cins düzeyinde *Astragalus*, *Helianthemum* ve *Onobrychis* ortak bulunan taksonlar olarak tespit edilmiştir. AB_ZT1 örneğinde cins düzeyinde *Campanula* bol bulunurken, AB_ZT2 ve AB_ZT3 örneklerinde *Trifolium* bol miktarda bulunmuştur. *Trifolium*, AB_ZT3 preparat örneğinde, %74’inde kaydedilmiştir.

İncelenen balların taksonlara göre polen spektrumları Tablo 4.3’te verilmiştir. Balda poleni tespit edilen taksonlardan dominant ($\geq$ %45) olanlar kırmızı, sekonder (%16 – 44) olanlar yeşil, minör (%3-15) olanlar sarı ve eser (< %3) miktarda olanlar ise açık sarı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Tez kapsamında incelenen bal örneklerinin melissopalinojik analiz spektrumu. Dominant (kırmızı), sekonder (yeşil), minör (koyu sarı), eser (açık sarı)

Familya	Takson	AB_ZT1		AB_ZT2		AB_ZT3	
		Polen sayısı	Polen spektrum (%)	Polen sayısı	Polen spektrum (%)	Polen sayısı	Polen spektrum (%)
Apiaceae	Apiaceae	32	24.8	27	20.5	2	1,6
Asteraceae	Asteraceae	43	33.3	7	5.3	2	1.6
Asteraceae	<i>Artemisia</i>	3	2.3				
Asteraceae	<i>Centaurea</i>			5	3.8		
Asteraceae	<i>Helianthus</i>			1	0.8		
Asteraceae	<i>Taraxacum</i>			3	2.3		
Boraginaceae	<i>Echium</i>			2	1.5		
Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	2	1.6				
Brassicaceae	Brassicaceae	5	3.9	22	16.7		
Campanulaceae	<i>Campanula</i>	12	9.3	2	1.5		
Caryophyllaceae	Caryophyllaceae	4	3.1			1	0.8
Caryophyllaceae	<i>Dianthus</i>			2	1.5		
Cistaceae	<i>Cistus</i>			3	2.3		
Cistaceae	<i>Helianthemum</i>	4	3.1	3	2.3	6	4.7
Chenopodiaceae	Chenopodiaceae			1	0.8		
Ericaceae	<i>Rhododendron</i>			3	2.3		
Fabaceae	Fabaceae	3	2.3	5	3.8		
Fabaceae	<i>Astragalus</i>	5	3.9	1	0.8	3	2.4
Fabaceae	<i>Hedysarum</i>	6	4.7	3	2.3		
Fabaceae	<i>Onobrychis</i>	3	2.3	6	4.5	1	0.8

Tablo 4.3. (Devam)

Fabaceae	<i>Trifolium</i>			11	8.3	94	74.0
Fabaceae	<i>Vicia</i>			4	3.0		
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	1	0.8	1	0.8		
Geraniaceae	<i>Geranium</i>			1	0.8		
Lamiaceae	Lamiaceae			4	3.0	1	0.8
Lamiaceae	<i>Salvia</i>	3	2.3				
Onagraceae	<i>Epilobium</i>			1	0.8		
Papaveraceae	<i>Papaver</i>			1	0.8	1	0.8
Plantaginaceae	<i>Plantago</i>			3	2.3	6	4.7
Poaceae	Poaceae					1	0.8
Polygonaceae	<i>Rumex</i>			1	0.8	2	1.6
Ranunculaceae	Ranunculaceae			2	1.5		
Rosaceae	Rosaceae	3	2.3	6	4.5	4	3.1
Rosaceae	<i>Potentilla</i>			1	0.8	3	2.4
Tanımlanan toplam polen sayısı		129		132		127	

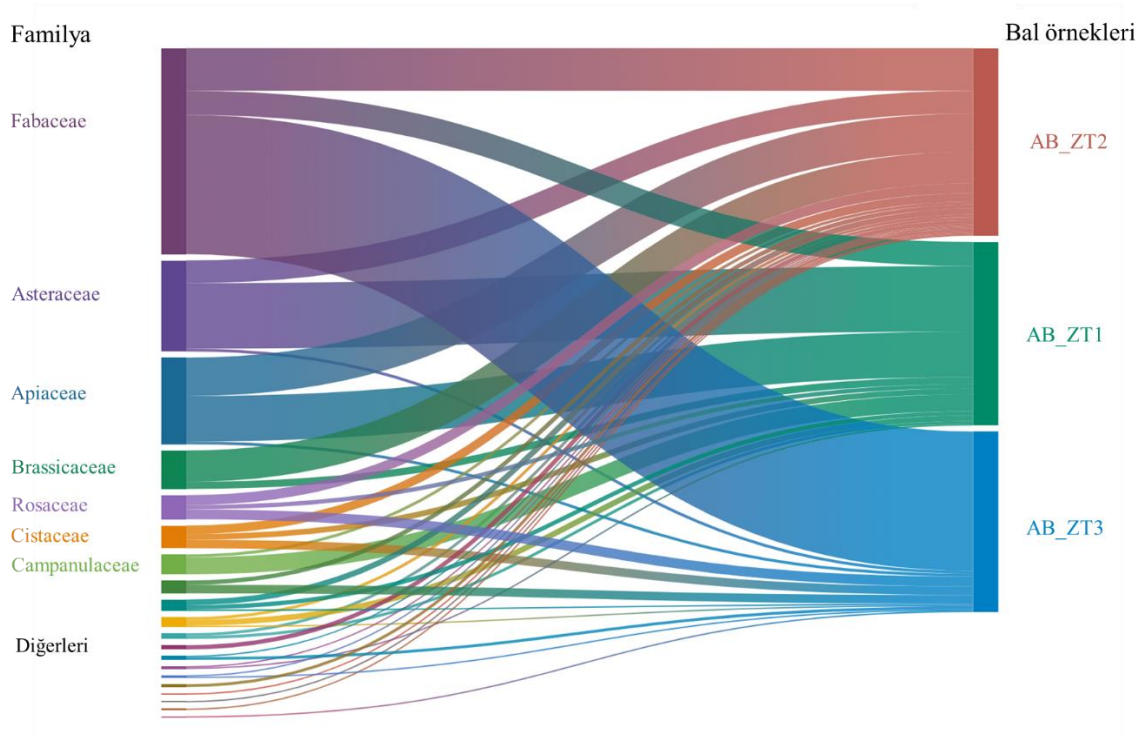
AB_ZT1 balından hazırlanan preparat örneğinde 11 familyaya ait 15 bitki taksonunun polenleri tespit edilmiştir. Toplamda 137 polen tanesi sayılmış olup bunlardan 8 polen tanesi tanımlanamamıştır (Tablo 4.2). Tanımlanan polen tanelerinden Apiaceae ve Asteraceae familyaları sekonder, Brassicaceae, Campanulaceae, Caryophyllaceae, Cistaceae ve Fabaceae familyaları minor, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda bulunmuştur (Tablo 4.3). Cins düzeyinde ise *Astragalus*, *Campanula*, *Hedysarum*, *Helianthemum* taksonları minor, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda tespit edilmiştir. Tür düzeyinde sadece *Castanea sativa* polen tanesi tayin edilmiştir (Tablo 4.3).

AB_ZT2 balından hazırlanan preparatlarda 19 familyaya ait 29 bitki taksonunun polenleri tespit edilmiştir. Toplamda 132 polen tanesi sayılmış olup, bunların hepsi tanımlanmıştır (Tablo 4.2). Tanımlanan polen tanelerinden Apiaceae, Brassicaceae ve Fabaceae familyaları sekonder, Asteraceae, Cistaceae, Lamiaceae ve Rosaceae familyaları minor olarak tespit edilmiştir, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda bulunmuştur (Tablo 4.3). Cins düzeyinde ise *Centaurea*, *Onobrychis*, *Trifolium* ve *Vicia*, taksonları minor, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda bulunmuştur (Tablo 4.3). Tür düzeyinde sadece *Castanea sativa* polen tanesi tayin edilmiştir.

AB_ZT3 balından hazırlanan preparatlarda 11 familyaya ait 14 bitki taksonunun polenleri tespit edilmiştir. Toplamda 129 polen tanesi sayılmış olup bunlardan 1 polen tanesi tanımlanamamıştır (Tablo 4.2). Tanımlanan polen tanelerinden Fabaceae familyası

dominant, Cistaceae, Plantaginaceae ve Rosaceae minor olarak tespit edilmiş, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda bulunmuştur (Tablo 4.3). Cins düzeyinde ise *Trifolium* dominant, *Helianthemum* ve *Plantago*, taksonları minor, geri kalan bitki taksonları ise eser miktarda bulunmuştur Bu bal örneğinde *Trifolium*'a ait polen tanelerinin bulunma yüzdesi %74'tür (Tablo 4.3). Tür düzeyinde tayin yapılamamıştır.

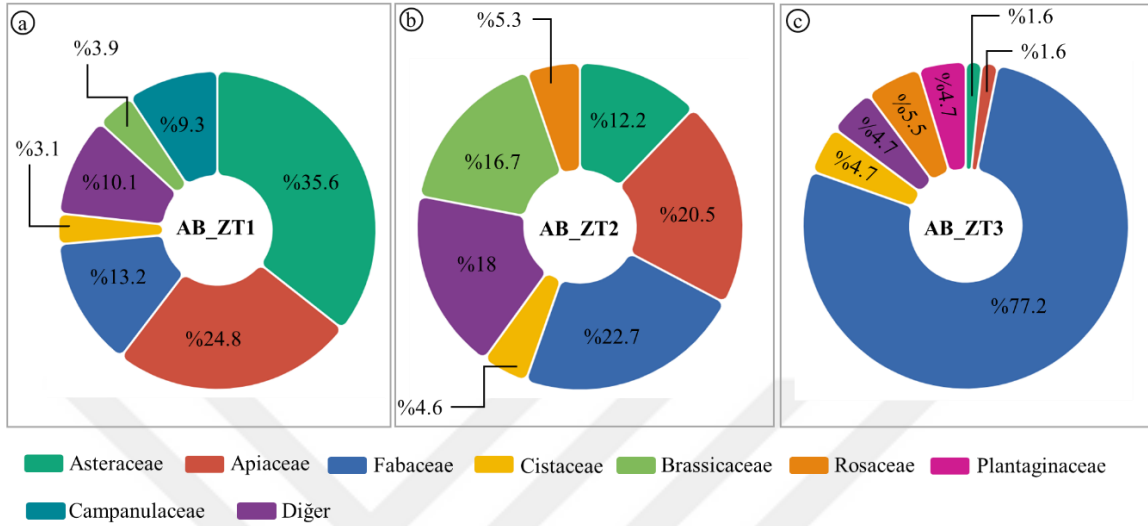
Melisopalinolojik verilerine göre incelenen ballardaki polenlerin ailya düzeyindeki dağılımları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Bal örneklerinde tespit edilen polenlerin ailya düzeyinde göre dağılımları

Melisopalinolojik analizlere göre en fazla polen ile temsil edilen ilk altı ailya Şekil 4.3'te gösterilmiştir. AB_ZT1 örneğinde, mikroskobik incelemeler sonucu tayin edilen taksonlar ele alındığında Asteraceae ailyası %35.6'lık oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer ailyaların bulunma yüzdeleri büyükten küçüğe doğru sıralandığında, Apiaceae (%24.8), Fabaceae (%13.2), Campanulaceae (%9.3), Brassicaceae (%3.9) ve Cistaceae (3.1)'dir. AB_ZT2 örneğinde ise, Fabaceae ailyası %59.8'lik oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer ailyalar sırasıyla Apiaceae (%20.5), Brassicaceae (%16.7), Asteraceae (%12.2) ve Cistaceae (%5.3)'dir. Son olarak, AB_ZT3 örneğinde, Fabaceae ailyası

%77.2'lik oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer familyalar sırasıyla Rosaceae (%5.5), Plantaginaceae (%4.7), Cistaceae (%4.7) Apiaceae (%1.6) ve Asteraceae (%1.6)'dir.



Şekil 4.3. Melissopalınolojik verilere göre tespit edilen polenlerin familya düzeyinde yüzde (%) dağılımı. a) Bal örneği AB_ZT1, b) Bal örneği AB_ZT2, c) Bal örneği AB_ZT3

4.3. NGS Verileri

Bu başlık altında incelenen bal örneklerinde bir çekirdek DNA belirteci olan ITS1 ve ITS2 ait 251 bp uzunluğunda bölgenin sekans verileri bulunmaktadır. Bal örneklerinden elde edilen DNA'ların Illumina (MiSeq) dizilemeye tabi tutulması sonucu, tüm ballar tekrar tekrar ekstrakte edilmiş ve farklı adaptörler kullanılarak çoğaltılmıştır. Illumina yaklaşımı kullanılarak ITS1 ve ITS2 etiketli dizilerle ilişkilendirilebilen 251 bp uzunluğundaki her bir örneğe ait farklı okuma dizisi bulunmaktadır.

ITS1 ve ITS2 etiketli dizilerle eşleşen 251 bp uzunluğunda 350 580 dizilimden oluştuğu bulunmuştur. Bunlardan 260 885 okuma sayısı (%74.4) familya, cins veya tür düzeyinde karakterize edilebilmiştir. Genel olarak ITS2, ITS1'e göre daha az okuma sağlanmıştır. Tüm bal örneklerinde ITS1 için tanımlanan okuma sayısı 52 375 ile 154 485 arasında değişmektedir. ITS2 için tanımlanan okuma sayısı 7 485 ile 18 150 arasında değişmektedir. Dizi kalitesi AB_ZT3 bal örneğine ait ITS2 bölgesi, diğer örneklere göre daha düşüktür. Ortalama Kalite Değeri (Mean Quality Value), tüm bal örneklerinde 37'dir. Illumina sonuçlarına göre Q20 ve Q30 okumalarının yüzdeleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Tüm

bal örneklerinde QV20 okumanın ortalaması %91 ile %96 arasında, QV30 okumanın ortalaması ise %87 ile %94 arasında değişmektedir.

Tüm bal örneklerine ait toplam takson sayısı 22 ile 41 arasında değişmektedir. Tanımlanan familya, cins veya tür sayısı %65 ile %78 arasında bulunmaktadır. En çok taksona sahip AB_ZT3 bal örneğine ait ITS1'dir. Bununla birlikte, aynı örnekteki ITS2 en düşük okuma sayısına ve en az taksona sahiptir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Illumina sonuçlarının özeti (DNA dizilerinin sayısı ve kaliteleri, karakterize edilemeyen dizilerin sayısı, toplam elde edilen dizilerin yüzde başarı oranı ve farklı taksonların toplam sayısı).

	AB_ZT1		AB_ZT2		AB_ZT3	
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
Toplam sayı	103 885	14 200	52 375	18 150	154 485	7 485
Okuma sayısı (251 bç)	78 690	10 130	41 055	11 785	113 910	5 315
Okunmayanların sayısı	25 195	4 070	11 320	6 365	40 575	2 170
Ortalama QV değeri	37	37	37	37	37	37
QV20 okunanların ortalama (%)	95,64	92	94	92	92	91
QV30 okunanların ortalama (%)	93,45	88	92	89	88	87
Tanımlanan familya, cins, veya tür sayısı (%)	76	71	78	65	74	71
Toplam takson sayısı	29	29	30	37	41	22

Dizileme verilerinden toplamda üç bal örneğinden ITS1 için 310 745 ve ITS2 için 39 835 filtrelenmiş çift taraflı okuma elde edilmiştir. Toplamda filtrelenmiş ITS1 okumalarının 233 655 (%75.2)'i, ITS2 okumaların 27 230 (%68.4)'ü özel hazırlanmış kütüphanedeki veritabanı ile en az familya düzeyinde eşleşmiştir. Ayrıca NCBI'da özel filtreleme ile tüm sekanslar BLAST yapılarak tekrar ek ilaveler yapılmıştır. Eşleşen taksonlardan çiçekli bitkiler hariç diğer canlılara ait okumalar filtrelenerek çıkarılmıştır.

Üç farklı örnekte tanımlanan bitki taksonları Tablo 4.5'te verilmiştir. Bu tabloya göre Illumina kullanılarak üç bal örneğinden 27 bitki familyasına ait 54 bitki taksonu kaydedilmiştir. Taksonların 29'u tür olarak belirlenmiştir ancak bazı okumalar yalnızca cins seviyesine kadar belirlenmiştir. Bütün ballarda tespit edilen ve en çok takson bulunduran

familyalar Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rosaceae'dir. AB_ZT1 örneğinde baskın olarak bulunan taksonlar *Artemisia*, *Dianthus*, *Salvia verticillata*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Potentilla crantzii*'dir. AB_ZT2 örneğinde baskın olan taksonlar ise, *Astragalus fragrans*, *Salvia verticillata*, *Cotoneaster*, *Potentilla crantzii* ve *Prunus divaricata*'dır. Son olarak AB_ZT3 örneğinde ise, *Taraxacum bessarabicum*, *Betula litwinowii*, *Dianthus*, *Juglans regia*, *Potentilla crantzii*, *Prunus divaricate*, *Prunus domestica* ve *Verbascum*'dur.

Tablo 4.5. Illumina analizi ile incelenen üç bal örneğindeki tespit edilen bitki taksonları. Dominant (kırmızı: >10000), Sekonder (yeşil: 1001-10000), Minör (koyu sarı:101-1000), Eser (açık sarı: 0-100).

Familya	Takson	AB_ZT1		AB_ZT2		AB_ZT3	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
Apiaceae	<i>Eryngium giganteum</i>	29				16	
Apiaceae	<i>Heracleum</i>			34			
Asteraceae	<i>Asteraceae</i>		45		30	16	
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i>				91		
Asteraceae	<i>Artemisia</i>	1855	179	112		125	14
Asteraceae	<i>Centaurea</i>			17	107		
Asteraceae	<i>Helianthus tuberosus</i>	29	89		30		
Asteraceae	<i>Helichrysum pallasii</i>					109	
Asteraceae	<i>Lactuca racemosa</i>				15		28
Asteraceae	<i>Taraxacum bessarabicum</i>	29		146	46	1354	110
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i>			154	15	47	96
Betulaceae	<i>Betula litwinowii</i>				229	2942	
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>					31	
Brassicaceae	<i>Brassicaceae</i>	114	893	154	30	1043	207
Caryophyllaceae	<i>Dianthus</i>	9704	357	661	15	2615	
Cistaceae	<i>Helianthemum nummularium</i>			26	61		
Convolvulaceae	<i>Calystegia sepium</i>		357		168	93	83
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>		89		15	78	
Cyperaceae	<i>Carex</i>	57		9			
Ericaceae	<i>Rhododendron</i>				30		
Ericaceae	<i>Vaccinium</i>	200	714	146	320	685	28
Fabaceae	<i>Astragalus fricki</i>	314	89	31482		140	193
Fabaceae	<i>Hedysarum hedysaroides</i>	57	45		15	31	
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>					156	
Fabaceae	<i>Melilotus albus</i>		45				
Fabaceae	<i>Onobrychis</i>		45	9		31	
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	314	89	9	76	156	
Fabaceae	<i>Trifolium</i>	171				31	
Fabaceae	<i>Vicia cracca</i>	371		9		16	

Tablo 4.5. (Devam)

Fagaceae	<i>Quercus</i>				76	529	
Gentianaceae	<i>Gentiana</i>		536			62	
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i>	143	179	26	427	50417	3883
Lamiaceae	<i>Mentha longifolia</i>	343	45		30	498	
Lamiaceae	<i>Salvia verticillata</i>	4453	2187	1939	2653	1992	179
Lamiaceae	<i>Stachys</i>	571	134				
Lamiaceae	<i>Teucrium chamaedrys</i>	29	89	34	30	31	55
Papaveraceae	<i>Papaver lateritium</i>			60			
Poaceae	<i>Poaceae</i>	200	223	17	61	202	14
Polygonaceae	<i>Polygonum bistorta</i>	200					
Polygonaceae	<i>Rumex</i>				91	16	28
Rosaceae	<i>Cotoneaster</i>	1827	446	2934	107	872	55
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	6793	536	34	854	560	14
Rosaceae	<i>Potentilla</i>	9647		120	168	3004	
Rosaceae	<i>Potentilla crantzii</i>	39616	1294	2273	3247	9371	14
Rosaceae	<i>Prunus divaricata</i>			60	1829	24578	28
Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>		45	17	152	2926	28
Rosaceae	<i>Sorbus aucuparia</i>			9	488	5650	
Salicaceae	<i>Salix</i>			9	15	62	28
Sapindaceae	<i>Acer</i>	29		189	107	654	138
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia</i>	86	179	26	15	171	28
Scrophulariaceae	<i>Verbascum</i>	1370	179		15	1977	
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i>	114	45				
Thymelaeaceae	<i>Daphne glomerata</i>	29	893	343	61	560	69
Verbenaceae	<i>Verbena</i>		89		61	62	
Okuma sayısı		78690	10130	41055	11785	113910	5315
Toplam okuma sayısı (ITS1+ITS2)		88 820		52 840		119 225	

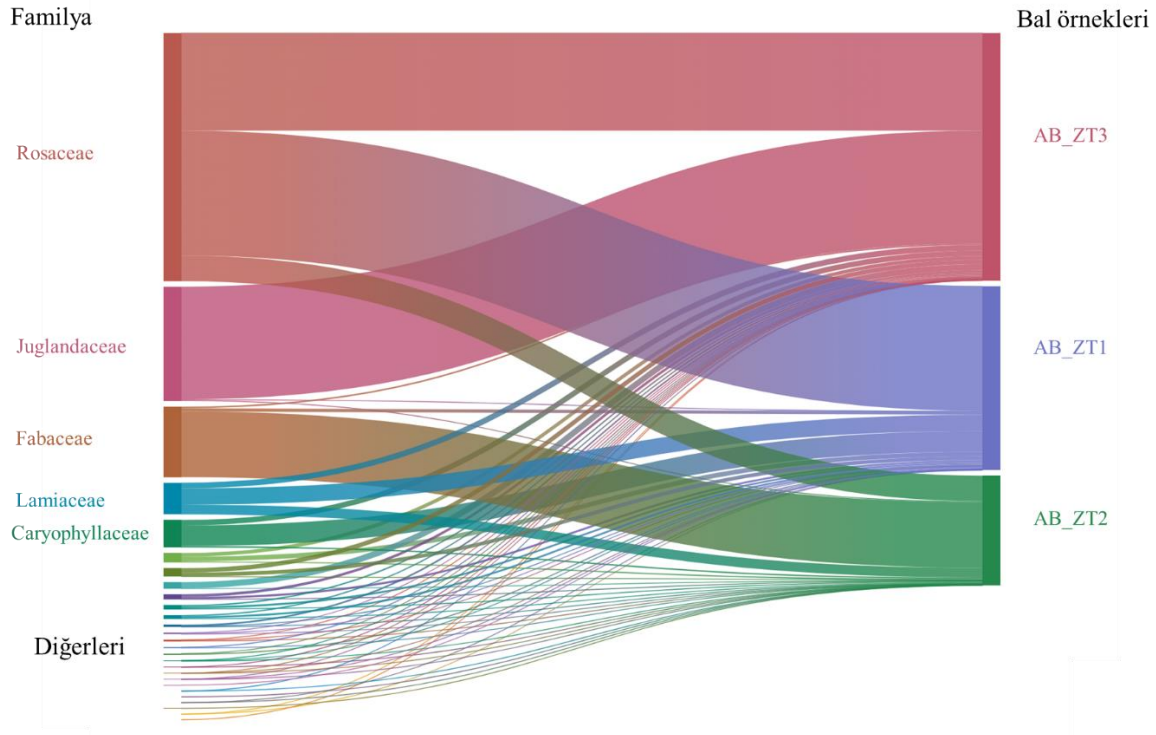
AB_ZT1 örneğine ait ITS1 okuma sayısı 103 885 olup bu dizilerin 78 690'nı (%76); ITS2 için okuma sayısı 14 200 olup bu dizilerin 10 130'u (%71) familya, cins veya tür düzeyinde karakterize edilmiştir. ITS1 ve ITS2'de eşleşen familya sayısı 16, takson sayısı 29 olarak tespit edilmiştir. Tür düzeyinde tespit edilen takson sayısı ITS1 için 15, ITS2 için de 14'tir. Hem ITS1 hem de ITS2 için ortak olan familya sayısı 12'dir (Tablo 4.5).

AB_ZT2 örneğine ait ITS1 okuma sayısı 52 375 olup bu dizilerin 41 055'i (%78); ITS2 için okuma sayısı 18 150 olup bunlardan 11 785'i (%65) familya, cins veya tür düzeyinde karakterize edilmiştir. ITS1'de eşleşen familya sayısı 18, takson sayısı 30 iken, ITS2'de eşleşen familya sayısı 21, takson sayısı ise 37 olarak tespit edilmiştir. Tür düzeyinde

tespit edilen bitki sayısı ITS1 için 15 iken, ITS2 için 19'dur. Hem ITS1 hem de ITS2 için ortak olan familya sayısı 15'dir (Tablo 4.5).

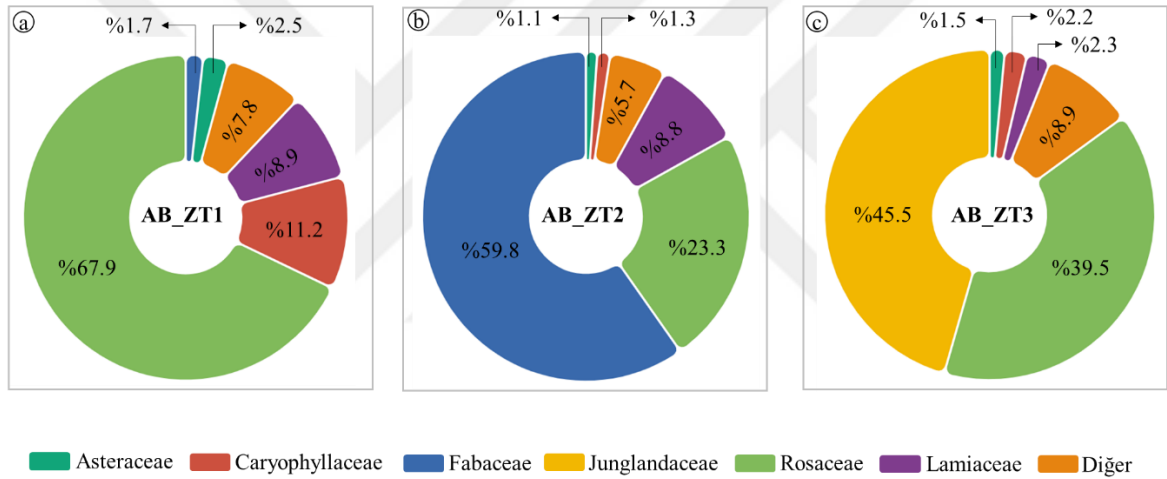
AB_ZT3 örneğine ait ITS1 okuma sayısı 154 485 olup bu dizilerin 113 910'u (%74); ITS2 için okuma sayısı 7 485 olup bunlardan 5 315'i (%71) familya, cins veya tür düzeyinde karakterize edilmiştir. ITS1'de eşleşen familya sayısı 23, takson sayısı 41 iken, ITS2'de eşleşen familya sayısı 15, takson sayısı ise 22 olarak tespit edilmiştir. Tür düzeyinde tespit edilen bitki sayısı ITS1 için 20 iken, ITS2 için 12'dir. Hem ITS1 hem de ITS2 için ortak olan familya sayısı 14'tür (Tablo 4.5).

Üç bal örneğine ait familya düzeyinde en fazla tanımlanan bitki taksonlarının özeti Şekil 4.4'te gösterilmiştir. AB_ZT1 örneğinde okuma sayısı en fazla olan familya Rosaceae (60 204) olup içinde *Potentilla crantzii* taksonu, örneğin %68'inde tespit edilmiştir. AB_ZT2 örneğinde okuma sayısı en fazla olan familya, Fabaceae (31 598) olup içinde *Astragalus fragrans* taksonu, örneğin %99.6'sında bulunmuştur. AB_ZT3 örneğinde ise Juglandaceae (54 300) familyası en fazla okuma sayısına sahip olup içinde *Juglans regia* %100 oranında balda tespit edilmiştir (Tablo 4.5).



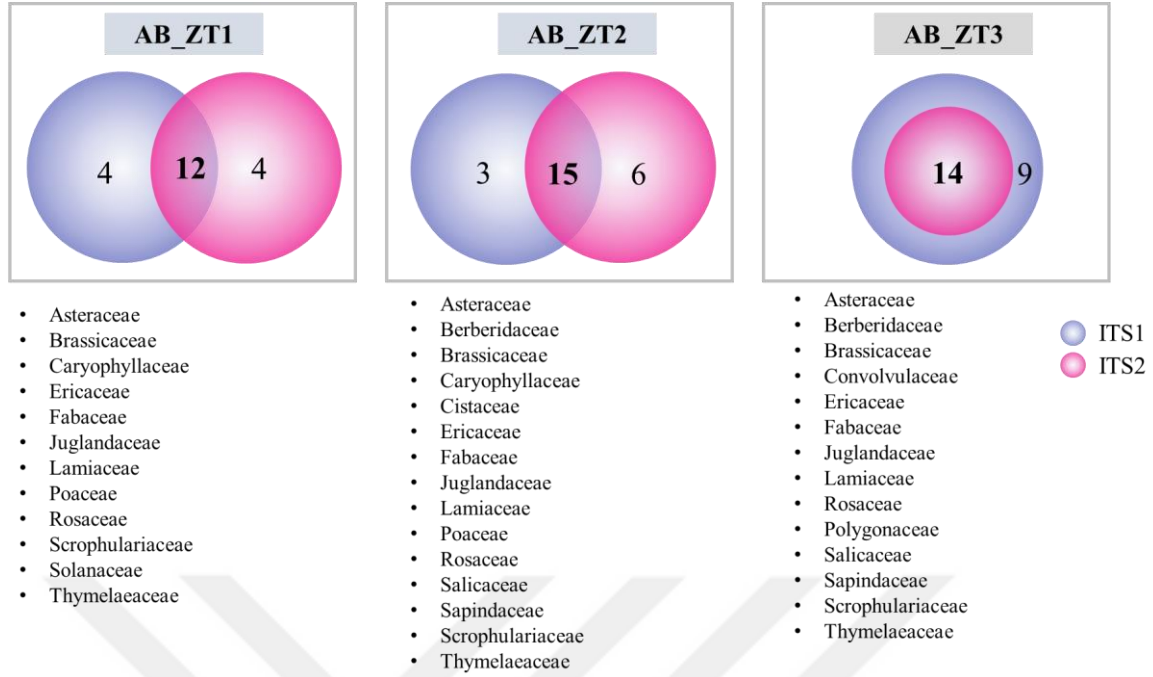
Şekil 4.4. Illumina verilerine göre tespit edilen familyaların bal örneklerine göre dağılımı

NGS analizi ile eşleşen familyaların dağılımı, tüm bal örneklerinde en fazla yüzdeye sahip ilk beş, familya Şekil 4.5'te gösterilmiştir. AB_ZT1 örneğinde, toplam ITS lokusu ele alındığında Rosaceae familyası %67.9'lık oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer familyaların bulunma yüzdeleri büyükten küçüğe doğru sıralandığında, Caryophyllaceae (%11.2), Lamiaceae (%8.9), Asteraceae (%2.5) ve Fabaceae (%1.7)'dir. AB_ZT2 örneğinde ise, Fabaceae familyası %59.8'lik oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer familyalar sırasıyla Rosaceae (%23.3), Lamiaceae (%8.8), Caryophyllaceae (%5.7) ve Asteraceae (%1.3)'dir. Son olarak, AB_ZT3 örneğinde Juglandaceae familyası %45.5'lik oranla ilk sırada yer almaktadır. Diğer familyalar sırasıyla Rosaceae (%39.5), Lamiaceae (%8.9), Caryophyllaceae (%2.3), Asteraceae (%1.5) ve Fabaceae (%2.2)'dir.



Şekil 4.5. Illumina verilerine göre tespit edilen familyaların bal örneklerine göre % dağılımı. AB_ZT1(a), AB_ZT2 (b), AB_ZT3 (c).

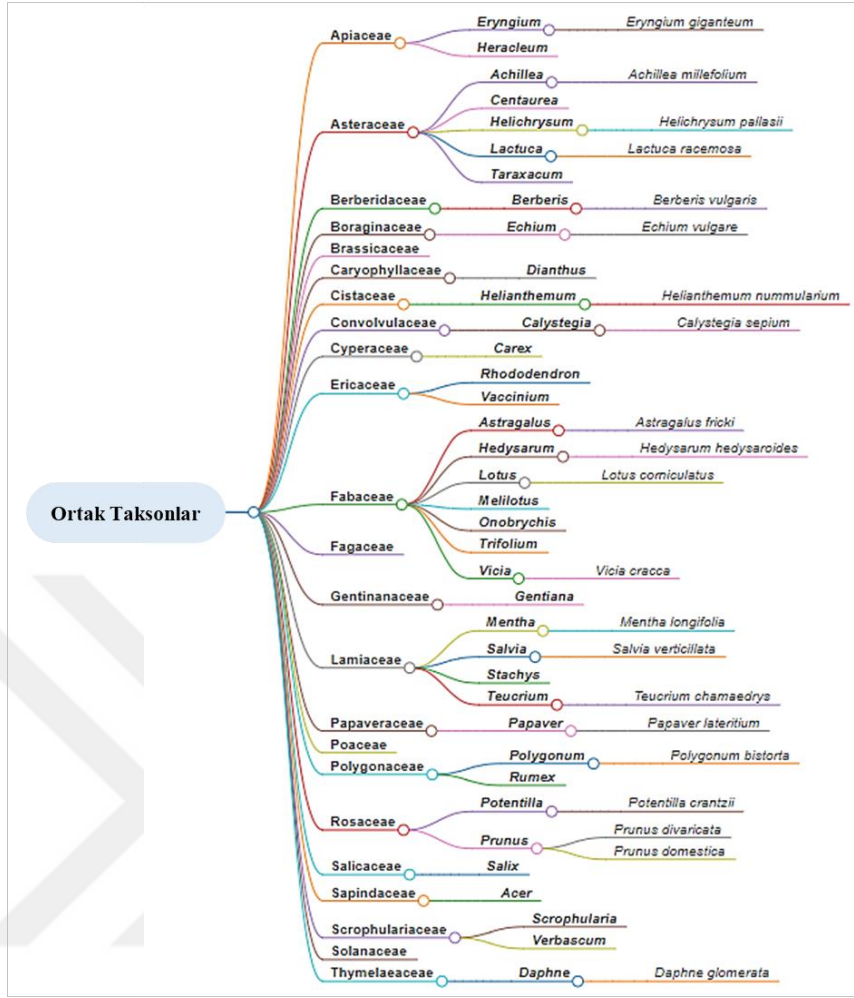
NGS analizi ile eşleşen familyaların dağılımı, hem ITS1 hem de ITS2 bölgeleri için Şekil 4.6' da gösterilmektedir. AB_ZT1 örneğinde ortak olan familyalar, tüm familyaların %60'nı, AB_ZT2 örneğinde ortak olan familyalar, tüm familyaların %63'nü, AB_ZT3 örneğinde ortak olan familyalar, tüm familyaların %61'ini oluşturmaktadır. Tüm bal örneklerinde, ITS1 ve ITS2 bölgelerinde tespit edilen ve ortak olan familyalar, Asteraceae, Brassicaceae, Juglandaceae, Ericaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Thymeleaceae'dir.



Şekil 4.6. ITS1 ve ITS2 verilerine göre tespit edilen familya sayılarının bal örneklerine göre dağılım (Venn) diyagramı.

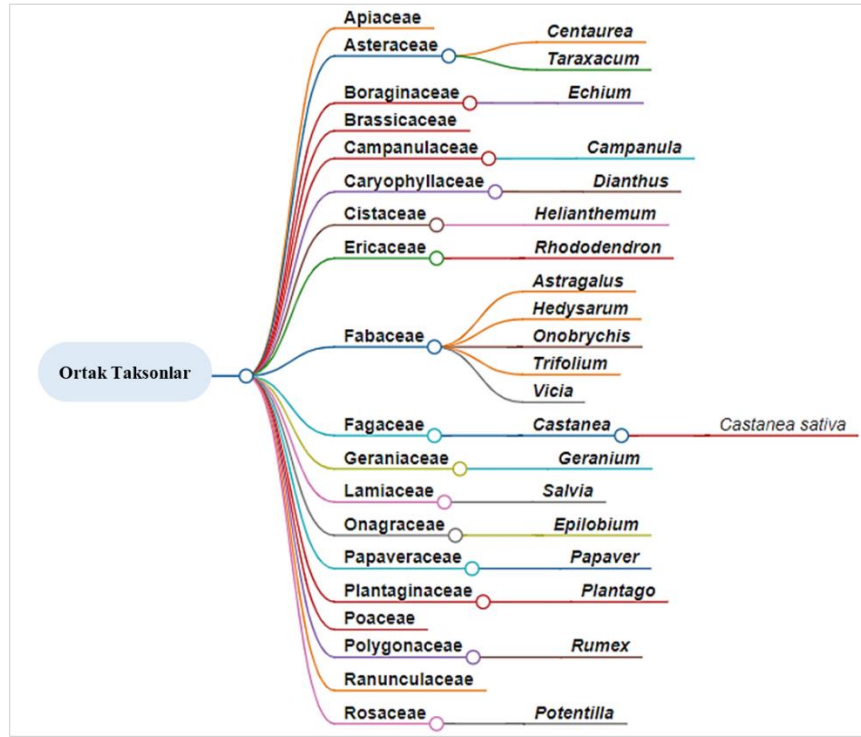
4.4. Floristik, Melissopalinojik ve NGS Sonuçlarının Numerik Analizi

Floristik bulgular, melissopalinojoloji ve NGS verileri ile karşılaştırıldığında en az familya düzeyinde eşleşmiştir. NGS verilerine bakıldığında, dört familya (Betulaceae, Cucurbitaceae, Juglandaceae ve Verbenaceae) hariç tüm familyalar, teşhis edilen bitkilerle örtüşmüştür. Floristik bulgular melissopalinojik bulgular ile familya düzeyinde %85.2 değerinde benzerlik göstermektedir. Floristik bulgular NGS verileri karşılaştırıldığında ortak familya sayısının 23, cins sayısının 37, tür sayısının 21 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



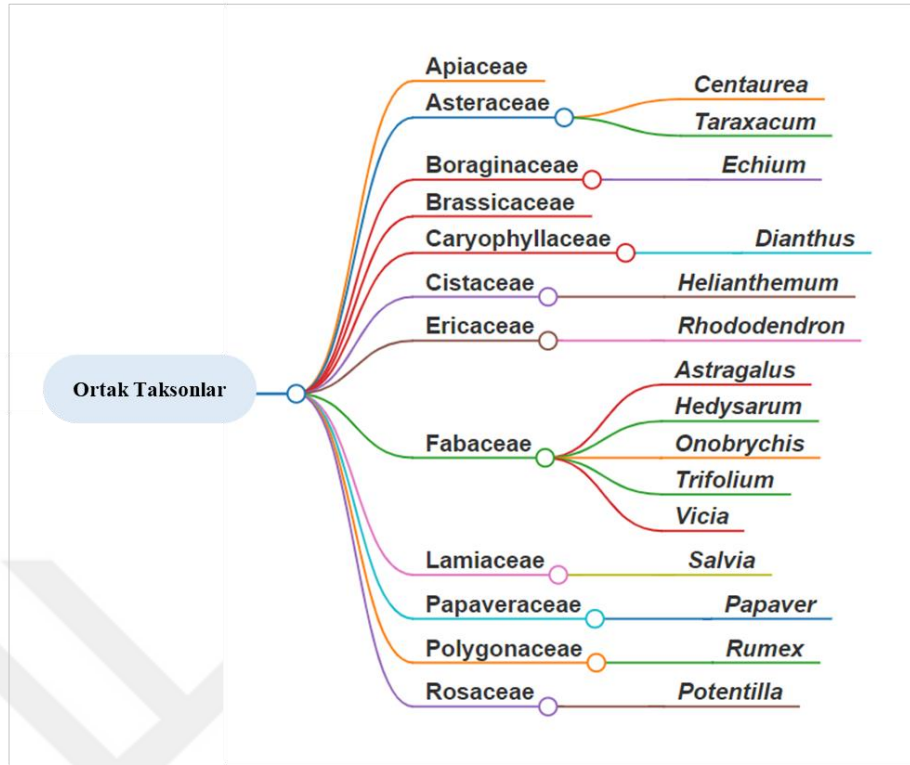
Şekil 4.7. İncelenen bal örneklerinde floristik ve NGS analizi sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı

Teşhis edilen bitkiler ile melissopalınolojik veriler karşılaştırıldığında familya olarak ortak olan bitkilerin sayısı 19, cins sayısı 20, tür sayısı sadece 1'dir. Her iki teknikte ortak olan taksonlar familya, cins, tür düzeyinde Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. İncelenen bal örneklerinde floristik ve melissopalinojik analiz sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı

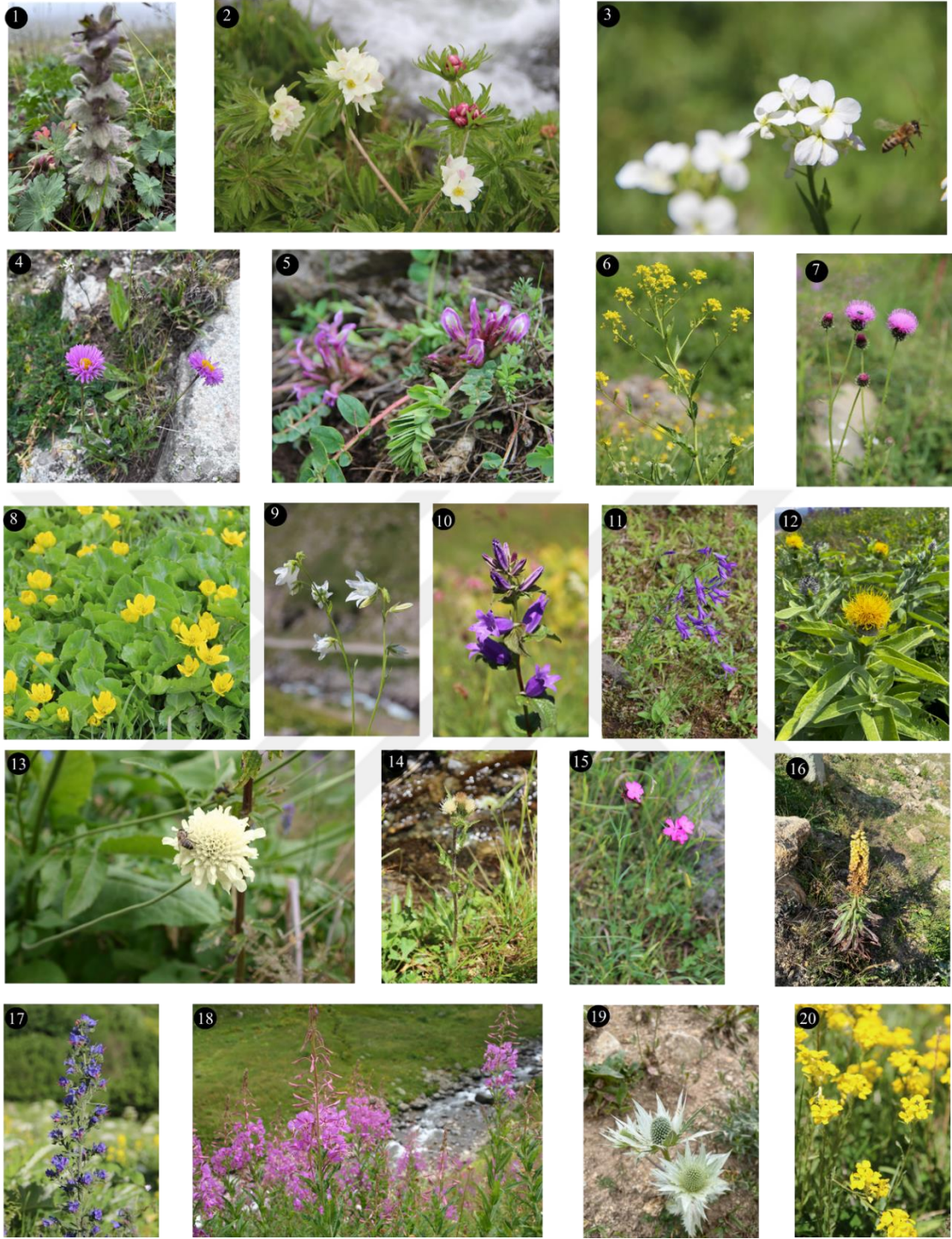
Teşhis edilen bitkiler, NGS ve melissopalinojik verilerin üçü karşılaştırıldığında ortak olan familya sayısı 13, cins sayısı 15'tir. Ortak olan taksonlar, Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9. İncelenen bal örneklerinde floristik, NGS ve melissopalinojik analiz sonucu tespit edilen ortak taksonların (familya, cins, tür) dağılımı

4.5. Palinolojik Veriler

Bu başlık altında palinolojik çalışmaları gerçekleştirilen bitkilerin arazide çekilmiş doğal fotoğrafları Şekil 4.10-4.12’de verilmiştir. Ayrıca arazi çalışmaları sırasındaki gözlemler ile melissopalinojik analizler sonucu tespit edilen 64 ortak taksonun palinolojik özellikleri (P, E, P/E, polen şekli, polen tipi ve ekzin yüzey ornamentasyonu), ışık ve taramalı elektron mikroskobu mikrofotoğraflarına yer verilmiştir (Şekil 4.13-4.23). Tez kapsamında yapılan farklı analizlerde incelenen bal örneklerinde ortak olduğu belirlenen 64 taksona ait palinolojik veriler Tablo 4.6’ta verilmiştir. Bu tabloda verilen taksonlardan 27 adeti ilk kez geri kalanları ise Anzer bölgesinden toplanan ülkemiz örneklerinden ilk kez ayrıntılı palinolojik özellikleri çalışılmıştır. Böylece Anzer (Ballıköy)’de yayılış gösteren ve tez kapsamında yapılan analizlerde Anzer balında olduğu belirlenen taksonların tür düzeyinde palinolojik verileri sağlanmış oldu. Bu durum ileride Anzer balında yapılacak melissopalinojik çalışmaların tür düzeyinde tanımlanmasında katkı sağlayacaktır. Ayrıca melissopalinojik verilerinden daha iyi sonuçlar elde edilmesi için polen referans veritabanı oluşturmak için kullanılabilecektir.



Şekil 4.10. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar. 1.*Ajuga orientalis*, 2. *Anemone narcissiflora* 3. *Arabis hirsuta*, 4. *Aster alpinus*, 5. *Astragalus fricki*, 6. *Bunias orientalis* 7. *Carduus adpressus* 8. *Caltha palustris* 9. *Campanula alliariifolia* 10. *Campanula glomerata* 11. *Campanula olympica* 12. *Centaurea helenioides* 13.*Cephalaria gigantea* 14.*Cirsium pseudopersonata* subsp. *pseudopersonata* 15.*Dianthus carmelitarum* 16.*Digitalis ferruginea* 17.*Echium vulgare* 18. *Epilobium angustifolium* 19. *Eryngium giganteum* 20. *Erysimum pulchellum*.



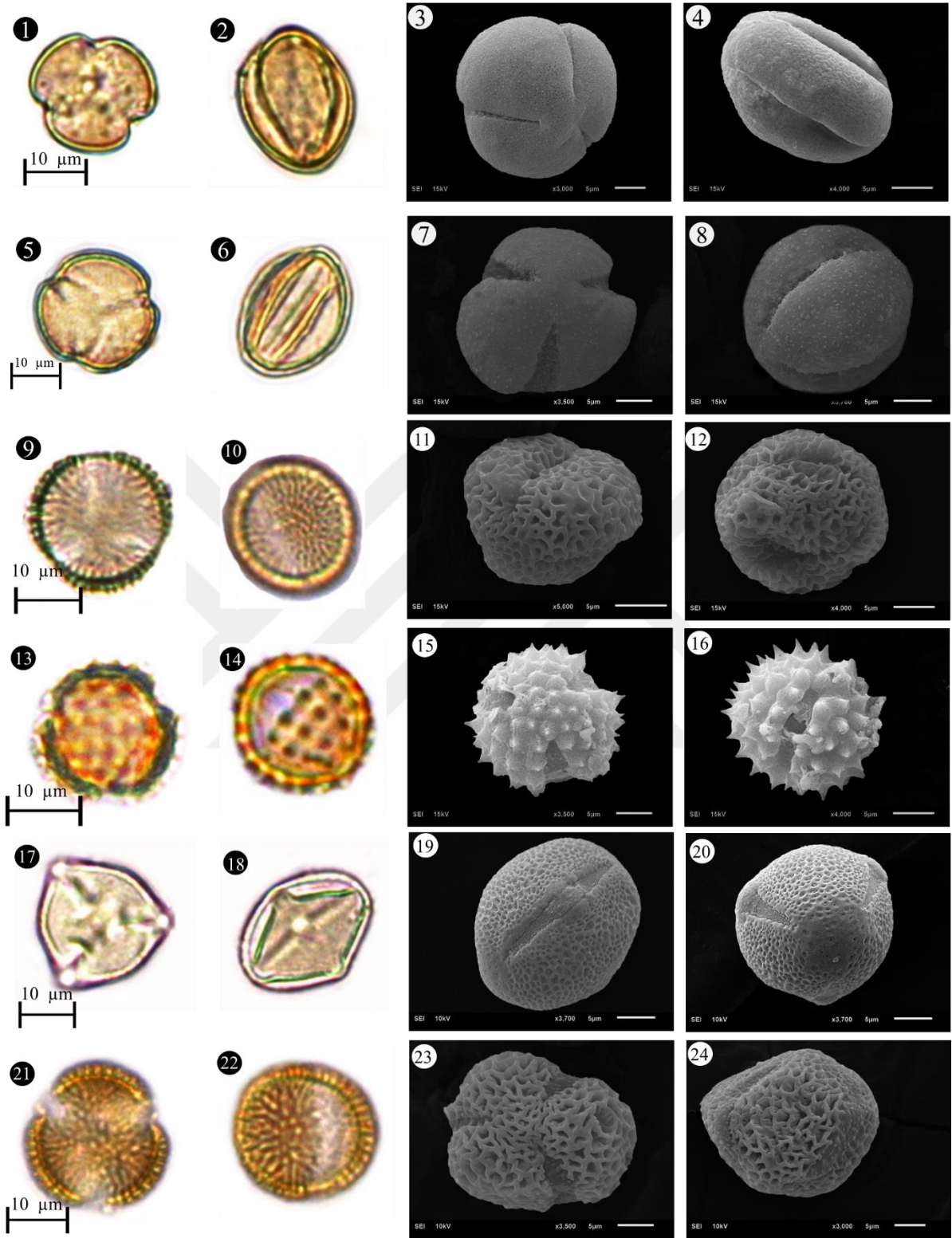
Şekil 4.11. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar.

1. *Galium verum*, 2. *Genista albida* 3. *Geranium ibericum* subsp. *jubatum*, 4. *Geranium ponticum*, 5. *Geranium pyrenaicum*, 6. *Geum aleppicum*, 7. *Hedysarum hedysaroides*, 8. *Helianthemum nummularium*, 9. *Heracleum platytaenium*, 10. *Lactuca racemose*, 11. *Lathyrus roseus*, 12. *Melilotus officinalis*, 13. *Mentha longifolia*, 14. *Nonea versicolor*, 15. *Onobrychis altissima*, 16. *Papaver lateritium*, 17. *Phedimus spurius*, 18. *Plantago lanceolata* 19. *Polygonum alpinum* 20. *Polygonum bistorta* subsp. *carneum*, 21. *Potentilla crantzii* 22. *Psephellus pulcherrimus*

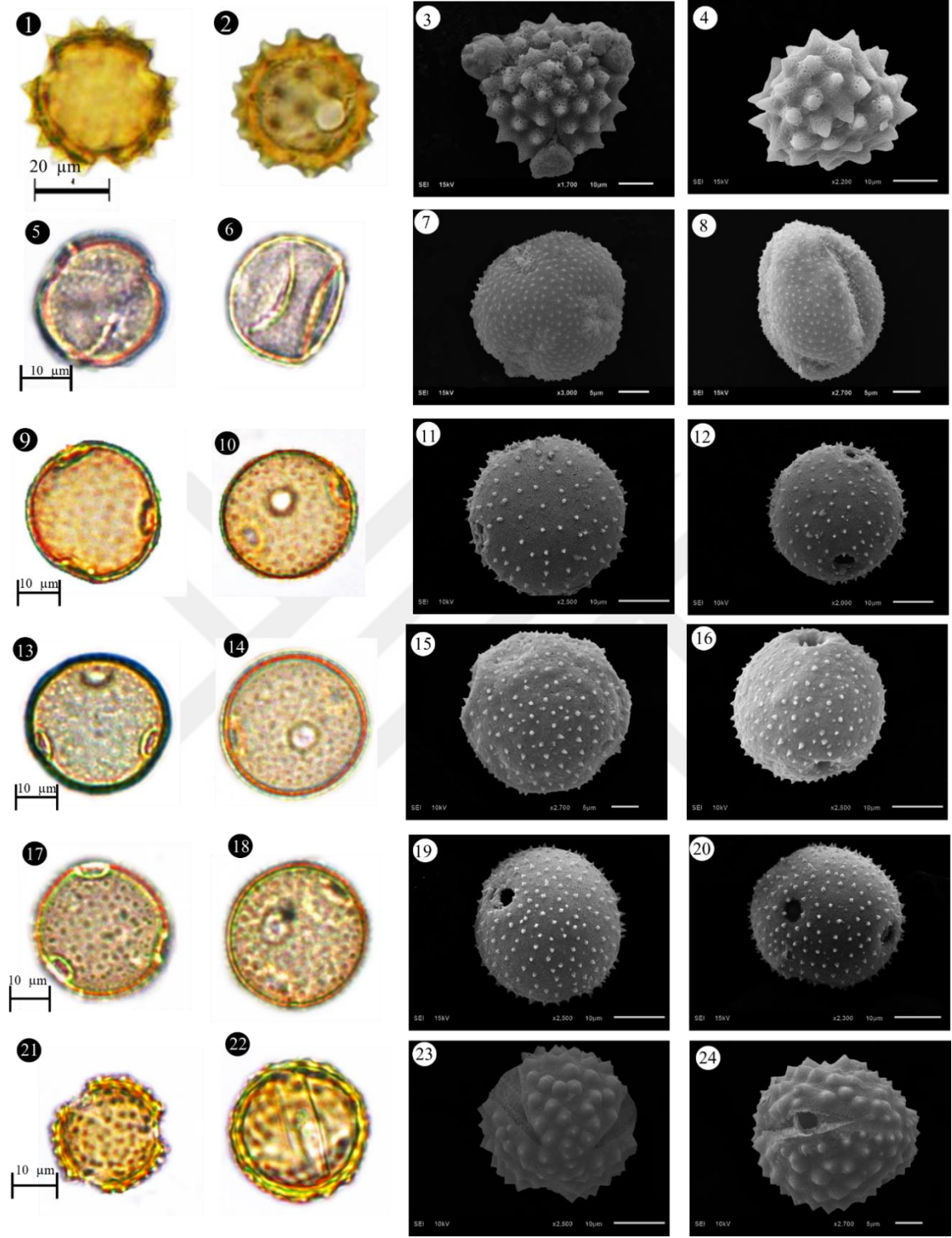


Şekil 4.12. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonlar.

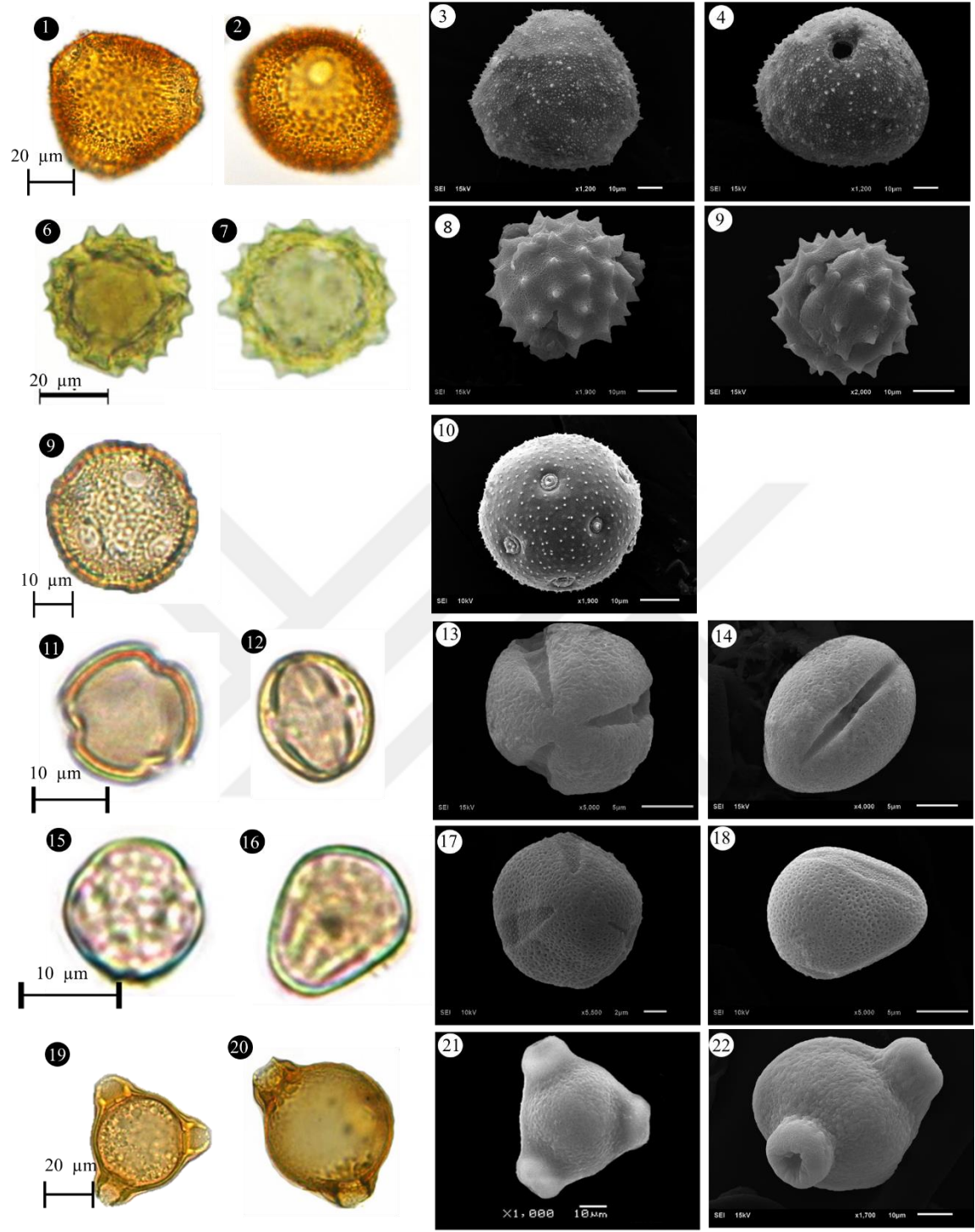
1. *Prunus divaricata*, 2. *Rhododendron caucasicum*, 3. *Rosa canina*, 4. *Rubus idaeus*, 5. *Rumex alpinus*, 6. *Salvia verticillate*, 7. *Scabiosa caucasica*, 8. *Securigera orientalis* subsp. *orientalis*, 9. *Securigera varia*, 10. *Solidago virgaurea* subsp. *alpestris*, 11. *Stachys macrantha*, 12. *Swertia iberica*, 13. *Taraxacum serotinum*, 14. *Teucrium chamaedrys*, 15. *Thymus praecox*, 16. *Trifolium ambiguum*, 17. *Trifolium canescens*, 18. *Trifolium pratense*, 19. *Trifolium spadiceum*, 20. *Trollius ranunculinus*, 21. *Vicia balansae* 22. *Vicia cracca* subsp. *cracca*



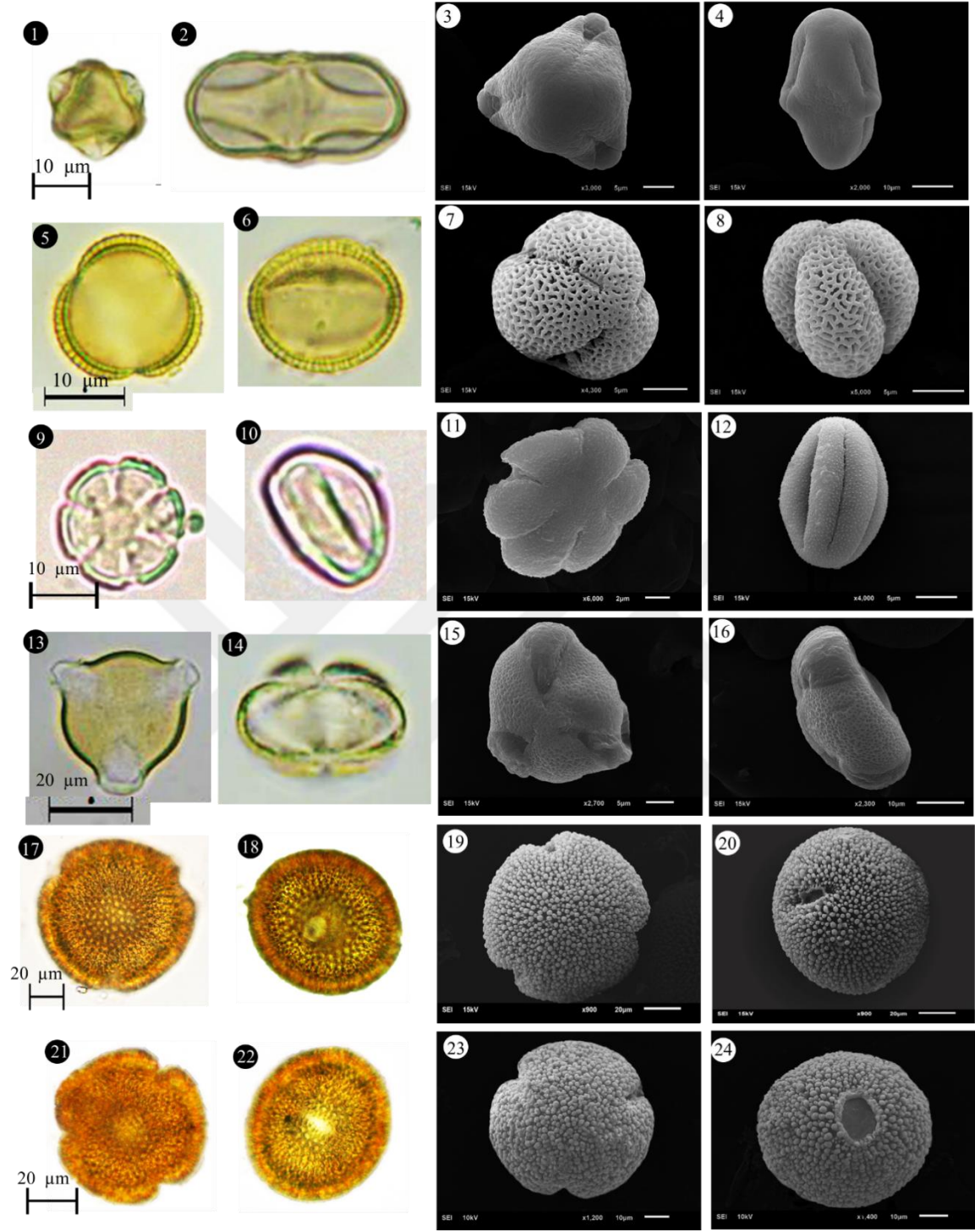
Şekil 4.13. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Ajuğa orientalis*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Anemone narcissiflora*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Arabis hirsuta*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Aster alpinus*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E; 17-20 *Astragalus fricki*; IM :17P, 18E; SEM: 19P, 20E; 21-24 *Bunias orientalis* ; IM :21P, 22E; SEM: 23P, 24E.



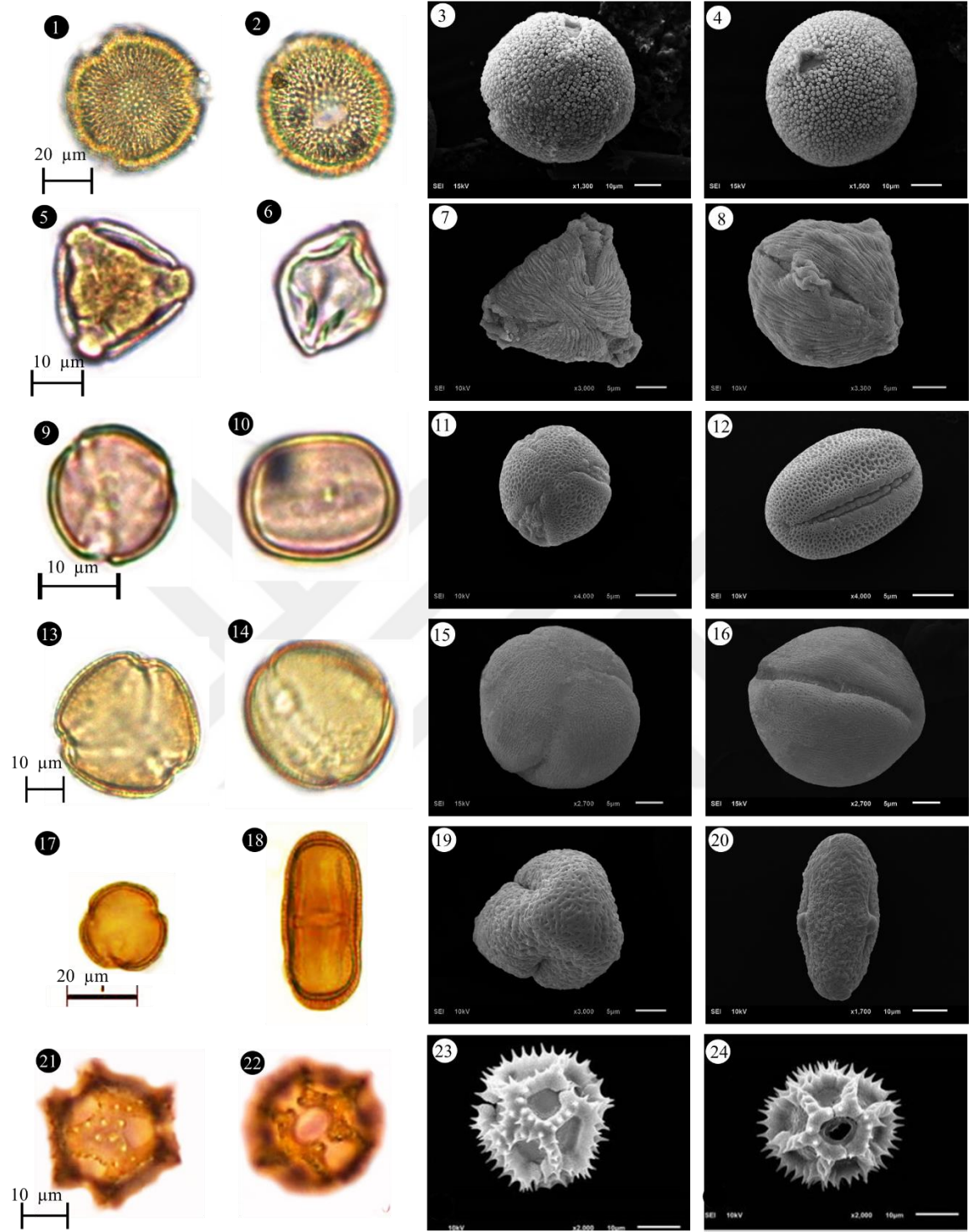
Şekil 4.14. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Carduus adpressus*; **IM** :1P, 2E; **SEM**: 3P, 4E; 5-8 *Caltha palustris*; **IM** :5P, 6E; **SEM**: 7P, 8E; 9-12 *Campanula alliarifolia*; **IM**: 9P, 10E; **SEM**: 11P, 12E; 13-16 *Campanula glomerata*; **IM** :13P, 14E; **SEM**: 15P, 16E; 17-20 *Campanula olympica*; **IM** :17P, 18E; **SEM**: 19P, 20E; 21-24 *Centaurea helenioides*; **IM** :19P, 20E; **SEM**: 21P, 22E.



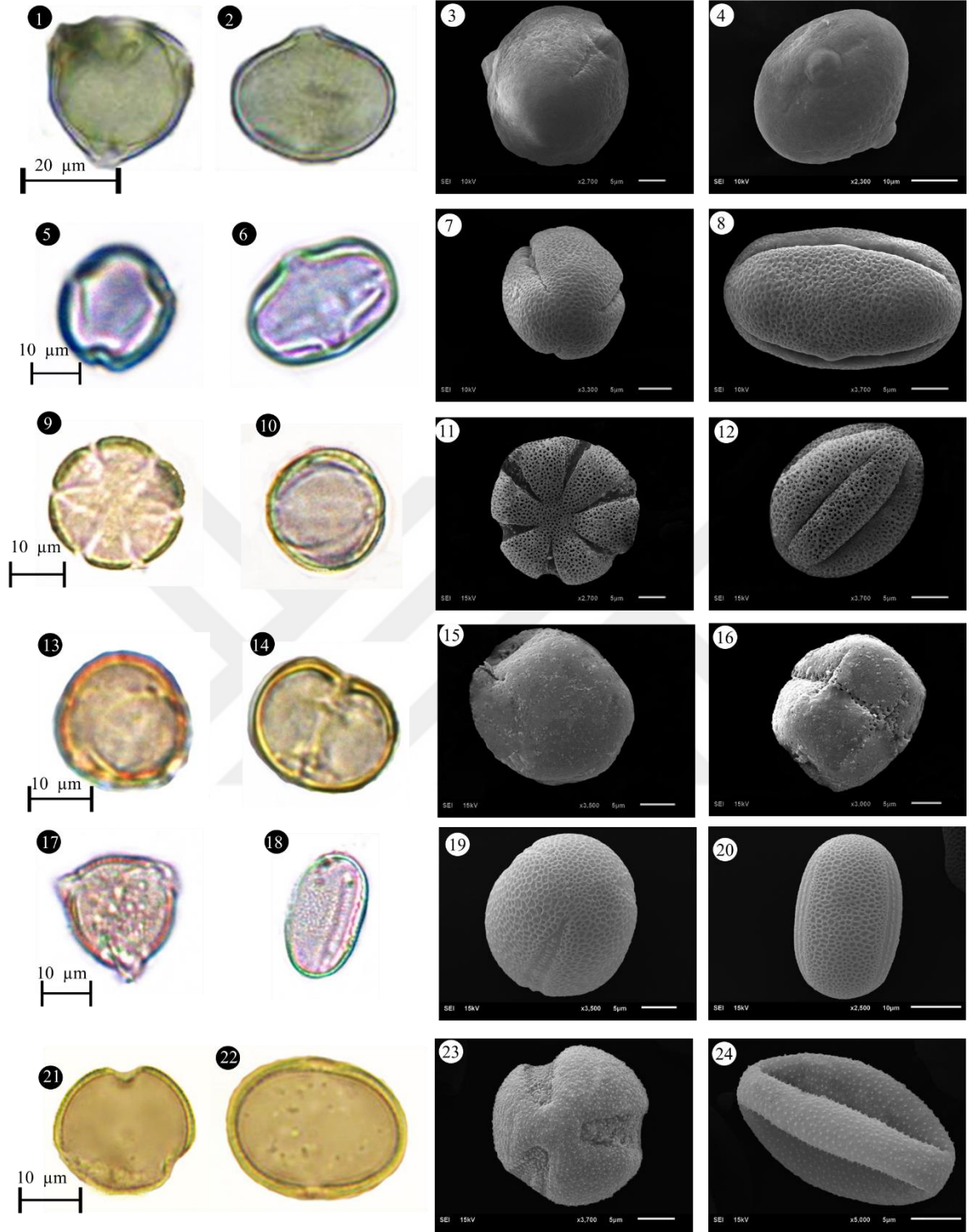
Şekil 4.15. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Cephalaria gigantea*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Cirsium pseudopersonata* subsp. *pseudopersonata*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-10 *Dianthus carmelitarum*; IM: 9P-E; SEM: 11P-E; 11-14 *Digitalis ferruginea*; IM :11P, 12E; SEM: 13P, 14E; 15-18 *Echium vulgare*; IM :15P, 16E; SEM: 17P, 18E; 19-22 *Epilobium angustifolius*; IM :19P, 20E; SEM: 21P, 22E.



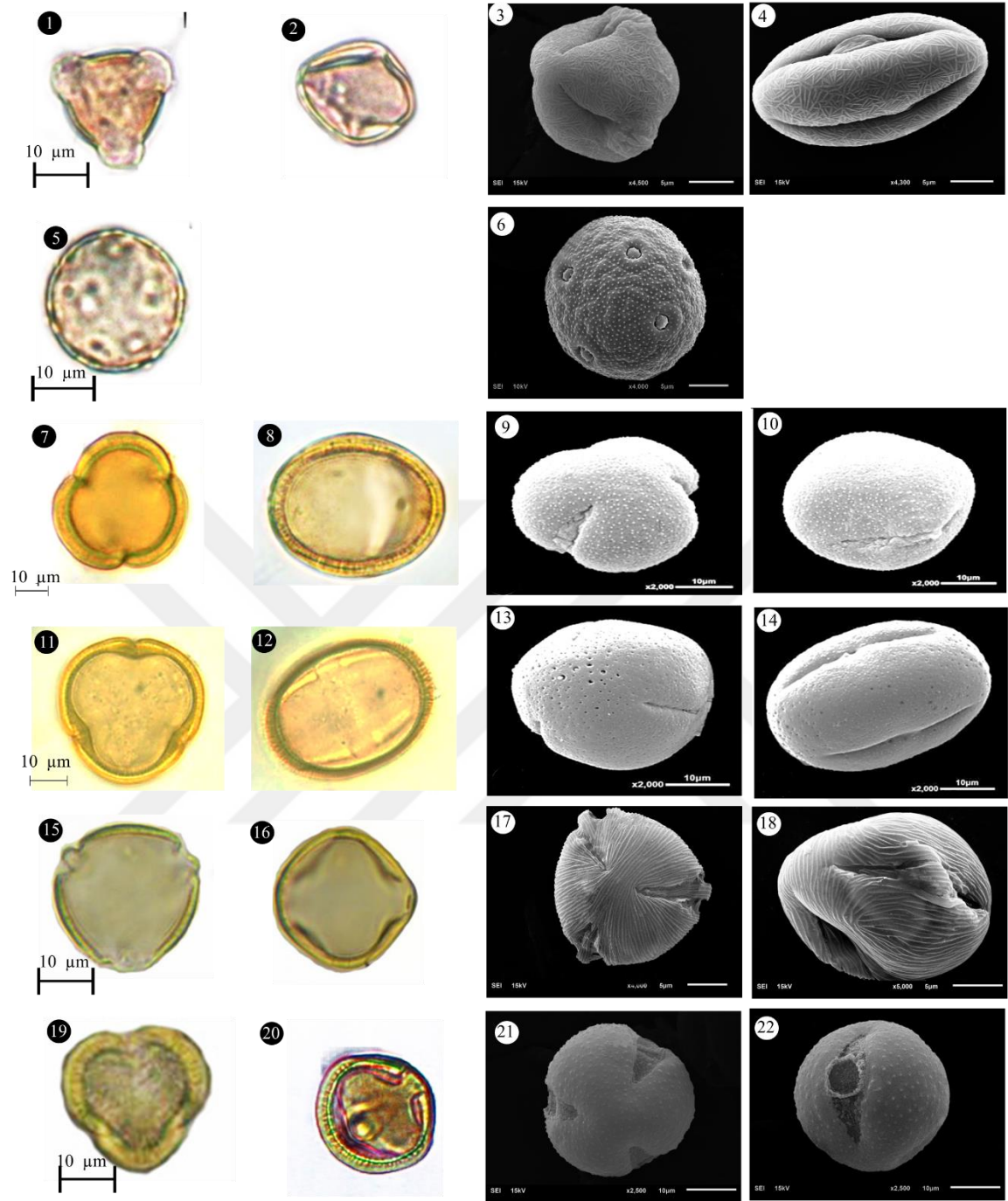
Şekil 4.16. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Eryngium giganteum*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Erysimum pulchellum*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Galium verum*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Genista albida*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E; 17-20 *Geranium ibericus* subsp. *jubatum*; IM :17P, 18E; SEM: 19P, 20E; 21-24 *Geranium ponticum*; IM :19P, 20E; SEM: 21P, 22E.



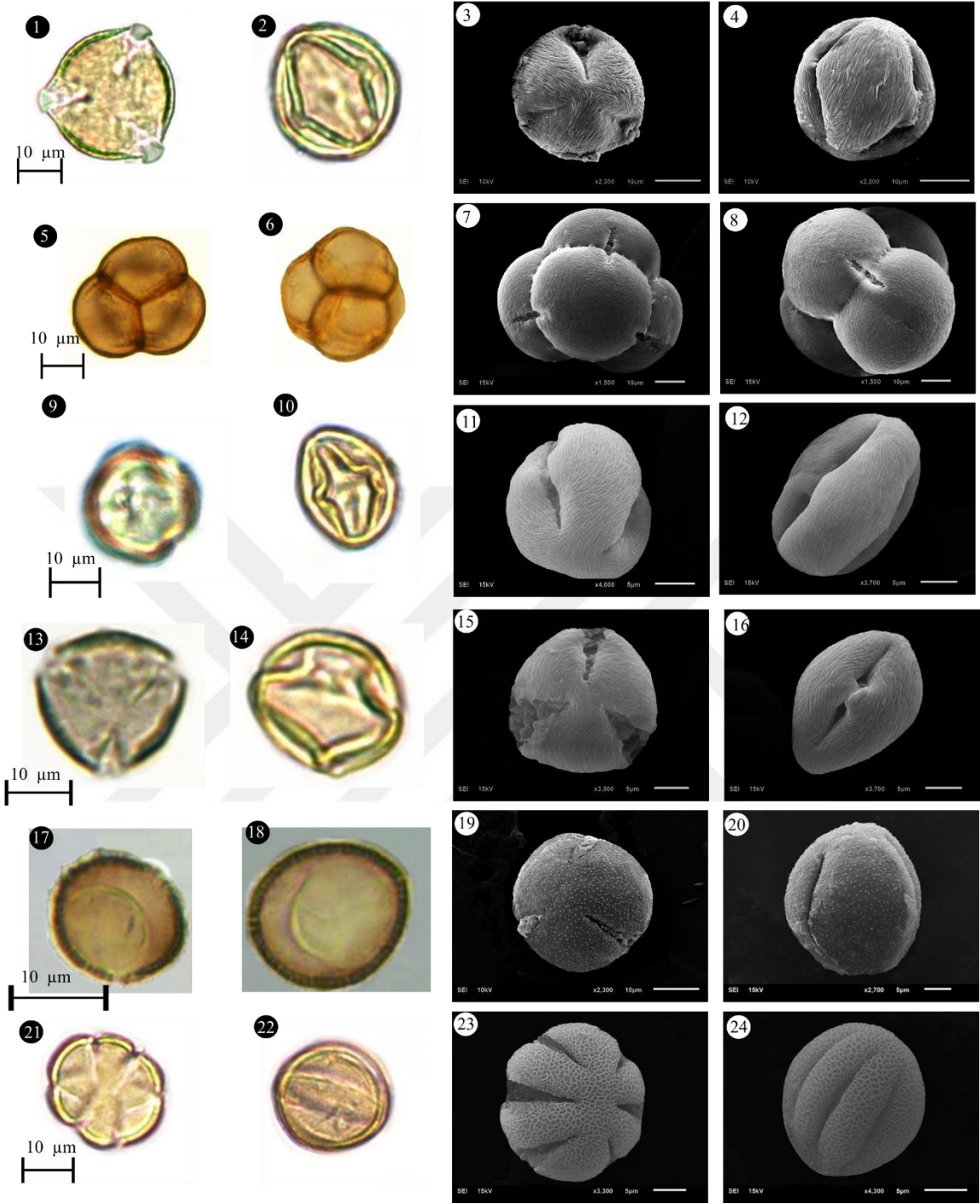
Şekil 4.17. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Geranium pyrenaicum*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Geum aleppicum*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Hedysarum hedysaroides*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Helianthemum nummularium*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E; 17-20 *Heracleum platytaenium*; IM :17P, 18E; SEM: 19P, 20E; 21-24 *Lactuca racemosa*; IM :19P, 20E; SEM: 21P, 22E.



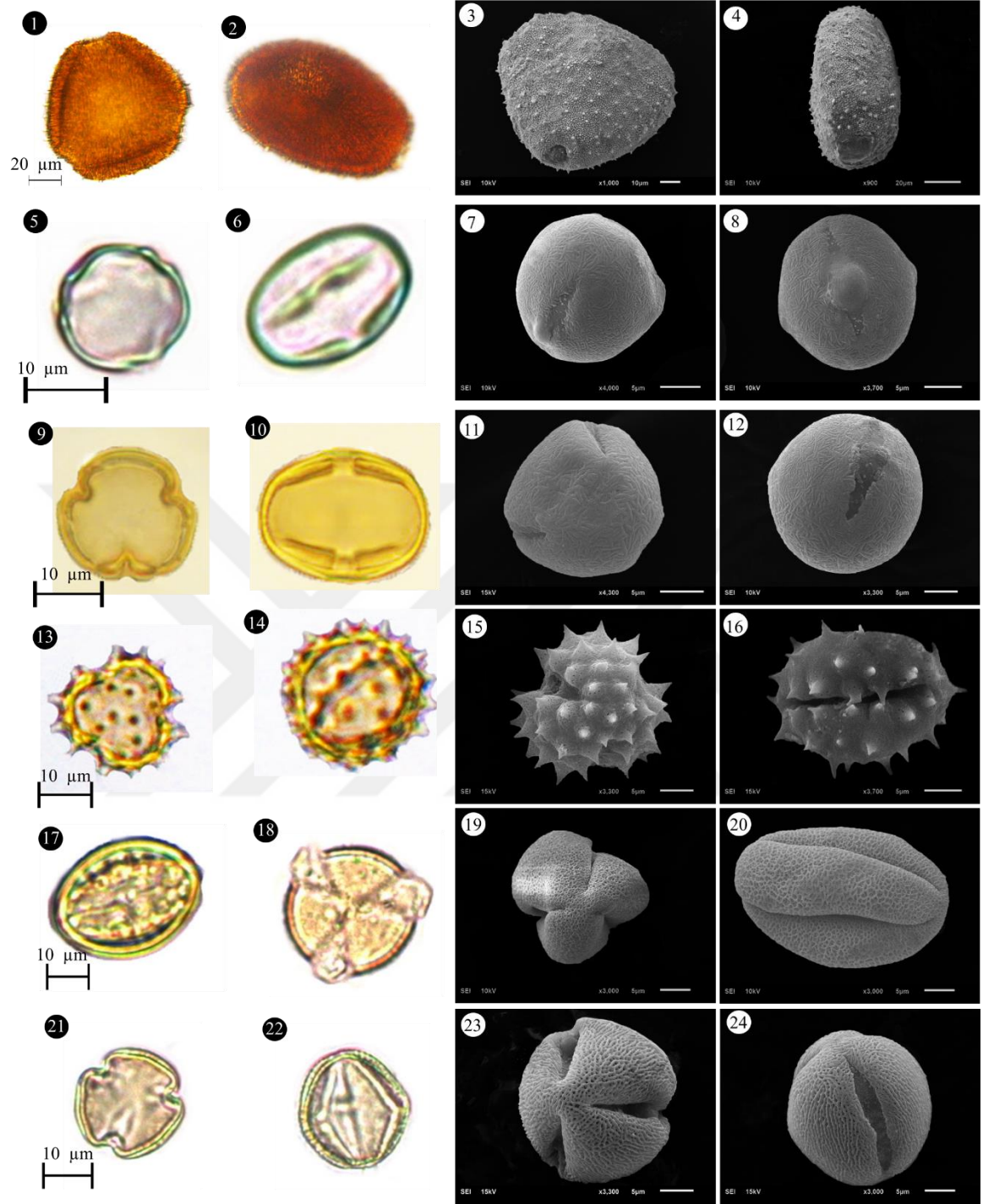
Şekil 4.18. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Lathyrus roseus*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Melilotus officinalis*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Mentha longifolia*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Nonea versicolor*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E; 17-20 *Onobrychis altissima*; IM :17P, 18E; SEM: 19P, 20E; 21-24 *Papaver lateritium*; IM :19P, 20E; SEM: 21P, 22E.



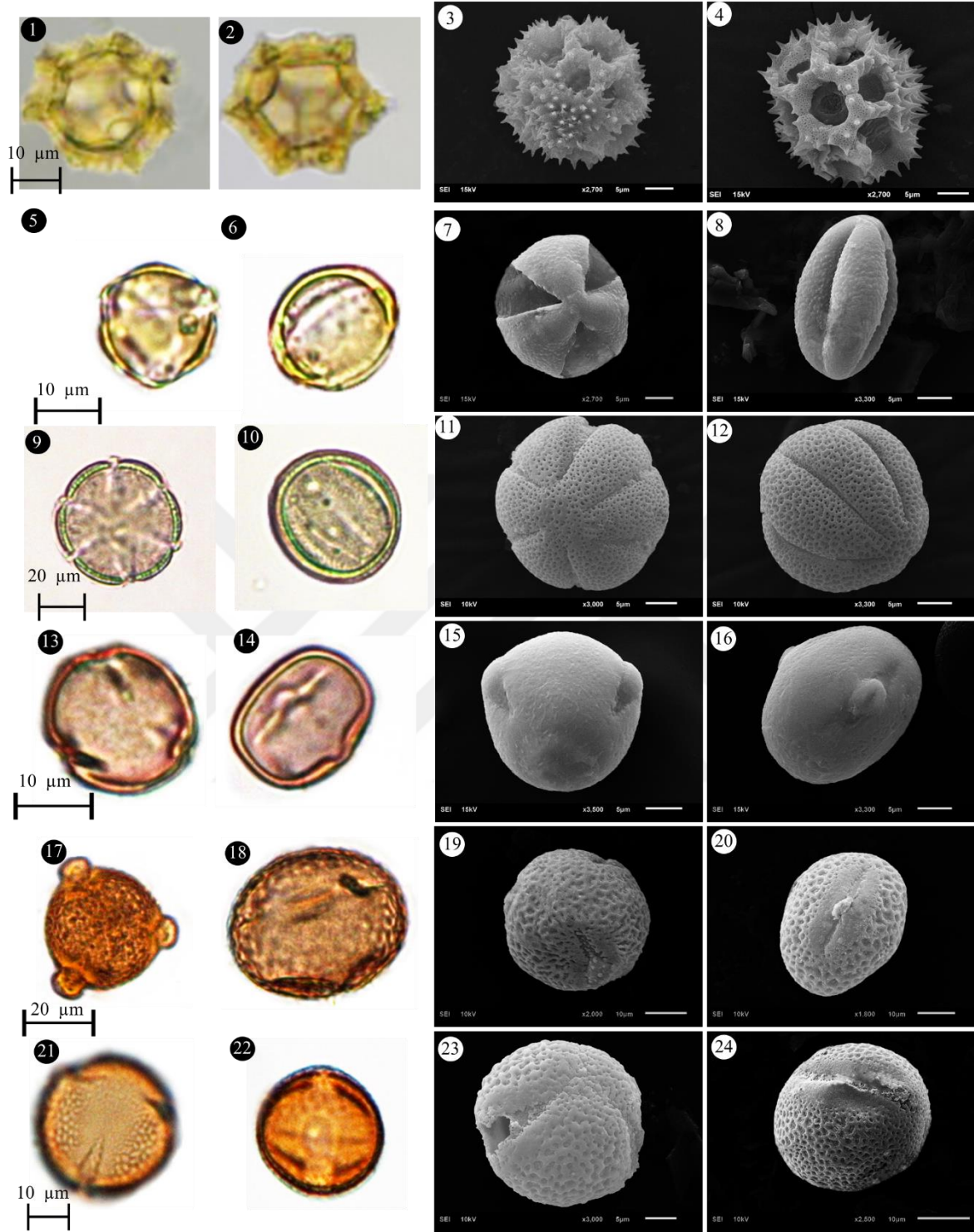
Şekil 4.19. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren **ve** bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Phedimus spurius*; **IM** :1P, 2E; **SEM**: 3P, 4E; 5-6 *Plantago lanceolata* **IM**: 5P-E; **SEM**:16P-E; 7-10 *Polygonum alpinum*; **IM** :5P, 6E; **SEM**: 7P, 8E; 11-14 *Polygonum bistorta* subsp. *carneum*; **IM** :11P, 12E; **SEM**: 13P, 14E; 15-18 *Potentilla crantzii*; **IM** :15P, 16E; **SEM**: 17P, 18E; 19-22 *Psephellus pulcherrimus*; **IM** :19P, 20E; **SEM**: 21P, 22E.



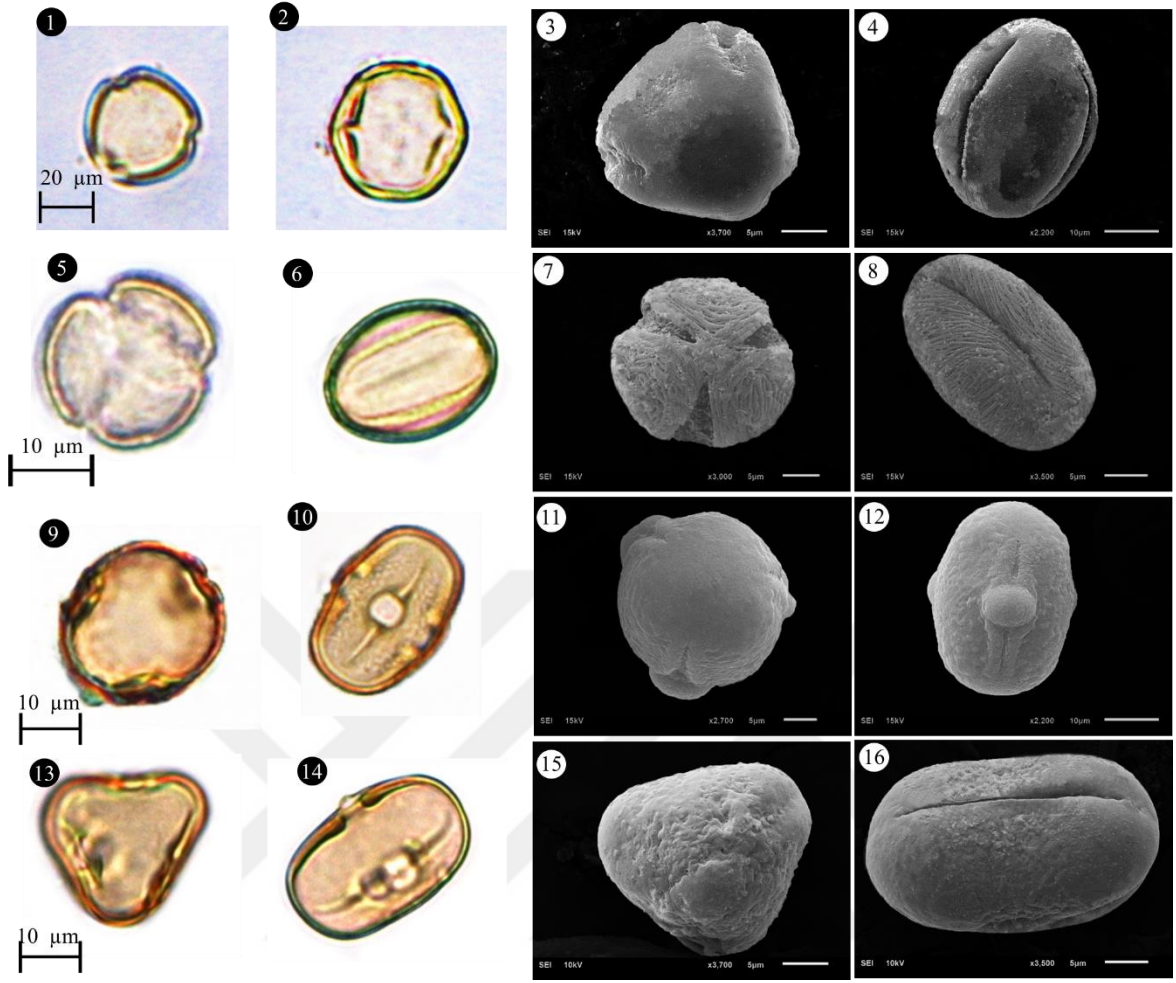
Şekil 4.20. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. **1-4** *Prunus divaricata*; **IM** :1P, 2E; **SEM**: 3P, 4E; **5-8** *Rhododendron caucasicum*; **IM** :5P, 6E; **SEM**: 7P, 8E; **9-12** *Rosa canina*; **IM**: 9P, 10E; **SEM**: 11P, 12E; **13-16** *Rubus idaeus*; **IM** :13P, 14E; **SEM**: 15P, 16E; **17-20** *Rumex alpinus*; **IM** :17P, 18E; **SEM**: 19P, 20E; **21-24** *Salvia verticillata*; **IM** :19P, 20E; **SEM**: 21P, 22E.



Şekil 4.21. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. **1-4** *Scabiosa caucasica*; **IM** :1P, 2E; **SEM**: 3P, 4E; **5-8** *Securigera orientalis* subsp. *orientalis*; **IM** :5P, 6E; **SEM**: 7P, 8E; **9-12** *Securigera varia*; **IM**: 9P, 10E; **SEM**: 11P, 12E; **13-16** *Solidago virgaurea* subsp. *alpestris*; **IM**: 13P, 14E; **SEM**: 15P, 16E; **17-20** *Stachys macrantha*; **IM** :17P, 18E; **SEM**: 19P, 20E; **21-24** *Swertia iberica*; **IM** :19P, 20E; **SEM**: 21P, 22E.



Şekil 4.22. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Taraxacum serotinum*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Teucrium chamaedrys*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Thymus praecox*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Trifolium ambiguum*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E; 17-20 *Trifolium canescens*; IM :17P, 18E; SEM: 19P, 20E; 21-24 *Trifolium pratense*; IM :19P, 20E; SEM: 21P, 22E.



Şekil 4.23. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren ve bal arılarının ziyaret ettiği bazı taksonların polenleri. 1-4 *Trifolium spadiceum*; IM :1P, 2E; SEM: 3P, 4E; 5-8 *Trollius ranunculinus*; IM :5P, 6E; SEM: 7P, 8E; 9-12 *Vicia balansae*; IM: 9P, 10E; SEM: 11P, 12E; 13-16 *Vicia cracca* subsp. *cracca*; IM :13P, 14E; SEM: 15P, 16E.

Tablo 4.6. Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren bazı çiçekli bitkilerin palinolojik özellikleri.
* İlk kez incelenen taksonlar.

Takson	Polar (µm)	Ekvatorial (µm)	P/E	Polen Şekli	Polen Tipi	Ornamentasyon
<i>Ajuga orientalis</i>	23.47±2.32	19.04 ±1.30	1.23	Prolat	Trikolpat	Tekta granulat
<i>Anemone narcissiflora</i>	25.91±1.83	21.70 ±2.10	1.19	Prolat	Trikolpat	Mikroekinat, perforat
<i>Arabis hirsuta</i>	21.38 ±1.04	21.37 ±1.30	1.00	Sferoidal	Trikolpat	Retikulat
<i>Aster alpinus</i>	19.42±1.58	18.30 ±1.62	1.06	Sferoidal	Trikolparat	Ekinat-perforat
<i>Astragalus fricki</i> *	26.86±1.12	22.29 ±1.15	1.21	Prolat	Trikolparat	Retikulat
<i>Bunias orientalis</i>	22.35 ±1.29	23.71 ±1.66	0.94	Sferoidal	Trikolpat	Retikulat
<i>Carduus adpressus</i>	33.32 ±2.27	35.04 ±2.39	0.95	Sferoidal	Trikolparat	Ekinat
<i>Caltha palustris</i>	27.34 ±2.06	25.71 ±2.84	1.06	Sferoidal	Trikolpat	Mikroekinat, perforat
<i>Campanula alliariifolia</i> *	32.41 ±1.61	33.96 ±1.58	0.95	Sferoidal	Triporat	Ekinat
<i>Campanula glomerata</i>	33.55 ±3.90	34.78 ±3.32	0.96	Sferoidal	Triporat	Rugulat

Tablo 4.6. (Devam)

<i>Campanula olympica</i>	31.11 ±3.04	31.95 ±2.30	0.97	Sferoidal	Triporat	Rugulat-skabrat
<i>Centaurea helenioides</i> *	33.05 ±2.05	32.59 ±1.94	1.01	Sferoidal	Trikolparat	Ekinat
<i>Cephalaria gigantea</i> *	68.02 ±2.12	58.79 ±2.17	1.16	Prolat	Triporat	Mikroekinat-ekinat-perforat
<i>Cirsium pseudopersonata</i> subsp. <i>pseudopersonata</i>	36.91 ±3.11	41.47 ±3.43	0.89	Oblat	Trikolparat	Ekinat
<i>Dianthus carmelitarum</i>	38.92 ±2.31	38.83 ±2.22	1.00	Sferoidal	Pantoporat	Mikroekinat, perforat
<i>Digitalis ferruginea</i> *	20.14 ±1.28	18.26 ±1.40	1.10	Prolat	Trikolporat	mikroretikulat
<i>Echium vulgare</i>	15.76 ±1.11	13.05 ±1.19	1.21	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Epilobium angustifolius</i>	48.65 ±4.74	64.16 ±4.03	0.76	Oblat	Triporat	Mikrogemmat-perforat
<i>Eryngium giganteum</i> *	38.89 ±3.72	19.40 ±2.08	2.00	Prolat	Trikolparat	Verrukat-skabrat
<i>Erysimum pulchellum</i> *	18.43 ±1.73	18.33 ±1.74	1.01	Sferoidal	Triporat	Retikulat
<i>Galium verum</i>	18.81 ±1.99	17.10 ±2.36	1.10	Prolat	Stephanokolpat	Mikroekinat-perforat
<i>Genista albida</i>	25.09 ±3.99	28.83 ±1.88	0.87	Oblat	Trikolporat	Mikroretikulat
<i>Geranium ibericum</i> subsp. <i>jubatum</i> *	92.88 ±4.18	84.79 ±3.67	1.10	Prolat	Trikolporat	Retikulat-klavat
<i>Geranium ponticum</i> *	65.59 ±7.19	60.99 ±6.29	1.08	Prolat	Trikolporat	Retikulat-klavat
<i>Geranium pyrenaicum</i>	56.72 ±2.66	52.55 ±2.19	1.08	Prolat	Trikolporat	Retikulat-klavat
<i>Geum aleppicum</i> *	25.63 ±3.21	22.50 ±2.98	1.14	Prolat	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Hedysarum hedysaroides</i>	20.62 ±1.71	16.22 ±2.16	1.27	Prolat	Trikolpat	Retikulat
<i>Helianthemum nummularium</i> *	36.94 ±4.13	34.7 ±3.92	1.08	Prolat	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Heracleum platytaenium</i>	47.02 ±3.63	21.98 ±2.07	2.14	Prolat	Trikolporat	Mikroretikulat
<i>Lactuca racemosa</i>	29.91 ±3.55	32.93 ±3.68	0.91	Oblat	Trikolporat	Ekinat, mikroretikulat
<i>Lathyrus roseus</i> *	35.87 ±1.97	29.60 ± 2.16	1.21	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Melilotus officinalis</i>	25.06 ±1.20	19.20 ±0.94	1.31	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Mentha longifolia</i>	23.68 ±2.22	21.25 ±1.87	1.11	Prolat	Hekzakolpat	Mikroretikulat
<i>Nonea versicolor</i> *	26.26 ±1.55	22.53 ±2.79	1.17	Prolat	Tetrakolporat	Psilat-perforat
<i>Onobrychis altissima</i>	34.22 ±2.79	20.75 ±2.83	1.65	Prolat	Trikolpat	Supraretikulat
<i>Papaver lateritium</i> *	22.46 ±1.93	17.82 ±3.00	1.26	Prolat	Trikolpat	Retikulat
<i>Phedimus spurius</i>	25.29 ±1.32	19.18 ±1.54	1.32	Prolat	Trizonokolporat	Rugulat-striat
<i>Plantago lanceolata</i>	22.96 ±1.03	22.38 ±1.06	1.03	Sferoidal	Pantoporat	Verrukat, mikroekinat
<i>Polygonum alpinum</i>	30.17 ±1.77	26.90 ±1.98	1.12	Prolat	Trikolpat	Mikroekinat-perforat
<i>Polygonum bistorta</i> subsp. <i>carneum</i>	43.16 ±4.37	32.70 ±3.23	1.32	Prolat	Trikolporat	Mikroekinat-perforat
<i>Potentilla crantzii</i> *	20.60 ±1.45	19.62 ±2.34	1.05	Sferoidal	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Psephellus pulcherrimus</i> *	31.95 ±1.72	31.47 ±1.75	1.02	Sferoidal	Trikolporat	Mikroekinat-perforat
<i>Prunus divaricata</i> *	30.69 ±2.03	27.30 ±2.97	1.12	Prolat	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Rhododendron caucasicum</i> *	57.59 ±5.64	59.10 ±4.51	0.97	Sferoidal	Trikolporat	Verrukat-Rugulat
<i>Rosa canina</i>	24.68 ±2.35	18.60 ±2.08	1.33	Prolat	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Rubus idaeus</i>	21.03 ±1.46	18.10 ±1.69	1.16	Prolat	Trikolporat	Striat-perforat
<i>Rumex alpinus</i>	15.06 ±1.35	13.96 ±1.69	1.08	Prolat	Trikolporat	Mikroekinat-perforat
<i>Salvia verticillata</i>	21.26 ±2.93	19.88 ±2.71	1.07	Prolat	Hekzakolpat	Mikroretikulat-retikulat-biretikulat
<i>Scabiosa caucasica</i>	51.27 ±1.62	92.84 ±1.12	0.55	Oblat	Triporat	Mikroekinat-ekinat-perforat
<i>Securigera orientalis</i> subsp. <i>orientalis</i> *	20.48 ±1.44	17.99 ±1.57	1.14	Prolat	Trikolporat	Rugulat-perforat

Tablo 4.6. (Devam)

<i>Securigera varia</i>	25.20 ±2.19	19.83 ±2.36	1.27	Prolat	Trikolporat	Rugulat-perforat
<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>alpestris</i> *	21.89 ±1.57	22.11 ±1.74	0.99	Sferoidal	Trikolporat	Ekinat-perforat
<i>Stachys macrantha</i> *	30.82 ±3.32	27.17 ±4.01	1.13	Prolat	Trikolpat	Retikulat-perforat
<i>Swertia iberica</i> *	27.60 ±1.36	26.24 ±1.32	1.05	Sferoidal	Trikolporat	Striato-mikroreticulate
<i>Taraxacum serotinum</i>	24.86 ±1.33	24.84 ±1.26	1.00	Sferoidal	Trikolporat	Ekinat-perforat
<i>Teucrium chamaedrys</i> *	23.81 ±2.14	23.81 ±2.26	1.00	Sferoidal	Trikolpat	Verrukat-perforat
<i>Thymus praecox</i>	25.37 ±2.01	27.41 ±2.86	0.93	Oblat	Trikolporat	Biretikulat
<i>Trifolium ambiguum</i> *	24.97 ±1.11	19.60 ±1.28	1.27	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Trifolium canescens</i> *	42.69 ±4.66	35.83 ±4.48	1.19	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Trifolium pratense</i>	36.42 ±3.52	32.41 ±3.29	1.12	Prolat	Trikolporat	Retikulat-perforat
<i>Trifolium spadiceum</i> *	21.74 ±1.87	20.89 ±1.68	1.04	Sferoidal	Trikolporat	Psilat-perforat
<i>Trollius ranunculinus</i>	20.98 ±2.96	20.77 ±3.79	1.01	Sferoidal	Trikolpat	Striat-perforat
<i>Vicia balansae</i> *	34.85 ±1.86	23.90 ±1.72	1.46	Prolat	Trikolporat	Verrukat-perforat
<i>Vicia cracca</i> subsp. <i>cracca</i>	35.47 ±2.40	23.50 ±2.25	1.51	Prolat	Trikolporat	Verrukat-perforat

4.6. Melissopalinoji ve NGS Arasındaki İlişki

Bu başlık altında incelenen üç bal örneğinin melissopalinoji ve NGS bulguları arasındaki benzerlikler ele alınmıştır. Ulaşılan sonuçlar arasında bazı farklılıklar olmasına rağmen, baskın bitkisel bileşenler her iki yöntemde de temel olarak ortaya konmuştur. Ancak her iki yöntemde ulaşılan taksonlar arasında önemli ölçüde oransal farklılık tespit edilmiştir.

NGS analizi ile tüm bal örnekleri için melissopalinojik yöntemle göre %63 daha fazla bitki taksonu tespit edilmiştir. Bazı familyalar her iki yöntemde de tanımlanmış olsa da, diğerleri ya NGS ya da melissopalinojik yöntemle belirlenmiştir.

Toplam melissopalinoji ve NGS'de bulunan bitki taksonların sayısı AB_ZT1 örneğinde 48, AB_ZT2 örneğinde 66, AB_ZT3 örneğinde 50'dir. Familya düzeyinde benzerlik düzeyi %13.6 ile %14.6 arasında, cins düzeyinde %42 ila %50 arasında ve tür düzeyinde %36.4 ile %44 arasında değişmektedir.

Ayrıca, hem melissopalinoji hem de NGS'de ortak bulunan bitki taksonlarının sayısı üç örnekte sırasıyla AB_ZT1'de 4, AB_ZT2'de 8, AB_ZT3'de 6'dır. Bu ortak taksonların familya benzerlik düzeyi %25 ile %50 arasında, cins düzeyinde %50 ile %75 arasında değişmektedir. Fakat mikroskopi analizinde tür düzeyinde ayırım yapılamadığı için, her iki yöntemde ortak tür bulunamamıştır (Tablo 4.7).

Mikroskopi ile Illumina arasındaki benzerlik düzeyi düşük olup mikroskopi ile birçok bitki taksonu familya seviyesinde karakterize edilirken, Illumina ile birçok farklı bitki taksonu tür seviyesinde karakterize edilmiş ve bu da sonuçların farklı çıkmasına neden olmuştur.

Tablo 4.7. İki teknikte tespit edilen taksonların sayısı ve genel benzerlik yüzdesi (familya, cins ve tür düzeyinde) (I: Illumina, M: Melissopalinoji)

		AB_ZT1	AB_ZT2	AB_ZT3
Illumina	Takson (s)	37.0	45.0	42.0
	Familya (%)	8.1	6.7	7.1
	Cins (%)	43.2	42.2	40.5
	Tür (%)	48.6	51.1	52.4
Melissopalinoji	Takson (s)	15.0	29.0	14.0
	Familya (%)	40.0	27.6	42.9
	Cins (%)	53.3	69.0	57.1
	Tür (%)	6.7	3.4	0.0
Toplam I&M	Takson (s)	48.0	66.0	50.0
	Familya (%)	14.6	13.6	14.0
	Cins (%)	47.9	50.0	42.0
	Tür (%)	37.5	36.4	44.0
Ortak I&M	Takson (s)	4	8	6
	Familya (%)	50.0	25.0	33.3
	Cins (%)	50.0	75.0	66.7
	Tür (%)	0.0	0,0	0.0

DNA metabarkodlama veya melissopalinoji için birden fazla cins veya tür kaydedilen 29 bitki familyası bulunmaktadır (Tablo 4.8). Bunlardan üç familyada DNA ve mikroskopi için tespit edilen takson sayısı aynıdır. Ancak, Rosaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae için DNA metabarkodlama ile daha fazla takson tespit edilmiştir. Boraginaceae, Campanulaceae, Cistaceae, Ranunculaceae için ise mikroskopi daha fazla takson tespit etmiştir, ancak bunların her biri sadece bir veya iki polen tanesi tarafından temsil edilmiştir. Hem tür hem cins düzeyinde ayırt edilebilen taksonların oranı DNA metabarkodlama da daha yüksektir. Tüm familyalarda, DNA metabarkodlama 54 takson (familya, cins ve tür düzeyinde) tespit edilirken melissopalinoji de ise 27 takson (familya, cins ve tür düzeyinde) tespit edilmiştir. DNA metabarkodlama kullanılarak tespit edilen 54 taksonun 23'ü cins, 26'sı tür düzeyinde ayırt edebilirken, mikroskopi kullanılarak 27 taksonun 23'ünü cins, sadece 1 tür düzeyinde ayırt edilmiştir (Şekil 4.24). Her iki teknikte ortak olan familya sayısı

(Tablo 4.7). Bu taksonlar her iki yöntemle de bulunmuştur böylece DNA ve mikroskopi arasında %23 uyumluluk sağlamıştır. Familya düzeyinde uyum gösteren taksonlar Asteraceae, Brassicaceae ve Poaceae'dir. Cins düzeyinde benzerlik gösteren taksonlar *Artemisia*, *Centaurea*, *Dianthus*, *Onobrychis*, *Rumex*'dir. Tür düzeyinde benzerlik bulunamamıştır (Tablo 4.8). Ayrıca hem melissopalynoloji hem de illumina da ortak olan familya sayısı 6 (Apiaceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Fabaceae, Lamiaceae ve Rosaceae)'dır (Şekil 4.25).

Tablo 4.8. Bal örneklerinde melissopalynoloji (M), ve Illumina (I) analizi ile tespit edilen bitki taksonları (Toplam polen tanelerinin ve DNA dizilerinin yüzdeleri)

Familya	Takson	AB_ZT1		AB_ZT2		AB_ZT3	
		M	I	M	I	M	I
Apiaceae	Apiaceae	24.81		20.45		1.57	
Apiaceae	<i>Eryngium giganteum</i>		0.03		0.06		0.01
Apiaceae	<i>Heracleum</i>				0.06		
Asteraceae	Asteraceae	33.33	0.05	5.30	0.06	1.57	0.01
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i>				0.17		
Asteraceae	<i>Artemisia</i>	2.30	2.29		0.21		0.12
Asteraceae	<i>Centaurea</i>			3.80	0.23		
Asteraceae	<i>Helianthus</i>			0.80			
Asteraceae	<i>Helianthus tuberosus</i>		0.13		0.06		
Asteraceae	<i>Helichrysum pallasii</i>						0.09
Asteraceae	<i>Lactuca racemosa</i>				0.03		0.02
Asteraceae	<i>Taraxacum</i>			2.30			
Asteraceae	<i>Taraxacum bessarabicum</i>		0.03		0.36		1.23
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i>				0.32		0.12
Betulaceae	<i>Betula litwinowii</i>				0.43		2.47
Boraginaceae	<i>Echium</i>			1.50			
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>						0,03
Boraginaceae	<i>Myosotis</i>	1.60					
Brassicaceae	Brassicaceae	3.88	1.13	16.67	0.35		1.05
Campanulaceae	<i>Campanula</i>	9.30		1.52			
Caryophyllaceae	Caryophyllaceae	3.10				0.79	
Caryophyllaceae	<i>Dianthus</i>		11.20	1.50	1.28		2.19
Chenepodiaceae	Chenepodiaceae			0.76			
Cistaceae	<i>Cistus</i>			2.30			
Cistaceae	<i>Helianthemum</i>	3.10		2.30		4.70	
Cistaceae	<i>Helianthemum nummularium</i>				0.16		

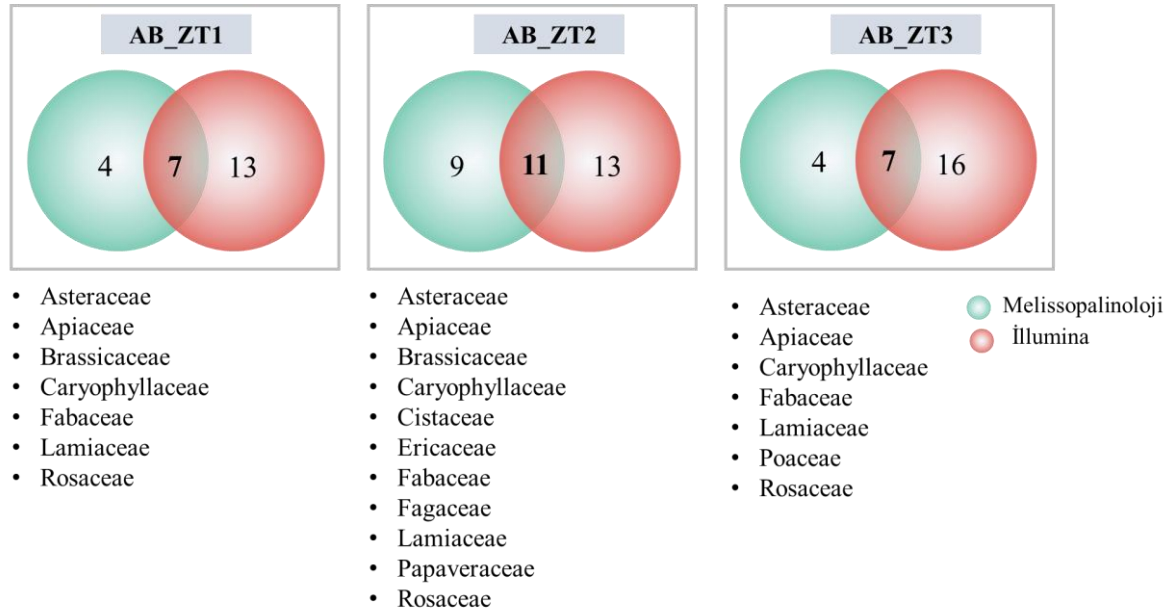
Tablo. 4.8. (Devam)

Convolvulaceae	<i>Calystegia sepium</i>		0.40		0.32		0.15
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>		0.10		0.03		0,07
Cyperaceae	<i>Carex</i>		0.06		0.02		
Ericaceae	<i>Rhododendron</i>			2.30	0.06		
Ericaceae	<i>Vaccinium</i>		1.03		0.88		0.60
Fabaceae	Fabaceae	2.33		3.79			
Fabaceae	<i>Astragalus</i>	3.90		0.80		2.40	
Fabaceae	<i>Astragalus fricki</i>		0.45		59.58		0.28
Fabaceae	<i>Hedysarum</i>	4.70		2.30			
Fabaceae	<i>Hedysarum hedysaroides</i>		0.11		0.03		0.03
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>						0.13
Fabaceae	<i>Melilotus albus</i>		0.05				
Fabaceae	<i>Onobrychis</i>	2.30	0.05	4.50	0.02	0.80	0.03
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>		0.45		0.16		0.13
Fabaceae	<i>Trifolium</i>		0.19	8.30		74.00	0.03
Fabaceae	<i>Vicia</i>			3.00			
Fabaceae	<i>Vicia cracca</i>		0.42		0.02		0.01
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	0.80		0.80			
Fagaceae	<i>Quercus</i>				0.14		0.44
Gentianaceae	<i>Gentiana</i>		0.60				0.05
Geraniaceae	<i>Geranium</i>			0.80			
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i>		0.36		0.86		45.54
Lamiaceae	Lamiaceae			3.03		0.79	
Lamiaceae	<i>Mentha longifolia</i>		0.44		0.06		0.42
Lamiaceae	<i>Salvia</i>	2.30					
Lamiaceae	<i>Salvia verticillata</i>		7.49		8.69		1.82
Lamiaceae	<i>Stachys</i>		0.79				
Lamiaceae	<i>Teucrium chamaedrys</i>		0.13		0.12		0.07
Onagraceae	<i>Epilobium</i>			0.80			
Papaveraceae	<i>Papaver</i>			0.80		0.80	
Papaveraceae	<i>Papaver lateritium</i>				0.11		
Plantaginaceae	<i>Plantago</i>			2.30		4.70	
Poaceae	Poaceae		0.48		0.15	0.79	0.18
Polygonaceae	<i>Polygonum bistorta</i>		0.23				
Polygonaceae	<i>Rumex</i>			0.80	0.17	1.60	0.04
Ranunculaceae	Ranunculaceae			1.52			
Rosaceae	Rosaceae	2.33		4.55		3.15	
Rosaceae	<i>Cotoneaster</i>		2.56		5.75		0.78
Rosaceae	<i>Crataegus</i>		8.26		1.68		0.48
Rosaceae	<i>Potentilla</i>		10.86	0.80	0.55	2.40	2.52
Rosaceae	<i>Potentilla crantzii</i>		46.06		10.45		7.87
Rosaceae	<i>Prunus divaricata</i>				3.57		20.64
Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>		0.05		0.32		2.48

Tablo 4.8. (Devam)

Rosaceae	<i>Sorbus aucuparia</i>				0.94		4.74
Salicaceae	<i>Salix</i>				0.05		0.08
Sapindaceae	<i>Acer</i>		0.03		0.56		0.66
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia</i>		0.30		0.08		0.17
Scrophulariaceae	<i>Verbascum</i>		1.75		0.03		1.66
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i>		0.18				
Thymelaeaceae	<i>Daphne glomerata</i>		1.04		0.76		0.53
Verbenaceae	<i>Verbena</i>		0.10		0.12		0.05

Bitki familyalarının dağılımı tüm bal örneklerinde analiz yöntemine göre değişmektedir. Ayrıca, her iki yöntem de bal örnekleri için baskın bitki familyalarının da farklı olduğu belirlenmiştir. NGS analizinde Asteraceae, Fabaceae ve Rosaceae familyaları dominant ve sekonder familyalar olarak tanımlarken, mikroskopik analizlerde Asteraceae, Apiaceae ve Fabaceae familyaları dominant ve sekonder familyalar olarak tanımlamıştır (Tablo 4.8). Ayrıca, melissopalinojik verinin bulamadığı bazı familyalar (Berberidaceae, Betulaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cyperaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Thymelaeaceae, Verbenaceae), NGS analizinde tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Bu durum, NGS analizinin melissopalinojik analize göre daha detaylı veri sağlayacağını göstermektedir.



Şekil 4.25. Yeni nesil dizileme ve melissopalinojik verilere göre tespit edilen familyaların sayıları

Tez kapsamında incelenen her bir bal örneğinde mikroskopik analiz sonucu elde edilen polen sayıları yüzdesi ile metabarkodlama sonucu eşleşen taksonların yüzdeleri arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman korelasyon katsayıları Tablo 4.9'da verilmiştir. Spearman korelasyon verileri hesaplanırken her bir bal örneği için metabarkodlama sonuçları ITS1, ITS2 ve ITS1&2 ayrı ayrı hesaplanarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, AB_ZT1 ve AB_ZT2 bal örneklerinde hem familya hem takson düzeyinde tanımlanan polen tanelerini göreceli bollukları arasında anlamlı ilişkiler belirlenmiş iken, AB_ZT3 örneğinde hem familya hem de takson düzeyinde anlamlı ilişki görülebilmiştir. Ayrıca ITS1 ve ITS2 barkodlama verilerini kendi aralarında karşılaştırıldığında her üç bal örneğinde hem familya hem de takson düzeyinde anlamlı korelasyon bulunmuştur, (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. İncelenen bal örnekleri arasındaki Spearman's korelasyon katsayı değerleri (Her test için Spearman ρ ve P değerini gösteren sayılar birlikte verilmiştir).

		Familya		Takson	
		Spearman's (ρ)	P-değeri	Spearman's (ρ)	P-değeri
AB_ZT1	Mikroskop ve ITS	0.290	0.100	-0.207	0.071
	Mikroskop ve ITS1	0.359	0.040	-0.234	0.040
	Mikroskop ve ITS2	0.196	0.270	-0.121	0.294
	ITS1 ve ITS2	0.630	0.000	0.620	0.000
AB_ZT2	Mikroskop ve ITS	0.247	0.166	-0.416	0.000
	Mikroskop ve ITS1	0.360	0.040	-0.303	0.007
	Mikroskop ve ITS2	0.059	0.750	-0.352	0.002
	ITS1 ve ITS2	0.483	0.000	0.520	0.000
AB_ZT3	Mikroskop ve ITS	0.080	0.657	-0.175	0.129
	Mikroskop ve ITS1	0.064	0.720	-0.167	0.148
	Mikroskop ve ITS2	0.166	0.360	-0.174	0.125
	ITS1 ve ITS2	0.664	0.000	0.580	0.000

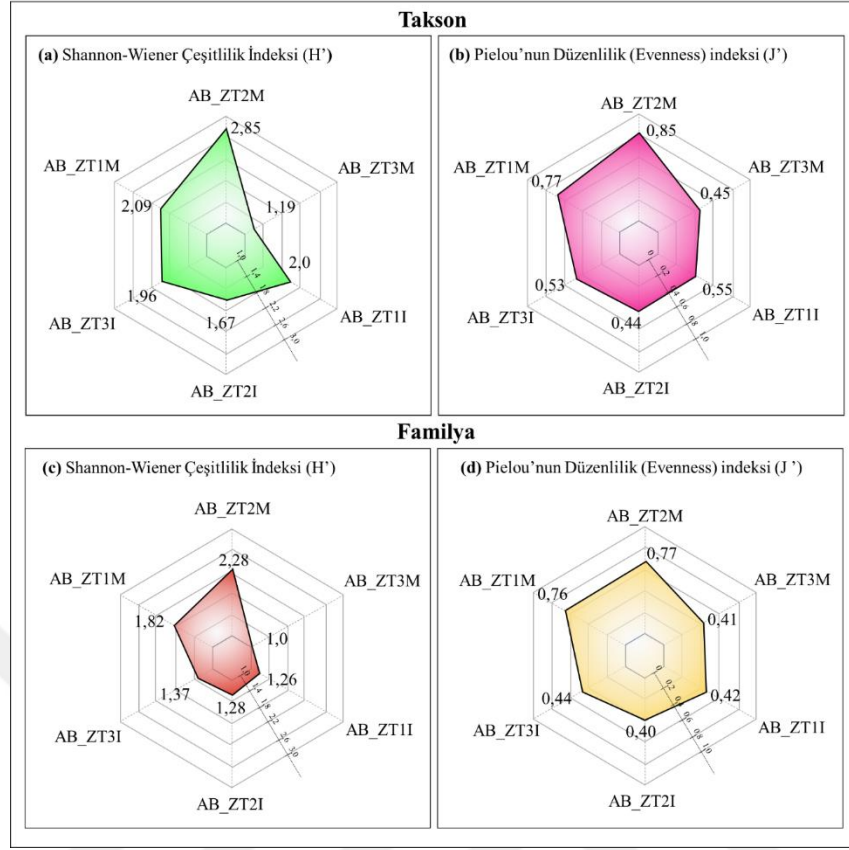
Anzerde üretilen ve tez kapsamında incelenen üç bal örneğine ait polen zenginliği, çeşitliliği ve düzgünlük (homojenlik) endeksleri olan Shannon-Weiner (H'), Pielou'nun Evenness (J') değerleride hesaplanmıştır. Shannon-Weiner indeksi hem takson zenginliğinin hem de takson eşitliğini dikkate alır. Pielou'nun düzgünlük (homojenlik) indeksi ise sayısal olarak eşitliği temsil eder. Eğer J değeri tüm taksonlar eşit sayıda temsil edilirse, bu indeks maksimum değere yani 1'e sahip olur veya yaklaşır.

Anzer bal örnekleri arasında bitki çeşitliliği ve bitkilerin örneklere eşit şekilde dağılıp dağılmadığı karşılaştırılmıştır. Tanımlanan toplam bitki taksonların sayısı, Shannon çeşitlilik indeksi, DNA metabarkodlama ve melissopalinojoloji ile elde edilen verilerin yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Shannon çeşitlilik indeksi, her bal örneği için takson ve aile seviyesinde formülünden hesaplanmıştır. Aynı şekilde Pielou'nun düzgünlük indeksi de her iki teknikle elde edilen veriler formülünden hesaplanmıştır. Sonuçlar 0 ve 1 değeri arasında yer almaktadır.

Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi değerleri göre her iki teknikte (mikroskop ve total ITS lokusu) bal örnekleri arasındaki takson düzeyinde dağılıma bakıldığında 1.19 ile 2.85 arasında değişmektedir. Örneklerden, AB_ZT2M (M: mikroskop) 2.85 değeri ile en yüksek çeşitliliğe (entropi) sahip iken, en düşük değer ise AB_ZT3M örneği 1.19 değeriyle temsil edilmektedir.

Pielou'nun Evenness derecesine göre her iki teknikte (mikroskop ve total ITS lokusu) örnekler arasındaki takson düzeyinde dağılıma bakıldığında 0.44 ile 0.85 arasında değişmektedir. Örneklerden AB_ZT2M örneği 0.85 maksimum değer ile 1'e en yakın değerdir. AB_ZT2I (I: Illumina) ise 0.44 minimum değer ile 1'e en uzak değer olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.26).

Shannon Çeşitlilik İndeksi'nin tür sayısı ve dağılımını dikkate alırken, Pielou Evenness İndeksi'nin türler arasındaki eşitliği ölçmesidir. Evenness komünite içerisinde bulunan taksonların nispi yoğunluğudur. Evenness derecesi yüksek olan komünitede çeşitlilik daha fazladır. Bu iki indeks değeri birbirini destekler nitelikte sonuçlar vermektedir.



Şekil 4.26. Bal örneklerinde Illumina (ITS) ve melissopalinojik verilerine göre, (a,c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indekslerinin takson ve ailya düzeyinde radar dağılımı.

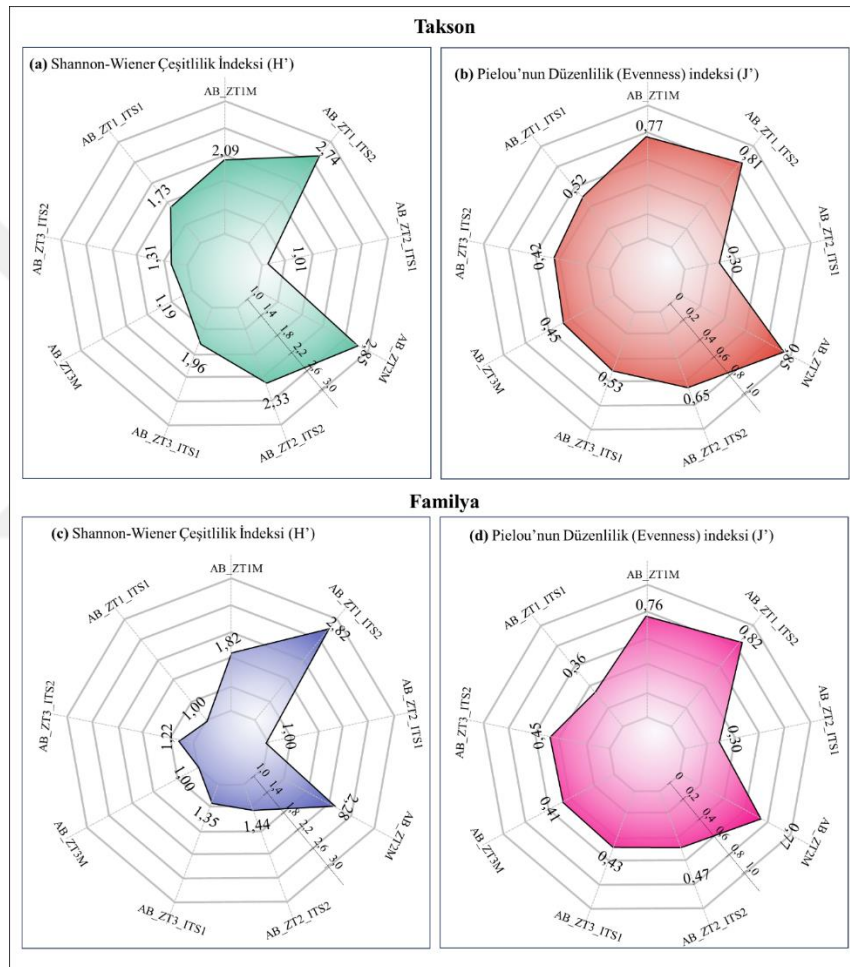
Shannon-Weiner çeşitlilik indeksine göre her iki teknikte (mikroskop ve total ITS lokusu) bal örnekleri arasında, ailya düzeyinde dağılıma bakıldığında 1.01 ile 2.85 arasında değişmektedir. Örneklerden AB_ZT2M 2.85 değeri ile en yüksek çeşitliliğe sahip iken, AB_ZT3M örneği 1.00 değeriyle en düşük çeşitlilikteki bal örneğini temsil edilmektedir (Şekil 4.26).

Pielou'nun Evenness derecesine göre her iki teknikte (mikroskop ve total ITS lokusu) örnekler arasında, ailya düzeyinde dağılıma bakıldığında 0.44 ile 0.77 arasında değişmektedir. AB_ZT2M örneği 0.77 maksimum değer ile 1'e en yakın değerdir. AB_ZT2I ise 0.44 minumum değer ile 1'e en uzak değerdir (Şekil 4.26).

Shannon-Weiner çeşitlilik indeksine göre her iki teknikte (mikroskop ve ITS1/ITS2 lokusları ayrı ayrı değerlendirilmiştir) örnekler arasındaki ailya düzeyinde dağılıma bakıldığında AB_ZT2M örneği 2.28 değeri ile en yüksek çeşitliliğe sahip iken, en düşük

değer ise AB_ZT2_ITS1, AB_ZT2_ITS2, AB_ZT3M örneği 1.00 değeriyle temsil edilmektedir (Şekil 4.27).

Pielou'nun Evenness derecesine göre her iki teknikte (mikroskop ve ITS1/ITS2 lokusları ayrı ayrı değerlendirilmiştir) örnekler arasındaki takson düzeyinde dağılıma bakıldığında AB_ZT1_ITS2 örneği 0.81 maksimum değer ile 1'e en yakın değerdir. AB_ZT2_ITS1 ise 0.30 minimum değer ile 1'e en uzak değerdir (Şekil 4.27).

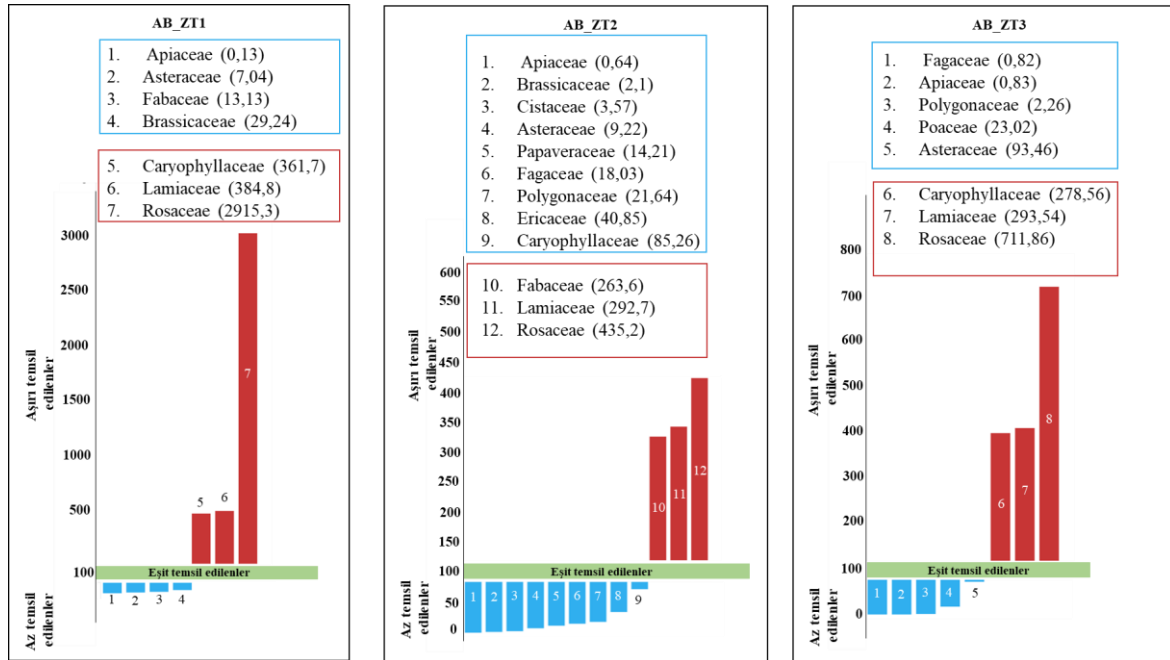


Şekil 4.27. Bal örneklerinde Illumina (ITS1/ITS2) ve melissopalınolojik verilerine göre, (a,c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indekslerinin takson ve ailya düzeyinde radar dağılımı.

Bu tez kapsamında incelenen ballardan hangisinin mikroskopik analize göre metabarkodlama analizinde hangi ailyaların aşırı veya yetersiz temsil edildiğini belirlemek için ailya düzeyinde R katsayıları ayrıca hesaplanmıştır. R katsayısı, belirli bir takson için, metabarkodlama ile göreceli bolluk okuma sayısının yüzdeleri ile mikroskopi

ile çıkarılan göreceli bolluğun yüzdelere bölümüdür. Bu katsayı, aşırı veya yetersiz temsiliyetin örnekler arasındaki varyansını gösterebilir. Hesaplamalar sonucunda Şekil 4.28’de görüldüğü üzere, her üç örnekte R katsayısı, Caryophyllaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rosaceae familyalarının aşırı temsil edilirken, Apiaceae, Asteraceae, Brasicaceae, Ericaceae, Fagaceae, Cistaceae, Papaveraceae, Poaceae, familyalarında ise az temsil edildiği belirlenmiştir.

AB_ZT1 örneğinde Rosaceae (2915.3) için R katsayısı, mikroskopi verilerine göre moleküler verilerde aşırı olarak temsil edildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, Apiaceae (0.13) için R katsayısı, mikroskopi verilerine göre az olarak belirlenmiştir. AB_ZT2 örneğinde ise, Rosaceae (435.2) için R katsayısı mikroskopi verilerine göre moleküler verilerde fazla olarak temsil edilmiştir. Apiaceae (0.64) ise az olarak temsil edilmiştir. Son olarak AB_ZT3 örneğinde de R katsayısı için, Rosaceae (711.86) yüksek oranda temsil edilirken, Fagaceae (0.82) en az olarak temsil edilmektedir. Burada iki familyaya ait verilerin yüzdeleri oranlanıp bulunan R katsayısı için, ideal temsil etme sayısı 100’dür. 100 rakamından uzaklaşmaya göre az ya da aşırı temsil etme durumu söz konusudur. Buna göre en iyi temsil eden familya AB_ZT1’de Brasicaceae (29.24) iken, AB_ZT2’de Caryophyllaceae (85.26), AB_ZT3’de ise Asteraceae (93.46)’dır (Şekil 4. 28).



Şekil 4.28. R katsayısına göre familyaların fazla veya az temsil edilmelerini gösteren sütun grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bal örneklerindeki polen tanelerinin tanımlanması, balın coğrafik ve botanik kökeninin belirlenmesi için kritik öneme sahiptir (131, 274). Bu amaçla kullanılan geleneksel yöntemlerden biri de melissopalinojidir (131). Melissopalinoji bal üretimi sırasında arılar tarafından ziyaret edilen bitkilerin polenlerinin mikroskopik analiz yoluyla belirlenmesini içerir. Yöntemin uzun analiz süresi, kapsamlı bir polen taneleri koleksiyonunun bulunabilirliği ve farklı polen morfolojilerini tanımlamak için uygun beceri ve deneyime sahip uzmanların gereksinimi gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır (2). Bununla birlikte bal örneklerinin botanik kökenini belirlemek için polen tanelerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi hala bir referans yöntemi olarak kullanılmaktadır (132).

Şimdiye kadar, balın botanik ve coğrafik kökenlerini doğru bir şekilde değerlendirmeyi amaçlayan melissopalinoji dışında ileri (yeni) yaklaşımlar birçok çalışmada kullanılmıştır. Bu yaklaşımlar arasında GC-MS, LC-MS, kapiler elektroforez-uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (CE-TOF-MS), matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI-TOF-MS) ve NMR spektroskopisi gibi balda belirli minör bileşiklere odaklanan metodlar sayılabilir (275). Bununla birlikte, uçucu bileşikler, fenolik asitler, şekerler ve diğer bal bileşenlerini içeren kimyasal işaretçilerin değerlendirilmesi, arıcılık teknikleri, çevresel koşullar ve iklim değişiklikleri tarafından etkilenebilir. Bu durum, balın bitkisel kaynağının veya coğrafi kökeninin güvenilir bir şekilde belirlenmesini zorlaştırabilir. (276). Ayrıca, bal arıların bal üretimi için tek bir bitki türünü ziyaret etmemesi nedeniyle polen kökeni açısından çok karmaşık bir matris oluşturur. Buda balın bileşiminde önemli oranda değişkenliğe yol açar. Bu sorunların üstesinden gelmek için polen tanımlaması için DNA belirteçlerinin kullanımı, bal üretiminin dış koşullarından bağımsız yeni alternatif araçlar sunmaktadır. Son yıllarda, polen tanelerinin tanımlanması için NGS (Illumina) analizi alternatif bir yaklaşım olarak önerilmiştir (277).

Bu çalışmada, Anzer (Ballıköy) de üretilen üç farklı bal örneği önce klasik melissopalinojik açıdan ardından DNA metabarkodlama yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışmada ayrıca arazi gözlemlerinden, melissopalinojik analizlerden ve DNA metabarkodlama analizlerinde balda olduğu kesinleşen taksonların palinolojik özellikleri de ilk kez ayrıntılı olarak incelenmiş literatür verileri ile karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında incelenen bal örnekleri takson çeşitliliği bakımından multifloral niteliğine sahip ballar arasında gruplandırılmıştır (121). Bu nedenle örnekler bu tez kapsamında ilk olarak toplam polen tanesi sayısı (TPS) bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar balların geniş bir çeşitliliğe sahip olduğunu multifloral bal özelliklerini taşıdığı görüşünü desteklemektedir (Tablo 4.3). Bu tür ballar yani toplam yüksek polen sayısına ve yüksek bal özütü içeriğine sahip örnekler aynı zamanda NGS analizi içinde uygun ballardır. AB_ZT3 bal örneği diğer ballardan daha yüksek bir TPS'ye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bununla beraber incelenen balların polen spektrumlarına bakıldığında incelenen tüm ballar multifloral bal olması gerekirken AB_ZT3 bal örneğinde *Trifolium*'a (Üçgül) ait polen tanelerinin bulunma yüzdesi %74 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar incelenen AB_ZT3 balının monofloral çiçek balı özelliğinde olduğunu göstermektedir. Bu durum AB_ZT3 balının ya Üçgül bitkisinin çok yoğun olarak yetiştiği bir alanda ve zamanda veya bal arılarının bu bitkiye ait polenlerle beslenerek üretildiği şeklinde yorumlanabilir. Sorkun ve Doğan (1995) (115) Anzer bölgesinde üretilen 28 balda gerçekleştirdikleri melissopalinolojik çalışmada 4 bal örneğinde *Trifolium ambiguum* polenlerine %45 oranında, 6 bal örneğinde *Trifolium* taksonuna ait polenlere %74 oranında rastladıklarını rapor etmişlerdir. Güner ve arkadaşlarının (1987) (255) yapmış oldukları bir çalışmada Rize yöresindeki bal örneklerinden yapılan polen analizinde Fabaceae familyasına ait *Trifolium* polenlerine iki örnekte dominant (<%45) miktarda rastlanmıştır. Louveaux ve arkadaşları (1978) (131) balın %45'ten fazlası bir türden polen içeriyorsa balları monofloral bal olarak sınıflandırmıştır.

Melissopalinolojik verilere göre, incelenen üç bal örneğinde ortak olan familyaların Asteraceae, Apiaceae, Cistaceae, Fabaceae, Rosaceae olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). En yüksek oranın Fabaceae (%74) familyası olduğu ortaya çıkmıştır. Anzer balında ilk melissopalinolojik çalışma Sorkun ve Doğan (1995) tarafından gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada ortaya konan veriler ile mevcut çalışmada ulaşılan verilerle paralellik göstermektedir. Bununla birlikte Sorkun ve Doğan (1995) (115) çalışmasında Anzer ballarında Fabaceae familyası üyeleri, baskın grup olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise incelenen tüm ballarda Fabaceae familyası üyeleri AB_ZT1'de %13.2 oranla minör, AB_ZT2'de %18.9 oranla sekonder miktarda bulunmaktadır (Tablo 4.3). Ancak AB_ZT3'te dominant (%75) miktarda tespit edilmiştir. Fabaceae üyelerinden biri olan *Trifolium*, bal yapımında önemli bir kaynak bitkilerden biri olup Anzer (Ballıköy)'de yaygın olarak bulunmaktadır (115). Yaptığımız çalışmada Anzer'den toplanıp teşhis edilen

taksonlardan 25 tanesi Fabaceae familyasına ait olup bunlardan 4'ü *Trifolium* cinsine ait türlerdir (*T. ambigium*, *T. canescens*, *T. pratense*, ve *T. spadiceum*) (Tablo 4.1). Güner vd. (1987) (255) Rize yöresi ballarında Fabaceae familyasından *Trifolium* cinsine ait 18 tür raporlamıştır. Bu türlerden 5'inin Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösterdiği listelenmiştir. Terzioğlu (1994) (256) yaptığı çalışmada *Trifolium* cinsine ait 6 türün (*T. arvense* L., *T. aureum* Pollich, *T. medium* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. repens* L. ve *T. spadiceum* L.) Anzer'i de içine alan İkizdere havzası için listelenmiştir.

Sorkun ve Doğan (1995) (115) Anzer bölgesinde üretilen 28 bal örneği üzerinde yaptıkları melissopalinojik çalışmada Anzer balını en iyi karakterize eden taksonun *Myosotis* (Boraginaceae) olduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna gerekçe olarak incelenen tüm örneklerde *Myosotis* poleninin az miktarda veya nadir seviyeleri gözlemlenmiş olmasını göstermişlerdir. Mevcut çalışma kapsamında incelenen üç bal örneğinde sadece AB_ZT1 örneğinde eser miktarda *Myosotis* polenine rastlanmıştır. Diğer ballarda *Myosotis* cinsine ait polen gözlemlenmemiştir. Her ne kadar mevcut tez kapsamında yapılan arazi çalışmasında *Myosotis* cinsine ait örnek toplanamamış (Tablo 4.1) olsa da Güner vd. (1987) (255) ve Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme Proje Rapor (2014)'nda (258) bu taksona farklı türler Anzer'den rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada *Myosotis* bitkisinin olmama nedeni aslında arazi sırasında bitki fotoğraflanmış fakat fotoğraftan tür teşhis edilemediği için bu taksonun olmadığı rapor edilmiştir.

Rize yöresine ait 26 bal örneğinin polen analizi gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada en fazla rastlanan polenin Fabaceae familyasına ait *Trifolium* olduğu rapor edilmiştir (255). Aynı çalışmada İkizdere'den alınan bal örneğinde *Trifolium* polenlerinin dominant olarak yer aldığı bununla beraber *Echium*, *Salvia verticillata*, *Rhododendron ponticum* ve Rosaceae taksonlarının minör polen ile temsil edildiği rapor edilmiştir. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar Güner vd. (1987) (255) verileriyle büyük oranda örtüşmektedir.

Tez kapsamında melissopalinojiye alternatif bir yöntem olan NGS ile Anzer'de üretilen üç bal örneği ilk kez analiz edilmiştir. NGS yöntemi ile bal üretiminde yararlanılan bitki türleri daha kesin ve daha düşük taksonomik düzeylerde tespit edilebilir (74, 278). Araştırmacılar ilk olarak bitkiye özgü primerler ve prob kullanarak balın bitkisel bileşimini moleküler teknikler kullanarak analiz etmişlerdir (150). Bununla beraber bugüne kadar DNA tabanlı bu yaklaşımlar yoğun olarak kullanılmadığı için protokoller henüz tam olarak optimize edilmemiştir (205, 209, 211). Mevcut tez çalışması Türkiye'de geleneksel

melisopalinojik çalışmayı yüksek kapasiteli dizi analizi (Illumina) tekniği ile birleştirmeye yönelik ilk kapsamlı çalışmadan biridir.

Bu amaçla, mikroskobik analizden geçmiş ve yüksek toplam polen tanesi sayısına sahip üç bal örneğinden izole edilen yeterli kalitede ve miktardaki total DNA'lar, ITS1 ve ITS2 belirteci kullanılarak çoğaltılmış ve hizmet alımı yolu ile dizinlenmiştir. Yapılan analizler incelenen bal metagenomun ITS1 ve ITS2 etiketli dizilerle eşleşen 251 bp uzunluğunda 350 580 dizilimden oluştuğu bulunmuştur. Bunlardan 260 885 okuma sayısı (%74.4) familya, cins veya tür düzeyinde karakterize edilebilmiştir. Tanımlanan familya, cins veya tür sayısı %65 ile %78 arasında değişmektedir (Tablo 5.1). Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında düşüktür. Bunun birçok nedeni olabilir. Birçok polen metabarkodlama çalışmasında da belirtildiği üzere okumaların ve tanımlamaların daha düşük oranda olma nedenlerinden biri, tek bir lokusun kullanılmasından ziyade birden fazla lokusun kombinasyon halinde kullanılması, daha güvenilir sonuçlar ve daha yüksek taksonomik tanımlama sağladığını göstermiştir (234). Daha fazla gen bölgesi kullanmak, taksonomik çözünürlüğü artırır ancak referans kütüphanesinin oluşturulmasında daha fazla çalışma gerektirir (279). Bir diğer neden ITS bölgesi araştırıldığından dolayı bitkilerle beraber mantarlar da çoğaltıldığı için birlikte dizilenmiş olmasıdır (280). Düşük ihtimal de olsa dizileme hatalarına yol açabilir. Ayrıca ITS1&2 belirteçlerinin okuma sayıları ve takson tanımlamaları açısından karşılaştırıldığında en fazla okuma sayısının AB_ZT3 ait ITS1 barkod belirteci iken, en az okuma sayısının da aynı örneğe ait ITS2 barkod belirteci olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1). Aynı zamanda ITS2 belirteçleri ITS1 belirteçlerine göre daha az okuma sayısına sahiptir. Ama buna rağmen genellikle tespit edilen takson çeşitliliği ITS2'nin daha fazla olduğu ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda ITS2 gen lokusu ITS1'e göre daha yüksek taksonomik çözünürlüğü nedeniyle barkodlamada önerilmiştir (212). ITS2 belirtecinin daha az okuma sayısına sahip olmasının nedenleri muhtemelen primer bölgesi universal çok olmayabilir, mantar oranının yüksek olması ya da izole edilen DNA'nın yeterince saf olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Son olarak üç bal örneğine ait NGS verilerine göre, ITS1 ve ITS2 bölgeleri eşleşen taksonları kıyasladığımızda taksonomik düzeyde birbirleriyle paralellik göstermektedir. Aynı zamanda Spearman korelasyon sonuçları, her üç balda ITS1&2 verileri kendi aralarında değerlendirildiğinde anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Tez çalışmasında Illumina platformunda her bir bal örneğinin ITS1&2 gen lokuslarının ayrı ayrı kalite skorları hesaplanmıştır (Tablo 5.1). Kalite Değeri (QV) her bir bazın doğru okunma olasılığını gösterir. QV, bir DNA dizisinin doğruluğunu ve güvenilirliğini ölçmek için kullanılan bir metriktir. Her bir balın kalite değeri 37 olarak bulunmuştur. Kalite puanı 37 verildiğinde, bunun %99.9 ile %99.99 arasında bir güven aralığında olduğu, yani hatalı olma ihtimalinin 1/1000 ile 1/10 000 arasında olduğu tahmin edilebilir. Kesin değer muhtemelen 1/10 000 hata olasılığına daha yakın bir yerde yer alır. Hawkins (2015) (100) yaptığı benzer çalışmada, on bal örneğinin tamamında okuma sayılarının en az %80'inde Kalite Değeri (QV) 20'den büyük olduğunu ifade etmiştir. Kalite skorunu 28 olarak hesaplamıştır. Bu değer muhtemelen 1/1000 hata olma ihtimalini ifade etmektedir.

Tablo 5.1. Bal örneklerine ait Illumina sonuçlarına göre okuma sayıları ve kalite değerleri.
* Illumina sonuçlarının özetleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Örnek No.	AB_ZT1		AB_ZT2		AB_ZT3	
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
Okuma Sayısı (251 bp)	78 690	10 130	41 055	11 785	113 910	5 315
Okunmayanların Sayısı	25 195	4 070	11 320	6 365	40 575	2 170
Ortalama QV değeri	37	37	37	37	37	37
Toplam Takson Sayısı	29	29	30	37	41	22

İki farklı belirteçten elde edilen aynı bal örneğe ait veriler benzer olmakla birlikte, bitki taksonlarının (familya, cins ve tür düzeyinde) nispi bolluğu önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. Bununla birlikte melissopalinolojik analizde tespit edilen taksonlar (*Campanula*, *Geranium*, *Myosotis*, *Plantago*, *Ranunculaceae* gibi) NGS analizi ile de tam olarak tespit edilememiştir. Hawkins vd. (2015) (102) belirttiği gibi bal oldukça heterojen doğal bir ürün olup, her iki teknikle elde edilen sonuçların farklı olması şaşırtıcı değildir (100). Ayrıca, her iki yöntem için polen tanelerinin elde edilme şeklinin farklı olması sonuçları da önemli ölçüde etkilemektedir. Mevcut çalışmada, melissopalinoloji için başlangıçta 10 g bal örneği kullanılırken, DNA dizilemesi için 50 g bal kullanılmıştır. Aslında tüm bu nedenler çalışmamızda bazı familyaların neden yalnızca bir barkod ile tanımlandığını ve diğerleriyle tanımlanmadığını açıklayabilir. Örneğin, metabarkodlama ile

Campanulaceae, Geraniaceae ve Plantaginaceae familyalarına ait polen tespit edemedi, ancak bu familyalar melissopalinojoloji ile tanımlanmıştır. Bu durum, Illumina platformu için PCR primer bağlanma verimliliğinden veya dizileme uzunluğu sınırlamalarından (~250 bp) kaynaklanıyor olabilir (101).

Yeni nesil dizileme ile elde edilen verilerin farklı taksonomik düzeylerde daha iyi tanımlamalar yapabilmesi için referans veri tabanlarının geliştirilmesi gerekir. DNA metabarkodlama, taksonomik atamalar için kullanılan referans veri tabanının tamlığına ve kalitesine bağlıdır. İdeal referans veri tabanları, belirli bir habitatın tüm taksonlarının tam temsilini, özellikle DNA metabarkodlama amaçları için elle düzenlenmiş ve doğrulanmış referans dizileriyle sağlamalıdır. Bitkiler için, referans dizileme verilerinin en büyük kaynakları, NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) (281), EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) (282) ve DDBJ (Japonya DNA Veri Bankası) (283) gibi depolardır. 32 milyondan fazla damarlı bitki nükleotid dizisi depo edilmiştir, ancak bunların yalnızca bir kısmı DNA barkodlama belirteçlerini temsil etmektedir. Dünya’da yaklaşık 369 400 angiosperm türü olduğu tahmin edilmektedir (284) ve şu anda bu türlerin yaklaşık %25’ine ait standart DNA barkodları kamuya açık veri tabanlarındadır (285). İngiltere’deki tüm çiçekli bitkiler (286) ve Kanada’daki bitkiler (287) için standart DNA barkodları için referans kütüphaneleri derlenmiştir. Diğer ülkelerde de ulusal veri tabanları geliştirme çalışmaları devam etmektedir. BOLD gibi veri tabanları için kalite kontrol standartları yüksek olmakla birlikte, GenBank gibi veritabanları araştırmacıların verileri yüklemelerine bağlı olarak kalite kontrollerini yapar ve yalnızca minimum kontroller gerçekleştirilir. Bu nedenle birçok hatalı dizi bulunmuştur (288). Bu tür veritabanlarını kullanmanın ek bir dezavantajı, yanlış tanımlamalar, tür içi varyasyon, dizileme hataları ve diğer sorunların bu tür depolarda mevcut olması ve bunların kolayca anlaşılamamasıdır. Bu bağlamda, bu ve diğer çalışmalar, DNA metabarkodlama ile klasik melissopalinojoloji tarafından tanımlanan bitki taksonlarının sayısını karşılaştırarak, DNA metabarkodlamanın benzer veya daha yüksek sayıda bitki türünü tespit ettiğini belirlemiştir (72, 101). DNA metabarkodlama daha fazla tür tespit ederken, DNA metabarkodlama ile elde edilen tür atamaları referans veri tabanı ve dizi hatalarından (hatalı dizilerden) etkilenebilir ve sonuç olarak yanlış taksonomik atamalara yol açabilir (7, 72). Tür atamalarının doğruluğu, referans veri tabanına bağlıdır çünkü referans veri tabanında bulunan bitki türleri yalnızca DNA dizilerine atama yapılabilir (4). Bizim çalışmamız da doğru takson eşleşmesi olabilmesi için referans veri tabanının kalitesi önemlidir. Ülkemizde bitkilere ait gen bölgeleri için özelleştirilmiş bir veri tabanı

olmadığından bu çalışmada GenBank veri tabanı kullanılmıştır. Fakat GenBank verilerinde hatalı dizilemeler olabilme ihtimali olduğu için tek tek kontrol edilip bozuk diziler kütüphaneden çıkarılmıştır. Ayrıca örnekleme alanının bilinen bitki türlerinin dağılımlarını kullanarak gerçeklik kontrolü yapmak, ayrımı iyileştirmeye yardımcı olabilir. Ayrıca daha kaliteli sonuçlar elde etmek için BLAST sonuçlarını filtreleyerek yalnızca Anzer (Ballıköy)’de ve yakın coğrafyada bulunan bitkiler kaydedilmiştir ve diğer canlı grupları bilinmeyen olarak listelenmiştir.

Üç bal örneğine ait NGS sonuçları DNA metabarkodlamanın Anzer balının bitki kaynaklarıyla ilgili detaylı bilgi sağlayabileceğini, buna ek olarak bölgesel kökenine dair çıkarımlar yapabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu yöntem arıların kullanabileceği tüm bitki kaynakları hakkında takson düzeyinde bilgi sağlayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, eksik bitki referans veritabanları ve bazı taksonların düşük taksonomik çözünürlüğü nedeniyle, metabarkodlama sonuçlarının yorumlanması farklı belirteçlerden elde edilecek sonuçlarla dikkatli şekilde yapılması gerektirir.

Bu çalışmada Anzer balı ile ilgili elde edilen NGS verileri genel olarak değerlendirildiğinde taksonomik açıdan daha ayrıntılı (tür veya tür altı düzeyde) bir ayırım sunarken, mikroskopi verileri uzman bilgisin yetersizliği veya polen referans kütüphanesinin yetersizliği nedeniyle daha çok familya düzeyinde bir ayırım sağlamaktadır. Örneğin melissopalinolojik verilerde Apiaceae, familya düzeyinde ancak tespit edilebilirken, NGS verilerine göre Apiaceae familyası *Heracleum* ve *Eryngium giganteum* taksonları tanımlanabilmiştir. Bir başka familya olan Rosaceae, melissopalinolojik verilerde sadece *Potentilla* cins düzeyinde ayrımı verirken, NGS verilerinde *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Potentilla crantzii*, *Prunus divaricata*, *Prunus domestica* ve *Sorbus aucuparia* taksonları tespit edilmiştir. Bununla beraber her iki yöntemin dezavantajlı durumlarını minimize etmek için Anzer’den toplanıp teşhis edilen 285 taksondan NGS ve melissopalinolojik analize göre tespit edilen ortak taksonlar ile arazi gözlemlerimiz sırasında bal arılarının en çok ziyaret ettiği taksonların ayrıntılı palinolojik özellikleri tespit edilerek polen referans kütüphanesi zenginleştirilmiştir.

Polen referans kütüphanesi için seçilen 64 taksonun palinolojik özellikleri Tablo 4.6 da ve taksonlara ait polenlerin ışık ve taramalı elektron mikroskopu mikrofotografı Şekil 4.13-4.23 de verilmiştir. Tablo 4.6 da verilen 64 taksondan 27’ sine ait palinolojik özellikleri ilk defa bu tez çalışmasında belirlenmiştir. Ayrıca Anzer’de yayılışı olan bu 64 taksonun

palinolojik özellikleri toplanan örnekler üzerinde yine bu tez çalışmasında ilk kez çalışılmış ve ilerde yapılacak polen referans kütüphanesi çalışmalarına katkı sağlanmıştır. Anzer' de yapılan arazi çalışmalarında Apiaceae familyasına ait *Eryngium giganteum* en fazla rastlanan taksonlardan biri olmasına rağmen melissopalinojik verilerde bu takson belirlenemezken, NGS ile belirlenmiştir. Bununla beraber melissopalinojik verilere göre Apiaceae familyasına ait polenler sekonder miktarda polen ile incelenen bal örneklerinde temsil edilmektedir. Bunun nedeni her iki yöntemde de tür düzeyinde bir ayrıma yetecek verinin eksikliğidir. Tez kapsamında *Eryngium giganteum* ayrıntılı polen özellikleri, SEM, IM görüntüleri çalışılarak melissopalinojik verilere için önemli bir altlık/katkı sağlanmıştır (Tablo 4.6). Apiaceae ailesinden palinolojik özellikleri çalışılan bir diğer takson *Heracleum platytaenium*' dur. Bu türün palinolojik özellikleri Ecevit ve Genç (2014) (289) tarafından daha önce incelenmesine rağmen, türün SEM ve ışık mikrofotografı çekilerek ilerde oluşturulacak polen kütüphanesine katkı sağlanmıştır.

Tez kapsamında Anzer'den toplanıp palinolojik özellikleri ilk kez çalışılan Asteraceae üyeleri arasında *Centaurea helenioides*, *Psephellus pulcherrimus* ve *Solidago virgaurea* subsp. *alpestris* taksonları yer almaktadır. Bu taksonlar hem melissopalinojik hem de NGS analizlerinde bal örneklerinde belirlenememiştir. Bunun nedeni bu taksonlara ait hem DNA barkodlama verisinin referans kütüphanesinde eksik olmasından hem de polenleri tür düzeyinde tanımlayacak verinin eksik olmasından kaynaklanmaktadır. Tez kapsamında palinolojik özellikleri incelenen diğer Asteraceae üyeleri *Carduus adpressus* ve *Cirsium pseudopersonata* subsp. *pseudopersonata* taksonlarıdır. *Carduus adpressus* taksonu Köstekci (2016) (290), *Cirsium pseudopersonata* subsp. *pseudopersonata* taksonunun ise Bak ve Özcan (2018) (291) tarafından palinolojik açıdan çalışılmış mevcut çalışmaya benzer sonuçlar rapor etmiştir. Bununla birlikte bu taksonlara ait veriler NGS referans kütüphanesinde olmadığı için NGS ile bu türlerin balda olup olmadığı belirlenememiştir.

Boraginaceae familyasına ait *Echium vulgare* taksonu her iki analiz sonucuna göre balda belirlenebilmiştir. Elde edilen veriler Liu vd. (2010) (292) tarafından yapılan palinolojik çalışmalarında ornamentasyon hariç diğer veriler örtüşmektedir. Liu, ornamentasyonu rugulat olarak değerlendirirken, mevcut çalışmada perforat olarak rapor edilmiştir. Bu familyaya ait diğer bir çalışılan takson *Nonea versicolor*'dur. Hem melissopalinoji verilerinde hem de NGS verilerinde bu taksonlar belirlenememiştir. Bunun

nedeni olarak Hawkins vd. (2015) (100) belirttiği gibi Boraginaceae ailesi üyelerini polen metabarkodlama ile tanımlamanın zor olmasından kaynaklanabilir. Bununla beraber literatürde bu türe ait detaylı bir polen morfolojisinin olmaması bir diğer sebep olarak düşünülebilir. Bu tez kapsamında bu türün IM ve SEM mikrografları çekilmiş ve polen özellikleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Böylece ileride yapılacak çalışmalar için altlık oluşturmaya katkı sağlanmıştır.

Brassicaceae ailesi, hem melissopalinojide hem de NGS verilerine göre familya düzeyinde tespit edilmiş olmasına rağmen daha alt düzeylerde bir ayrıma gidilememiştir. Ancak bu tez kapsamında bu aileye ait üç taksonun polen özellikleri Anzer den toplanan örneklerden elde edilen polenlere dayalı olarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bunlardan *Erysimum pulchellum* türünün polen özellikleri ile ilgili IM ve SEM mikrofotoğrafları bu tez kapsamında ilk defa çalışılmıştır. Bununla beraber ailenin bir diğer üyesi olan *Bunias orientalis*'a ait veriler PalDat verileri ile palinolojik açıdan karşılaştırılmış ve ülkemizden toplanan örneğe dayalı olarak karşılaştırılmıştır. PalDat'a göre prolat olan polen şekli oblat olarak yeniden düzenlenmiştir. Bu tezde incelenen bir diğer Brassicaceae üyesi *Arabis hirsuta* olup palinolojik özellikleri Mutlu ve Erik (2012) (293) ile oldukça benzer olduğu belirlenmiştir.

Farklı çalışmalarda Anzer (Ballıköy)'de oldukça fazla *Campanula* taksonuna ait türlere raporlanmıştır (255, 256, 258). Bu tez kapsamında farklı dönemlerde yapılan arazi çalışmalarında *Campanula* cinsine ait *C. alliariifolia*, *C. aucheri*, *C. glomerata* *C. lactiflora* *C. olympica* olmak üzere 5 tür tespit edilmiştir. Melissopalinojide ve NGS verileri karşılaştırıldığında bu cinse ait sadece melissopalinojide verilerde minör miktarda bu cinse ait polene rastlanmıştır. NGS verilerinde tanımlanamama nedeni, Anzer'de toplanan taksonlara ait sekansların GenBank veri tabanında olmamasından kaynaklı olabilir. Bu tezde Anzer'den toplanan üç *Campanula* taksonunun polen morfolojileri ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Bunlardan *C. alliariifolia* türüne ait polen özellikleri ilk defa çalışılmıştır. Bununla beraber polen morfolojileri daha önceden de çalışılmış olan *C. glomerata* ve *C. olympica*'ya ait ayrıntılı polen özellikleri ve IM ve SEM mikrografları bu çalışmada da Tablo 4.6'da verilmiştir. *C. olympica* taksonu Erkara vd., (294) *C. glomerata* Khansari vd. (295) tarafından polen morfolojileri çalışılmış ekzin yapısı haricinde diğer özellikler benzer görülmüştür. Bu çalışmalarda *C. glomerata* taksonunda ekzin yapısı granulat-skabrat *C. olympica* taksonunda ise rugulat-skabrat olduğu rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada ise tüm

Campanula taksonlarında yüzey yapılarının çok fazla değişmediği, mikroekinat ve mikoretikulat olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan NGS’de bu taksonun belirlenememiş olması referans veri tabanında *C. olympica*, *C. alliariifolia* taksonlarına ait ITS barkod bölgesinin çalışılmamış olmasından kaynaklanmaktadır.

Caprifoliaceae familyasına ait *Scabiosa* ve *Cephalaria* taksonlarına ait bireylerin bal arıları tarafından oldukça fazla ziyaret edildiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber bu taksonlara ait verilerin hem melissopalinojik hem de NGS referans kütüphanesinde eksik olması her iki türün tez kapsamında belirlenememişiyle sonuçlanmıştır. Bu nedenle *Cephalaria gigantea* taksonuna ait palinojik özellikler ilk kez bu çalışma ile incelenerek referans veri tabanı zenginleştirilmiştir. Bununla beraber daha önce çalışılmış olan *Scabiosa caucasica* (296) türünün palinojik özelliklerine önemli katkılarda da bulunulmuştur.

Caryophyllaceae familyasına ait *Dianthus* cinsi hem melissopalinojik hem de NGS verilerine göre incelenen bal örneklerinde tespit edilmiştir. Bununla beraber Anzer’de yapılan arazi çalışmalarda sadece *D. carmelitarum* taksonu toplanılmış ve palinojik açıdan çalışılmıştır. Bu taksonun tespit edilen palinojik özellikleri Mete vd. (2021) (297) tarafından ortaya konan veriler ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Cistaceae familyasına ait taksonlardan *Helianthemum*, hem melissopalinoji hem de NGS verilerinde tespit edilen diğer bir taksondur. Bununla beraber Illumina sonuçlarında tür seviyesinde (*Helianthemum nummularium*) eşleşme sağlanmıştır. Cistaceae ailesine ait *Cistus* polenleri metabarkodlama ile tespit edilememiş, ancak bu takson melissopalinoji ile belirlenmiştir. Richardson (2015) (101) yaptığı çalışmada, bu durumun Illumina platformu için PCR primer bağlama verimliliğinden veya dizileme uzunluğu kaynaklanabildiğini ifade etmiştir.

Arazi çalışmalarında yaptığımız gözlemlerde bal arılarının sıklıkla ziyaret ettiğini tespit ettiğimiz bir diğer takson Crassulaceae familyasına ait *Phedimus spurius*’tur. Ancak her iki teknik sonucunda bu taksona rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu taksona ait ayrıntılı palinojik veriler bu tezde çalışılarak referans kütüphanesine katkıda bulunulmuştur. Yapılan tespitler daha önce yapılan bir çalışmada (298) ortaya konan verilerle örtüşmektedir.

Anzer’de arıların fazlaca ziyaret ettiği bir diğer takson Ericaceae familyasına ait *Rhododendron caucasicum*’dur. Melissopalinojide cins düzeyinde bu taksona ait veri yer alırken NGS verilerinde tür (*Rhododendron caucasicum*) düzeyinde eşleşme sağlanmıştır. Her iki teknikten elde edilen verilerde yer alan bu taksonla ilgili Özkök vd. (2022)’de (299)

yaptıkları çalışmada bazı polen özellikleri ve IM mikrofotografları rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada ise IM mikrofotografları yanı sıra SEM mikrofotografları da Şekil 4.20’de kaydedilmiştir.

Her iki teknikte en fazla tespit edilen familyalardan biri Fabaceae’dir. Bu taksona ait üyelerin melissopalinojik verilerde familya ve cins düzeyinde tanımlanırken, NGS verilerinde hem cins hem de tür düzeyinde tanımlamalar gerçekleşmiştir. Bu familya üyeleri aynı zamanda bal arılarının en çok ziyaret ettiği bitkileri barındırdığı arazi çalışmaları ile tespit edilmiştir. Floristik çalışmalarda bu aileye ait toplamda 29 bitki toplanmış, 24 tür ve alttür teşhis edilmiştir. Bu taksonlardan her iki teknikte en çok belirlenenlerden 12 taksonun palinojik verileri bu tezde belirlenmiştir. Bu taksondan 6’si (*Astragalus*, *Hedysarum*, *Onobrychis*, *Trifolium* ve *Vicia*) her iki teknikte ortak tespit edilen türlerdir. NGS’de ise ortak taksona ilave olarak *Melilotus* cinsi ayrıca tanımlanmıştır. Bunların dışında kalan (*Genista albida*, *Lathyrus roseus*, *Securigera orientalis* ve *Securigera varia*) taksonların palinojik özellikleri bu tez kapsamında ilk kez tespit edilmiştir. Özellikle bal arılarının ziyaret ettiği ve benzer çalışmalarda (115, 255) yer alan *Trifolium*’a ait 4 türün ve *Vicia*’ya ait 2 türün polen morfolojileri de ilave olarak çalışılmıştır. Polen çalışmaları gerçekleştirilen 12 taksondan *Astragalus fricki*, *Lathyrus roseus*, *Securigera orientalis* subsp. *orientalis*, *Trifolium ambiguum*, *Trifolium canescens*, *Trifolium spadiceum* ve *Vicia balansae* taksonlarının IM ve SEM mikrofotografları ile polen özellikleri ilk kez Tablo 4.6’da verilmiştir. Bu taksonlardan *Melilotus officinalis*, *Securigera varia*, *Trifolium pratense*, ve *Vicia cracca*’ya ait palinojik özellikleri ve SEM, IM mikrofotografları PalDat verilerinde yer almaktadır. Bu veriler incelendiğinde mevcut verilerle örtüşmektedir. Bu aileye ait diğer taksonlardan *Hedysarum hedysaroides* ve *Securigera varia* ile ilgili yapılan polen çalışmalarında sadece polen şekillerinde farklılıklar rapor edilmiştir. Hem *Securigera varia* ile yapılan bir çalışmada (300) hem de *Hedysarum hedysaroides* yapılan bir çalışmada (301) polen özellikleri mevcut çalışmayla benzerlik göstermiştir. *Genista albida* taksonu İşgör (2006) (302), *Onobrychis altissima* taksonunun ise Talebi vd. (2020) (305) tarafından palinojik açıdan çalışılmış mevcut çalışmaya benzer sonuçlar rapor etmiştir. Koçyiğit vd. yaptığı çalışmada bazı *Trifolium* taksonlarının polen karakterleri ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada yer alan ve bizim çalışmamızda da olan *T. pratense* ile ilgili polen sonuçları paralellik göstermektedir.

Arazi çalışmalarında sıkça bal arılarının ziyaret ettiği bir diğer takson ise Gentianaceae familyasına ait *Swertia iberica*'dır. Bu türe ait palinolojik çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez polen morfolojisi hakkında bilgiler bu tezde rapor edilmiştir. Bununla beraber NGS verilerinde Gentianeceae familyasına ait okuma sayısı mevcuttur fakat bu türün GenBank veri tabanında çalışılmış herhangi bir barkod belirteci olmadığı için yakın cinslerin DNA dizisiyle eşleşmiş olabilir.

Geraniaceae familyasına ait *Geranium* cinsi melissopalinooloji verilerinde eser miktarda tanımlanmış olup NGS verilerinde yer almamıştır. Polen referans kütüphanesi için belirlenen ve araziden toplanan bu cinse ait üç taksonun polen özellikleri ele alınmıştır. Ayrıca arazi gözlemlerimiz sonucunda bal arılarının *Geranium* taksonlarını ziyaret ettiğini tespit edilmiştir. Bunlardan *Geranium ibericum* subsp. *jubatum* ve *G. ponticum* türüne ait literatürde bir palinolojik çalışmaya rastlanmamıştır. Deniz vd. (2011) (304) yaptığı palinolojik çalışmada *Geranium* cinsine ait türlerin polen özelliklerini ortaya koymuştur. Yaptığımız çalışma ile kıyaslandığında cins düzeyinde veriler benzerlik göstermektedir.

Tez kapsamında Anzer'den toplanan Lamiaceae familyasına ait 6 taksonun ayrıntılı palinolojik özellikleri ortaya koyulmuştur. Bu taksonlardan sadece *Salvia* hem melissopalinooloji hem de NGS sonuçlarında yer almıştır. Melissopalinoolojide *Salvia* dışında kalanlar familya düzeyinde olup cins veya tür düzeyinde belirlenememiştir. Bunun nedeni elimizde o bölgeye ait polen referans veri tabanının olmamasından kaynaklıdır. Sadece NGS de tanımlanan *Salvia* ile birlikte *Mentha*, *Stachys*, *Teucrium* üyelerine ait taksonların palinolojik özellikleri ve (IM ve SEM) mikrografları detaylı şekilde verilmiştir. Bu taksonların haricinde *Ajuga orientalis* ve *Thymus praecox* taksonlarının polen morfolojileri de verilmiştir. Lamiaceae familyasına ait *Stachys macrantha* taksonunun ilk kez polen morfolojisi bu tezde ortaya koyulmuştur. Anzer'de arazi çalışmalarında yaptığımız gözlemler bal arıların oldukça fazla ziyaret ettiği *Stachys macrantha* iki teknikte de belirlenememiştir. Fakat NGS verilerinde *Stachys* cins düzeyinde tanımlanmış olup tür düzeyinde tanımlama yapılamamıştır. Bunun nedeni GenBank referans veri tabanında bu türe ait ITS barkod bölgesi olmamasından kaynaklı olabilir. *Ajuga orientalis* taksonu Köse vd. (2011) (305) ve *Mentha longifolia* taksonunun ise Çelenk vd. (2007) (306) tarafından palinolojik açıdan çalışılmış mevcut çalışmaya benzer sonuçlar rapor etmiştir. Özler ve arkadaşları (2011) (307) yaptıkları polen morfoloji çalışmasında *Salvia* cinsine ait bazı türlerin polen tanelerini incelenmiştir. Bizim çalışmamızla ortak olan *Salvia verticillata*

polen özellikleri değerlendirilmiş benzer sonuçlar elde edilmiştir. Melissopalinojik verilerde cins düzeyinde tanımlanan bu takson, NGS verilerinde tür düzeyinde tanımlanmıştır. Eğer polen referans veri tabanı önceden sahip olunsaydı, melissopalinojik verilerde *Salvia* tür düzeyinde tanımlanabilirdi. Özaltan ve Koçyiğit yaptığı bir çalışmada (2022) (308), *Teucrium chamaedrys* subsp. *syspirense* taksonun polen özelliklerini değerlendirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda yer alan *Teucrium chamaedrys* ve *Thymus praecox* taksonuna ait polen özellikleri PalDat 3.4 yer almaktadır. Verilerin birbiriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Her iki teknikle yapılan çalışmada elde edilen verilerde ortak çıkan taksonlardan bir diğeri Papaveraceae ailesine ait *Papaver*'dir. Melissopalinojik verilerde bu takson cins düzeyinde tanımlanırken, NGS verilerinde tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Arazide de toplanmış olup NGS sonuçlarında belirlenen *Papaver lateritium* taksonuyla ilgili herhangi bir palinojik çalışmaya rastlanmamıştır. Polen özellikleri ve polen görüntüleri (IM ve SEM) ilk defa bu tezde verilmiştir.

Bal arılarının oldukça fazla ziyaret ettiği bir diğerk takson Onagraceae familyasına ait *Epilobium angustifolium* (*Chamanerion angustifolium*)'dır. Bu taksonun polenleri metabarkodlama ile tespit edilememiş, ancak bu takson cins düzeyinde melissopalinojide analizi ile belirlenmiştir. Bu bitki taksonunun moleküler olarak tanımlanamamasının bir nedeni, dizilerin karşılaştırıldığı referans veri tabanında bu türe ait veri olmamasıdır.

Tez kapsamında Plantaginaceae familyasına ait iki türün polen morfolojileri Anzer'den toplanmış örnekler üzerinden incelenmiştir. Bunlardan *Digitalis ferruginea* ile ilgili polen özellikleri ve mikroskop (SEM ve IM) görüntüleri ilk kez rapor bu tezde rapor edilmiştir. Diğerk bir takson olan *Plantago* cinsi, melissopalinojide verilerinde eser miktarda bulunurken, NGS verilerinde belirlenememiştir. Anzer'de toplanan *Plantago lanceolata* taksonu Mohsenzadeh vd. (2020) (309) tarafından polen morfolojisi belirlenmiş olup mevcut çalışmayla benzer sonuçlar rapor edilmiştir.

Polygonaceae familyasına ait *Polygonum* ve *Rumex* cinsleri, arazi çalışmalarında bal arılarının ziyaret ettiği bitki gruplarındandır. Ayrıca melissopalinojide ve Illumina bulgularımızda bu taksonlar belirlenmiştir. *Polygonum* ve *Rumex* taksonu melissopalinojide cins düzeyinde belirlenmiş olup NGS verilerinde tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tez kapsamında Anzer'de arazi çalışmalarında toplanan *Polygonum alpinum* (*Acanogonon alpinum*), *Polygonum bistorta* (*Bistorta carnea*) ve *Rumex alpinus*

taksonları ile ilgili Başer vd. (2022) (310) yaptıkları çalışmada her birine ait polen morfolojileri, IM ve SEM ile detaylı bir şekilde incelenmiştir. Benzer palinolojik sonuçlar elde edilmiştir.

Anzer (Ballıköy)'de sıklıkla yayılış gösteren birçok üyesi olan bir diğer familya Ranunculaceae'dir. Melissopalinojik verilerde Ranunculaceae familya üyelerine rastlanmış fakat daha alt kategorilerde ayırım yapılamamıştır. Illumina verilerinde ise bu aileye ait bir bulguya rastlanmamıştır. Arazi çalışmalarında toplanan bu aileye mensup üç taksonun palinolojik özellikleri tez kapsamında incelenmiştir. Bu taksonlar, *Anemone narcissiflora*, *Caltha palustris* ve *Trollius ranunculinus*'dir. *Anemone narcissiflora*, *Caltha palustris* taksonlarına ait palinolojik çalışmalar sadece PalDat'da yer almaktadır. Bu familyaya ait taksonlardan bir diğer takson olan *Trollius ranunculinus*'le ilgili yapılan çalışmada (311) polen özellikleri verilmiştir. Bizim çalışmamızda da elde edilen sonuçlar literatürle uyum içinde olduğu tespit edilmiştir.

Anzer (Ballıköy)'de tür çeşitliliği fazla olan ve bal arılarının sıklıkla ziyaret ettiği bir diğer familya Rosaceae'dir. Farklı dönemlerde gerçekleştirilen arazi çalışmalarında bu aileye ait 9 takson toplanıp teşhis edilmiştir. (Tablo 4.1). Rosaceae, Illumina verilerinde farklı taksonomik seviyelerde (cins ve tür düzeyinde) oldukça fazla okuma oranına sahiptir. Hem melissopalinojik veriler hem de Illumina verilerinde ortak tanımlanan tek takson *Potentilla*'dır. Bu takson Illumina yüksek okuma oranıyla *P. crantzii* türüyle eşleşme göstermiştir. Aynı zamanda tez kapsamında toplanıp teşhis edilen bu türün palinolojik özellikleri ayrıntılı olarak ilk kez çalışılmıştır. Melissopalinojide tür seviyesinde bir tanımlama yapılamamıştır. Muhtemen bu türün olma olasılığı yüksektir. Melissopalinojide belirlenemeyen ama Illumina da yüksek oranda bulunan *Prunus divaricata* taksonuna ait palinolojik çalışma ilk kez gerçekleştirilmiştir. Literatürde de bu taksona ait bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Arazi çalışmalarında arıların oldukça fazla ziyaret ettiği bu ailenin üyelerinden *Geum aleppicum*, *Rosa canina* ve *Rubus idaeus* ile ilgili polen morfolojileri bu tezde ilk kez Anzer'den toplan örnekler üzerinden ortaya konulmuştur. Bununla beraber *Rosa canina* Wrońska-Pilarek (2015) (312) ve *Rubus idaeus* taksonunun ise Lechowicz vd. (2020) (313) tarafından palinolojik açıdan çalışılmış mevcut çalışmaya benzer sonuçlar rapor etmiştir. Melissopalinojik analiz ile Rosaceae üyelerini daha düşük taksonomik düzeyde tanımlama olasılığı polen varyasyonundan dolayı oldukça düşük olduğu belirtilmektedir (314). Mevcut sonuçlar bu durumu desteklemektedir. Bununla beraber bu

tez çalışma ile ortaya konan veriler daha sonra yapılacak hem melissopalinojik hem de NGS analizleri için iyi bir altlık sağlayacaktır.

Tez kapsamında palinojik özellikleri incelenen bir diğer familya Rubiaceae'dir. Arazi çalışmalarında farklı vejetasyon dönemlerinde *Galium verum* taksonuna ait örnekler toplanıp teşhis edilmiştir (Tablo 4.1). İki teknikte elde edilen bulgularda bu taksona ait hiçbir bireye rastlanılmamıştır. Bunun nedenlerinden biri ya polen referans veri tabanının ya da moleküler referans veri tabanının eksikliğinden kaynaklı olabilir. Huysmans vd. (2003) (315) yaptığı polen çalışmasıyla kendi çalışmamız kıyaslandığında benzer sonuçlar görülmektedir.

Tez kapsamında elde edilen melissopalinojik verileri incelendiğinde çoğu takson cins ve tür seviyesinde tayin edilememiştir. Bunun nedeni referans kütüphanesinde yeterli verinin olmadığını göstermektedir. Bu da bize çalıştığımız coğrafik bölgenin hem melissopalinoji hem de Illumina sonuçlarının doğruluğu için referans veritabanlarının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu yüzden arazide toplanan bitkilerin bal arılarının en çok ziyaret ettiği taksonlar, her iki teknikte ortak olarak bulunan taksonlar ve literatür taramaları sonucu elde edilen veriler derlenerek polen referans veri tabanı oluşturma ihtiyacı duyulmuştur. Tez kapsamında Anzer (Ballıköy)'de yayılış gösteren 64 taksonun tür seviyesinde palinojik özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konmuş böylece ileride bu bölgede üretilen ballarda yapılacak melissopalinojik analizlerde bu polen kütüphanesi önemli bir boşluğu dolduracaktır.

Melissopalinoji ve Illumina sonuçları arasında karşılaştırma yapıldığında, her teknikte elde edilen sonuçlar arasında bazı oransal farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıkların olası nedenleri arasında incelenen numunelerden alınan miktar, örneklem sayısı, metodolojik önyargılar, seçilen DNA barkod bölgesi, verilerin işleme sorunları, uzman deneyimi, referans veri tabanlarının doğruluğu ve kapsamı sayılabilir. İki teknikte balın baskın bileşenlerini tespit eder, ancak bazı taksonlar ve bal örneğinde bulunan bu taksonların oranlarında farklılıklar gösterir. Bal oldukça heterojen bir doğal üründür, iki yöntem için belirlenen örnekleme stratejileri farklıdır. DNA izolasyonu için 50 g bal kullanılırken, melissopalinojik analiz için aynı numuneden 10 g bal kullanılmıştır. Hawkins vd. (2015) (100) ve Özkök vd. (2023)'de (240) çalışmalarında benzer durumu ifade etmişlerdir. Bir diğer neden, iki teknikteki veriler karşılaştırıldığında tür düzeyinde bir benzerlik ya da farklılıkları ayırma gidilememektedir. Benzer çalışma olan Hawkins vd. (2015) (100)

birçok bitkiyi mikroskopi ile aile seviyesinde tanımlarken, Illumina yöntemiyle birçok farklı bitki ailesi tür seviyesinde tanımlanmışlar ve bu da sonuçların farklılaşmasına yol açtığını ifade ettiler. DNA yöntemleri daha yüksek bir ayırım gücü sağladığını, bu nedenle sonuçların mikroskopi ile doğrudan karşılaştırılmanın zor olduğunu belirtmişlerdir. Bazı türler, özellikle düşük miktarlarda olanlar, karışık bir örnek amplifiye edildiğinde gözden kaçabilir (316, 317). Bu durum, mevcut çalışmada mikroskopi kullanılarak tek bir polen tanesinden kaydedilen türlerin (*Epilobium*, *Geranium* ve *Castanea sativa*) DNA metabarkodlama kullanılarak tespit edilme olasılığının daha düşük olduğunu göstermektedir. Amplifikasyon ve DNA dizilemesi sırasında oluşan dizilim hataları da örneklerin doğru bir şekilde belirlenmesini sınırlandıracaktır. Bir diğer neden, metabarkodlama için seçilen ITS bölgesi tek başına taksonu tanımlamak için yeterli olmayabilir. Aslında birçok çalışma ITS2 belirteci kullanarak birçok bitki topluluğunun referans veri tabanı ile eşleştirdiğini ortaya koymuştur (7, 101, 234). Bunun yanı sıra polen metabarkodlama çalışmaları, birden fazla belirteç kombinasyonunun, bireysel belirteçlerden daha güvenilir sonuçlar sağladığını rapor etmişlerdir (234, 286).

Melissopalinooloji ve Illumina teknikleri, bal örneklerinde bulunan polenlerin karakterizasyonu için etkili yöntemlerdir (278, 318). Bu tez kapsamında bu teknikler kullanılarak Anzer'de üretilen üç balın bitki profilleri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizler incelenen üç bal örneğini karakterize edilen ortak bitkilerin geniş bir taksonomik yelpazeye sahip olduğunu göstermiştir. Tüm bal örneklerinde tanımlanan 33 aileye ait 77 takson tanımlanmıştır ve her bir bal örneğinde takson sayısı 14 ile 39 arasında değişmektedir. Bununla beraber farklı bal örneklerinde sürekli olarak tespit edilen ortak takson sayısı nispeten azdır. Sıkça rastlanan taksonlar arasında *Astragalus*, *Onobrychis* ve *Potentilla* sayılabilir. Hawkins vd. (2015) (100) melissopalinooloji, Illumina ve 454 pirodizileme olmak üzere üç farklı tekniği kullanarak 7 bal örneğini karşılaştırdığı çalışmada *Taraxacum officinale*, *Trifolium*, *Rubus fruticosus* başta olmak üzere 83 ortak takson tanımlamıştır.

NGS tabanlı polen tanımlamasının doğruluğunu etkileyebilecek çeşitli nedenler bulunmaktadır (279). İlk olarak, primer bölgelerindeki dizi polimorfizmi, bazı bitki türlerinin diğerlerine göre daha az verimli amplifiye olmasına neden olabilir. Başka bir primer bölgesi kullanmak veya SNP pozisyonunda bir dejenere nükleotid içeren bir primer tasarlamak bu sorunu kolayca çözebilir. İkinci olarak, kullanılan ITS dizisine ait verinin veri tabanında yeterli bulunmaması gösterilebilir. Örneğin Anzer bölgesinde de *Swertia iberica*

taksonu bulunmasına rağmen veri tabanında bu bitkiye ait sekans olmadığı için çalışma kapsamında hiçbir bal örneğinde tanımlanamadı. Buna benzer sorunları çözmek için, en önemli adım çalışılan coğrafik bölgede yayılış gösteren türlere ait verilere referans kütüphanesinde yer verilmesidir. Üçüncü olarak, yöntemimizle tespit ettiğimiz DNA, sağlam polenlerden elde edilebildiği gibi, hem sitoplazmik kalıntılardan hem de hücre çeperi parçalarından gelen hasarlı polenlerden kaynaklanabilir. Bundan dolayı mevcut çalışmada izole edilen DNA'nın yeterince saf olmaması ve okuma sayılarının azlığına neden olabilir. Eğer sadece sağlam polenden DNA elde edilmiş olsaydı, nonodropta ölçülen DNA miktarları hem daha yüksek hem de bitkilere ait olan daha saf DNA'lar elde edilebilirdi. Dördüncü olarak, PCR sırasında rastgelelik sonuçları etkileyebilir. Ancak, karışık ampikon deneyimiz sonuçların oldukça tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Son olarak, aynı diziyi içeren okumalar, gerçek tekrarlar yerine PCR tekrarlarını temsil edebilir. Bu durum okuma sayılarının oranını düşürmüş olabilir. Bu sorunlar çözülmüşse ileride okuma sayılarında artışa neden olup daha fazla bitki DNA dizilerin eşleşmesini sağlayacaktır.

Melissopalınoloji kullanarak polen tanelerinin bir karışımdaki oranı ile yeni nesil dizi okumalarının oranı arasındaki ilişkiyi, yani kantifikasyonu araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Ancak farklı çalışma sistemleri ve analiz yöntemlerinden elde edilen sonuçlar, aynı belirteçler kullanıldığında bile çelişkili olmuştur (7, 72, 95, 101, 234, 318). Keller vd. (2015) (7), ITS2 dizileme okumalarının nispi bollukları ile ışık mikroskobu aracılığıyla sayılan polen tanesi bollukları arasında yaklaşık olarak benzer oranlar bulmuştur. Buna karşılık, Richardson vd. (2015) ve Smart vd. (2017) (72, 101), mikroskop tabanlı ve ITS2 metabarkod tabanlı yöntemlerle tanımlanan polen türlerinin nispi bollukları arasında güvenilir bir ilişki bulamamış ve metabarkodlama ile mikroskop tabanlı tanımlamaların karşılaştırılmasında belirli taksonların sürekli olarak aşırı temsil edildiğini veya az temsil edildiğini belirlemiştir. Benzer şekilde mevcut çalışmada mikroskop ve NGS verilerinde tanımlanan bazı polen taksonların nispi bollukları arasında güvenilir bir ilişki bulunamamıştır. R katsayıları hesaplandığında bazı bal örneklerinde Rosaceae ve Lamiaceae familyaları aşırı temsil edilirken, Apiaceae, Asteraceae az temsil edilmiştir. İki teknikte tanımlanan taksonlar niteliksel olarak benzerlik gösterse de, nicel yönden benzer oranlar bulunamamıştır. Buradan da anlaşıldığı üzere tek başına NGS verileriyle bir balın multifloral mi yoksa monofloral mi olduğuna karar verilemez. Bell vd. (2019) (319) gerçekleştirdiği benzer bir diğer çalışmada kontrol altına aldıkları alanlara, tür zenginliği, taksonomik akrabalık ve nadirlik açısından değişen polen karışımları, belirteç olarak *rbcl* ve ITS2 ile

Illumina MiSeq kullanarak metabarkodlamanın niceliksel ve niteliksel sağlamlığını test ettiler. Niteliksel olarak, tür bileşimi belirlemeleri büyük ölçüde doğruluk sağlamıştır, ancak yanlış pozitif ve negatif sonuçlar meydana gelmiştir. Negatif sonuçlar barkod belirtecinden kaynaklı veya bir örnekte bu taksonun nadir bulunmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak tür zenginliği ve taksonomik akrabalık sonuçlarını etkilememiştir. Yanlış pozitifler muhtemelen kontaminasyon, kimerik diziler veya biyoinformatik sonuçlardan kaynaklı ortaya çıkmış olabilir. Niceliksel olarak, her türün dizi oranı yalnızca göreceli bollukları ile zayıf bir ilişki görülmüştür. Sonuç olarak metabarkodlamanın polen varlığı/yokluğu belirlemeleri için büyük ölçüde güvenilir olduğunu, ancak dizi okumalarının polen tanelerinin göreceli bolluğunu yansıtmak için kullanılmaması gerektiğini göstermektedir. Buradan da anlaşıldığı üzere mevcut çalışmada metabarkodlama sonuçlarımız örnekte polenin var olup olmaması konusunda güvenilir sonuç verirken aslında DNA dizilerinin okuma sayılarındaki göreceli bolluk gerçeği yansıtmıyor olabilir.

Hawkins vd. (2015) (8, 100), yaptıkları benzer çalışmada 9 bal örneğinde iki tekniği (melissopalinoji ve 454 pirosekanslama) *rbcL* DNA barkod belirteci kullanarak karşılaştırmıştır. Sonuç olarak, farklı taksonomik düzeylerde dominant taksonlarda %92 uyum tespit etmişlerdir. Ancak tüm taksonlar karşılaştırıldığında benzerlik düzeyi daha düşük olup %22-45 arasında değiştiğini iki teknik kullanılarak bulunan taksonların göreceli bolluğu arasında çok az uyum gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada üç bal örneği iki teknik ITS barkod belirteci kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki teknikten elde edilen verilere göre farklı taksonomik düzeylerde taksonlar arasındaki uyum tüm bitki taksonları kıyaslandığında %49 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde niceliksel olarak, her taksonun dizi oranı göreceli bollukları ile zayıf bir ilişki tespit edilmiştir.

Galimberti vd. (2014) (219) Alpler'deki korunan bir alanda (Grigna Settentrionale Bölgesel Parkı, İtalya) yerleştirilen kovanlar kullanılarak polen pelletleri toplanmıştır. Bu çalışma kapsamında 104 bitki türü sekanslanmış ve 693 bitki türünden *rbcL* ve *trnH-psbA* sekanslarını içeren bir DNA barkod referans veri tabanı oluşturulmuştur. Bu veri tabanı, kovanlardan toplanan poleni tanımlamak için kullanılmış olup moleküler düzeyde 52 bitki türü tanımlanmıştır. Sonuçlar, *rbcL*'nin tek başına aynı cins içindeki bitkileri ayırt edemediğini; ancak *psbA-trnH*'nin polen örneklerinin çoğunu tür seviyesinde tanımladığını göstermiştir. Tez kapsamında Anzer bölgesinden toplanan 285 bitkinin 216'sının farklı taksona ait bitki olduğu belirlenmiş, bu bitkilerinde içerisinde yer aldığı ITS barkod tabanlı

referans kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu veri tabanında GenBank'tan verisi çekilmiş toplamda 1965 çiçekli bitkiye ait sekans olup Anzer'den toplanan bitkilerden 156'sı bu kütüphanede yer almaktadır. Geri kalan 60 taksonun sekansı daha önceden çalışılmadığı için veri tabanında bulunmamaktadır. Çalışmada bal polenlerinin farklı taksonomik düzeylerde tanımlanamaması muhtemelen toplamış olduğumuz özellikle endemik türlere ait GenBank'ta sekans verisinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu durumun önemi şöyle açıklanabilir; kontrol grubu olarak, araziden toplanan *Astragalus fricki* diye teşhis edilen bitkinin DNA'sı izole edilmiş ve bu DNA'nın da içinde bulunduğu bir karışımı Illumina'da dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra veri tabanı ile eşleştirildiğinde *A. fricki* türünün GenBank'ta verisi olmadığı için *A. fragrans* ile eşleşmiştir. Yani NGS veri sonuçlarında *A. fragrans* olarak tanımlanan taksonun aslında *A. fricki* olduğu söylenebilir. Bundan dolayı çalışılan bölgenin bitkilerini bilmek ve onlardan oluşan veri tabanını oluşturmak oldukça önemlidir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda Galimberti vd. (2014) (219) yaptıkları gibi o bölgeden toplanan bitkilerin sekans verileri elde edilip diğer çalışmalardaki bitkilerin sekanslarında bulunduğu referans veri tabanı oluşturulabilir.

Kraaijeveld vd. (2015) (318) DNA dizileme kullanarak havadaki polenin tanımlanması ve miktarının belirlenmesini sağladılar. Polenler, standart teknikler kullanılarak hava ortamından toplanmıştır. Toplanan polenden DNA ekstrakte edilmiş olup kloroplast geni (*trnL*), PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR ürünü daha sonra yeni nesil dizileme platformunda (Ion Torrent) dizilenmiştir. Amplikon molekülleri tek tek dizilenerek, karışık bir örnekten farklı dizilerin tanımlanmasına olanak sağlanmıştır. Sonuç olarak, bu yöntemin mevcut polen izleme tekniklerinden daha verimli ve hassas olduğunu ve bu nedenle polen izlemenin verimliliğini artırma potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yöntemin mikroskopik olarak ayırt edilemeyen polenleri güvenilir bir şekilde tanımlayabildiğini göstermiştir. Ancak dizilemede DNA parçasının kısa uzunluğu bazı taksonlar arasında ayırım yapılmasını engellemiştir. Mevcut çalışmada kullanılan ITS2 barkod belirtecinin baz uzunluğu *trnL* kloroplast gen baz uzunluğu gibi kısa olduğundan dolayı bazı taksonların tanımlanamamasında rolü olabilir. Mevcut çalışmada ITS barkod belirteci kullanılmıştır. Richardson vd., (2019) (320) göre ITS2'nin ayırıştırma gücü, *trnL*'ye kıyasla genellikle daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Buna rağmen bu çalışmada kullanılan ITS2 barkod belirtecinin baz uzunluğu *trnL* kloroplast gen baz uzunluğu gibi kısa olduğundan dolayı bazı taksonların tanımlanamamasında rolü olabilir. Bundan dolayı ballarda toplam okumaların %74.4 familya, cins veya tür düzeyinde karakterize

edilebilmiştir. Bu oranın artması için daha uzun barkod belirteci seçilebilir ya da birkaç barkod belirteci kombinasyonları olabilir.

Keller vd. (2015) (7) yaptıkları bir çalışmada, nükleer ribozomal DNA'nın oldukça değişken ITS2 amplikonlarının NGS yoluyla karışık polen problemlerini değerlendirmişlerdir. Ayrıca, bu yüksek verimli verileri analiz etmek için yeni oluşturulmuş bir referans veri tabanı ile biyoinformatik bir iş akışı geliştirdiler. Uygulanabilirliği değerlendirmek için, aynı örneklerden elde edilen ışık mikroskopuyla yapılan klasik tanımlama sonuçlarını dizileme sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Dizileme tekniğinin, ışık mikroskobuna kıyasla daha fazla takson zenginliği (daha derin sınıflandırmalar ve daha fazla tanımlanan tür) sağladığı ve dizileme verilerinden elde edilen nispi bolluk tahminlerinin, ışık mikroskopuyla sayılan nispi bolluklarla anlamlı bir ilişkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Takson özgüllüğü ve duyarlılığına ilişkin simülasyon analizleri, veri tabanında bulunan taksonların %96'sının cins düzeyinde ve %70'inin tür düzeyinde doğru bir şekilde tanımlanabildiğini ifade ettiler. Biz çalışmamızda aynı şekilde ITS1 ve ITS2 belirteçleri kullanılarak NGS yoluyla analiz edilmiş olup, referans veri tabanı kullanılarak bitki taksonları tanımlanmıştır. Mikroskop verilerimizle karşılaştırıldığında bu çalışmada olduğu gibi, dizileme tekniğinin daha yüksek takson zenginliği sağladığını görmekteyiz. Bu durum literatürle uygunluk göstermektedir.

Bir diğer benzer çalışma Richardson vd. (2015) (101, 234) aynı yıl içerisinde iki kere gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında Amerika'nın farklı eyaletlerinde arılar tarafından toplanan ilk önce dört polen örneğinde melissopalinojisi ve metabarkodlama verilerini kıyaslamışlardır. Tek lokus olarak ITS2 metabarkodlama kullanılmış olup, bu verilerin melissopalinojisiye göre daha duyarlı ve cins düzeyinde çözünürlük sağladığını tespit etmişlerdir. Daha sonra yaptıkları diğer çalışmada ise ribozomal lokus yanında plastid lokuslarını (*rbcL* ve *matK*) hedef alarak bal arıları tarafından toplanan altı polen örneğini karakterize ettiler. Bulgular, ribozomal lokusa kıyasla, plastid lokuslarından elde edilen metabarkodlama verilerinin, polen topluluklarının nicel karakterizasyonu için daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca, polenlerin çok lokuslu metabarkodlaması, tek lokus analizlerinden daha güvenilir olduğunu ve bu da moleküler palinojisi için optimize edilmiş, yeni barkodlar ve barkod kombinasyonlarının keşfinin gerekliliğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda sadece tek bir lokus hedef alındığından dolayı iki teknik karşılaştırıldığında daha az uyum sağlanmış olabilir. Bundan dolayı ilerdeki çalışmalarda yeni barkod bölgeleriyle kombinasyonlar gerçekleştirilebilir.

Laha vd. (2017) (4) yaptıkları benzer çalışmada Hindistan'ın Kuzeydoğu Mizoram bölgesinden toplanan 20 örnekten oluşan bal metagenomunu, Illumina Miseq platformunu kullanarak dizilenmiş üç gen bölgesi (*rbcL*, *matK* ve ITS2) ile karşılaştırmaktadır. Ayrıca mevcut çalışmada olduğu gibi klasik palinoloji çalışması da gerçekleştirilmiş olup çoğu bitki taksonu tanımlanamamıştır. Çok gen lokusu ile çalışmanın, tek bir lokus kullanarak herhangi bir teknikte bulunandan daha fazla bitki türünü tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada daha fazla gen bölgesi kullanılsaydı taksonomik düzeylerde daha alt kategorideki bitki taksonlarının sayısında artış olabilirdi.

Tanaka vd. (2020) (321) yaptıkları çalışmada, Tokyo Kōtō-ku'da kentsel arıcılığın nektar kaynaklarını polen DNA metabarkodlama analizi kullanarak araştırmışlardır. Yerel bir kentsel arıcılık işletmesi tarafından toplanan polenlerden DNA elde edilmiştir. DNA metabarkodlama analizi, kloroplast genomunun bir kısmı olan *rbcL* bölgesinin sekanslanmasıyla gerçekleştirilmiştir. 2018 yılı Mart ortasından Ekim ortasına kadar toplanan toplam 31 örnek, 14 familya, 32 cins ve 8 türü içeren 54 operasyonel taksonomik birim (OTU) oluşturulmuştur. Beş OTU tüm mevsimlerde profilde bulunurken, 38 OTU belli mevsimlere özgüydü (ilkbahar, yaz veya sonbahar). Bu nedenle, arıcılık işletmesi için mevsimsel nektar kaynaklarını familya veya cins seviyesinde, daha az ölçüde ise tür seviyesinde çıkarabilmişlerdir. Yöntem, birçok familya ve cinsin profilini çıkarmayı sağlasa da, tür seviyesinde yapılan tespitler azdır. Mevcut çalışmada ise, örnek sayısı azalmasına rağmen birçok familyanın ve cinsin yanında aynı oranlarda tür seviyesinde de ayırım görülmüştür. Sonuçlara göre üç balda toplamda 28 familya, 22 cins ve 29 tür tespit edilmiştir.

Geleneksel mikroskobik analize göre NGS yöntemi kullanılarak bitki türleri daha ayrıntılı bir şekilde tespit edilebilir. Ancak bitki familyalarındaki farklılıkların tespiti, bu iki yöntemin bu alanda kullanımını sınırlamaktadır. Hawkins vd. (2015) (100) Boraginaceae ve Euphorbiaceae üyeleri için *rbcL* ve *trnH-psbA* belirteçlerini kullanarak tür tespitinde bulunmak oldukça zor olduğunu ortaya koymuştur. Mevcut çalışmada Boraginaceae familyasına ait melissopalinojik verilerde bir bal örneğinde *Myosotis* polenine rastlanırken, NGS verilerinde bu taksona ait bir tanımlama yapılamamıştır. Bu nedenle, mevcut çalışmada NGS analizinin, bazı bal örneklerinde mikroskobik analizle tanımlanan Boraginaceae familyasını tespit edememesinin nedenlerinden biri olabilir. Ayrıca, polen

taneleri morfoloji, boyut ve çeper bileşimi açısından farklılık gösterir. Bu da farklı bitki türleri için DNA izolasyon verimliliğini etkileyebilir (322).

Farklı çalışmalarda, klasik ışık mikroskobuna dayalı tanımlama sonuçları DNA metabarkodlama ile elde edilen her bitki türünün sonuçlarıyla karşılaştırmıştır (7, 101, 319, 320). Bu çalışmalarda bazen aynı barkod belirteçleriyle bile tutarsız sonuçlar raporlanmıştır; bazıları bitki türlerinin dizileme okumalarının oranı ile polen taneciklerinin oranı arasında pozitif bir ilişki bulmuştur. Örneğin, Keller vd. (2015) (7), mikroskopi kullanılarak elde edilen polen taneciklerinin oranlarını ITS2 metabarkodlama ile elde edilen dizi okumalarının oranlarıyla karşılaştırdığında benzer oranları bulmuştur. Diğerleri ise her iki yöntem arasında zayıf bir korelasyon bulmuştur (101). Ayrıca, diğer çalışmalar birden fazla barkod belirteçleri kullanmıştır (319, 320). Örneğin, Richardson vd. (2019) (320), ITS2'yi üç kloroplast işaretleyici (*trnL*, *rbcL* ve *trnH*) ile birlikte kullanmış ve mikroskopi polen sayımları ile her bitki familyası için üretilen ortalama dizi okumaları arasında önemli bir istatistiksel ilişki bulmuştur. Bizim çalışmamızda ise iki teknik arasında üç bal örneğinde ITS1 ve ITS2 belirteçleri kullanılarak Spearman korelasyonu yapılmış olup familya ve taksonlar arasında iki örnekte orta doğrusal bir ilişki görülmüştür. Ayrıca iki bal örneğinde (AB_ZT1 ve AB_ZT2) familya düzeyinde değerlendirildiğinde pozitif doğrusal korelasyon görülürken, takson düzeyinde negative doğrusal korelasyon görülmektedir. Yani familya düzeyinde iki değişken arasında benzer familyalarda artış görülürken, takson düzeyinde ise farklı taksonlarda bir doğrusal korelasyon söz konusudur. Ancak AB_ZT3 örneğinde hem familya hem de takson olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir korelasyon görülememiştir. Anlamlı bir istatistiksel ilişkinin gözlemlenmesi için, Richardson vd. ard arda yaptığı makalelerde görüldüğü üzere daha fazla bal örneği ve daha fazla DNA barkod belirtecinde uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, Bell vd. (2019) (319) tarafından yürütülen bir çalışmada, ITS2'nin kloroplast işaretleyici *rbcL* ile birleştirilmesi, karışımlardaki polen taneciklerinin oranı ile her tür için ITS2 ve *rbcL* dizileme okumaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermiştir. Bu çalışmada, mikroskopi ve Illumina'da eşleşen taksonların Shannon-Weiner (H') çeşitlilik indeksi ve Pielou'nun Evenness (J') indeksi dağılımı ayrıca hesaplanmıştır. Smart vd. (2017) (72) da Shannon ve Pielou indeksleri, altı çalışma alanını karakterize etmek ve karşılaştırmak için belirlenmiştir. Bu çalışma alanlarından toplanan polenlerin cins seviyesinde karşılaştırıldığında üç alanın en yüksek çeşitliliğe sahip olduğu, altı alanda yer alan bitki topluluklarının eşit dağılım gösterdiği ortaya konulmuştur. Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi bal içerisindeki takson

çeşitliliğini ve dağılımını gösterirken, Pielou düzenlilik indeksi ise bal içerisinde taksonların bolluklarının ne kadar eşit dağıldığını gösterir. Yüksek Shannon değeri yüksek takson çeşitliliğini gösterirken, düşük Shannon değeri düşük takson çeşitliliği anlamına gelir; Pielou değeri ise 0 ile 1 arasında değer alır 1'e yakın değerler yüksek eşitlik gösterir. Bizim çalışmamız da, mikroskopi ve Illumina sonuçları ile eşleşen bal örneklerinden Shannon-Weiner çeşitlilik indeksi takson düzeyinde hesaplandığında AB_ZT2 bal örneğinde mikroskopi ile eşleşen taksonların çeşitliliğinin (2.85) en yüksek olduğu aynı zamanda Pielou değeri 0.85 olup 1'e yakındır. Bu durum AB_ZT2 bal örneğinde taksonların eşit dağılım gösterdiğinin kanıtıdır. Diğer taraftan, en düşük H' değerinin ise AB_ZT3 örneğine (1.19) ait olduğunu görülmektedir. Bunun nedeni muhtemelen AB_ZT3 örneğinde dominant miktarda *Trifolium* polen tanelerinin olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer taksonların az miktarda bulunması, *Trifolium* polenlerinin fazla olması takson bolluğunun örnek içinde eşit dağılım göstermemesinin nedenidir. Bundan dolayı Pielou değeri 0.45'dir. Bu da değer 0'a yakın olup takson bolluğunun eşit olmadığına göstergesidir. Illumina sonuçları ile eşleşen taksonlara bakıldığında en düşük H' (2.00) ve J' (0.44) değerinin AB_ZT2 örneğine ait olduğu görülmektedir. Bunun nedeni muhtemelen bu bal örneğindeki okuma sayısının büyük çoğunluğunun *Astragalus frickii* bitkisine ait olmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada Shannon ve Pielou değerlerinin her iki teknik kullanılarak yapılan analizi familya düzeyinde de hesaplandığında dağılımın takson düzeyindeki sonuçlarla paralellik gösterdiğini görmekteyiz.

Tablo 5.2. Bal örneklerinde iki teknik verilerine göre, (a,c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou'nun Düzenlilik (J') indeks sonuçları. * Grafikselsel dağılımı Şekil 4.26'da verilmiştir.

Kullanılan teknik	Bal örneği	Çeşitlilik İndeksi (Shannon –Weiner)		Düzenlilik İndeksi (Pielou' Evenness)	
		Familya	Takson	Familya	Takson
Melissopalinojoloji	AB_ZT1	1.82	2.09	0.76	0.77
	AB_ZT2	2.28	2.85	0.77	0.85
	AB_ZT3	1.00	1.19	0.42	0.45
Illumina	AB_ZT1	1.26	2.00	0.42	0.55
	AB_ZT2	1.28	1.67	0.40	0.44
	AB_ZT3	1.37	1.96	0.44	0.3

Her iki teknikte, Shannon- Weiner çeşitlilik indeksi ve Pielou'nun Evenness indeksi verileri Tablo 5.2’de verilmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde melissopalinojistik verilerde en fazla çeşitlilik AB_ZT2 bal örneğinde ve taksonların en iyi homojen şekilde dağılım gösterdiği belirtilmiştir. En az çeşitlilik ve en fazla düzensizlik AB_ZT3 örneğinde rastlanmaktadır. Bunun nedeni AB_ZT3 bal örneğinde oldukça fazla *Trifolium* örneğine rastlanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat Illumina sonuçları aralarında değerlendirildiğinde melissopalinojistik sonuçların aksine AB_ZT3 diğer örneklerle eşit oranda indekse sahipken, aile düzeyinde düzensizlik de diğerlerine göre daha azdır. Buradan anlaşıldığı üzere melissopalinojisiye göre AB_ZT3 örneği için monofloral bal ile uyumlu iken Illumina sonuçlarına göre monofloral bal ile uyumlu çıkmamıştır. Her iki teknikte ayrıca ITS1 ve ITS2 gen lokusları ayrı ayrı hem aile hem de takson düzeyinde Shannon ve Pielou indeksleri hesaplanmıştır. AB_ZT1 ve AB_ZT2 bal örneklerinde ITS2, ITS1’e göre daha iyi çeşitlilik ve homojen dağılım gösterdiği Tablo 5.3’de belirtilmiştir.

Tablo 5.3. Bal örneklerinde Illumina (ITS1/ITS2) ve melissopalinojistik verilerine göre, (a,c) Shannon-Wiener Çeşitlilik (H'), ve (b,d) Pielou’nun Düzenlilik (J') indekslerinin hesaplanması. * Grafiksel dağılımı Şekil 4.27’de verilmiştir.

Kullanılan teknik	Bal örneği	Çeşitlilik indeksi (Shannon –Weiner)		Düzenlilik indeksi (Pielou Evenness)	
		Familya	Takson	Familya	Takson
Melissopalinojisi	AB_ZT1	1.82	2.09	0.76	0.77
	AB_ZT2	2.28	2.85	0.77	0.85
	AB_ZT3	1.00	1.19	0.42	0.45
Illumina	AB_ZT1_ITS1	0.99	1.73	0.36	0.52
	AB_ZT1_ITS2	2.28	2.74	0.82	0.81
	AB_ZT2_ITS1	0.88	1.01	0.30	0.30
	AB_ZT2_ITS2	1.44	2.33	0.47	0.65
	AB_ZT3_ITS1	1.35	1.96	0.43	0.53
	AB_ZT3_ITS2	1.22	1.31	0.45	0.42

Richardson vd. (2015) ve Smart vd. (2017) (72, 101), mikroskop tabanlı ve ITS2 metabarkod tabanlı yöntemlerle tanımlanan polen türlerinin nispi bollukları arasında güvenilir bir ilişki bulamamış ve metabarkodlama ile mikroskop tabanlı tanımlamaların

karşılaştırılmasında belirli taksonların sürekli olarak aşırı temsil edildiğini veya az temsil edildiğini belirlemiştir. Benzer şekilde mevcut çalışmada mikroskop ve NGS verilerinde tanımlanan bazı polen taksonların nispi bollukları arasında güvenilir bir ilişki bulunamamıştır. R katsayıları familya düzeyinde bal örneklerinde hesaplandığında bazı bal örneklerinde Rosaceae ve Lamiaceae familyaları aşırı temsil edilirken, Apiaceae, Asteraceae az temsil edilmiştir. Bu sonuçların, yalnızca ITS2 dizileme verilerinin, arılar tarafından toplanan örneklerdeki polenlerin göreceli bolluğunun nicel ölçümü için yeterli olmadığını ortaya koymuşlardır.

Metabarkodlama tekniği kullanılarak balda en çok bulunan mikroskopi ile tespit edilen taksonlar familya ve cins düzeyinde önemli oranda doğru olarak tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar mikroskopi ve metabarkodlama ile tespit edilen taksonlara ait polenlerin göreceli bolluğu ile dominant taksonlar arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (72, 323). Hawkins vd. (2015)'de (100) benzer çalışmada farklı tekniklerle tespit edilen taksonlar arasında farklılıklar olsa da, balların baskın floral bileşenlerinin her üç yöntemle (melissopalinoji, Illumina, 454 pirodizileme) de tespit edildiği görülmektedir, ancak bunların oranları önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar, her yöntemin ulaştığı çözünürlük seviyelerindeki farklılıklara bağlanabilir. DNA metabarkodlama ve mikroskopi kullanılarak tüm bal örneklerinde %20'den fazla bollukla ortaya çıkan 27 takson bulunmaktadır. Bu 27 taksondan 14'ü cins seviyesinde, her üç yöntemle de tespit edilmiştir ve bu da %52 uyum sağlamaktadır. Her iki çalışmada taksonomik düzeylerde taksonların farklı oranlarda olmasının nedenlerinden biri kısmen balın heterojen yapısı ve örnekleme sürecinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevcut çalışmada ise her iki teknikte elde edilen verilere göre familya düzeyinde örtüşen takson sayısı 13'tür. Her iki teknikte elde edilen tüm ailelerin %38'ini oluşturmaktadır. İki teknikte cins düzeyinde örtüşen takson sayısı 18 olup belirlenen tüm cinslerin %51'ini oluşturmaktadır. Her iki çalışmada benzer oranlar gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan iki teknikte de farklı takson seviyeleri tespit edilmiştir. Mikroskop analizi kullanılarak tespit edilen birçok takson (*Campanula*, *Castanea sativa*, Chenepodiaceae, *Cistus*, *Geranium*, *Epilobium*, *Myosotis* ve *Plantago*, Ranunculaceae) DNA metabarkodlama ile tespit edilmemiştir. Bu taksonların birçoğu bal örneklerinde tek polen tanesi tarafından temsil edilmiştir. DNA metabarkodlama ile daha düşük bollukta olan türler ampikon üretmeyebilir. Bu nedenle NGS dizileme yaklaşımı,

örneğin %1'den az bolluğa sahip türlerin tanımlanması için uygun değildir (316). Mevcut çalışmada incelenen örnekler için melissopalinojide verilerine bakıldığında AB_ZT2 bal örneğinde en çok tek polen tanesi iktiva etmektedir. Bu durum bu balda polen tanelerinin yüksek çeşitlilikte olduğunu göstermektedir. Örneğin AB_ZT2 balında mikroskopi verilerine göre, *Chenopodiaceae*, *Epilobium*, *Geranium*, tek bir polenle temsil edilirken, Illumina okumalarında bu taksonlar tespit edilememiştir. Aynı şekilde hem AB_ZT1 hem de AB_ZT2 ballarında tek polenle temsil edilen *Castanea sativa*, Illumina okumalarında yer almamaktadır. Aslında Anzer balında kestane poleni bulunmamalıdır. Fakat melissopalinojide verilerle bakıldığında bazı örneklerde eser miktarda kestane poleni rastlanmıştır. Bu durum şöyle açıklanabilir, muhtemelen yetiştirici Anzer'e çıkmadan önce bal arılarını daha düşük rakımlı yerlerde yani kestanenin olduğu bölgelerde bulundurmuşsa o zaman Anzer balında istemesek de düşük miktarda kestane poleni veya kestaneye ait DNA'ya rastlanabilir. Burada önemli olan sonuçlarda az miktarda kestane poleniyle karşılaşmaktır. Melissopalinojide tanımlanan bu taksonun Anzer bal örneklerinde olmaması gerekir. Bulunma nedenlerinden biri üretici bal kovanlarını Anzer dışında bir bölgeye yerleştirmiş olabilir. AB_ZT3 balında *Papaver*, tek bir polen tanesi ile temsil edilirken, Illumina verilerine göre bu taksona ait okuma bulunmamaktadır. Her ne kadar hem DNA metabarkodlama hem de melissopalinojide sınırlamalara sahip olsa da, her ikisi de balın çiçek kompozisyonunu anlamada kullanışlı araçlardır. DNA metabarkodlama daha fazla miktarda balın incelenbilmesine imkan vermesi, yüksek düzeyde taksonomik uzmanlığı gerektirmemesi, bir kez optimize edildiğinde, tekniğin çok hızlı bir şekilde birçok örneğin tanımlanmasına izin vermesi bakımından önemli bir avantajdır. Ancak polen miktarı tahmini için ve balda düşük seviyelerde poleni bulunan taksonları belirlemeye uygun bir yöntem değildir. Melissopalinojide verilerde tek polenle temsil edilen taksonlar (*Castanea sativa*, *Chenopodiaceae*, *Epilobium*, *Geranium*) NGS verilerinde tanımlanamamıştır.

Tez kapsamında tüm taksonomik seviyelerde DNA dizilimi tekniği ile ışık mikroskobuna göre daha fazla takson tayin edilmiştir. Tayin edilen taksonların ortalama sayısındaki en büyük fark tür seviyesinde tespit edilmiştir. İncelenen üç bal örneğinde iki teknik karşılaştırıldığında melissopalinojide de ailya seviyesinde kalan birçok takson metabarkodlama da tür seviyesine kadar belirlenmiştir. Örneğin AB_ZT1 balında melissopalinojide de *Apiaceae* olarak tanımlanan polen taneleri Illumina sonuçlarında *Eryngium giganteum* olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde melissopalinojide de *Asteraceae* ailyasına ait sadece cins seviyesinde *Artemisia* poleni tanımlanırken, Illumina

okumalarında *Artemisia*, *Helianthus tuberosus*, *Taraxacum bessarabicum* cins ve tür seviyesine kadar belirlenmiştir. AB_ZT2 ve AB_ZT3 örneklerinde ise melissopalinojide Lamiaceae polenleri ayrılamazken, Illumina okumalarında *Mentha longifolia*, *Salvia verticillata*, *Teucrium chamaedrys* tür seviyesinde ayrılmıştır. Ayrıca melissopalinojide AB_ZT3 örneğinde baskın şekilde *Trifolium*'a ait polen taneleri yer alırken, Illumina verilerine göre aynı cinsin okuma sayısı oldukça düşüktür. Smart vd. (2017) (72) yaptığı çalışmada bu durumu destekler veriler raporlamıştır. Bu tez kapsamında mikroskop ve metabarkodlama yöntemlerle tanımlanan polen türlerinin nispi bollukları arasında güvenilir bir ilişki bulamamıştır. Melissopalinojide verilerine göre, AB_ZT1'de en baskın polen sayısı *Campanula*, AB_ZT2 ve AB_ZT3'te *Trifolium*'dur. Fakat AB_ZT3'te *Trifolium* bulunma oranı % 74'tür. Louveaux vd. (1978) (131) balın % 45'ten fazlası bir türden polen içeriyorsa, balları monofloral olarak sınıflandırmıştır. Bu durum AB_ZT3'te balın multifloral balı olmadığını bir göstergesidir. NGS verilerine göre AB_ZT1'de en çok okuma sayısı, *Potentilla crantzii*, AB_ZT2'de ise *Astragalus frickii* ve AB_ZT3 örneğinde ise *Juglans regia* ve *Prunus divaricata*'dır. Çoğu takson her iki teknikte benzerlik göstermesine rağmen bulunma oranlarında farklılık bulunmaktadır.

Smart vd. (2017)'de (74) yaptıkları benzer bir çalışmada yoğun bitki çeşitliliğinin olduğu tarımsal bir alana üretilen bal arısı kolonilerinden toplanan örneklerinin mikroskopi ve DNA dizileme tekniklerinden elde edilen polen tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırmışlar. Tüm taksonomik seviyelerde, DNA dizisinin daha fazla sayıda taksonu ayırt edebildiğini ve özellikle nadiren tespit edilen türlerin tanımlanması için yararlı olduğunu göstermişlerdir. Fakat mikroskopi ile tanımlanan taksonların azlığı nedeniyle, iki tekniği karşılaştırma için verileri aynı taksonomik seviyeye (cins seviyesinde 82 takson) indirgediler. Yine de, teknikler arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenememiştir. Bununla birlikte, sonuçları tek bir taksonomik sırada karşılaştırmak, taksonominin hiyerarşik doğasına pek uygun değildir. Yani, belirli taksonlar için yöntemler arasındaki belirgin uyumsuzluk, aslında bir polen kaynağının tespit edilmemesinden ziyade nispi çözünürlükten kaynaklanabilir. Örneğin, mikroskopi ile bulunan ancak dizileme ile tespit edilmeyen dört cins (*Astragalus*, *Lathyrus*, *Phaseolus*, *Vicia*), aslında dizileme ile yaygın olarak atanan Fabaceae familyası içindedir. Mevcut çalışmada benzer durumlar söz konusudur. Örneğin NGS verilerinde cins (*Heracleum*) ve tür (*Eryngium giganteum*) seviyesinde tespit edilen taksonlar, aslında mikroskopide yaygın olarak bulunan Apiaceae familyası üyelerinden olabilir. Bir başka örnek, NGS verilerinde Rosaceae familyası farklı taksonomik seviyelerde ayrılmıştır.

Melissopalınolojik verilerde Rosaceae'ye ait polen taneleri daha alt taksonomik düzeylere tanımlanamamıştır. Ayrıca Spearman korelasyonu sonuçlarına göre hem familya hem takson düzeyinde iki örnekte orta düzeyde doğrusal korelasyon görülmesine rağmen genel anlamda anlamlı bir korelasyon bulunmamaktadır.

Tespit edilen taksonlar arasındaki farklılıklar, hem DNA metabarkodlama hem de mikroskopik analizdeki belirsizlikleri yansıtır. Hawkins (2015) (8) çalışmasında bazı familyalar, örneğin Asteraceae ve Rosaceae DNA metabarkodlamada ile melissopalınolojiye kıyasla daha yüksek bir çözünürlük sunduğunu, diğer bazı familyalar örneğin Asparagaceae, DNA metabarkodlama ile bu gruptaki türleri tespit etme yeteneğinin daha düşük olduğunu ifade etmiştir. Bu yüzden mevcut çalışmada Illumina sonuçlarında Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae familyaları mikroskopiye göre daha iyi ayırım vermiştir. Ayrıca Fabaceae familyası hem mikroskopi de hem de Illumina da cins ve tür seviyesinde en iyi ayırımı yapmıştır. Hem melissopalınolojik verilerde hem de Illumina verilerinde Brassicaceae, ve Poaceae familya düzeyinde belirlenmiş olup, daha düşük taksonomik seviyelerde tanımlama tespit edilememiştir.

Bu tezde mikroskopi iyi ayırım vermemesine rağmen Illumina da en yüksek ayırımı Rosaceae familyasında tespit edilmiştir. Mikroskopi verilerine göre AB_ZT1 örneğinde familya seviyesinde iken, AB_ZT2 ve AB_ZT3 örneklerinde ise sadece *Potentilla* cins seviyesine kadar belirlenmiştir. Illumina verilerinde ise Rosaceae familyası, AB_ZT1 örneğinde *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Potentilla crantzii* ve *Prunus domestica* tür ve cins seviyesinde, AB_ZT2 ve AB_ZT3 örneklerinde ise *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Potentilla crantzii*, *Prunus divaricata*, *Prunus domestica* ve *Sorbus aucuparia* tür ve cins seviyelerine kadar belirlenmiştir.

Bütün bunlara rağmen balın, bitki kompozisyonunu karakterize etmek için kullanılan melissopalınoloji yöntemi de bazı sınırlamalara sahiptir. Örneğin Poaceae ailesindeki polen morfolojisinde farklılıkların olmaması nedeniyle yalnızca familya düzeyine kadar tanınabilir (219, 318). Mevcut çalışmada da hem mikroskopi hem de Illumina sonuçlarına göre Poaceae ve Brassicaceae familyaları alt taksonomik seviyelerde tespit edilememiştir.

İki teknikteki veriler karşılaştırıldığında bal örneklerindeki ortak familyaların sayısı 13'tür. Bu da bütün ballarda belirlenen familyaların %38'ini oluşturmaktadır. Özkök vd. 2023'te (240) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden birkaç bal hâriç monofloral bal örneklerine *rbcL* ve *trnH-psbA* plastid barkod belirteçleri kullanarak iki

tekniki (mellisopalinoloji ve Ion Torrent) karşılaştırılmıştır. Bu bal örneklerinden üçü Rize-Anzer balına aittir. Elde edilen sonuçlar familya düzeyinde değerlendirilmiş olup, her iki teknikte ortak buldukları familya sayısı 18'dir. Anzer ballarında ortak belirledikleri familyaların oranı %10 dur. Mevcut çalışma ile örtüşen bu familyalar sırasıyla Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Fabaceae, Fagaceae, Lamiaceae, Poaceae ve Rosaceae'dir. Mevcut çalışma sadece birkaç bal örneğine dayanmasına rağmen, sonuçlar yerel bitki türlerini bal örneğinde tespit edilenlerle karşılaştırarak balın sahtekarlık veya yanlış etiketlenmesini tespit etme potansiyelini desteklemektedir. DNA barkodlama, üretim ve dağıtımın farklı aşamalarında balın izlenebilirliği için güvenilir bir araç olarak işlev görebilir (139). Ayrıca polen tanelerinin coğrafik kökeni, balın ticari değerinin değerlendirilmesinde önemlidir (324). Bal arılarının ziyaret ettiği bitkilerin belirlenmesi, arıcıların ürünlerinin kalitesini değerlendirmek ve tüketicilerin ürün güvenliğini sağlamak açısından önemlidir. Tüketiciler, gıda etiketlemesinin ürünün gerçek kimliğini doğru bir şekilde yansıtmaması beklerler. Gıda hilesi, tüketicileri ve gıda üretimi ve dağıtımıyla ilgili tüm tarafları etkileyen yaygın bir ekonomik dolandırıcılık biçimidir (325). Yanlış etiketleme ve gıda hilesi, deniz ürünleri, et ve kümes hayvanı türevleri, baharatlar, kahve, peynir (326) ve bal dahil olmak üzere tüm ana gıda kategorilerinde temel bir sorundur. Gıda emtialarındaki hileyi tespit etmek için çeşitli analitik teknikler mevcuttur. NGS, bal gibi son derece karmaşık gıdalar için düzenleyici uyumu ve itibarı korumayı sağlamak amacıyla değerli bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır (327).

Dünyaca ünlü özel çiçek ballarından biri olan Anzer Balı, içerisinde herhangi bir gıda bileşeni, gıda katkı maddesi veya başka bal dışı herhangi bir madde olmamasıyla değerli organik bir üründür. Sağlık açısından faydaları ve pek çok biyolojik özellikleri nedeni ile ticari sahtekarlığa yatkındır. Hem üreticiler hem de tüketiciler için balın gerçekliği ve kökeninin garanti altına alınması önemlidir. Bu amaçla, ürünün doğru botanik tanımlaması için geleneksel melissopalinolojik analiz, DNA metabarkodlama ile desteklenebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Bell KL, De Vere N, Keller A, Richardson RT, Gous A, Burgess KS, Brosi BJ (2016). Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. *Genome* 59: 629–640.
2. Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I (2015). Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control* 48: 130–136.
3. Balkanska R, Stefanova K, Stoikova-Grigorova R, Ignatova M (2020). A preliminary assessment of *trnH-psbA* as DNA barcode for botanical identification of polyfloral honey samples and comparison with *rbcL* marker. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 26: 238–242.
4. Laha RC, De Mandal S, Ralte L, Ralte L, Kumar NS, Gurusubramanian G, Satishkumar R, Mugasimangalam R, Kuravadi NA (2017). Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition. *AMB Express* 7.
5. Rize İl Tarım ve Orman Müdürlüğü (2019). Anzer Balı Türkiye: Türk Patent.
6. Ulusoy E, Kolayli S, Sarikaya AO (2010). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Floral Origin Honeys from Türkiye. *Journal of Food Biochemistry* 34: 321–335.
7. Keller A, Danner N, Grimmer G, Ankenbrand M, von der Ohe K, von der Ohe W, Rost S, Härtel S, Steffan-Dewenter I (2015). Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology* 17: 558–566.
8. Hawkins J (2015). Investigating Antibacterial Plant-Derived Compounds from Natural Honey Cardiff: Cardiff University.
9. Zumla A (1989). Honey-a remedy rediscovered. *Journal of The Royal Society of Medicine* 82: 384–385.
10. Allsop KA, Miller JB (1996). Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. *British Journal of Nutrition* 75: 513–520.
11. Breeze TD, Bailey AP, Balcombe KG, Potts SG (2011). Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 142: 137–143.

12. Genç F, Aksakal V, Göktaş B, Cengiz MM, Memiş S, Korucuk S, Erdoğan Ü, Erdoğan Y, Yılmaz YY (2020). Türkiye’de ve Dünya’da Arıcılık Faaliyetlerinin Ekonomisi. Arıcılık Üzerine Bilimsel Araştırmalar Ankara: Iksad Publications, pp 173–200.
13. Burucu Volkan (2022). Ürün Raporu Arıcılık 2022 Ankara.
14. TÜİK (2021). Türkiye İstatistik Kurumu.
15. Orman Genel Müdürlüğü (2022). Bal Ormanı Eylem Planı (2018-2023) Ankara.
16. FAO (2010). Codex Alimentarius. Available at: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/archives/en/?y=2010>. [Accessed: 6 September 2023].
17. Tewari J, Irudayaraj J (2004). Quantification of Saccharides in Multiple Floral Honeys Using Fourier Transform Infrared Microattenuated Total Reflectance Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 3237–3243.
18. Anklam E (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry 63: 549–562.
19. Kaškonienė V, Venskutonis PR (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9: 620–634.
20. Won SR, Li CY, Kim JW, Rhee HI (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. Food Chemistry 113: 1334–1338.
21. Weston RJ (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. Food Chemistry 71: 235–239.
22. Bucekova M, Valachova I, Kohutova L, Prochazka E, Kloudiny J, Majtan J (2014). Honeybee glucose oxidase - Its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H2O2-mediated antibacterial activity in natural honeys. Naturwissenschaften 101: 661–670.
23. Rampim L, Fey R, Do M, Lana C, Vinicius M, Sarto M, Rosset JS, Luiz Piva A, Mezzalana ÉJ, Koppo J (2014). African Journal of Agricultural Research Phosphorus and potassium fertilization in culture of soybean plants in the Oxisol 9: 1461–1466.
24. Manyi-Loh CE, Ndip RN, Clarke AM (2011). Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential

- Biomedical Activities. International Journal of Molecular Sciences 2011, Vol 12, Pages 9514–9532 12: 9514–9532.
25. Jerković I, Mastelić J, Marijanović Z (2006). A Variety of Volatile Compounds as Markers in Unifloral Honey from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.). Chemistry & Biodiversity 3: 1307–1316.
 26. Jerkovic I, Marijanovic Z, Staver MM (2011). Screening of Natural Organic Volatiles from *Prunus mahaleb* L. Honey: Coumarin and Vomifoliol as Nonspecific Biomarkers. Molecules 16: 2507–2518.
 27. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, González-Viñas MA, De La Fuente E, Pérez-Coello MS (2008). Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1999–2006.
 28. Dong R, Zheng Y, Xu B (2013). Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. Food and Bioprocess Technology 6: 762–770.
 29. Pyrzynska K, Biesaga M (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. TrAC Trends in Analytical Chemistry 28: 893–902.
 30. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences 74: 2157–2184.
 31. Pinho E, Ferreira ICFR, Barros L, Carvalho AM, Soares G, Henriques M (2014). Antibacterial potential of northeastern portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. BioMed Research International 2014: 8.
 32. Lin LZ, Harnly JM (2007). A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 1084–1096.
 33. Dixon RA, Pasinetti GM (2010). Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. Plant Physiology 154: 453–457.

34. Cherchi A, Spanedda L, Tuberoso C, Cabras P (1994). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A* 669: 59–64.
35. Assia A, Ali L (2015). Enzymes activities, hydroxymethylfurfural content and pollen spectrum of some Algerian honey. *African Journal of Agricultural Research* 10: 613–621.
36. Erbilir F, Erdoğan Ö (2005). Determination of heavy metals in honey in Kahramanmaraş City, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 109: 181–187.
37. Bang LM, Bunting C, Molan P (2004). The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine* 9: 267–273.
38. Kwakman PHS, Zaat SAJ (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* 64: 48–55.
39. White JW, Subers MH, Schepartz AI (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 73: 57–70.
40. Bogdanov S (1997). Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. *LWT - Food Science and Technology* 30: 748–753.
41. Kwakman PHS, te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ (2011). Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. *PLOS ONE* 6: e17709.
42. Brudzynski K, Abubaker K, St-Martin L, Castle A (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in Microbiology* 2: 213.
43. Majtan J, Klaudiny J, Bohova J, Kohutova L, Dzurova M, Sediva M, Bartosova M, Majtan V (2012). Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: Possible therapeutic implications. *Fitoterapia* 83: 671–677.

44. Stephen A (2014). Pollen-A microscopic wonder of plant kingdom. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 1: 45–62.
45. Janzen DH (1983). Seed and pollen dispersal by animals: convergence in the ecology of contamination and sloppy harvest. *Biological Journal of the Linnean Society* 20: 103–113.
46. Kshirsagar Sanjay R (2020). Role of pollen morphology in taxonomy and detection of adulterations in crud drugs. *Journal of Plant Science and Phytopathology* 4: 024–027.
47. Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1096–1101.
48. Taha EKA (2015). Chemical composition and amounts of mineral elements in honeybee-collected pollen in relation to botanical origin. *Journal of Apicultural Science* 59: 75–81.
49. Komosinska-vassev K, Olczyk P, Ka J, Mencner L, Olczyk K (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: 6.
50. Campos MGR, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F (2015). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research* 47: 154–161.
51. Li QQ, Wang K, Marcucci MC, Sawaya ACHF, Hu L, Xue XF, Wu LM, Hu FL (2018). Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods* 49: 472–484.
52. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology* 63: 233–239.
53. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science* 73: R117–R124.

54. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinou I, Karathanos VT (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 116: 452–461.
55. Müller MB, Kunz N, Kammerer DR (2013). Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. *Article in Journal of Applied Botany and Food Quality* 86.
56. Gardana C, Scaglianti M, Pietta P, Simonetti P (2007). Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45: 390–399.
57. National Honey Board (2023). Honey Varietals. National Honey Board. Available at: <https://www.honey.com/about-honey/honey-varietals>. [Accessed: 8 September 2023].
58. Devillers J, Morlot M, Pham-Delègue MH, Doré JC (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry* 86: 305–312.
59. Kek SP, Chin NL, Tan SW, Yusof YA, Chua LS (2017). Classification of Honey from Its Bee Origin via Chemical Profiles and Mineral Content. *Food Analytical Methods* 10: 19–30.
60. Sanz S, Perez C, Herrera A, Sanz M, Juan T (1995). Application of a statistical approach to the classification of honey by geographic origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 135–140.
61. Kleijn D, Winfree R, Bartomeus I, Carvalheiro LG, Henry M, Isaacs R, Klein AM, Kremen C, M'Gonigle LK (2015). Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature Communications* 2015 6:1 6: 1–9.
62. Hoshiba H, Sasaki M (2008). Perspectives of multi-modal contribution of honeybee resources to our life. *Entomological Research* 38: S15–S21.
63. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 345–353.
64. Wright GA, Nicolson SW, Shafir S (2018). Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annual Review of Entomology* 63: 327–344.

65. Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* 10: 133–141.
66. Waller GD (1972). Evaluating Responses of Honey Bees to Sugar Solutions Using an Artificial-Flower Feeder. *Annals of the Entomological Society of America* 65: 857–862.
67. Wykes GR (1952). The Preferences of Honeybees for Solutions of Various Sugars Which Occur in Nectar. *Journal of Experimental Biology* 29: 511–519.
68. Clarke D, Morley E, Robert D (2017). The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A* 203: 737–748.
69. Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE* 8.
70. Kleijn D, Raemakers I (2008). A Retrospective Analysis of Pollen Host Plant Use by Stable and Declining Bumble Bee Species. *Ecology* 89: 1811–1823.
71. Requier F, Odoux JF, Tamic T, Moreau N, Henry M, Decourtye A, Bretagnolle V (2015). Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications* 25: 881–890.
72. Smart MD, Cornman RS, Iwanowicz DD, McDermott-Kubeczko M, Pettis JS, Spivak MS, Otto CRV (2017). A Comparison of Honey Bee-Collected Pollen From Working Agricultural Lands Using Light Microscopy and ITS Metabarcoding. *Environmental Entomology* 46: 38–49.
73. Goulson D, Lye GC, Darvill B (2008). Diet breadth, coexistence and rarity in bumblebees. *Biodiversity and Conservation* 17: 3269–3288.
74. Hanley ME, Awbi AJ, Franco M (2014). Going native? Flower use by bumblebees in English urban gardens. *Annals of Botany* 113: 799–806.
75. Klecka J, Hadrava J, Biella P, Akter A (2018). Flower visitation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a temperate plant-pollinator network. *PeerJ* 2018: e6025.

76. Sutherland JP, Sullivan MS, Poppy GM (1999). The influence of floral character on the foraging behaviour of the hoverfly, *Episyrphus balteatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 157–164.
77. Heinrich B (1976). The Foraging Specializations of Individual Bumblebees. *Ecological Monographs* 46: 105–128.
78. Osborne JL, Clark SJ, Morris RJ, Williams IH, Riley JR, Smith AD, Reynolds DR, Edwards AS (1999). A landscape-scale study of bumble bee foraging range and constancy, using harmonic radar. *Journal of Applied Ecology* 36: 519–533.
79. Balfour NJ, Fensome KA, Samuelson EEW, Ratnieks FLW (2015). Following the dance: Ground survey of flowers and flower-visiting insects in a summer foraging hotspot identified via honey bee waggle dance decoding. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 213: 265–271.
80. Seeley TD (1995). *The Wisdom of the Hive*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, London, England.
81. Seeley TD, Towne WF (1992). Tactics of dance choice in honey bees: do foragers compare dances? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30: 59–69.
82. Schürch R, Couvillon MJ, Burns DDR, Tasman K, Waxman D, Ratnieks FLW (2013). Incorporating variability in honey bee waggle dance decoding improves the mapping of communicated resource locations. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 199: 1143–1152.
83. Couvillon MJ, Ratnieks FLW (2015). Environmental consultancy: Dancing bee bioindicators to evaluate landscape “health.” *Frontiers in Ecology and Evolution* 3: 44.
84. Riley JR, Greggers U, Smith AD, Reynolds DR, Menzel R (2005). The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature* 435: 205–207.
85. Capaldi EA, Smith AD, Osborne JL, Fahrbach SE, Farris SM, Reynolds DR, Edwards AS, Martin A, Robinson GE, Poppy GM (2000). Ontogeny of orientation flight in the honeybee revealed by harmonic radar. *Nature* 403:6769 403: 537–540.
86. Beekman M, Ratnieks FLW (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology* 14: 490–496.

87. Visscher PK, Seeley TD (1982). Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Deciduous Forest. *Ecology* 63: 1790–1801.
88. Couvillon MJ, Schürch R, Ratnieks FLW (2014). Waggle dance distances as integrative indicators of seasonal foraging challenges. *PLoS ONE* 9.
89. Hass AL, Liese B, Heong KL, Settele J, Tscharntke T, Westphal C (2018). Plant-pollinator interactions and bee functional diversity are driven by agroforests in rice-dominated landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 253: 140–147.
90. Ornai A, Ne'eman G, Keasar T (2020). Management of forest fire buffer zones: Implications for flowering plants and bees. *Forest Ecology and Management* 473: 118310.
91. Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 71: 170–180.
92. de Manincor N, Hautekète N, Mazoyer C, Moreau P, Piquot Y, Schatz B, Schmitt E, Zélazny M, Massol F (2020). How biased is our perception of plant-pollinator networks? A comparison of visit- and pollen-based representations of the same networks. *Acta Oecologica* 105: 103551.
93. Galliot JN, Brunel D, Bérard A, Chauveau A, Blanchetête A, Lanore L, Farruggia A (2017). Investigating a flower-insect forager network in a mountain grassland community using pollen DNA barcoding. *Journal of Insect Conservation* 21: 827–837.
94. Pornon A, Andalo C, Burrus M, Escaravage N (2017). DNA metabarcoding data unveils invisible pollination networks. *Scientific Reports* 7: 1–11.
95. Pornon A, Escaravage N, Burrus M, Holota H, Khimoun A, Mariette J, Pellizzari C, Iribar A, Etienne R, Taberlet (2016). Using metabarcoding to reveal and quantify plant-pollinator interactions. *Scientific Reports* 6: 1–12.
96. Wilson EE, Sidhu CS, Levan KE, Holway DA (2010). Pollen foraging behaviour of solitary Hawaiian bees revealed through molecular pollen analysis. *Molecular Ecology* 19: 4823–4829.
97. Zhao YH, Lázaro A, Ren ZX, Zhou W, Li HD, Tao Z Bin, Xu K, Wu ZK, Wolfe LM, Li DZ (2019). The topological differences between visitation and pollen transport

networks: a comparison in species rich communities of the Himalaya–Hengduan Mountains. *Oikos* 128: 551–562.

98. Pornon A, Baksay S, Escaravage N, Burrus M, Andalo C (2019). Pollinator specialization increases with a decrease in a mass-flowering plant in networks inferred from DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution* 9: 13650–13662.
99. Macgregor CJ, Kitson JJN, Fox R, Hahn C, Lunt DH, Pocock MJO, Evans DM (2019). Construction, validation, and application of nocturnal pollen transport networks in an agro-ecosystem: a comparison using light microscopy and DNA metabarcoding. *Ecological Entomology* 44: 17–29.
100. Hawkins J, De Vere N, Griffith A, Ford CR, Allainguillaume J, Hegarty MJ, Baillie L, 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: e0134735.
101. Richardson RT, Lin C-H, Sponsler DB, Quijia JO, Goodell K, Johnson RM (2015). Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences* 3: 1400066.
102. Bell KL, Loeffler VM, Brosi BJ (2017). An *rbcL* reference library to aid in the identification of plant species mixtures by DNA metabarcoding. *Applications in Plant Sciences* 5: 1600110.
103. Sickel W, Ankenbrand MJ, Grimmer G, Holzschuh A, Härtel S, Lanzen J, Steffan-Dewenter I, Keller A (2015). Increased efficiency in identifying mixed pollen samples by meta-barcoding with a dual-indexing approach. *BMC Ecology* 15: 1–9.
104. Deagle BE, Thomas AC, McInnes JC, Clarke LJ, Vesterinen EJ, Clare EL, Kartzinel TR, Eveson JP (2019). Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Molecular Ecology* 28: 391–406.
105. Downey G, Hussey K, Daniel Kelly J, Walshe TF, Martin PG (2005). Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry* 91: 347–354.
106. Bogdanov S, Lullmann C, Mossel BL, D’arcy BR, Russmann H, Vorwohl G, Oddo L, Sabatini AG, Marcazzan GL, Piro R (1999). Honey quality, methods of analysis and

- international regulatory standards: review of the work of the International Honey Comission. *Bee World* 80: 61–69.
107. Persano Oddo L, Bogdanov S (2004). Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie* 35: S2–S3.
108. Ulusoy E, Kolaylı S (2014). Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen. *Journal of Food Biochemistry* 38: 73–82.
109. Tezcan F, Kolaylı S, Sahin H, Ulusoy E, Erim FB (2011). Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. *Journal of Food and Nutrition Research* 50: 33–40.
110. Özbalci B, Boyacı IH, Topcu A, Kadilar C, Tamer U (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chemistry* 136: 1444–1452.
111. Cavdar S, Yıldız O, Şahin H, Karahalil F, Kolaylı S (2013). Comparison of physical and biochemical characteristics of different quality of Turkish honey. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 13.
112. Tarım ve Orman Bakanlığı (2020). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği. Available at: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>. [Accessed: 27 October 2023].
113. Hotaman HE (2015). Anzer bal ve polenin bazı biyoaktif özelliklerinin in vitro olarak incelenmesi Rize: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi.
114. Güner A, Vural M, Sorkun K (1987). Rize Florası, Vejetasyonu ve Yöre Ballarının Polen Analizi. TÜBİTAK Matematik, Fizik ve Biyolojik Bilimler Araştırma Grubu.
115. Sorkun K, Doğan C (1995). Pollen analysis of Rize-Anzer (Turkish) honey. *Apiacta/An International Technical Magazine of Apicultural and Economic Information* 30: 75–82.
116. Oustuani AM (1976). Das mikroskopische Bild der Honige des östlichen Mittelmeergebietes.
117. Sorkun K, İnceoğlu Ö (1984). İç Anadolu Bölgesi ballarında polen analizi. *Doğa bilim dergisi* 8: 222–228.

118. Sorkun K, Dogan C (2002). The importance of the total number of pollen types in 10 gr of honey in distinguishing natural honey and artificial honey produced in Turkey. *Mellifera* 2.
119. Gümüş Y, Sorkun K, Doğan C, Başoğlu N, Bulakari N, Ergün K (1999). Türkiye’de üretilen doğal ve yapay kaynaklı balın ayırt edilmesine esas olacak fiziksel, kimyasal ve palinolojik kriterlerin belirlenmesine yönelik araştırmalar.
120. Hepsağ F (2019). Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Anzer Honey Produced in Rize, Turkey. *Gıda The Journal of Food* 44: 641–653.
121. Malkoç M, Çakir H, Kara Y, Can Z, Kolaylı S (2019). Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer honey from black sea region of Turkey. *DergiPark* 19: 143–151.
122. Doğan A, Kolankaya D (2005). Protective effect of Anzer honey against ethanol-induced increased vascular permeability in the rat stomach. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 173–178.
123. Korkmaz A, Kolankaya D (2009). Anzer honey prevents N-ethylmaleimide-induced liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61: 333–337.
124. Çakir Y, Çobanoğlu DN, Dervişoğlu G, Koçyiğit S, Karahan D, Yelkovan S (2020). Determination antimicrobial activity, palynological characteristics and chemical composition of some honey samples from Turkey. *Mellifera* 20: 41–60.
125. Demir E (2013). Ayder-Ceymakçur (Çamlıhemşin/Rize) yaylalarının florası ve yöre ballarının kimyasal ve palinolojik özellikleri Rize: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi.
126. Çöl B, Karaali M (2016). Evaluation of Different DNA Isolation Methods from Pine Honey. *Mugla Journal of Science and Technology* 2: 152–155.
127. Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission., Joint FAO/WHO Food Standards Programme. (2001). *Codex alimentarius. Food labelling, complete texts* 49.
128. Gençay Çelemlı Ö, Özkök A, Özenirler Ç, Mayda N, Zare G, Sorkun K (2021). Highlighting the Melissopalynological and Physicochemical Characteristics of Ayder-Rize (Turkey). *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology* 30: 119–133.

129. Yetkin G, Kundakçı S, Kanbur ED, Coskunçelebi K, Makbul S (2023). Melissopalynological and Physico-Chemical Properties of Cimil Plateau (Rize) Honey. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 4: 51–64.
130. Batáry P, Báldi A, Sárospataki M, Kohler F, Verhulst J, Knop E, Herzog F, Kleijn D (2010). Effect of conservation management on bees and insect-pollinated grassland plant communities in three European countries. Agriculture, Ecosystems & Environment 136: 35–39.
131. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G (2015). Methods of Melissopalynology. Bee World 59: 139–157.
132. Pires J, Estevinho ML, Feás X, Cantalapiedra J, Iglesias A (2009). Pollen spectrum and physico-chemical attributes of heather (*Erica* sp.) honeys of north Portugal. Journal of the Science of Food and Agriculture 89: 1862–1870.
133. Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, De Mattia F, Casiraghi M, Labra M (2015). A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. Food Chemistry 170: 308–315.
134. Koca I, Koca AF (2007). Poisoning by mad honey: A brief review. Food and Chemical Toxicology 45: 1315–1318.
135. Edgar JA, Roeder E, Molyneux RJ (2002). Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2719–2730.
136. Olivieri C, Marota I, Rollo F, Luciani S (2012). Tracking Plant, Fungal, and Bacterial DNA in Honey Specimens*. Journal of Forensic Sciences 57: 222–227.
137. Molan PC (2015). The Limitations of the Methods of Identifying the Floral Source of Honeys. Bee World 79: 59–68.
138. Cheng H, Jin W, Wu H, Wang F, You C, Peng Y, Jia S (2007). Isolation and PCR Detection of Foreign DNA Sequences in Bee Honey Raised on Genetically Modified Bt (Cry 1 Ac) Cotton. Food and Bioproducts Processing 85: 141–145.
139. Galimberti A, Mattia F De, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. Elsevier 50: 55–63.
140. Erdtman G (1963). Advances in Botanical Research (Vol. 1).

141. Vorwohl G (1967). The microscopic analysis of honey, a comparison of its methods with those of the other branches of palynology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 3: 287–290.
142. Farkas A, Orosz-Kovacs Z (2012). Assessment of honey plant resources through pollen analysis in Coorg honeys of Karnataka state. *The International Journal of Plant Reproductive Biology* 4: 31–39.
143. Valentini A, Miquel C, Taberlet P (2010). DNA Barcoding for Honey Biodiversity. *Diversity* 2: 610–617.
144. Mitchell RJ, Irwin RE, Flanagan RJ, Karron JD (2009). Ecology and evolution of plant–pollinator interactions. *Annals of Botany* 103: 1355–1363.
145. Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83: 263–268.
146. Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Bello-López MÁ, Callejón-Mochón M, Jiménez-Sánchez JC, Guiraúm-Pérez A (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta* 65: 686–691.
147. Schnell IB, Fraser M, Willerslev E, Gilbert MTP (2010). Characterisation of insect and plant origins using DNA extracted from small volumes of bee honey. *Arthropod-Plant Interactions* 4: 107–116.
148. Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 1342–1350.
149. Alves RDF, Santos FDAR Dos (2014). Plant sources for bee pollen load production in Sergipe, northeast Brazil. *Palynology* 38: 90–100.
150. Laube I, Hird H, Brodmann P, Ullmann S, Schöne-Michling M, Chisholm J, Broll H (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry* 118: 979–986.
151. Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods,

- monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547.
152. Wang J, Li Q (2011). Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Advances in food and nutrition research* 62: 89–137.
 153. Davies AMC (1976). The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *International Journal of Food Science & Technology* 11: 515–523.
 154. Davies AMC (1975). Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research* 14: 29–39.
 155. Von der Ohe W, Dustmann J-H, von der Ohe K (1991). Prolin als kriterium der reife des honigs. *Deutsche Lebensmittel* 87: 383–386.
 156. Gilbert FS (1981). Foraging ecology of hoverflies: morphology of the mouthparts in relation to feeding on nectar and pollen in some common urban species. *Ecological Entomology* 6: 245–262.
 157. Pawlowska M, Armstrong DW (1994). Evaluation of enantiomeric purity of selected amino acids in honey. *Chirality* 6: 270–276.
 158. Pirini A, Conte LS, Francioso O, Lercker G (1992). Capillary gas chromatographic determination of free amino acids in honey as a means of discrimination between different botanical sources. *Journal of High Resolution Chromatography* 15: 165–170.
 159. Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35: 4–17.
 160. Baroni M V., Chiabrando GA, Costa C, Wunderlin DA (2002). Assessment of the Floral Origin of Honey by SDS-Page Immunoblot Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1362–1367.
 161. Wang J, Kliks MM, Qu W, Jun S, Shi G, Li QX (2009). Rapid Determination of the Geographical Origin of Honey Based on Protein Fingerprinting and Barcoding Using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10081–10088.
 162. Bouseta A, Collin S (1995). Optimized Likens-Nickerson Methodology for Quantifying Honey Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1890–1897.

163. Bianchi F, Careri M, Chemistry MM (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 89: 527–532.
164. Radovic BS, Careri M, Mangia A, Musci M, Gerboles M, Anklaam E (2001). Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry* 72: 511–520.
165. Radovic BS, Goodacre R, Anklaam E (2001). Contribution of pyrolysis-mass spectrometry (Py-MS) to authenticity testing of honey. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 60: 79–87.
166. Alissandrakis E, Tarantilis PA, Harizanis PC, Polissiou M (2005). Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 91–97.
167. Serra Bonvehí J, Ventura Coll F (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 275–282.
168. Bentivenga G, D’Auria M, Fedeli P, Mauriello G, Racioppi R (2004). SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence for the presence of pollutants from anthropogenic activities. *International Journal of Food Science & Technology* 39: 1079–1086.
169. Gritzapis P, Timotheou-Potamia M (1989). Determination of reducing sugars with a 2,4-dinitrophenolate-selective membrane electrode. *Analytica Chimica Acta* 218: 37–46.
170. Girish Kumar K, Indrasenan P (1988). Titrimetric methods for the determination of some sulphur drugs using N-bromophthalimide and N-bromosaccharin. *Analyst* 113: 1369–1372.
171. Peris-Tortajada M, Puchades R, Maquieira A (1992). Determination of reducing sugars by the neocuproine method using flow injection analysis. *Food Chemistry* 43: 65–69.
172. White JW (1980). Detection of Honey Adulteration by Carbohydrate Analysis. *Journal of AOAC International* 63: 11–18.

173. Pukl M, Prošek M (1990). Rapid quantitative TLC analysis of sugars using an improved commonly used solvent system. *Journal of Planar Chromatography* 3: 173–176.
174. Low NH, Sporns PE (1988). Analysis and Quantitation of Minor Di- and Trisaccharides in Honey, Using Capillary Gas Chromatography. *Journal of Food Science* 53: 558–561.
175. Peschet JL, Giacalone A (1991). Un nouveau concept en analyse des sucres : la chromatographie ionique couplée à l'ampèrométrie pulsée. *Industries alimentaires et agricoles* 108: 583–586.
176. Bogdanov S (1989). Determination of Pinocembrin in Honey Using HPLC. *Journal of Apicultural Research* 28: 55–57.
177. Bugner E, Feinberg M (1992). Determination of Mono- and Disaccharides in Foods by Interlaboratory Study: Quantitation of Bias Components for Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 75: 443–464.
178. Zunin P, Calcagno C, Evangelisti F (1987). L'analisi chimico-bromatologica nel controllo della genuinità del miele. *Rivista Italiana di Scienze Alimentari* 16: 317–322.
179. Calcagno C, Zunin P, Evangelisti F (1987). Chemical analysis to determine the genuineness of honey samples. *Revista Ital Sci Aliment* 16: 453–458.
180. Swallow KW, Low NH (1994). Determination of Honey Authenticity by Anion-Exchange Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 77: 695–702.
181. Voldřich M, Rajchl A, Cuhra P (2009). Detection of Foreign Enzyme Addition into the Adulterated Honey. *Special Issue Czech J Food Sci* 27.
182. Schade JE, Marsh GL, Eckert JE (1958). Diastase Activity and Hydroxy-Methyl-Furfural in Honey and their Usefulness in Detecting Heat Alteration. *Journal of Food Science* 23: 446–463.
183. Oddo' LP, Pulcini P (n.d.). Scientific note A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content 1.
184. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1220–1234.

185. Ferreres F, Giner JM, Tomás-Barberán FA (1994). A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65: 371–372.
186. Ferreres F, Blázquez MA, Gil MI, Tomás-Barberán FA (1994). Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* 669: 268–274.
187. Delgado C, Tomás-Barberán FA, Talou T, Gaset A (1994). Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. *Chromatographia* 1994 38:1 38: 71–78.
188. Tomaand's-Barberaand'n FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 485–496.
189. Ferreres F, García-Viguera C, Tomás-Lorente F, Tomás-Barberán FA (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 121–123.
190. Andrade P, Ferreres F, Gil MI, Tomás-Barberán FA (1997). Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry* 60: 79–84.
191. Perez-Cerrada M, Herrero-Villén MA, Maquieira A (1989). Sugar-rich food: Determination of inorganic anions by ionic chromatography. *Food Chemistry* 34: 285–294.
192. Pietra R, Fortaner S, Sabbioni E, Gallorini M (1993). Use of Chelex 100 resin in preconcentration and radiochemical separation neutron activation analysis applied to environmental toxicology and biomedical research. *Journal of trace and microprobe techniques* 11: 235–250.
193. Sevimli H, Bayulgen N, Varinlioglu A (2005). Determination of trace elements in honey by INAA in Turkey. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 165: 319–325.
194. Stein K, Umland F (1986). Spurenbestimmung von Blei, Cadmium und Mangan in Honigen und Zuckern. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 323: 176–177.

195. Jain SA, de Jesus FT, Marchioro GM, de Araújo ED (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology* 33: 753–756.
196. Loman NJ, Pallen MJ (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology* 13: 787–794.
197. Kulski JK (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges IntechOpen*, p 464. doi:10.5772/61964.
198. Illumina (2023). NGS Workflow Steps | Illumina sequencing workflow. Illumina. Available at: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>. [Accessed: 14 October 2023].
199. Metzker ML (2009). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31–46.
200. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045–2050.
201. Yoccoz NG (2012). The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology* 21: 2031–2038.
202. Kajtoch Ł (2014). A DNA Metabarcoding Study of a Polyphagous Beetle Dietary Diversity: the Utility of Barcodes and Sequencing Techniques. *Folia Biologica (Poland)* 62: 223–234.
203. Mardis ER (2013). Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6: 287–303.
204. Richardson RT, Lin C-H, Quijia JO, Riusech NS, Goodell K, Johnson RM (2015). Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Applications in Plant Sciences* 3: 1500043.
205. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* 38: 95–109.

206. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT (2012). Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLOS ONE* 7: e30087.
207. Guertler P, Eicheldinger A, Muschler P, Goerlich O, Busch U (2014). Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chemistry* 149: 302–306.
208. Waiblinger H-U, Ohmenhaeuser M, Meissner S, Schillinger M, Pietsch K, Goerlich O, Mankertz J, Lieske K, Broll H (2012). In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 7: 243–254.
209. Lalmangaihi R, Ghatak S, Laha R, Gurusubramanian G, Kumar NS (2014). Protocol for optimal quality and quantity pollen DNA isolation from honey samples. *Journal of Biomolecular Techniques* 25: 92–95.
210. Coissac E, Riaz T, Puillandre N (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology* 21: 1834–1847.
211. Hollingsworth PM, Li DZ, Van Der Bank M, Twyford AD (2016). Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 20150338.
212. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, *et al.* (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLOS ONE* 5: e8613.
213. Koetschan C, Förster F, Keller A, Schleicher T, Ruderisch B, Schwarz R, Müller T, Wolf M, Schultz J (2010). The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny. *Nucleic Acids Research* 38: D275–D279.
214. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society Publishing* 270: 313–321.
215. CBOL Plant Working Group 1 (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
216. Techen N, Parveen I, Pan Z, Khan IA (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology* 25: 103–110.

217. Cheng T, Xu C, Lei L, Li C, Zhang Y, Zhou S (2016). Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16: 138–149.
218. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8369–8374.
219. Galimberti A, De Mattia F, Bruni I, Scaccabarozzi D, Sandionigi A, Barbuto M, Casiraghi M, Labra M (2014). A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees. *PLOS ONE* 9: e109363.
220. Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S, Eiler A (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS ONE* 10.
221. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology* 21: 1794–1805.
222. Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P (2012). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21: 1931–1950.
223. Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG, Thompson J, Uriarte M, Zimmerman JK (2010). Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *PLOS ONE* 5: e15409.
224. Buchheim MA, Keller A, Koetschan C, Förster F, Merget B, Wolf M (2011). Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLOS ONE* 6: e16931.
225. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2011). GenBank. *Nucleic Acids Research* 39.
226. Deiner K, Bik HM, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, Altermatt F, Creer S, Bista I, Lodge DM, de Vere N, *et al.* (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872–5895.

227. Harper LR, Lawson Handley L, Hahn C, Boonham N, Rees HC, Gough KC, Lewis E, Adams IP, Brotherton P, Phillips S, *et al.* (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and Evolution* 8: 6330–6341.
228. Thomsen PF, Sigsgaard EE (2019). Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution* 9: 1665–1679.
229. Kartzinel TR, Chen PA, Coverdale TC, Erickson DL, Kress WJ, Kuzmina ML, Rubenstein DI, Wang W, Pringle RM (2015). DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 8019–8024.
230. Arrizabalaga-Escudero A, Merckx T, García-Baquero G, Wahlberg N, Aizpurua O, Garin I, Goiti Urtzi, Aihartza J (2019). Trait-based functional dietary analysis provides a better insight into the foraging ecology of bats. *Journal of Animal Ecology* 88: 1587–1600.
231. Li M, Cao H, But PP-H, Shaw P-C (2011). Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution* 49: 271–283.
232. De Boer HJ, Ghorbani A, Manzanilla V, Raclariu AC, Kreziou A, Ounjai S, Osathanunkul M, Gravendeel B (2017). DNA metabarcoding of orchid-derived products reveals widespread illegal orchid trade. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284.
233. Stoeckle MY, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP (2011). Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Scientific Reports* 1: 42.
234. Richardson R, Lin C-H, Quijia JO, Riusech NS, Goodell K, Johnson RM (2015). Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Applications in Plant Sciences* 3: 1500043.
235. Prosser SWJ, Hebert PDN (2017). Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry* 214: 183–191.

236. Lucek K, Galli A, Gurten S, Hohmann N, Maccagni A, Patsiou T, Willi Y (2019). Metabarcoding of honey to assess differences in plant-pollinator interactions between urban and non-urban sites. *Apidologie* 50: 317–329.
237. Khansaritoreh E, Salmaki Y, Ramezani E, Azirani TA, Keller A, Neumann K, Alizadeh K, Zarre S, Beckh G, Behling H (2017). Employing DNA metabarcoding to determine the geographical origin of honey. *Heliyon* 6: e05596.
238. Chiara B, Francesco C, Fulvio B, Paola M, Annalisa G, Stefania S, Luigi AP, Simone P (2021). Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control* 128.
239. Milla L, Sniderman K, Lines R, Mousavi-Derazmahalleh M, Encinas-Viso F (2021). Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution* 11: 8683–8698.
240. Özkök A, Akel Bilgiç H, Kosukcu C, Arık G, Canlı D, Yet İ, Karaaslan C (2023). Comparing the melissopalynological and next generation sequencing (NGS) methods for the determining of botanical origin of honey. *Food Control* 148: 109630.
241. Sorek R, Zhu Y, Creevey CJ, Francino MP, Bork P, Rubin EM (2007). Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* 318: 1449–1452.
242. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8.
243. Gilles A, Meglécz E, Pech N, Ferreira S, Malausa T, Martin J-F (2011). Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12: 1–11.
244. Bordoni R, Bonnal R, Rizzi E, Carrera P, Benedetti S, Cremonesi L, Stenirri S, Colombo A, Montrasio C, Bonalumi S (2008). Evaluation of human gene variant detection in amplicon pools by the GS-FLX parallel Pyrosequencer. *BMC Genomics* 9: 1–8.
245. Moore MJ, Dhingra A, Soltis PS, Shaw R, Farmerie WG, Foltá KM, Soltis DE (2006). Rapid and accurate pyrosequencing of angiosperm plastid genomes. *BMC Plant Biology* 6: 1–13.

246. Hornshøj H, Bendixen E, Conley LN, Andersen PK, Hedegaard J, Panitz F, Bendixen C (2009). Transcriptomic and proteomic profiling of two porcine tissues using high-throughput technologies. *BMC Genomics* 10: 1–12.
247. Jiménez DJ, Andreote FD, Chaves D, Montaña JS, Osorio-Forero C, Junca H, Zambrano MM, Baena S (2012). Structural and Functional Insights from the Metagenome of an Acidic Hot Spring Microbial Planktonic Community in the Colombian Andes. *PLoS ONE* 7: e52069.
248. Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* 12: 118–123.
249. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348–352.
250. Wang Y, Wen Z, Shen J, Cheng W, Li J, Qin X, Ma D, Shi Y (2014). Comparison of the performance of Ion Torrent chips in noninvasive prenatal trisomy detection. *Journal of Human Genetics* 59: 393–396.
251. Bragg L, Tyson GW (2014). Metagenomics using next-generation sequencing. *Methods in Molecular Biology* 1096: 183–201.
252. Davis PH (1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Edinburgh: University Press.
253. Davis PH, Mill RR, Tan K (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 10), Edinburgh: Edinburgh University Press.
254. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer HC (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 11), Edinburgh University Press.
255. Güner A, Vural M, Sorkun K (1987). *Rize Florası, Vegetasyonu ve Yöre Ballarının Polen Analizi* Ankara.
256. Terzioğlu S (1994). *Of-İkizdere-Anzer Vadisi Florası* Karadeniz Teknik Üniversitesi.
257. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)* İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

258. Anonim (2014). Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme Proje Raporları.
259. Erdtman G (1952). Pollen Morphology and Plant Taxonomy Uppsala: Almqvist and Wiksells.
260. Ben-Halbritter H, Ulrich S, BGrímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, Buchner R, Svojtka M, Frosch-Radivo A (2018). Illustrated Pollen Terminology 1–483.
261. Sorkun K (2008). Türkiye’nin Nektarlı Bitkileri, Polenleri ve Balları. Palme Yayıncılık Palme Yayıncılık.
262. Wodehouse RP (1935). Pollen Grains and Worlds of Different Sizes. The Scientific Monthly 40: 58–62.
263. PalDat (2023). Palynological Database. Available at: <https://www.paldat.org/>. [Accessed: 17 December 2023].
264. Sorkun K (1985). Balda Polen Analizi. Teknik Arıcılık Dergisi 1: 28–30.
265. Sorkun K, Doğan C (2002). Türkiye’de üretilen doğal ve yapay balların ayırt edilmesinde 10 gram baldaki toplam polen sayısının (TPS) önemi. Mellifera 2: 2–6.
266. Doyle JJ, Doyle JL (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Phytochemical Buttetin 19: 11–15.
267. Çöl B, Karaali M (2016). Evalution of Different DNA Isolation Methods from Pine Honey. Article in Mugla Journal of Science and Technology 2: 152–155.
268. Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, Sigsgaard EE, Hellström M (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. Methods in Ecology and Evolution 8: 635–645.
269. Oksanen J, Simpson GL (2009). The vegan Package.
270. Zymo Research (2024). What Are Phred Scores? Available at: <https://zymoresearch.eu/blogs/blog/what-are-phred-scores>. [Accessed: 26 August 2024].
271. Spellerberg IF, Fedor PJ (2003). A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. Global Ecology and Biogeography 12: 177–179.

272. Heip C (1974). A New Index Measuring Evenness. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 555–557.
273. Bryant Jr VM, Jones GD, Bryant VM, Palynology Laboratory TAMU J (2001). The r-values of honey: Pollen coefficients. *Palynology* 25: 11–28.
274. Feller-Demalsy MJ, Parent J, Strachan AA (1989). Microscopic Analysis of Honeys from Manitoba, Canada. *Journal of Apicultural Research* 28: 41–19.
275. Schievano E, Morelato E, Facchin C, Mammi S (2013). Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. *Journal of agricultural and food chemistry* 61: 1747–1755.
276. Madesis P, Ganopoulos I, Sakaridis I, Argiriou A, Tsaftaris A (2014). Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* 60: 163–172.
277. Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I (2017). A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16: 1072–1100.
278. Bell KL, Fowler J, Burgess KS, Dobbs EK, Gruenewald D, Lawley B, Morozumi C, Brosi BJ (2017). Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant–pollinator interactions. *Applications in Plant Sciences* 5.
279. Bell K, Turo K, Lowe A, Nota K, Keller A, Encinas-Viso F, Parducci L, Richardson R, Leggett R, Brosi B (2022). Pollen DNA metabarcoding and related methods in global change ecology: prospects, challenges, and progress. *Authorea*.
280. Cornman RS, Otto CRV, Iwanowicz D, Pettis JS (2015). Taxonomic Characterization of Honey Bee (*Apis mellifera*) Pollen Foraging Based on Non-Overlapping Paired-End Sequencing of Nuclear Ribosomal Loci. *PLOS ONE* 10: e0145365.
281. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2015). GenBank. *Nucleic Acids Research* 43: D30.
282. Squizzato S, Park YM, Buso N, Gur T, Cowley A, Li W, Uludag M, Pundir S, Cham JA, McWilliam H (2015). The EBI Search engine: providing search and retrieval functionality for biological data from EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 43: W585–W588.

283. Mashima J, Kodama Y, Kosuge T, Fujisawa T, Katayama T, Nagasaki H, Okuda Y, Kaminuma E, Ogasawara O, Okubo K (2016). DNA data bank of Japan (DDBJ) progress report. *Nucleic Acids Research* 44: D51–D57.
284. Willis KJ (2016). *State of the World's Plants*.
285. Bell KL, Petit RA, Cutler A, Dobbs EK, Macpherson JM, Read TD, Burgess KS, Brosi BJ (2021). Comparing whole-genome shotgun sequencing and DNA metabarcoding approaches for species identification and quantification of pollen species mixtures. *Ecology and Evolution* 11: 16082.
286. Jones L, Twyford AD, Ford CR, Rich TCG, Davies H, Forrest LL, Hart ML, McHaffie H, Brown MR, Hollingsworth PM (2021). Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom. *Molecular ecology resources* 21: 2050–2062.
287. Kuzmina ML, Braukmann TWA, Fazekas AJ, Graham SW, Dewaard SL, Rodrigues A, Bennett BA, Dickinson TA, Saarela JM, Catling PM (2017). Using herbarium-derived DNAs to assemble a large-scale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. *Applications in Plant Sciences* 5: 1700079.
288. Breitwieser FP, Perteu M, Zimin A V., Salzberg SL (2019). Human contamination in bacterial genomes has created thousands of spurious proteins. *Genome research* 29: 954–960.
289. Ecevit Genç G (2015). Anatomical, micromorphological and palynological studies on Turkish endemic *Heracleum platytaenium* Boiss. (Apiaceae). *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University* 44: 207–214.
290. Köstekçi S (2016). Türkiye’de yetişen *Carduus* L. (Asteraceae, Cardueae) cinsinin revizyonu Malatya: İnönü Üniversitesi.
291. Erşen Bak F, Özcan M (2018). Pollen Morphology of Endemic ne Anatolian *Cirsium* Taxa (Asteraceae). *Pak J Bot* 50: 1181–1185.
292. Liu J-X, Li J-Y, Zhang Y-L, Ning J-C (2010). Pollen morphology of the tribe Lithospermeae of Boraginoideae in China and its taxonomic significance on JSTOR. *Plant Systematics and Evolution* 290: 75–83.

293. Mutlu B, Erik S (2012). Pollen morphology and its taxonomic significance of the genus *Arabis* (Brassicaceae) in Turkey. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1931–1946.
294. Erkara IP, Ocak A, Pehlivan S (2008). Pollen morphology of some Turkish *Campanula* spp. and their taxonomic value. *Bangladesh Journal of Botany* 37: 33–42.
295. Khansari E, Zarre S, Alizadeh K, Attar F, Aghabeigi F, Salmaki Y (2012). Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207: 203–211.
296. Mostafa EN, Sedigheh NS, Rosa E (2017). Pollen characters as taxonomic evidence in some species of Dipsacaceae from Iran. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 24: 129–136.
297. Mete D, Şahin AA, Hamzaoglu E, Pinar NM (2021). Pollen morphology applied to species delimitation of Turkish *Dianthus* L. (Caryophyllaceae). *Palynology* 45: 599–625.
298. Shahrestani MM, Faghir MB (2021). Taxonomic significance based on palynological data of the genus *Sedum* in Iran. *Rostaniha* 22: 259–272.
299. Özkök A, Mayda N, Bayram NE (2022). Comparison of Pollen Morphologies Examination of Some *Rhododendron* Species - Plant Source of Mad Honey. *The Journal of Food* 47: 212–219.
300. Maciej Serda, Becker FG, Cleary M, Team RM, Holtermann H, The D, Agenda N, Science P, Sk SK, Hinnebusch R (2011). Morphological characterization and the germinating potential of *Coronilla varia* L. pollen. (G. Balint, B. Antala, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova, editors) *Uniwersytet śląski* 7: 343–354.
301. Saatçioğlu G (2017). Türkiye’de yetişen *Hedysarum* L. (Fabaceae) taksonlarının polen morfolojisi Bursa: Uludağ Üniversitesi.
302. İşgör FG (2006). *Genista* L. cinsinin (Leguminosae) polen morfolojisinin ışık ve taramalı elektron mikroskoplarında karşılaştırmalı incelenmesi Ankara: Ankara Üniversitesi.

303. Talebi SM, Azizi N, Yadegari P, Matsyura A (2020). Analysis of pollen morphological characteristics in Iranian *Onobrychis* Miller (Fabaceae) taxa. *Brazilian Journal of Botany* 43: 609–632.
304. Deniz İ, Çırpıcı A, Yıldız K (2013). Palynological study of the *Geranium* (Geraniaceae) species from the Thrace region (Turkey-in-Europe). *Phytologia Balcanica* 19: 347–355.
305. Köse YB, Erkara IP, Alan S (2011). Pollen morphology of some Turkish *Ajuga* L. (Lamiaceae) and its taxonomic value. *Bangladesh Journal of Botany* 40.
306. Celenk S, Tarımcılar G, Bıçakcı A, Kaynak G, Malyer H (2008). A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 157: 141–154.
307. Özler H, Pehlivan S, Kahraman A, Doğan M, Celep F, Başer B, Yavru A, Bagherpour S (2011). Pollen morphology of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206: 316–327.
308. Ozaltan Z, Kocıyigit M (2022). Pollen morphology of some taxa in the family Lamiaceae (Labiatae) from Turkey. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences* 5: 11–20.
309. Mohsenzadeh S, Sheidai M, Ghahremaninejad F, Koohdar F (2020). A palynological study of the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Grana* 59: 454–465.
310. Başer B, Aşit MY, Kürşat M (2022). Pollen Morphology of Some Taxa Belonging to *Polygonum* L. and *Rumex* L. (Polygonaceae) and Its Taxonomic Significance. *International Journal of Pure and Applied Sciences* 8: 163–172.
311. Lee S, Blackmore S (1992). A palynotaxonomic study of the genus *Trollius* (Ranunculaceae). *Grana* 31: 81–100.
312. Wrońska-Pilarek D, Jagodziński AM, Bocianowski J, Janyszek M (2015). The optimal sample size in pollen morphological studies using the example of *Rosa canina* L. (Rosaceae). *Palynology* 39: 56–75.
313. Lechowicz K, Wrońska-Pilarek D, Bocianowski J, Maliński T (2020). Pollen morphology of Polish species from the genus *Rubus* L. (Rosaceae) and its systematic importance. *PLOS ONE* 15: e0221607.

314. Hebda RJ, Chinnappa CC, Hebda RJ, Chinnappa CC (1990). Studies on pollen morphology of Rosaceae in Canada. *RPaPa* 64: 103–108.
315. Huysmans S, Dessein S, Smets E, Robbrecht E, Huysmans S, Dessein S, Smets E, Robbrecht E (2003). Pollen morphology of NW European representatives confirms monophyly of Rubieae (Rubiaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology* 127: 219–240.
316. Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLOS ONE* 6: e17497.
317. Gibson J, Shokralla S, Porter TM, King I, Van Konyenburg S, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabaei M (2014). Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasystematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 8007–8012.
318. Kraaijeveld K, de Weger LA, Ventayol García M, Buermans H, Frank J, Hiemstra PS, den Dunnen JT (2015). Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources* 15: 8–16.
319. Bell KL, Burgess KS, Botsch JC, Dobbs EK, Read TD, Brosi BJ (2019). Quantitative and qualitative assessment of pollen DNA metabarcoding using constructed species mixtures. *Molecular Ecology* 28: 431–455.
320. Richardson RT, Curtis HR, Matcham EG, Lin CH, Suresh S, Sponsler DB, Hearon LE, Johnson RM (2019). Quantitative multi-locus metabarcoding and waggle dance interpretation reveal honey bee spring foraging patterns in Midwest agroecosystems. *Molecular Ecology* 28: 686–697.
321. Tanaka K, Nozaki A, Nakadai H, Shiwa Y, Shimizu-Kadota M (2020). Using pollen DNA metabarcoding to profile nectar sources of urban beekeeping in Kōtō-ku, Tokyo. *BMC research notes* 13.
322. Borg M, Twell D (2011). Pollen: Structure and Development. *Encyclopedia of Life Sciences*.

323. Bänsch S, Tschardt T, Wünschiers | Röbbel, Netter | Leonie, Bertram Brenig |, Gabriel D, Westphal C (2020). Using ITS2 metabarcoding and microscopy to analyse shifts in pollen diets of honey bees and bumble bees along a mass-flowering crop gradient. *Molecular Ecology* 29: 5003–5018.
324. De Almeida-Muradian LB, Stramm KM, Horita A, Barth OM, Da Silva de Freitas A, Estevinho LM (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science & Technology* 48: 1698–1706.
325. Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J, Ortea I (2019). Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 3854–3864.
326. Palumbo F, Scariolo F, Vannozzi A, Barcaccia G (2020). NGS-based barcoding with mini-COI gene target is useful for pet food market surveys aimed at mislabelling detection. *Scientific Reports* 10: 1–8.
327. Helyar MJ (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control* 101: 134–143.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep TÜRKER

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi :

Telefon (İş) :

E-Posta :

Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğal ve Bitkisel Ürünler, Kozmetik Ürünler Ana bilim Dalı	2024
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Botanik Ana bilim Dalı	2014
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Trabzon Lisesi (YDA)	

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Botanik, Moleküler Sistematiği, Tıbbi Bitkiler, Palinoloji, Metabarkodlama

YAYINLAR

1. Gültepe, M., Makbul, S., Güzel, M. E., Türker, Z., & Coşkunçelebi, K. (2024). *Tragopogon davutii-turanii*: a new species of *Tragopogon* from Anatolia. *Nordic Journal of Botany*, 2024(3): e04178.

2. Coşkunçelebi, K., Gültepe, M., Türker, Z., & Makbul, S. (2023). Türkiye Florasına Katkı: *Tragopogon porrifolius* subsp. *eriospermus* (Asteraceae; Cichorieae). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 10(3): 311-318.
3. Budak Ü., Hamzaoğlu E., Coşkunçelebi K., Türker Z., (2017). Three new species of *Paronychia* (Caryophyllaceae) from Turkey, *PHYTOTAXA*, 291:224-230.

BİLDİRİLER

1. Türker Z., Coşkunçelebi K., Budak Ü., (2022). Taxonomical notes on *Paronychia beauverdii* Czecz. (Caryophyllaceae) based on nrDNA ITS in Turkey. ISBR 2022, Sözlü Bildiri, 21-23 Eylül 2022, Rize, Türkiye.
2. Türker Z., Coşkunçelebi K., Budak Ü., (2021). *Paronychia kurdica* Boiss. Kompleksinin nrDNA ITS'ye Verilerine Bağlı Olarak Taksonomik Açıdan Değerlendirilmesi. ISBR 2021 Sözlü Bildiri, 18-20 Kasım 2021, Rize, Türkiye.
3. Türker Z., Coşkunçelebi K., Gültepe M., (2014). *Tragopogon porrifolius* (Asteraceae) Türünün Türkiye’de Dağılışı ve Taksonomik Durumu. Poster Bildiri, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
4. Türker Z., Makbul S., Okur S., Coşkunçelebi K., (2012). *Scorzonera laciniata* (Asteraceae) Türünün Türkiye’de Dağılışı ve Taksonomik Durumu. Poster Bildiri, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye.

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. 2211-A Yurt içi Genel Doktora Bursu, TUBİTAK BİDEB, 2023.
2. YÖK 100/2000 Doktora Bursu, Yükseköğretim Kurulu, 2021.