

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA YÖRESİ *BOMBUS TERRESTRIS* ARISINDA mtDNA
BAKIMINDAN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Şadiye TAŞBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA YÖRESİ *BOMBUS TERRESTRİS* ARISINDA mtDNA
BAKIMINDAN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN
ARAŞTIRILMASI

Şadiye TAŞBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2016-1502proje numarası ile desteklenmiştir.

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA YÖRESİ *BOMBUS TERRESTRIS* ARISINDA mtDNA
BAKIMINDAN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN
ARAŞTIRILMASI

Şadiye TAŞBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 23 / 05 / 2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Devrim OSKAY

Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Doç. Dr. Kemal KARABAĞ

ÖZET

ANTALYA YÖRESİ *BOMBUS TERRESTRIS* ARISINDA mtDNA BAKIMINDAN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN ARAŞTIRILMASI

Şadiye TAŞBAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr.Kemal Karabağ

Mayıs 2017 / 64 Sayfa

Tamamlanan bu tez projesinde, materyal olarak 5 farklı ticari firmadan, 3 farklı doğal alandan (Faselis, Termessos, Bayatbademler), 3 farklı yoğun seracılık bölgesinden (Aksu, Demre, Kumluca) ve 1 yayla seracılığının yeni başladığı alandan (Geyikbayırı-Sinan Değirmeni) 30'ar *Bombus terrestris* L. işçi arı örneği toplanmıştır.

Tüm bireylerden Chelex-100 ve CTAB yöntemi kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmış ve özgün primerler kullanılarak mtDNA CO1b (sitokromoksidaz Ib) ve Cytb (sitokrom b) gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Toplamda mtDNA CO1b gen bölgesine ait 180 adet ve mtDNA Cytb gen bölgesine ait 180 adet nükleotid dizisi üzerinden SNP haplotipler belirlenmiştir. Haplotip analizleri sonucunda 12 populasyonun genetik yapısı ve populasyonlar arası filogenetik ilişkiler ortaya çıkartılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda ticari firma ve seralara yakın doğal alanlardaki arı örneklerinin çalışılan gen bölgeleri bakımından yüksek benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu tespit, bitkisel üretimde polinasyon amacıyla seralarda kullanılan kolonilerden yakın çevreye gen akışının olduğunu işaret etmektedir. Farklı habitatlardan toplanan doğal populasyonların filogenetik ağaçta ticari ve sera bölgesi populasyonlarından farklı dalları teşkil etmesi kendilerine özgün genetik yapıları koruduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, ticari kolonilerin kontrolsüz ve tedbirsiz kullanımının yakın zamanda orijinal *B. terrestris* gen kaynaklarına ciddi tehdit olacağını düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: MtDNA, CO1b, Cytb, filogenetik, *Bombus terrestris*

JÜRİ : Doç. Dr. Kemal KARABAĞ (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Devrim OSKAY

Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENETIC DIVERSITY AND PHILOGENETIC RELATIONS WITH REGARD TO mtDNA OF BOMBUS TERRESTRIS BEE IN ANTALYA REGION

Şadiye TAŞBAŞ

MScThesis in AgriculturalBiotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kemal Karabağ

May 2017 / 64 Pages

Bombus terrestris L. worker bee samples were collected as material from 5 different commercial companies, 3 different natural areas (Fhaselis, Termessos, Bayatbademler), 3 different dense greenhouses areas (Aksu, Demre, Kumluca) and 1 plateau area (Geyikbayırı-Sinan Değirmeni) where greenhouses activities have been just beginning in this completed thesis project. 30 bees from each of locations.

DNA extraction was performed by Chelex-100 and CTAB from all individuals and mtDNA CO1b (cytocromoxidase Ib) and Cytb (cytochrome b) gene regions were amplified by PCR using specific primers. In total, SNP haplotypes were determined from 180 nucleotide sequences belonging to the mtDNA CO1b gene region and 180 nucleotide sequences belonging to the mtDNACytb gene region. Haplotype analysis revealed genetic structure of 12 populations and phylogenetic relationships between populations.

As a result of the analyzes, it was determined that bombus samples in the natural areas near the greenhouses and commercial firms have high similarity in terms of the studied gene regions. This finding indicates that there is a gene flow in the vicinity of the colonies used in the greenhouse for the purpose of policing in crop production. The fact that the natural populations collected from different habitats constitute different branches from the commercial and greenhouses populations in the phylogenetic tree show that they have retained their genetic constructs. The results obtained suggest that the uncontrolled and imprudent use of commercial colonies will soon be a serious threat to the original *B. terrestris* gene sources.

KEYWORDS: MtDNA, CO1b, Cytb, Phylogenetic, *Bombus terrestris*

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Kemal KARABAĞ (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Devrim OSKAY

Asst. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

ÖNSÖZ

Türkiye biyolojik çeşitlilik bakımından dünya çapında önemli coğrafyalardan biridir. Sahip olduğu genetik kaynaklardan tam anlamıyla faydalanamayan ülkemizin en azından özgün canlı türlerini tanımlaması ve koruması gerekmektedir. Bu çerçevede, bombus arılarının Türkiye biyolojik çeşitliliğinin en önemli parçalarından biri olduğu bilinmektedir. Dünya genelinde doğal bombus arı popülasyonlarının azaldığı ve birçok türün yok olma tehlikesi altında olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Doğal bombus tür ve popülasyonlarının azalışı yalnız biyolojik çeşitlilik bakımından bir kayıp değil aynı zamanda ekosistemin korunması açısından tehlikeli bir durumdur. Antalya yöresi Türkiye ölçeğinde önemli bir gen merkezi olup farklı iklim ve floraya adapte olmuş çok sayıda bombus arısı türü ve alttürü barındırmaktadır.

Genetik çeşitliliğin tespit edilmesi ve gen kaynaklarının korunması Türkiye yerel bombus popülasyonları için oldukça önemlidir. Bu sebeple doğal popülasyonların korunması amacıyla genetik yapılarının belirlenmesi gerekmektedir. Bombus arılarında türler arası ve tür içi farklılıkların ortaya konulmasında yapılan araştırmalarda kullanılan yöntemlerin başında mitokondriyal DNA (mtDNA) gelmektedir. Seracılığın yoğun yapıldığı Antalya yöresinde polinasyon amacıyla kitlesel olarak üretilen ticari *B. terrestris* kolonilerinin kullanımı da oldukça yoğundur. Sera içerisine bırakılan kolonilerden dışarıya arı çıkışı olduğu rahatça gözlemlenebilmektedir. Bu arıların doğal çevredeki arılarla çiftleşebildiği ve yeni popülasyonlar oluşturabildiği öngörülmekteydi. Tamamlanan bu proje ile bu öngörünün gerçekliği çalışılan gen bölgeleri bakımından ispatlanmıştır. Bu çalışmada mtDNA'ya özgün gen bölgelerinden faydalanılarak Antalya yöresinde doğal olarak bulunan ve ticari olarak üretilen *B. Terrestris* arıları arasında gen akışının meydana gelip gelmediği irdelenmiş ve popülasyonların genetik yapılarının saptanması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar sera bölgelerine uzak doğal habitattaki *B. terrestris* kolonilerinin özgün genetik yapılarını koruduğunu ancak seracılık faaliyetlerinin yoğun yapıldığı yörelerde doğal popülasyonlar ile ticari popülasyonlar arasında gen akışının olduğunu net bir şekilde göstermiştir.

Öncelikle, FYL-2016-1502 proje kodu ile sağladığı maddi destek sayesinde bilimsel araştırma yapma imkanı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Özgün bir konuda, bana çalışma fırsatı veren, arazi ve laboratuvar çalışmalarında, büyük emek harcayan bilgi ve tecrübeleri ile beni motive eden, yazım ve istatistiksel analizler aşamasında sabır ve özverilerini esirgemeyen çok değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Kemal KARABAĞ'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Fehmi GÜREL'e, Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN'a Arş. Gör. Bahar ARGUN KARSLI'ya ve değerli çalışma arkadaşım Ayşe ALEMLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların bir kısmı 15-17 Mayıs 2017 tarihinde Kapadokya'da düzenlenen "The International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies" kongresinde ICAFOF-730 kodu ile kabul edilmiş ve sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. <i>Bombus terrestris</i> Arısının Genel Özellikleri.....	4
2.2. <i>Bombus Terrestris</i> 'in Yaşam Döngüsü	5
2.3. <i>Bombus terrestris</i> 'in Ekonomik Önemi	6
2.4. <i>Bombus</i> Arılarında Moleküler Çalışmalar	9
2.5. Hayvansal Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı	11
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	13
2.7. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) yöntemi	14
2.8. DNA Dizi Analizi.....	15
2.9. Elektroforez	17
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Materyal.....	18
3.2. Yöntem	20
3.2.1. DNA ekstraksiyon çalışmaları	21
3.2.2. DNA kantitasyonu	23
3.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) çalışmaları	24
3.2.4. Elektroforez işlemleri	25
3.2.4.1. Agaroz jellerin hazırlanması	25
3.2.4.2. PCR ürünlerinin elektroforezi	25
3.2.5. Sekans analizleri	26
3.2.6. SNP haplotiplerin belirlenmesi.....	27
3.2.7. İstatistik analizler.....	27
4. BULGULAR.....	29

4.1. PCR Bulguları	29
4.2. DNA Nükleotid Dizilerinin Belirlenmesive SNP Haplotiplerin Tespiti	30
4.2.1. COIb bulguları	30
4.2.2. Cytb bulguları	37
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	48
7. KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1. PCR amplifikasyonu sonucunda Faselis bölgesine ait 30 bireyde amplifiye edilen COIb gen fragmentlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.... 29
- Şekil 4.2. PCR amplifikasyonu sonucunda Faselis bölgesine ait 30 bireyde amplifiye edilen Cytb gen fragmentlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü..... 29
- Şekil 4.3. DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda tespit edilen mtDNA COIb gen bölgesine ait sekans örnekleri 30
- Şekil 4.4. DNA sekanslarında tespit edilen SNP lokus örnekleri 32
- Şekil 4.5. mtDNA COIb gen bölgesinde tespit edilen SNP haplotiplere göre populasyonlar arasındaki genetik mesafeleri gösteren dendrogram 36
- Şekil 4.6. DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda tespit edilen mtDNA Cytb gen bölgesine ait sekans örnekleri 37
- Şekil 4.7. DNA sekanslarında tespit edilen SNP lokus örnekleri 39
- Şekil 4.8. mtDNA Cytb gen bölgesinde tespit edilen SNP haplotiplere göre populasyonlar arasındaki genetik mesafeleri gösteren dendrogram 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bombus arısının taksonomideki yeri (Linnaeus 1758).....	4
Çizelge 3.1. Arı örneklerinin toplandığı yörelerin koordinat ve rakım bilgileri.....	20
Çizelge 3.2. Proje kapsamında laboratuvar çalışmalarında kullanılan araç-gereçler.....	21
Çizelge 3.3. PCR-mix içerikleri ve sıcaklık döngü protokolü	24
Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer setleri.....	24
Çizelge 3.5. 10 X TBE Buffer tampon çözeltisi olarak hazırlanışı.....	25
Çizelge 3.6. PCR-mix içerikleri ve sıcaklık döngü protokolü	26
Çizelge 4.1. mtDNA COIb gen bölgesinin DNA nükleotid dizisi ile yapılan BLAST analiz sonucu	31
Çizelge 4.2. mtDNA COIb bakımından tespit edilen SNP haplotipler.....	33
Çizelge 4.3. mtDNA COIb gen bölgesinin AMOVA analiz sonuçları	34
Çizelge 4.4. mtDNA COIb gen bölgesi bakımından çalışılan populasyonların FST değerleri.....	34
Çizelge 4.5. mtDNA COIb gen bölgesi bakımından çalışılan <i>B. terrestris</i> populasyonlarının genetik uzaklıkları	35
Çizelge 4.6. mtDNA Cytb gen bölgesinin DNA nükleotid dizisi ile yapılan BLAST analiz sonucu	38
Çizelge 4.7. mtDNA Cytb bakımından tespit edilen SNP haplotipler.....	40
Çizelge 4.8. mtDNA Cytb gen bölgesinin AMOVA analiz sonuçları	40
Çizelge 4.9. mtDNA Cytb gen bölgesi bakımından çalışılan populasyonların FST değerleri.....	41
Çizelge 4.10. mtDNA Cytb gen bölgesi bakımından çalışılan <i>B. terrestris</i> populasyonlarının genetik uzaklıkları	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat derece
ddH ₂ O	De-iyonize su
gr	Gram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
FST	Alt popülasyonlar arası genetik farklılık
Km	Kilo metre
M	Molar
mm	milimetre
mM	Mili molar
ml	mililitre
µl	mikrolitre
ng	nanogram
pm	piko mol
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
ATP	Adenozintrifosfat
bç	Baz çifti
B.terrestris	<i>Bombus terrestris</i>
CO1a	Cytochrome oxidase 1a
CO1b	Cytochrome oxidase 1b
Cytb	Cytochrome b
DNA	Deoksiribo Nucleic Acid
dNTP	Di Nucleotide Tri Phosphate
ddNTP	Di Deoksinukleotide Tri Phosphate
EDTA	Ethylene Daimin Tetra Acetic Acid
G	Relative Centrifugal Force
MtDNA	Mitokondriyal DNA
OD	Optic Density
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophesis
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rotate Per Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Poliorfizmi)
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
tRNA	Transfer RNA
U	Ünite
UV	UltraViole
vd	ve diğerleri

1. GİRİŞ

Dünyada yaklaşık 20 bin türü tanımlanmış olan arılar, tozlaştırıcı rollerinden dolayı karasal ekosistemlerin ayrılmaz bir parçası olmuştur. *Bombus terrestris*, bal arılarına gören daha iri yapılı, yoğun tüyleri bulunan ve göz alıcı canlılıkta renklere sahip bir arı türüdür. Bal arılarından sonra hem doğal hem de kültüre alınmış bitkilerin en önemli tozlaştırıcılarından biri *B. terrestris*'dir (Michener 2000).

Farklı iklim ve çevre koşullarına iyi uyum sağlayan bombus arıları, Kuzey Kutubu'ndan Güney Amerika'ya, deniz seviyesinden 5800 m yüksekliğe kadar geniş bir habitata sahiptir. Bu güne kadar dünyada 239 bombus türü tanımlanmıştır (Williams 1998, Benton 2000, Cameron 2007). Asya'da 199, Avrupa'da 58, Kuzey Amerika'da 41, Orta ve Güney Amerika'da 43 bombus türü saptanmıştır (Michener 2000). Bombus arısı günümüzde Türkiye dahil 57'den fazla ülkede kullanılmakta olup bu ülkelerden 16'sında doğal olarak bulunmamaktadır (Murray vd 2013). Türkiye'de az sayıda yapılan çalışma ile 50'ye yakın türü belirlenmiştir. Dünyadaki tür dağılımına bakıldığında Türkiye'nin bombus arıları açısından çok önemli bir gen merkezi olduğu anlaşılmaktadır (Özbek 1997, AYTEKİN 2001). Dünya genelinde doğal bombus arı popülasyonları azalmaktadır ve bombus türlerinin %11'i yok olma tehlikesi altındadır. Avrupa genelinde 4 bombus türü tamamen yok olmuş, 13 bombus türünün ise en az bir Avrupa ülkesinde nesli tükenmiştir (Arbetman vd 2013). Kuzey Amerika'daki bombus türlerinde de benzer azalmalar saptanmıştır. Bombus arılarının azalışı yalnız biyolojik çeşitliliğin ve ekosistemin korunması açısından bir sorun değil aynı zamanda bitkisel üretim bakımından da sorun oluşturmaktadır.

Günümüzde dünyada her yıl bir milyon adedin çok üstünde ticari üretilmiş bombus arısı kolonileri tozlaşma amacıyla kullanılmaktadır. Ticari üretilen kolonilerin yaklaşık %90'nını *B. terrestris* türü oluşturmaktadır (Velthuis ve Doorn, 2006). Bu tür günümüzde Türkiye dahil 57 den fazla ülkede kullanılmaktadır ve bu ülkelerden 16 adedinde yabancı bir türdür (Ings vd 2010, Murray vd 2013). Ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerine özellikle örtü altı domates yetiştiriciliğinde meyve verim ve kalitesini artırması, hormon ve kimyasal ilaç kullanımını azaltması gibi birçok faydalarından dolayı tüm dünyada giderek artan bir talep vardır. Ancak, bu tür yüksek göç yeteneği, erken mevsimsel çıkışı, farklı habitatlardaki kötü iklimsel koşullara yüksek uyumu, çok geniş sayıda çiçekten faydalanabilme yeteneği, uzak mesafelere tarlacılık yapabilmesi, düşük sıcaklıklara dayanma yeteneği gibi birçok özelliklerinden dolayı yayılmacı bir türdür. Ticari kolonilerden doğaya çıkan arıların yuva yeri ve besin kaynakları bakımından yerel arı popülasyonları ile rekabet, yerel bombus alttür ve ekotipleri ile melezlenme, parazit ve patojenlerin yayılması gibi doğal ekosisteme zarar verebilecek bazı sorunlara yol açabileceği bildirilmektedir. Ayrıca ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonileri doğal popülasyonlara oranla daha fazla ana arı üretebilmekte (bir koloni uygun ortamda 100 den fazla ana arı üretebilmektedir) ve daha rekabetçi olmaktadır. Bu sebeplerden, seradan doğaya geçen ticari koloniler doğal olanların yerini alabilmektedirler (Goka vd 2001, Goulson, 2008).

Ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerine özellikle örtü altı domates yetiştiriciliğinde meyve verim ve kalitesini artırması, hormon ve kimyasal ilaç kullanımını azaltması gibi birçok faydalarından dolayı tüm dünyada giderek artan bir

talep vardır. *B. terrestris* arıları yüksek göç, erken mevsimsel çıkış, farklı habitatlara iyi adaptasyon, çok geniş sayıda çiçekten faydalanabilme ve uzak mesafelere uçabilme gibi birçok özelliklerinden dolayı yayılmacı bir türdür.

Türkiye’de her yıl yaklaşık 200.000 adet ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonisi tozlaşma amacıyla büyük ölçüde Akdeniz sahil kesiminde domates seralarında kullanıldığı tahmin edilmektedir. Ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerinin belirli alanlarda (özellikle Batı Akdeniz sahil kesiminde) çok yoğun kullanılması, ülkemizde seraların içerdeki *B. terrestris* arılarının sera dışına çıkmasını engelleyecek ölçüde izolasyonunun sağlanmamış olması, sera içindeki ticari kolonilerin ekonomik ömrü tükendiğinde sera dışına atılmaları, bir koloninin genellikle yaşam dönemi sonuna doğru çok sayıda ana arı ve erkek arı üretmesi gibi birçok etkenden dolayı ülkemizde seralarda kullanılan ticari kolonilerden bombus arıları sera dışına çıkabilmekte, koloni oluşturabilmekte ve sera çevresindeki doğal popülasyonla etkileşim içine girebilmektedir. Ayrıca ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonileri doğal popülasyonlara oranla daha fazla ana arı üretebilmektedir. Ticari bir koloni uygun şartlarda 100 den fazla ana arı yetiştirebilmekte ve daha rekabetçi olmaktadır. Böylece seradan doğaya çıktıklarında onların yerini alabilmektedirler (Goka vd 2001, Goulson vd 2008).

Türkiye’de ve Dünya’da doğal bombus popülasyonları kaybolma tehlikesi altında olup birçok ülkede mevcut potansiyeli belirlemek için genetik ve morfolojik çeşitliliği tanımlama çalışmaları sürdürülmektedir. Ülkemiz coğrafyasına ait *Bombus* popülasyonlarına yönelik yapılacak araştırmalarla genetik çeşitliliğin tespiti ve bu sayede gen kaynaklarını koruma stratejilerinin belirlenmesi önemlidir.

B. terrestris arısı kendi türleri içerisinde çevresine uyumu yüksek bir türdür. Doğada bulunan ana ve erkek arılar ile ticari olarak üretilen ana ve erkek arılar doğada koloni oluşturma ve çiftleşme olanağına sahiptir (Argun Karşlı 2011). Türkiye’de ticari olarak kullanılan *B. terrestris* kolonileri yabancı firmalardan sağlanan ana arılardan üretilmektedir ve bu ana arıların genetik kökeni bilinmemektedir. Bu nedenle, zaman içinde ticari kolonilerde üretilen ana arı ve erkek arılarla çiftleşmesi ve melezlenmesi Türkiye yerel *B. terrestris* genotiplerinin kaybolmasının kaçınılmaz olacağı sonuç olarak da yerel *B. terrestris* popülasyonlarının doğal genetik yapısının farklılaşacağı beklenmektedir. Bu durumun önlenmesi amacıyla ülkemiz ve diğer birçok ülke, yalnız kendi doğalarında bulunan bombus tür veya alttürlerinin ticari üretimde kullanılmasına izin vermektedir (Argun Karşlı 2011).

Bombus arılarının tanımlanmasında morfolojik özellikler çevre koşullarına göre değişiklik gösterdiğinden dolayı tüy ve renk yapısına dayalı tanımlamalar yeterli olmamaktadır. Araştırmalarda morfolojik özellikler yetersiz kaldığı için güvenilir moleküler materyal ve yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Genetik çeşitliliğin tespit edilmesi ve gen kaynaklarının korunması Türkiye yerel *B. terrestris* popülasyonları için oldukça önemlidir. *B. terrestris* arılarında türler arası ve tür içi farklılıkların ortaya koyulmasında yapılan araştırmalarda kullanılan yöntemlerin başında mitokondriyal DNA (mtDNA) gelmektedir ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. mtDNA ile nükleer DNA karşılaştırıldığında, mtDNA yüksek evölüsyon oranına sahip olmasından dolayı popülasyon genetiği ve filogenetik çalışmalarda güvenilir ve etkili bir materyal ve maternal kalıtım göstermesinden dolayı tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, Antalya yöresinde doğal olarak bulunan ve ticari olarak üretilen *B.terrestris* arıları arasında gen akışının olup olmadığı irdelenmiştir. Bu amaçla, ticari üretim yapan firmalardan, yoğun olarak ticari üretilmiş *B.terrestris* kolonileri kullanan sera bölgelerinden ve doğal habitattan arı örnekleri toplanmıştır. Bu populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkiler mitokondriyal DNA COIb ve Cytb bölgelerinin sekansları üzerinde tespit edilen SNP haplotipler bakımından ortaya koyulmuştur.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. *Bombus terrestris* Arısının Genel Özellikleri

Böcek sınıfından zarkanatlılar (*Hymenoptera*) takımının *Apidea* familyasına ait olan (Çizelge 2.1) bombus arıları genel olarak ılıman iklim kuşağında bulunan bitkilerin en önemli tozlaştırıcıları arasında yer almaktadır. Afrika'nın büyük kısmında ve Hindistan'ın alçak bölgelerinde bulunmaz. Avustralya ve Yeni Zelanda'ya polinasyona yardımcı olmak için insan eliyle götürülmüştür (Hingston vd 2002).

Çizelge 2.1. *Bombus* arısının taksonomideki yeri (Linnaeus 1758)

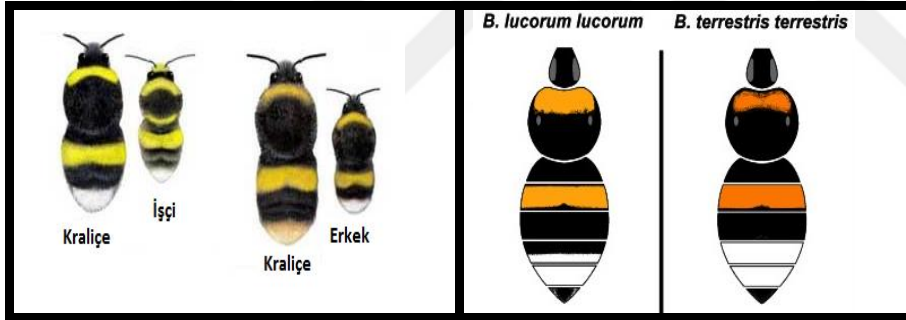
Alem	Animalia (Hayvanlar)
Şube	Arthropoda (Eklem Bacaklılar)
Alt Şube	Hexapoda (Altıbacaklılar)
Sınıf	Insecta (Böcekler)
Takım	Hymenoptera (Zar Kanatlılar)
Familya	Apidae
Alt Familya	Apinae
Oymak	Bombini
Cins	<i>Bombus</i>
Tür	<i>Bombus terrestris</i>

Bombus, tüylü ve sağlam yapılı bir arıdır. Ortalama olarak 1.5-2.5 cm boyunda, çoğunlukla sarı ve siyah renktedir. Genellikle yerde, terk edilmiş kuş ve fare yuvalarında kovan yapar. Organize yaşayan, sosyal böceklerdir. Kovanda bir kraliçe, dölleyici arılar (dronlar) ve işçiler olmak üzere 50-400 arı bulunur.

Yaklaşık 250 türü tanımlanan bombus arılarında tozlaşma amacıyla ticari yetiştiriciliği yapılan 5 tür bulunmaktadır (Williams ve Osborne, 2009). Bu türler genel olarak; Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Güney Amerika da kullanılan *B. terrestris*, Doğu Asya' da kullanılan *B. lucorum* ve *B. ignitus*, ve Kuzey Amerika'da kullanılan *B. occidentalis* ve *B. impatiens* dir. Dünya genelinde yaygın olarak bulunan bazı bombus ait resimler Şekil 2.1'de gösterilmiştir. *B. terrestris* ve *B. lucorum* türleri oldukça benzer olup bu iki türü birbirinden ayırt etmek için kıl örtüsünün renk tonlarına dikkat etmek gerekmektedir. *B. terrestris* arıları siyah üzerine toraksta bir turuncuya yakın bir bant ve kuyruk kısmında kirli beyaz bir bant bulundurur. Kraliçelerin kuyruk bandı daha geniş ve devetüyü rengine yakındır. *B. lucorum* türünde ise kuyruk kısmındaki bant tam olarak beyaz görülür (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Bazı Bombus türlerine ait görseller

Şekil 2.2. *B. terrestris* ve *B. lucorum* arıları arasındaki farklılıklar

2.2. *Bombus Terrestris*'in Yaşam Döngüsü

B. terrestris arısının doğal yaşam döngüsü bal arısından oldukça farklılık göstermektedir. Bombus arıları sosyal böcekler olup ana, erkek ve işçi arıdan oluşan düzenli bir koloni içinde yaşarlar ve kendi aralarında iş bölümü yaparlar. Bal arılarından farklı olarak koloni yaşamı tamamlanan genç ana arı yuvayı terk eder ve çiftleştikten sonra toprak altında bir yer bularak hareketsiz kalır. Döllenmiş ana arının toprak altında geçirdiği bu sürece diyapoz denir. Çevre koşullarının arı isteğine uygun hale gelmesine bağlı olarak döllenmiş ana arı toprağın altından çıkar. Yumurtlayabileceği ve yavru geliştirebileceği yeni bir yuva için uygun yer aramaya başlar. Yerleştiği yuvaya polen ve nektar taşır. Böylece hem yavru üretiminde kullanmak hemde kendini beslemek için stok oluşturur. Yeterli stok oluşumundan sonra genç işçi arıların meydana geleceği ilk yumurtalarını bırakır.

İşçi arılar olgunlaşıp çalışmaya başlayınca ana arı tarlacılık faaliyetlerine son vererek yuva içerisinde yumurtlamaya devam eder. Bundan sonra tarlacılık faaliyetlerini ve yeni doğan yavruların bakımını işçi arılar sürdürür. Koloni yaşamı sonlara yaklaşınca artık kolonide genç ana arı ve erkek arılar üretilmeye başlanır. Bu arılar cinsel olgunluğa gelince çiftleşmek amacıyla koloniyi terk ederler. Bundan sonra kolonide bulunan yaşlı ana arı ve işçi arılar ölürler. Yeni çiftleşen genç ana arılar diyapoz sürecini geçirmek ve bir sonraki generasyonun başlaması için çevre, iklim ve besin koşullarının uygun hale geleceği zamana kadar toprak altında yer bulur ve bu uyuma sürecini geçirirler. Bu da koloni yaşam sürecini bir mevsim olarak sınırlandırmış olur (Heinrich 1979).

Toprak altında fizyolojik uyku dönemini geçiren ana arılar 2-6 ay arasında diyapozda olurlar. Bu nedenle ticari üretim faaliyetlerinde yeni koloniler oluşturulurken kontrollü olarak uyku dönemleri göz önüne alınmalı ve yaşanabilecek sıkıntılarla karşılaşılması engellenmelidir. Ticari kaygılardan dolayı firmalar tarafından bağımsız olarak yıl boyunca üretimleri yapılan *B. terrestris* kitlesel yetiştiriciliği ile ilgili ayrıntılı bilgileri tam olarak açıklanmamaktadır.

2.3. *Bombus terrestris*'in Ekonomik Önemi

Bombus arılarının kontrollü koşullarda yetiştiriciliği ile ilgili çalışmalar ortalama 100 yıl önce başlamış olmasına rağmen Hollanda ve Belçika'daki ticari firmaların yoğun araştırma ve geliştirme çalışmaları sonucunda kitlesel üretim 1987 yılında gerçekleştirilmiştir (Velthuis ve Doorn 2006, Coppee 2010). Kitlesel üretim ile ilgili çalışmalar tozlaşma amacı ile örtü altı domates yetiştiriciliğinde *bombus* arılarının başarılı olarak kullanılabilmesinin anlaşılmasıyla hızlanmıştır. Tozlaşmada kullanma amacıyla birçok *bombus* türü denenmiş olmasına rağmen ticari olarak kitlesel üretim için uygun olan beş türün (*B. terrestris*, *B. lucorum*, *B. ignitus*, *B. occidentalis* ve *B. impatiens*) yetiştiriciliği yapılmaktadır. Avrupa'da diğer *bombus* türlerine kıyasla daha yaygın dağılım gösterdiği, büyük koloni oluşturduğu ve yıl boyunca yetiştiriciliğe uygun olduğu için ticari olarak en çok tercih edilen tür *B. terrestris* L. olmuştur. (Goka 1998, Widmer vd 1998, Hingston vd 2002).

Antalya yöresi yoğun seracılık ve *B. terrestris* arısı yetiştiriciliğinin yapıldığı bir bölge olup bu bakımdan ülke ekonomisinde önemli bir yere sahiptir. Aynı zamanda doğal *B. terrestris* tür ve alt türlerini yaşam alanlarını barındırmaktadır. Türkiye'de her yıl yaklaşık 200 000 adet ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonisi tozlaşma amacıyla büyük ölçüde Akdeniz sahil kesiminde domates seralarında kullanılmaktadır. (Gösterit ve Gürel, 2005). Antalya yöresi dünyada ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerinin en fazla kullanıldığı ve doğal yaşam alanlarından birisi olmasına rağmen üzerinde yürütülmüş çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Türkiye'de kitlesel üretimi yapılan *B. terrestris* kolonileri 1997-1998 yılında tozlaşma amacıyla seralarda kullanılmaya başlanmıştır (Gürel ve Gösterit, 2007). Özellikle Akdeniz sahil kesiminde örtü altı yetiştiriciliğin yoğun olarak yapılmasından dolayı *B. terrestris* arılarına olan ilgi yıllar geçtikçe önemli bir artış göstermiştir. 2009–2010 yıllarında sera üretimlerinde 75 000 bin dekar sera alanında ortalama 150000 adet ticari *bombus* kolonisinin kullanıldığı tahmin edilmektedir (Gürel ve Gösterit, 2007).

Son yıllarda kış aylarında hava koşullarının elverişli olması, seracılık faaliyetlerinin artması, domates üretiminin ekonomik değerini sürdürmesi, ticari rekabetten dolayı bombus kolonilerinin fiyatındaki düşüş, tüketicinin arılı domatese olan ilgisigibi sebeplerden dolayı bombus arısı kullanımına olan talep artmış ve çiftçilerin arı kullanımını tam olarak benimsemesinde etkili olmuştur. (Gösterit ve Gürel, 2014).

B. terrestris arısının koloni gelişimini ve yaşam döngüsünü yaşadıkları bölgelerin ilkim şartları belirler. Bu sebepten dolayı bölgesel olarak yılın farklı zaman aralıklarında diyapoza girerler. Bu durum *B. terrestris* arısının geniş bir ekolojik esnekliğe sahip olduğunu göstermektedir. Türkiye’de Ege, Akdeniz ve Karadeniz sahil kesimlerindeki doğal yaşam alanlarında Ekim–Aralık aylarında diyapozdan çıkan *B. terrestris* ana arıları iç bölgelerde Şubat-Mayıs aylarında diyapozdan çıkmaktadırlar. Hatta arazilerde yapılan gözlemlere göre bazı kesimlerde yılda iki generasyonun olabileceği de tahmin edilmektedir (Beekman ve Van Stratum 2000, Gürel vd 2008).

B. terrestris kolonilerinde yaşam döngüsünün anlaşılması amacı ile laboratuvar çalışmaları yapılmış ve ilk aşama koloni başlangıç aşaması olarak saptanmıştır. Bu aşamada koloni yaşam süresini ve sosyal düzeni başlatmak için diyapoz süresini geçiren ana arı ortalama 5-15 gün içerisinde yumurtlar ve ilk işçi arı topluluğunu yaklaşık 5-6 hafta içinde oluşturur (Gürel vd 1999a).

İkinci aşama ana arının yumurtlamaya başlayarak erkek arıların yetiştirildiği dönemdir. Yani döllenmiş (diploid) yumurtalar yerine döllenmemiş (haploid) yumurtalar meydana gelmektedir. Son aşama ise kurucu ana arının etkisinin ve üstünlüğünün ortadan kalktığı aşamadır. Bu aşama rekabet aşaması olup özellikle ana arı ve işçi arılar arasında ve işçi arıların kendi aralarında çatışmaya başladığı dönemdir. Hatta işçi arılardan bir kısmı yumurtlamaya başlar. Bu durumda ana arı ve işçi arılar karşılıklı olarak birbirlerinin yumurtalarını yerler yada dışarıya atarlar. Bu rakabet koloninin düzenini bozar ve koloni yaşamı sona erer (Gösterit ve Gürel 2005).

Seracılıkta, bir kolonide sağlıklı bir ana arı, 50-60 adet işçi arı ve açık-kapalı yavru alanı olması tozlaşma amacıyla kullanmak için yeterli olmaktadır. Kolonilerin yaşam süreci bir ay kadardır. Fakat tozlaşmada kullanılan bitkiye göre 1500-2000 m² sera alanında ve 45 gün süre kullanılabilir. Bu süre sonunda koloninin yenilenmesi gerekmekte, ana arı veya erkek arı üretimi başladığı için koloni ömrü tükenmiş olmaktadır (Duchateau ve Velthuis 1988, Velthuis ve Van Doorn 2006).

Polinasyon amacıyla seralarda *B. terrestris* kullanımı yaygınlaştıkça işçilik azaldığı için üretim maliyetleri düşmektedir. Ayrıca, zirai ilaç kullanımı azalmakta ve bitki büyüme düzenleyici olan hormon takviyelerinin oluşturduğu sorunlar ortadan kalmaktadır. Bu sayede daha sağlıklı üretim yapılmakta olup hem üreticinin hem tüketicinin istediği kalitede ürünler elde edilmektedir (Ono 1998, Goulson ve Hanley 2004, Hingston 2006, Inoue vd 2008, Williams ve Osborne 2009).

B. terrestris’in yayılış alanı deniz seviyesinden 1500 metre yüksekliğe kadar geniş bir habitatu kapsamaktadır. Bu sebeple Türkiye coğrafyasının doğal faunasında bulunan en yaygın türdür (Özbek 1997). Antalya yöresi ülkemizin en fazla seracılık faaliyetlerinin yapıldığı yerdir. Antalya’da yoğun seracılık faaliyetlerine paralel olarak

yüksek miktarda *B. terrestris* kullanımı olmaktadır. Yörede bulunan bazı firmalar önceleri Bombus üretimi yapan yabancı firmalarla anlaşarak Bombus ithalatı yapmışlardır. Daha sonra üretim faaliyetlerinin ülkemizde gerçekleştirilmesi için Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı talepte bulunmuştur. Ülkemizdeki firmaların yıllık üretim miktarı yaklaşık 1 milyon adet kolonidir. Bu kolonileri genel olarak diğer ülkelerdeki ortakları ile birlikte pazarlamaktadırlar yada bunları direk ihraç etmektedirler (Argun Karşlı 2011).

Türkiye’de 15 yıl içerisinde ticari olarak 8 firma kurulmuş olmasına rağmen bu firmalardan sadece 5 tanesi üretime devam etmektedir. Firmalar ilk yıllarda yalnızca koloni ithalatı yapmışlardır. Gıda tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın koloni ithalatına sınırlama getirmesi, ülkemizde bombus arılarına olan talebin sürekli artması ve maliyetlerin yüksek olmasından dolayı yabancı ortakların Türkiye’de yatırım yapması hızlandırılmış ve firmalar yurt dışındaki ortaklarından koloni yerine ana arı alarak Türkiye’deki işletmelerde koloni üretmeye başlamışlardır. Son yıllarda bu firmalar gerekli yatırımları yaparak ana arı üretimi de olmak üzere yetiştiricilikteki bütün aşamaları Türkiye’de gerçekleştirerek seracılık sektörünün tozlaşmadaki bombus arısı talebini karşılamakta, bu sayede insanların sağlıklı beslenmesine ve ülke tarımına önemli katkıları bulunmaktadır (Gürel ve Gösterit 2007).

Son yirmi yıl içinde *B. terrestris* arılarının örtü altında yetiştirilen domates, biber, patlıcan, çilek vb. bitkilerde verim ve kaliteye olan etkilerini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda bombus arılarının önemli üstünlükleri belirlenmiştir. Sera domatesi yetiştiriciliğinde vibrasyon, hormon, kontrol ve bombus arılarının verim ve kaliteye olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada bombus arısı kullanımının hormon uygulamasına göre verimi %11.2 vibrasyon ve kontrol grubuna göre sırasıyla %45.4 ve %106.6 oranlarında arttırdığı tesbit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise *B. terrestris* olan grup birinci sınıf meyve miktarı ve en, boy, ağırlık, tohum sayısı gibi kalite özellikleri bakımından en yüksek değerleri almış bu grubu hormon ve viratör grupları izlemiştir. Isıtılmamış seralarda yetiştirilen domates ve patlıcan bitkisinde yapılan bir çalışmada da bombus arılı grup, kontrol grubuna oranla m²’deki meyve sayısında ve meyvedeki tohum sayısında önemli artışlar sağlamıştır. Isıtılmamış seralarda kış aylarında yetiştirilen biber bitkisinde de bombus arılı grup, arısız gruba oranla meyve ağırlığı, meyve çapı ve tohum sayısı bakımından önemli üstünlükler göstermiş ve toplam üründe %22.4 artış saptanmıştır. Plastik seralarda yetiştirilen bazı çeşitlerinde bal arısı ve bombus arısının meyve verimi ve kalitesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada ise bombus arılarının düşük sıcaklıklarda bal arılarına oranla daha etkin olduğu ve daha kaliteli meyvelerin üretilmesini sağladıkları belirlenmiştir (Karaman 2002).

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesinde yürütülen bir çalışmada Ege bölgesinden sonbaharda toplanan çiftleşmiş ve diyapozdan çıkmış *B. terrestris* ana arılarının laboratuvar koşullarında koloni oluşturma ve koloni gelişim özellikleri incelenmiş ve ana arıların %50.3’ünün koloni oluşturduğu saptanmıştır (Gürel vd 1999a). Bu çalışmayı Antalya ve çevresindeki seralarda kullanılan *B. terrestris* kolonilerinin performanslarının değerlendirildiği çalışma izlemiş ve arı kullanılarak üretilen ürünlerde ağırlık artışı ve bir örneklilik gözlenmiş ve üreticilerin önemli bir bölümü arı kullanmayı sürdüreceklerini belirtmişlerdir (Gürel vd 1998). Örtü altı

domates yetiştiriciliğinde bombus arısı polinasyonunun verim ve kaliteye olan etkilerinin incelendiği çalışmada ise bombus arısı, kontrol, hormon ve vibratör olmak üzere dört grup karşılaştırılmış ve bombus arılı grup meyve miktarı ve kalitesi bakımından birinci sırada yer almıştır (Gürel vd 1999b).

2.4. Bombus Arılarında Moleküler Çalışmalar

B. terrestris arılarıyla ilgili yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda daha çok tür tespiti, coğrafik farklılaşma ve genetik yapıların belirlenmesi konuları ele alınmıştır. Bu amaçla mitokondriyal DNA üzerinde bulunan özel gen bölgeleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Estoup vd (1996) Avrupa kıtası ve adaları arasında *B. terrestris* arılarında mitokondriyal COII geninin kısmi sekansını çalışmışlar ve bu iki grup arı popülasyonlarının önemli derecede birbirlerinden ayrıldıklarını bulmuşlardır. Kıta popülasyonları arasında önemli sayılacak bir fark yokken ada popülasyonlarının kıta popülasyonlarından çok farklı olduğunu göstermişlerdir. *B. terrestris* mitokondriyal DNA (COII) geni düşük nükleotid farklılığı göstermiş ve sadece bir SNP bakımından arı popülasyonları arasında fark olduğu bildirilmiştir.

Pedersen (1996) bombus arıları üzerinde yaptığı çalışmada, mtDNA COI genine ait 532 bp uzunluğundaki fragmentin nükleotid dizisini belirleyerek 11 bombus türünün filogenetik ilişkisini ortaya çıkartmıştır.

Yoon vd (2003) Kore yarımadasında bulunan yedi bölgeden 44 bireyin COI gen bölgesinin nükleotid dizisini belirlemişler ve dört haplotip arasında bir dominant haplotip olduğunu bildirmişlerdir. Çalıştıkları bölge içerisinde düşük sekans farklılığının olduğunu göstermişlerdir.

Kim vd (2009) *B. ardens* mtDNA'sı üzerinde bulunan ve genetik barkod olarak tanımlanan COI (658 bp) geninin nükleotid dizisini belirledikleri bir çalışmada Kore'de bulunan 15 bölgeden 160 arı örneği toplamışlar ve belirledikleri sekiz haplotip arasında düşük genetik farklılığın olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak biyocoğrafik bariyerlere maruz kalmadığı ve genetik alt yapılarının homojen olduğu tesbit edilmiştir.

Tokoro vd (2010) yerel Japon bombus arılarında genetik bozulma riskini ve dışarıdan gen akışını belirlemek için Japonya, Çin ve Kore'den topladıkları örneklerin mtDNA COI (1048 bp) geni üzerinde çalışmışlar ve 15 haplotip belirlemişlerdir. Yapılan analizler sonucunda Japon adalarında bulunan arıların yerel olduğu ve Asya kıtasından bir gen akışının olmadığı belirlenmiştir.

Williams vd (2012) yaptığı bir çalışmada 33 ülkeden 279 bölgeden toplanan 579 arının mtDNA-COI bölgesinin DNA sekansı belirlenmiştir. Türlerin birbirine olan akrabalıkları incelenmiş ve 17 tür sınıflandırılarak 7 lokasyona ayrılmıştır. Bu sayede küresel olarak türler teşhis edilmiş ve coğrafi aralıkları belirlenmiştir.

Widmer ve Hempel (1999) mitokondriyal DNA (Cytb)'dan faydalanarak Madeira ve Kanarya adalarındaki *B. terrestris* popülasyonlarının genetik yapı ve

kolonizasyon hikayesini araştırmıştır. Guruplar ve adalar arasındaki genetik farklılaşma sonuçlarına göre Kanarya adalarındaki arı populasyonları birbirlerine daha yakınken Madeira populasyonu genetik olarak kıta populasyonlarına daha yakın bulunmuştur. Bu sonuçlara göre mtDNA ata haplotiplerin Kanarya adalarında olduğu görülmüştür. Ancak, türev haplotip Avrupa kıtasında bulunmuştur. Bundan başka Kanarya ve Madeira adalarındaki bombus arıları genel kolonizasyon hikâyesini paylaşmadıkları ortaya çıkmıştır.

Koulianos ve Hempel (2000) Avrupa'da bulunan 16 bölgeden ve Kuzey ve Güney Amerika'da bulunan 3 bölgeden toplanan 19 bombus türünde mtDNA Cytb ve COI gen bölgelerini kullanarak genetik farklılıkları ve akrabalık ilişkilerini araştırmışlardır. Sonuçta bu iki gen bölgesi kullanılarak çalışılan türler arasındaki ilişkiler filogenetik olarak başarıyla gösterilmiştir.

Morath (2007) yaptığı çalışmada bombus impatiens arılarında genetik varyasyonu belirlemek için mtDNA Cytb gen bölgesini kullanmıştır.

Avrupa'da yaygın olarak bulunan *B. terrestris* türünde mtDNA markırları üzerinde DNA çalışmaları yapılarak birbirinden izole farklı bölgelerde bulunan *B. terrestris* populasyonlarının genetik yapıları tanımlanmıştır (Gegear vd 2005).

Diğer bir çalışmada yine Avrupa da geniş coğrafi alanlara yayılmış olan *B. terrestris* türü ve yoğun olarak görülen bir diğer tür olan *B. pascuorum* arısının bulunduğu Cytb gen dizilerinin farklılıklarından yararlanılarak 13 farklı populasyonda mtDNA çalışması yapılmış ve genetik çeşitlilik araştırılmıştır. Sonuç olarak Avrupa kıtası boyunca *B. Pascorum* populasyonlarının genetik olarak birbirine benzer yapıda olduğu fakat İtalya Alplerinin güneyindeki populasyonlar arasında önemli boyutta genetik farklılığın olduğu tespit edilmiştir (Pirounakis vd 1998).

Asya'da populasyonların genetik yapı bakımından farklılaşmasını sağlayan temel faktörler araştırılmış ve Asya'daki yedi kıta ve bazı adalarda bulunan *B. ignitus* populasyonları üzerinde çalışılarak, bu kıtada bulunan populasyonların kendi aralarında homojen bir genetik yapıya sahip oldukları ve uzak ada populasyonları arasındaki genetik farklılığın fazla olduğu tespit edilmiş, sıra dağlar veya su alanları gibi etkenlerin genetik yapı bakımından farklılaşmayı sağlayan temel faktör olabileceği saptanmıştır (Shao vd 2004).

Polonya'da 3 adet sera ve sera çevresindeki doğal populasyonlardan alınan bombus arıları kullanılarak araştırma yapılmış, ticari olarak üretilen *B. terrestris* kolonilerinden doğal populasyondan alınan bombus arısına doğru genotip değişikliğine sebep olacak herhangi bir gen aktarımının bulunup bulunmadığına bakılmış ve ticari üretimi yapılan arılardan, materyal olarak kullanılan doğal populasyon arılarına doğru gen akışının meydana geldiği belirtilmiştir (Kraus vd 2011).

Geniş bir alanda yapılan diğer bir çalışmada *B. terrestris* mtDNA bilgileri kullanılarak bombus türleri arasındaki filogenetik ilişkiler araştırılmıştır. Sonuç olarak, diğer bombus türlerine kıyasla *melipona* ile *apis* türü daha yakın bir genetik mesafe göstermiştir (Du vd 2015).

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesinde yürütülen bir tez çalışmasında mikrosatellit markırlar kullanılarak Akdeniz Bölgesi doğal faunasında bulunan *B. terrestris* populasyonları DNA düzeyinde tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular Akdeniz Bölgesi'nde birbirinden oldukça uzak ve farklı yükseltilerde bulunan üç doğal populasyonundan alınan örneklerin *B. terrestris dalmatinus* alttürüne ait olduğunu göstermiştir (Argun Karşlı 2011).

Meydan vd (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, 2 adet Türkiye doğal ve 2 adet ticari firma populasyonları beş mikrosatelit lokusu bakımından karşılaştırılmıştır. Populasyonlar içinde populasyonlar arasındakinden çok daha fazla genetik varyasyon saptanmıştır. Araştırma sonucunda çalışılan beş mikrosatelit lokusu bakımından doğal ve ticari bombus populasyonlarının benzer genetik yapılarda olduğu sonucuna varılmıştır.

Özellikle Antalya yöresi *B. terrestris* arısının doğal habitatta yaygın olarak bulunduğu bir tür olup birçok alt türüne de rastlanmaktadır. Bununla birlikte ülkemizin ve Avrupa'nın en yoğun seracılık yapılan ve bu seralarda ticari yetiştirilmiş *B. terrestris* kolonilerinin en yoğun kullanıldığı yerdir. Ticari *B. terrestris* kolonilerinin yoğun kullanımı sonucunda bu kolonilerden doğaya kaçan arı populasyonunda artış olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan kolonilerin yayılması doğal populasyonlar ile rekabetin artmasına, hastalıkların yayılmasına ve yerel genotiplerle kontrolsüz melezlenmeye sebep olabileceği bildirilmiştir (Dafni 1998, Goka vd 2001).

2.5. Hayvansal Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı

1960'lı yıllarda mitokondri ve kloroplastların DNA taşıdığı gösterilmiştir. Çekirdek DNA'sından bağımsız olan mitokondriyal DNA çift sarmal ve halkasal yapıdadır. Genellikle 16 kb boyutundadır. Tüm hayvanların mtDNA'sı 37 gen içerir. Bunlar; 2 rRNA, 13 protein ve 22 tRNA kodlaması yaparlar. mtDNA'nın bölünmesi çekirdekten bağımsız olarak durdurulabilir veya gerektiği zamanlarda başlatılabilir. mtDNA sayısı değişmekle beraber 2-10 kopyası bulunur. Çekirdek DNA'sı tarafından kodlanan proteinlerin bazıları mtDNA tarafından da kodlanmaktadır. Çok hücreli (ökaryotik) canlıların sahip olduğu toplam DNA materyali hayvanlar için çekirdek ve mitokondri DNA'sından oluşur. Çok sayıda enzimi sentezleyebilen, kendine özgü DNA molekülü ve ribozomu olan, çift hücre membranına sahip ve adenozin trifosfat (ATP) şeklinde enerji sentezini gerçekleştiren bir organeldir (Boore 1999).

Mitokondriyal DNA aerobik solunumla ilgili genleri içeren, hayvansal hücrelerde küçük, dairesel ikili sarmal şekilde bulunan bir DNA molekülüdür (Rokas vd 2003). mtDNA molekülünün yapısal olarak prokaryotik kalıtım materyaline olan benzerliğinin sebebi dairesel ve ikili sarmal bir DNA molekülünden oluşmasından dolayıdır.

Çok hücreli canlıların hemen hepsinde mtDNA yalnızca anne tarafından maternal döllere aktarılır. Spermdede 100-1000 arası mtDNA bulunurken, yumurtada 100.000 ila 1.000.000 arası mtDNA bulunur. Ayrıca döllenme sırasında meydana gelen biyokimyasal tepkimeler, sperm mtDNA'sının çok büyük bir kısmının yumurtaya

geçmesine engel olur. Ayrıca yumurta döllenirken sonra sperm ve mtDNA yumurta tarafından "yabancı madde" olarak algılanarak yok edilir. Zaten spermdeki mtDNA'nın çoğu, mitokondrilerin yoğunlukla bulunduğu kuyruk kısmındadır ve kuyruk çoğu zaman döllenme sırasında mtDNA'larla birlikte kaybedilir. mtDNA anaya ait kalıtım bilgisine sahip olup sitoplazmik kalıtım materyali olarak yumurtanın sitoplazması vasıtasıyla generasyonlar boyunca aktarımı gerçekleştirilmektedir. mtDNA'da meydana gelen mutasyonlar ile bireyler ve türler arasındaki farklılıkların takibi kolaylaşır. Farklı canlıların mtDNA'sı kıyaslanır ve buna göre soy ağacı çıkarılır. Nadiren mtDNA'nın erkek tarafından aktarıldığı da gözlenmiştir. Örneğin birkaç bal arısı türünde, meyve sineklerinde bu durum gözlenmiştir. In vivo dediğimiz ve canlı dışında gerçekleştirilen döllenmelerde de erkekten mtDNA'nın geçmesi durumu gözlenebilir.

MtDNA molekülünün anaya ait kalıtım modeline sahip olması ve yeni kombiasyonların oluşmaması popülasyon genetiği, filogenetik çalışmalar, tür içi/türler arası genetik benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkarılmasında kullanılmasının başlıca sebepleridir (Avice 2004). Mitokondriyel genetik materyalin daire şeklinde olması ve ikili sarmalda tek bir DNA molekülünün olmasından dolayı çekirdek DNA molekülünde homolog kromozomlar arasında gerçekleşen crossingover meydana gelmez. Bu durum döllerde yeni kombinasyonlar oluşma ihtimalini ortadan kaldırır. Döllerde yeni kombinasyonların oluşmamasından dolayı genetik markırların çok düşük sıklıklarda (2×10^{-8}) gerçekleşen mutasyona uğramasına ve markırların sabit kalmasını sağlamaktadır (Özdil 2007). Mutasyon sıklığının düşük olduğu mtDNA molekülünde meydana gelen genetik varyasyonun sebepleri nükleotid eksilmesi (deletion), nükleotid eklenmesi (insertion), nükleotid dönüşümleri (substitution) ve belirli gen bölgelerinde DNA parçalarının farklı uzunluklarda olması olarak özetlenebilir (Moritz vd 1986, Solignac 1991).

Genel olarak mtDNA markırları:

- ✓ Popülasyonların tanımlanması,
- ✓ Popülasyon ve ekotiplerin orijinlerinin belirlenmesi,
- ✓ Popülasyonların coğrafi dağılımlarının ortaya konması,
- ✓ Alttür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi,
- ✓ Popülasyonlar arasındaki gen akışı ve hibritlenme seviyelerinin tahmin edilmesi,
- ✓ Anaya ait (maternal) kalıtım modellerinin izlenmesi,
- ✓ Popülasyonlar içi/arası genetik varyasyon düzeylerinin hesaplanması,
- ✓ Popülasyonların genetik benzerlik ve farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı mtDNA molekülü fonksiyonel olarak yaklaşık 37 gen, filogenetik olarak ise çok sayıda genin var olduğu tek bir bağlantı grubundan meydana gelmiş süpergen olarak tanımlanmıştır (Moritz vd 1986).

Cytb bölgesi mitokondrinin solunum ile ilgili zincirinde elektron iletiminden sorumlu, tRNASer ile ND6 genleri arasında bulunan 1149 bp'lik bir lokustur. COI bölgesi tRNALeu ve tRNATrp arasında yer alan 1560 bp uzunluğunda mitokondriyal solunumda elektron transferini sağlayan enzimin üretiminden sorumludur (Özdil 2007). mtDNA COI gen bölgesi, elektron transfer zincirinde işlev görmekte ve bu yüzden de yüksek derecede korunmuş bir bölge olup nötralite göstermektedir. Bu sebeple, COI gen bölgesi evrensellik göstermekte ve böylece bu gen bölgesi referans alınarak oluşturulan

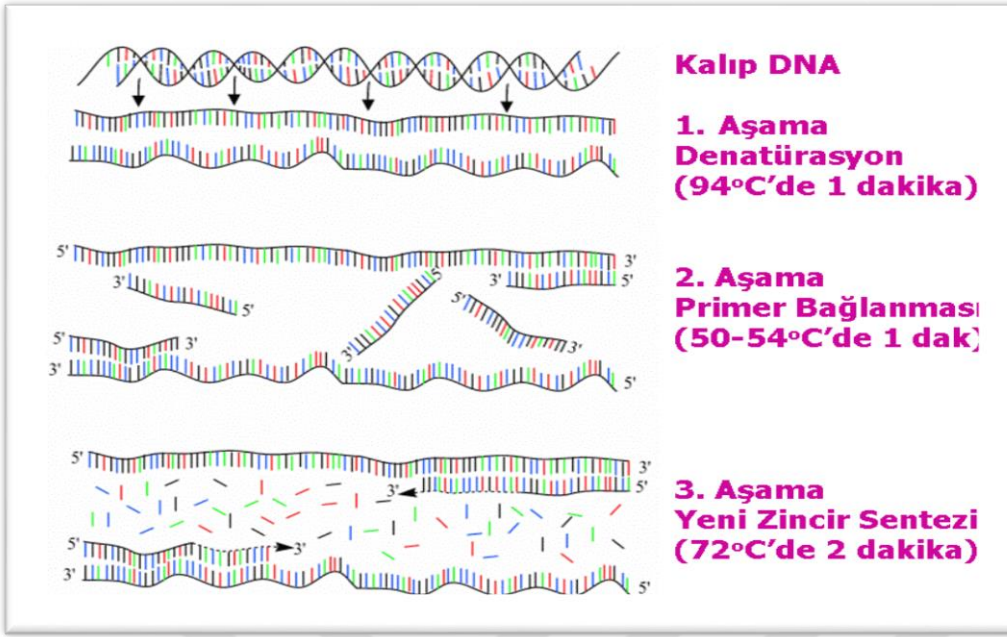
primerler, türlerin çoğunluğunda DNA barkodlama amacıyla kullanılabilir. Ayrıca COI gen bölgesi, populasyon genetiği çalışmalarında genetik varyasyon ve farklılaşma derecesinin ölçümü için de belirteç (markır) olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Öksüz 2014).

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ilk kez ABD’de 1985 yılında Cetus şirket çalışanı Henry A. Erlich, Kary Mullis, Randall K. Saiki birlikte geliştirmişlerdir ve bu buluş araştırma laboratuvarlarında yeni bir çağ açmıştır. Buluşundan dolayı Kary Mullis 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü kazanmıştır. Basit olarak metod; tüpler içerisinde Nükleik asitlerin (amplifikasyonu) çoğaltılmasıdır. Uygun primerler tarafından DNA kopyalarının enzimatik olarak sentezlenmesi olarak tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Çoğaltılacak olan bölgenin iki taraftan da uçlarına bölgeye özgü ve bu bölgede bulunan baz dizilimlerini tamamlayan çiftler sentetik oligonükleotid primerleri kullanılarak, bu primerlerle bölgenin enzimatik olarak üretilmesine dayanır. En basit anlatımla PCR; DNA moleküllerinin milyarlarca kez basit olarak çoğaltılmasıdır. Üç aşamanın tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu aşamalar sırasıyla iki DNA zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), primerlerin hedef DNA molekülüne bağlanması (annealing) ve DNA zincirinin uzaması (extention)’dir (Şekil 2.3).

Genel olarak;

- ✓ DNA haritalama ve DNA dizi analizlerinde,
- ✓ Kalıtsal hastalıkların tanısı,
- ✓ Adli tıp çalışmalarında,
- ✓ DNA parmak izi analizinde,
- ✓ DNA klonlanmasında,
- ✓ Evrimsel araştırmalarda,
- ✓ İnsan genom projesindeki araştırmalarda,
- ✓ Tarımsal araştırmalarda,
- ✓ DNA-Protein interaksiyonunda ve
- ✓ Doğadaki türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.3. PCR yönteminin görsel anlatımı

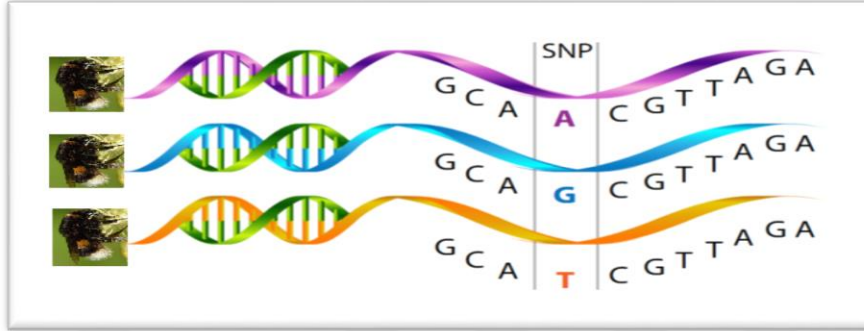
2.7. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) yöntemi

Sadece tek bir nükleotitte meydana gelen değişiklik SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) olarak adlandırılmaktadır ve genomda en sık görülen polimorfizmdir. Genel olarak bir popülasyonda 2 allelin bulunması durumunda genetik varyasyon kaynağı olarak gösterilmektedir. Polimorfizm bir popülasyonda iki ya da daha fazla sayıda birbirinden ayrılmış ya da farklı fenotiplerin varlığı olarak tanımlanabilir. Yeni polimorfizmleri taramak ve saptamak için kullanılmaktadır.

DNA zincirinde bir bazın başka bir baz ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan polimorfizmdir (Şekil 2.4). Yani pürin (G/A) nükleotidinin veya pirimidin (C/T) nükleotidinin yer değiştirmesi (transition), bir pürin nükleotidi ile bir pirimidin nükleotidi veya tersi şeklindeki yer değiştirmeler (transversion), DNA zincirine tek baz eklenmesi (insertion) veya eksilmesi (deletion)'de SNPs markırlarının meydana gelmesine sebep olan faktörlerdendir. SNP'ler genel olarak gen fonksiyonlarını ve kalıtsal özellikleri etkilemezler. SNP'ler ortalama 1331 bazda 1 kez görülmektedir (Failin vd 2000).

Son yıllarda DNA dizi analiz yöntemleri ve teknolojisindeki gelişmelerle birlikte çiftlik hayvanı türlerini de kapsayan moleküler çalışmalar SNPlar üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok polimorfizm çalışmasında, kalıtsal hastalıkların genetik kökeninin araştırılmasında, metabolik faaliyetlerin aydınlatılmasında, biyoteknolojik çalışmalarda, evrim genetiğinde ve adli bilimlerde SNP kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. SNP markırlarının genetik çalışmalarda kullanımının yaygınlaşmasının 4 önemli nedeni şu şekildedir (Beuzen vd 2000).

- Eğer SNP markırları gen ürününün karşılığı bulunan bölgelerde bulunursa doğrudan fenotipi etkilerler.
- Diğer moleküler yöntemlere göre her lokusta çok daha fazla markır elde edilmektedir.
- SNP seleksiyon markırı olarak mikrosatellitlere oranla daha uzun vadede döllere aktarılabilmektedir.



Şekil 2.4. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP: Single Nucleotide Polymorphism)

2.8. DNA Dizi Analizi

Gelişen teknik ve teknolojilere paralel olarak herhangi bir kaynaktan elde edilen DNA fragmentlerinin nükleotid dizilerini belirlemek moleküler genetik alanında yeni çığırar aşmıştır. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi çalışmalarında ilk olarak Holley vd (1965) tarafından 74 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. 1977 yılında Allan Maxam- Walter Gilbert ve Frederick Sanger tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982 yılında Akiyoshi Wada DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır. 1986 yılında Leroy Hood ve Llyod Smith tarafından DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur.

Sürekli gelişen yöntemler sayesinde sırasıyla 1992 yılında insan genomunda 21.kromozom, 1995 yılında *haemophilus influenzae*'ya ait ilk DNA dizisi, 1996 yılında ekmeek mayası olan *S.cerevisiae*'nin DNA dizisi, 1998 yılında *Caenorhabditis elegans*'ın DNA dizisi, 1999 yılında insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır, 2000 yılında *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisi, insan gen haritasının taslağı ve *Arabidopsis thaliana* DNA dizisi ve 2003 Y kromozomunun dizi analizini tamamlamıştır.

DNA nükleotid dizi analizleri başlıca şu amaçlar için yapılır:

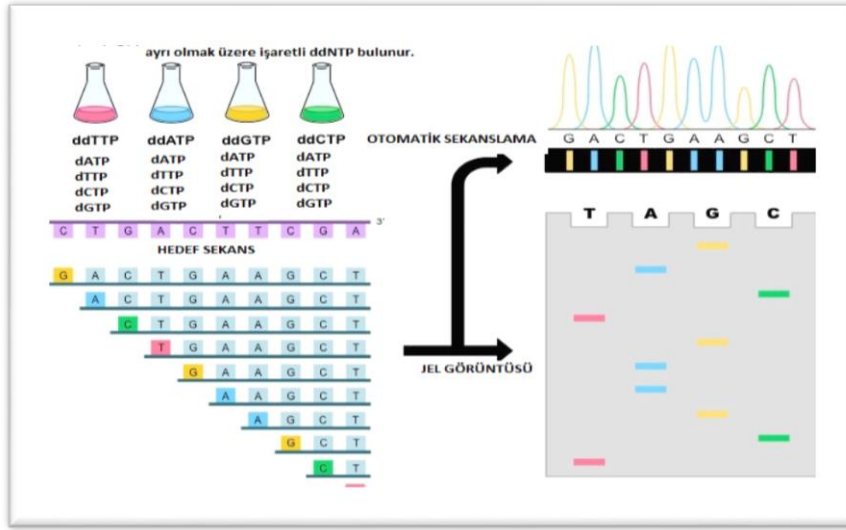
- ✓ Biyolojik hayatı kontrol eden genlerin ve kalıtsal şifrenin belirlenmesi
- ✓ Gen ve allellerin fonksiyonel yapılarının ortaya çıkartılması
- ✓ Genom haritalarının oluşturulması
- ✓ Mutasyonların saptanması
- ✓ Tür içi ve türler arası genetik ilişkilerin araştırılması.
- ✓ Kalıtsal hastalıkların meydana gelme ve tedavi süreçleriyle ilgili mekanizmaların anlaşılması.

Sanger dizileme yöntemi, enzimatik DNA sentezine dayanır ve en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir. Yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezi sağlamak için Klenov, *Taq* DNA polimeraz, ters transkriptaz yada sequenz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli, DNA polimerazın dNTP (deoksiribonükleotid trifosfat) ve ddNTP (dideoksiribonükleotid trifosfat) leri de substrat olarak kullanabilmesi esasına dayanır. Frederick Sanger (1975) tarafından geliştirilmiş ve dideoksinükleotid olarak adlandırılmıştır (enzimik metod). Bu metotla, Sanger, küçük DNA fajlarından olan øX174 fajının 5386 baz çiftinden (bç) oluşan genomunun nükleotid sıralarını saptamıştır (Sanger vd 1977).

Sanger yönteminin ana ilkesi zincir sonlandırıcı olarak dideoksi nükleotid tri fosfatlar (ddNTP) kullanılmasıdır. Klasik zincir sonlandırma yöntemi için tek iplikli bir DNA kalıp, bir DNA primeri, bir DNA polimeraz, normal deoksi nükleotid tri fosfatlar (dNTP'ler) ve DNA zincir büyümesini sonlandıran modifiye edilmiş nükleotidler (ddNTP) kullanılır. Bu ddNTP'ler otomatik dizileme makinalarında otomatik olarak tespit edilebilmek için radyokatif veya floresan olarak işaretlenir. DNA numunesi dört ayrı dizileme reaksiyonu için paylaşılır, bunlarda ortak olarak standart deoksi nükleotidler (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) ve DNA polimeraz bulunur. Her reaksiyona dört dideoksi nükleotid'ten bir tanesi (ddATP, ddGTP, ddCTP, veya ddTTP) eklenir. İki nükleotid arasında bir fosfodiester bağı oluşması için gerekli olan 3'-OH, dideoksi nükleotidlerde bulunmadığı için bunları içeren bir DNA zinciri daha fazla uzayamaz. Bu nedenle, çeşitli uzunluklarda DNA zincirlerinin oluşumuyla reaksiyon sona erer.

Yeni sentezlenen ve işaretlenen DNA parçaları ısıtılarak denatüre edilir ve jel elektroforeziyle büyüklüklerine göre ayrıştırılır. Dört reaksiyonun (A, C, G ve T) her birindeki DNA parçaları elektrik alanının etkisiyle jel içinde birbirine paralel ayrı yollardan ilerleyerek ayrıştırılır. Aynı uzunluğa sahip DNA parçaları aynı hızda ilerler ve görselleştirildiklerinde (otoradyografi veya mor ötesi ile) birer bant olarak görünürler. Dört şeritteki farklı bantların göreceli konumlarına bakılarak DNA dizisi (alttan yukarı doğru) okunabilir (Şekil 2.5).

Zincir sonlandırma dizilemesinin teknik çeşitlemeleri mevcuttur. Radyoaktif fosfor içeren nükleotidler kullanılarak radyo işaretleme yapılabilir veya 5' ucunda floresan boya ile işaretlenmiş bir primer kullanılabilir. Optik bir sistemde yapılan boya-primer dizilemesi sayesinde okuma daha hızlı ve ekonomik yapılabilir ve sistemin otomatizasyonu mümkün olur. Leroy Hood vd tarafından geliştirilen bu sistemler otomatik ve yüksek hacimli DNA dizilemesini mümkün kılmaktadır.



Şekil 2.5. Sanger yönteminin görsel anlatımı

2.9. Elektroferez

Elektroferez, büyük moleküllü iyonların ve yüklü parçacıkların elektrik akımı verilen bir alanda artı uca (anot) ya da eksi uca (katot) doğru hareket etmelerini ifade etmektedir. Moleküllerin hareket hızları; sahip oldukları elektrik yüküne, molekülün büyüklüğüne ve şekline bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca kullanılan tampon çözeltiler, taşıyıcı materyalin özelliği, akım şiddeti, süresi, ortam sıcaklığı ve pH moleküllerin hareketini etkileyen temel etmenlerdir (Harris ve Angal 1995). Elektroferezin çalışma ilkesi molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını göstermektedir.

Agaroz Jel Elektroferezi daha çok proteinlerin ve küçük DNA parçalarının ayırımı ve analizi için kullanışlıdır. Agar bir alg türünden elde edilir. Jel elektroferez tamponuna koyulmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır. Kaynatılmış agaroz çözeltisi 50 dereceye kadar soğutularak jel tepsilerine dökülür. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve elektriksel alanda yürütülerek ayırımı yapılır. Jel uygun şekilde hazırlanırken ya da örnekler yüklenip elektriksel olarak ayrıldıktan sonra boyanır ve örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu projede materyal olarak *B. terrestris* işçi arı örnekleri kullanılmıştır. Proje materyali oluşturulurken Antalya yöresindeki doğal alanlar, yoğun seracılık yapılan bölgeler ve ticari üretim yapan firmalardan örnek toplanmıştır.

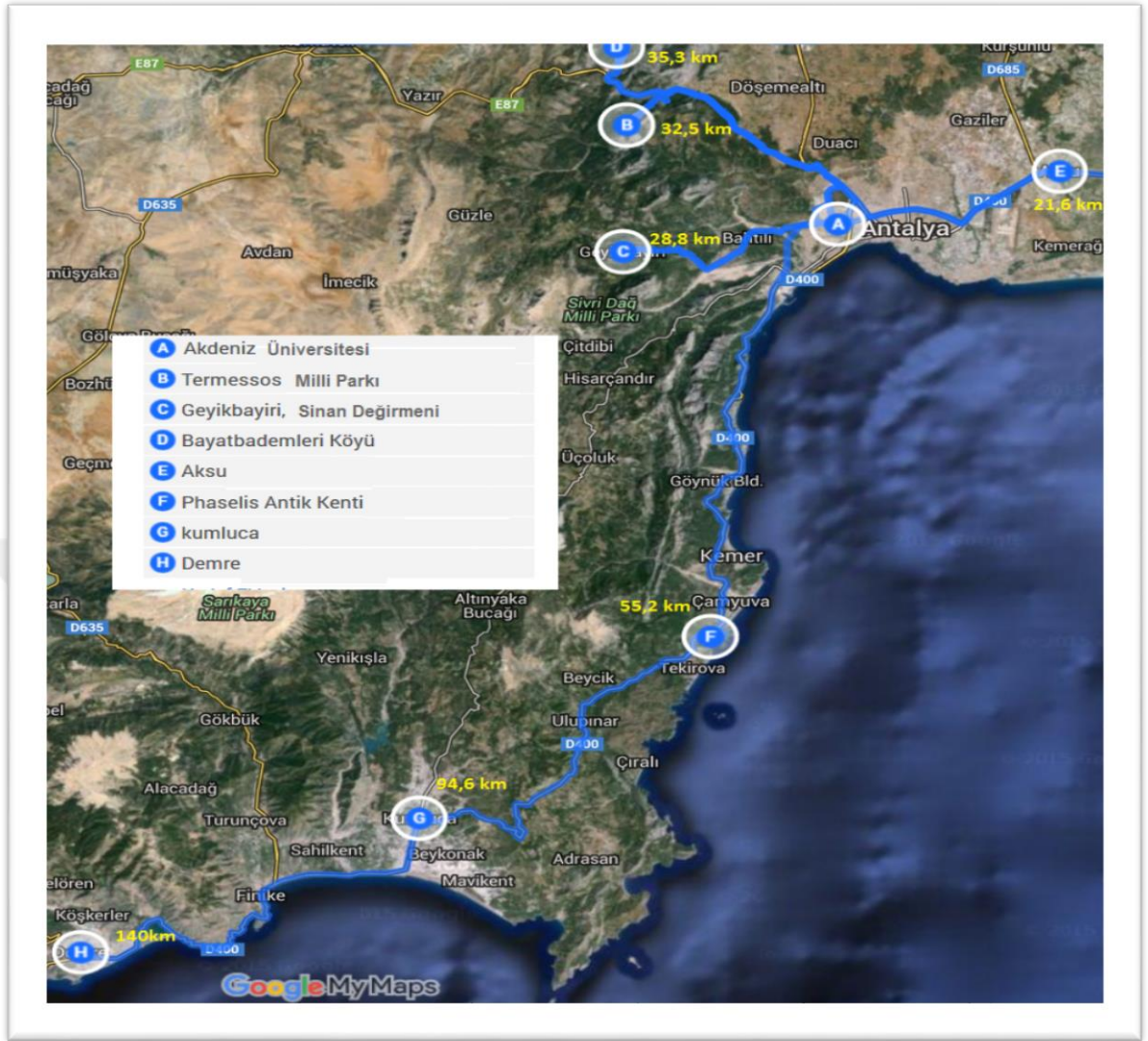
B. terrestris arılarının doğal yetişme alanları olarak yerleşim yerlerine ve sera alanlarına en az 30 km uzaklıkta bulunan izole yerler tercih edilmiştir. Böylece, Faselis ve Termessos milli parkları ile Bayatbademleri köyü civarından 30'ar işçi arı toplanmıştır.

Aksu (Perge, TIGEM, Boztepe Köyü), Kumluca-Hasyurt ve Demre-Beymelekilçeleri yoğun seracılık faaliyetlerinin yapıldığı ve bu seralarda yoğun olarak ticari üretilmiş *B. terrestris* arılarının kullanıldığı yörelerdir. Buradaki seralardan doğaya *B. terrestris* işçi arılarının kaçma olasılığı yüksektir. Bu sebeple, birçok defa ziyaretler yapılarak farklı sera ve sera çevrelerinden 30'ar işçi arı örneği toplanmıştır. Proje önerisinde sadece Aksu ve Demre yöresinden örnek alınması ön görülmesine rağmen başka bir proje için Kumluca bölgesine yapılan ziyaretlerde bu proje için de materyal toplanmıştır. Sonuçta proje bütçesini etkilemeyen bu durum projenin materyal sayısını da arttırmıştır.

Ayrıca, Batı Akdeniz bölgesinde ticari üretim yapan 5 firmadan rastgele 30'ar koloniden 1'er adet olmak üzere 30'ar işçi arı örneği alınmıştır. Böylece ticari üretilen *B. terrestris* kolonilerine ait 150 işçi arı materyal olarak kullanılmıştır.

Ayrıca, yayla seracılığının henüz yaygınlaştığı Geyikbayırı-Sinandeğirmeni yöresinden de 30 işçi arı örneği toplanmıştır. Bu yöredeki seralarda ticari üretilmiş arı kolonilerinin kullanılmadığından emin olunmadığı için buradan toplanan örnekler doğal populasyon olarak değerlendirilmemiştir.

Böylece, 12 farklı bölgeden toplam 360 adet işçi arı materyali elde edilmiştir. Arı örnekleri toplamak için ziyaret edilen yerler Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Yakalanan tüm arı örnekleri üzerinde tarih, yakalandığı lokasyon yazan ve içerisinde saf alkol bulunan cam kavanozlara (Şekil 3.2) konularak laboratuvara getirilmiştir. Bu şekilde biriktirilen örnekler kullanılıncaya kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir. Arazi çalışmalarında arı örneklerinin toplandığı yerlere ait koordinat rakım bilgisi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Örnek toplama çalışmaları Nisan-Mayıs-Haziran 2016 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Arı örneklerinin toplandığı bölgeler



Şekil 3.2. Arı örneklerinin etil alkol bulunan kavanozlar içerisinde muhafazası

Çizelge 3.1. Arı örneklerinin toplandığı yörelerin koordinat ve rakım bilgileri

Lokasyon	Koordinatı	Yükseklik
Aksu	36°57'K 30°51'D	10 m
Kumluca	36°22'K,30°17'D	15 m
Demre	36°14'K,29°57'D	12 m
Faselis	36°31'K 30°33'D	4 m
Bayatbademler	37°3 'K,30° 27' D	589 m
Termasos	36°59' K,30°28' D	1150 m
Geyikbayırı	36°54'K, 30°32'D	900

3.2. Yöntem

Bu proje kapsamında arı örneklerinden DNA ekstraksiyonu, DNA kalite-kantite ölçümü, PCR çalışmaları, elektroforez çalışmaları ve jel dökümantasyon işlemleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Proje konusu mtDNA COIb ve Cytb genlerinin PCR'da amplifiye edilen fragmentlerinin DNA baz dizilimi hizmet alımı yoluyla belirlenmiştir. Deneme materyalini oluşturan arı örneklerinden her birinin mtDNA'sında bulunan iki gen bölgesi (COIb ve Cytb) spesifik primerler ile PCR'da çoğaltılmıştır. PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin DNA nükleotid dizileri belirlenmiş ve SNP haplotipler oluşturulmuştur. Elde edilen veriler üzerinden populasyonların genetik yapısı ve filogenetik ilişkiler ortaya çıkartılmıştır. Böylece, önemli yerli gen kaynaklarımızdan biri olan *B. terrestris* arılarına ait önemli genetik bilgiler sağlanmıştır. Projede kullanılan yöntemlerin ayrıntıları sırasıyla aşağıda açıklanmıştır. Bu çalışmada kullanılan malzemeler ve kullanım amaçları Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Proje kapsamında laboratuvar çalışmalarında kullanılan araç-gereçler

Adı	Kullanım Amacı
Gradient Thermal Cycler	mtDNA COI ve Cytb genlerinin özgün primerler kullanılarak çoğaltılması
Santrifüj	DNA ekstraksiyon çalışmalarında moleküllerin merkez kaç kuvveti ile kütle büyüklüklerine göre ayırıştırma işlemleri
Tissue Lyser	Arı doku ve hücrelerinin lizis edilmesi
BioDrop	DNA kalite ve kantite ölçümleri
Otomatik pipet	Mikrolitre seviyesinde ölçümler
Saf Su Cihazı	Çeşitli çözeltilerin hazırlanması için gerekli saf su sağlama
pH Metre	Çözeltilerin asit-baz değerlerinin ayarlanması
Otoklav	Laboratuvar malzemelerinin ve çözeltilerin sterilizasyonu
Sıcak Su Banyosu	Enzim aktivasyonunun gerçekleştirilmesi
Vortex – Çalkalayıcı	Çözelti ve reaksiyon karışımlarının homojenizasyonu
Hassas Terazi	Katı kimyasalların hassas ölçümleri
Horizontal Jel Elektrofez	Nükleik asitlerin ve PCR ürünlerinin agaroz jelde tespit edilmesi
Güç Kaynağı	Elektrofez işlemi için sürekli sabit enerjinin sağlanması
Jel Dökümantasyon	Elektroforezde ayırıştırılan DNA fragmentleri görüntülenmesi
Mikrodalga Fırın	Elektroforez için jel hazırlama
-20 °C soğutucu	Proje materyal ve bazı sarf malzemelerin depolanması
Manyetik Karıştırıcı	Çözeltilerin homojenizasyonu

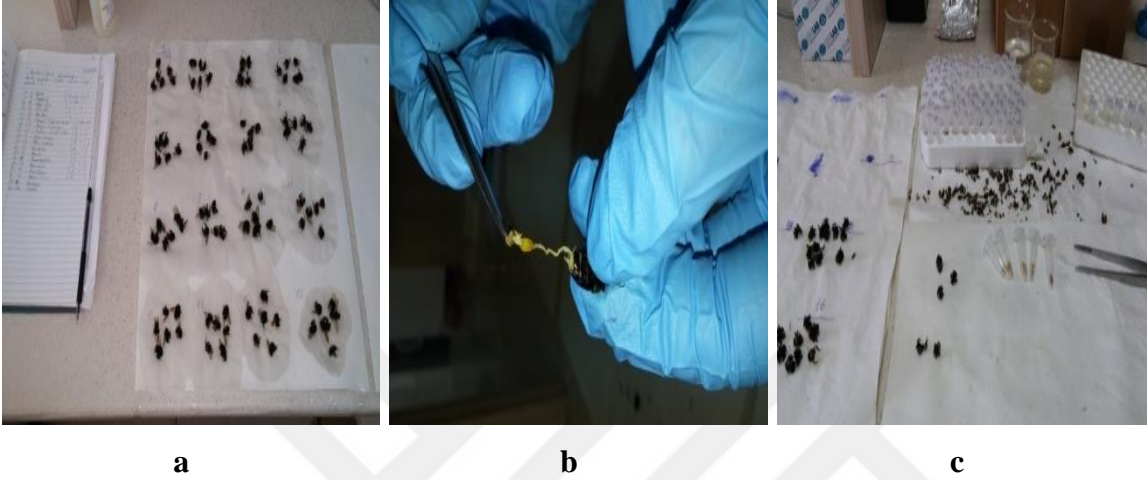
3.2.1. DNA ekstraksiyon çalışmaları

Proje materyali olarak her lokasyondan 30'ar işçi arı örneği toplanmış ve böylece 12 lokasyona ait toplam 360 *B. terrestris* işçi arı örneği projenin materyalini oluşturmuştur. DNA ekstraksiyonu çalışmaları her birey için ayrı olarak gerçekleştirilmiş ve toplam 360 DNA örneği elde edilmiştir.

DNA ekstraksiyon çalışmalarında ilk olarak Chelex yöntemi uygulanmış ancak elde edilen DNA örneklerinin kalite ve kantitesi istenilen düzeyde olmadığı için Chelex yönteminde elde edilen DNA örneklerine ek olarak CTAB yöntemi (Hall 1990)'de uygulanmıştır.

DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce saf alkol içerisinde bulunan arıların alkolden uzaklaştırılma işlemi yapılmıştır. Bunun için, laboratuvar tezgâhına 40x40cm ebatlarında kurutma kâğıdı yerleştirilmiştir. Kâğıdın hareket etmesini engellemek için köşelerinden bant ile zemine sabitlenmiştir. Örneklerin bulunduğu her bir şişeden 15 arı örneği alınacağı için kâğıdın üzerine birden onbeşe kadar numara yazılmıştır. İki adet 250 cc'lik erlenmeyer kaplarına saf su doldurulmuştur. Arılar tek tek steril cımbız yardımıyla depolandığı şişeden çıkartılmıştır. Bu işlem sırasında arıların ezilmemesine özen gösterilmiştir. Şişeden çıkartılan arılar birinci erlenmeyer kabına atılmıştır. Burada yaklaşık 2 dakika bekletilen arılar, cımbız yardımıyla alınarak ikinci kaba atılmıştır. Burada da 2 dakika bekletilen arılar, tekrar cımbız yardımıyla alınarak kurutma kâğıdının üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.3a).

Arı örneklerinin oda sıcaklığında (25°C) kâğıt üzerinde kurumaları sağlanmıştır. Steril cımbızlar yardımıyla vücut kısımları birbirinden ayrılmıştır. Kanatları ve bacakları gövdeden (toraks) uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3b). Bu şekilde elde edilen her bir toraks ve iç organlar önceden numaralandırılmış steril 2 ml'lik tüplere ayrı ayrı bireysel olarak aktarılmıştır (Şekil 3.3c). Toraks ve iç organlardan DNA ekstraksiyonu her bir birey için ayrı ayrı yapılmıştır.



Şekil 3.3. Arı örneklerinin DNA ekstraksiyonu için hazırlanması

Arıların kısımları ayrılıp numaralandırılmış steril tüplere aktarılmasından sonraki işlemler aşağıda sırasıyla maddeler halinde verilmiştir.

Chelex-100 DNA İzolasyonu

1. Örnekler saf su ile yıkanır ve kurutulmuştur.
2. Toraks ve iç organlar ayrı olarak 2 ml'lik doku parçalama (tissue lyzer) tüplerine alınır.
3. Her bir tüpün içerisine 2 mm çapında 2 adet tungsten metal bilye atılmıştır.
4. Üzerine %10'luk 800 µl chelex eklenir ve tissue lyzer cihazında 10 dakika 30.000 G'de tüm dokuların parçalanması sağlanmıştır.
5. Tüp içerisinde şeffaf köpüklü bir görüntü oluştuktan sonra, her bir tüp önceden numaralandırılmış steril eppendorf tüplerin içine ters çevrilmiştir. Bu haldeyken 2-3 saniye santrifüj yapılarak tissue lyzer tüpündeki parçalanmış içeriklerin eppendorf tüplere geçmesi sağlanmıştır.
6. Üzerine 5 µl proteinaz-K ve 5 µl RNAse eklenir, 30 saniye vorteks yapılmıştır.
7. Önceden 56 °C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilen tüpler burada en az 3 saat inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyondan sonra enzim aktivitesini bitirmek için su banyosundan alınan tüpler önceden 95 °C'ye ayarlanmış su dolu kap içerisinde 15 dakika bekletilmiştir.
9. Tüpler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüj sonucunda oluşan ve total DNA içeren üstteki sıvı faz yeni steril tüpe aktarılmıştır (yaklaşık 500 µl).

CTAB Protokolü

11. %2 CTAB + %2 β -Merkaptoetanol çözelti hazırlanmıştır (500 μ l).
12. Bu çözelti Chelex yöntemiyle elde edilen DNA örneklerinin üzerine eklenmiştir.
13. 56 °C’de en az 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
14. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine 500 μ l kloroform + izoamil alkol karışımı (24:1) eklenmiştir, vortex yapılmıştır.
15. Tüpler 14.000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
16. Tüp içerisinde oluşan DNA içeren üst faz yeni tüplere aktarılmıştır (yaklaşık 500 μ l).
17. Üzerine tekrar 400 μ l kloroform + izoamil alkol eklenmiştir, vortex yapılmıştır.
18. Tüpler 14.000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
19. Tüp içerisinde oluşan DNA içeren üst faz yeni tüplere aktarılmıştır (yaklaşık 400 μ l).
20. Bunun üzerine alınan faz kadar soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
21. Tüpler yavaşça alt-üst (invert) edilmiştir.
22. Ardından tüpler -20 °C’de 1 saat bekletilmiştir.
23. Sonra 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
24. Total DNA parçaları tüplerin dibinde pelet oluşturur.
25. Üstteki sıvı kısım dikkatlice dökülür, pelet halindeki DNA’yı yıkamak için 500 μ l %70’lik soğuk etanol eklenmiştir.
26. Bir dakika bekledikten sonra 14.000 rpm’de 5-7 dakika santrifüj yapılmıştır.
27. Üstteki sıvı kısım dökülür. Üzerine tekrar %70’lik soğuk etanol eklenmiştir.
28. Bir dakika bekledikten sonra 14.000 rpm’de 5-7 dakika santrifüj yapılmıştır.
29. Sıvı kısım dikkatlice dökülür ve tüpler kurutma kâğıdı üzerine yan yatırılarak içerideki alkolün tamamen uzaklaşması beklenmiştir.
30. Tüpler iyice kuruduktan sonra üzerine 100-150 μ l ddH₂O (nükleaz-free) su eklenerek pelet haldeki DNA’nın çözülmesi sağlanmıştır.
31. Ekstrakte edilen DNA örneklerinin kalite ve miktarı BioDrop cihazında tespit edilmiştir. Sonuçta istenilen kalite ve miktarda DNA materyali sağlanmıştır. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA kantitasyonu

Ekstraksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen 360 mtDNA örneğinin miktar ve kalitesini belirlemek için BioDrop Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Ölçüm işlemi için ekstraksiyon ürününden otomatik pipet yardımıyla 1 μ l çekilmiş ve BioDrop cihazının okuma gözüne damlatılmıştır. Ölçüm değerleri bilgisayar yazılımına aktarılmıştır. Spektrofotometre ölçümleri sonucunda 260/280 dalga boylarında OD değeri 1.8-2.0 arasında olan DNA örneklerinin 50 ng/ μ L olduğu kabul edilmiştir. Yoğunluk değerlerine göre bi-destile saf su kullanarak yoğunluk değerleri eşitlenmiştir. Bu değerlerin altındaki ve üstündeki örnekler PCR çalışmalarında kullanılmamıştır.

Ayrıca, DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadığı) kontrolleri %2’lik agaroz jelde yapılmıştır. Bu amaçla, 3 μ l DNA ürünü 2 μ l yükleme tamponu ile boyanarak agaroz jele yüklenmiştir ve 60 dakika 80 volta (Thermo EC 300 XL Power Supply) koşturulmuştur. Elektroforez işleminden sonra DNA fragmentlerinin görünür hale getirilip değerlendirilebilmesi için jeller ethidium bromide

ile boyandı. Elektroferezde sıralanan fragmentlerin büyüklükleri DNA Ladder kullanılarak belirlenmiştir. Görüntüleme sistemi (*SYNGENE-inGENUS*) kullanılarak ultraviyole ışık altında örnek fotoğrafları bilgisayar yazılımına aktarılmıştır. DNA molekülleri PCR işlemi yapıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. PCR çalışmalarında her bir lokasyon için en iyi değerlere sahip 15'er DNA örneği seçilmiştir.

3.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) çalışmaları

DNA miktarlarının ölçüm değerlerine göre her bir örneğin bulunduğu tüplere gerektiği kadar bi-distile saf su eklenerek DNA miktarı yaklaşık olarak 50 ng/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. İlgili gen bölgelerinin PCR amplifikasyonunda kullanılacak primerlerin Tm değerlerine göre PCR protokolü hazırlanmıştır. PCR amplifikasyonunda 2 µl kalıp DNA kullanılmış ve toplam hacim 40 µl olarak ayarlanmıştır. Önceden numaralandırılmış olan PCR tüplerine 2'şer µl DNA dağıtılmıştır. PCR karışımı hazırlarken sırasıyla nukleaz free saf su, 10X tampon, dNTPs, MgCl₂, Primerler (R-F) ve en son *Taq* polimeraz eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan mixten 38'er µl çekilerek DNA içeren PCR tüplerine dağıtılmıştır. Thermal Cycler cihazında 35 döngü şeklinde gerçekleştirilen PCR işleminde primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklığı 55 °C olarak ayarlanmıştır (Çizelge 3.3). Elde edilen PCR ürünlerinin varlığı elektroferez işlemi ile tespit edilmiştir. PCR-karışımı hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonlarında hedef DNA bölgesi olan mtDNA COIa, COIb ve Cytb gen bölgelerine özgü primerler (Çizelge 3.4) literatür bilgisinden faydalanılarak sentezletirilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR-mix içerikleri ve sıcaklık döngü protokolü

Kalıp DNA (50ng)	2 µl		
10X	4 µl	94°C	5 dk
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	94°C	30 sn
MgCl ₂ (25 mM)	3,1 µl	55°C	30 sn
Primer R (10 mM)	0,3 µl	72°C	45 sn
Primer F (10 mM)	0,3 µl	72°C	5 dk
Taq polimeraz (5u/ul)	0,3 µl	4°C	∞
Su	26 µl		

Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer setleri

Primerler	Ürün (bç)	Literatür
F 5'-TAAACTTCTGGATGACCAAAAAATCA R 3'-TATCTACTAATCATAAAAAATATTGG	COIa (658bç)	Kim vd 2009
F 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG R 3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COIb (758bç)	Hebert vd 2003
F 5'-CAACATTTATTTTGATTTTGG R 3'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	COIb (758bç)	Sperling and Hickey (1994)
F 5'-TACTACCATGAGGACAAATATC R 3'-ATTACACCTCCTAATTTATTAG	Cytb (434bç)	Morath S. 2007

3.2.4. Elektroforez işlemleri

3.2.4.1. Agaroz jellerin hazırlanması

PCR amplifikasyonlarının başarısı %2'lik agaroz jel elektroforezinden yararlanılarak kontrol edilmiştir. Bunun için 2 gr agaroz tartılmış, tartılan agaroz erlene aktarılmış ve 1X TBE çözeltisi (Çizelge 3.5) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözelti içindeki agaroz tamamen eriyip şeffaf bir görüntü oluşuncaya kadar mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Elde edilen agaroz jel yaklaşık 50 °C'ye kadar hafif çalkalanarak, köpük oluşturulmadan soğutulmuştur. Soğuyan jel çözeltisini içerine 3 µl etidyum bromide çözeltisi (10 mg etidyum bromide / ml deiyonize su) ilave edilmiştir. Elektroforez tepsisine yaklaşık 30 µl hacminde dişleri olan aparat (tarak) yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel, hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edilerek tepsiye dökülmüştür ve jel katılaşana kadar soğumaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmıştır.

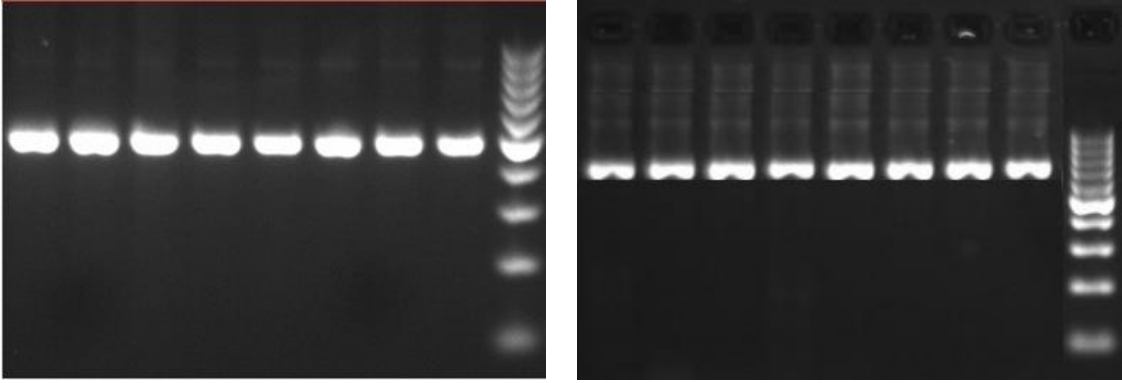
Hazırlanan jel 1X TBE Elektroforez / Jel Tampon çözeltisi ile dolu olan yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini tamamen kaplayacak şekilde 1 X TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir. Tarak dişlerinin oluşturduğu kuyucuklara mikto pipet kullanılarak PCR ürünleri enjekte edilmiştir. Bu şekilde PCR ürünleri elektroforez işlemine hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.5. 10 X TBE Buffer tampon çözeltisi olarak hazırlanışı

Tampon çözelti	Molarite /Miktar	İçerik
10X TBE Elekrtoforez/Jel	108 gr	Tris
Stok Tampon Çözeltisi	55 gr	Boric Asit
	7,5 gr	EDTA
	H ₂ O	ddH ₂ O

3.2.4.2. PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR sonucunda amplifiye edilen fragmentlerin varlığını ve doğruluğunu belirlemek amacıyla elektroforez işlemi yapılmıştır. PCR ürününden 5 µl alınıp üzerine 3 µl yükleme boyası (brom fenol blue) eklendi. Elde edilen karışım mikropipet ile agaroz jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüklerini belirleyebilmek amacı ile ilk kuyucuğa 100 bç'lik DNA Leadder (Fermentas® GeneRuler SMO241) yüklendi (Şekil 3.4). 80 V'da 45 dk koşuturulan PCR ürünlerinin jeldeki görüntüleri Jel Görüntüleme Analiz Sistemi (INGENIUS) ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsüne bir örnek bant modelleri

3.2.5. Sekans analizleri

PCR çalışmaları sonucunda elde edilen mtDNA COIb ve Cytb bölgesinin nükleotid dizi analizleri hizmet alımı yoluyla tamamlanmıştır. DNA dizi analizlerinde izlenen yöntem ve yapılan işlemler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri EXOSAP kullanılarak saflaştırılmıştır. Uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir.

- 5 µl PCR ürünü üzerine 2 µl exosap eklenerek 65 °C’ de 10 dakika inkübe edilmiştir. Böylece PCR ürünlerindeki kirlilik giderilmiştir.
- Saflaştırma sonrasında elde edilen prüfiye PCR ürünleri proje konusu gen bölgelerine özgün primerler kullanılarak sekans PCR’ı yapılmıştır. PCR karışımı Çizelge 3.6’da verilmiştir. Bir amplifikasyon tüpü için 10 µl reaksiyon hacmi ayarlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin temizlenmesinde Zymogen DNA Sequencing Clean-Up kit kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. PCR-mix içerikleri ve sıcaklık döngü protokolü

Prüfiye PCR ürünü	2,4 µl		
10X	2,0 µl	96 °C 10 sn	} 25 döngü
BigDye Ready Mix	1,0 µl	50 °C 5 sn	
Primer R(3.2pmol/µl)	0,3 µl	4 °C 10 dk	
Primer F(3.2pmol/µl)	0,3 µl		
Su	4,0 µl		

- Elde edilen Sekan PCR ürünlerinin temizlenmesi
- 10 ml PCR ürünü üzerine 200 ml DNA Binding Buffer eklenmiştir,
 - Hazırlanan karışım Zymo-spin klon transfer edilmiştir,
 - 10000 G'de 60 sn santrifüj edilmiştir,
 - Akan sıvı tüplerden uzaklaştırılmıştır,
 - Üzerine 200 ml Wash Buffer ilave edilerek 10000 G'de 60 sn santrifüj yapılmıştır,
 - Zymo-spin kolon yeni temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 20 ml distile su ilave edildi ve 10000 G'de 60 sn santrifüj uygulanmıştır.
 - Böylece filtrelenmiş sekans PCR ürünü ABI Prism 3100 cihazını yüklenip DNA nükleotid dizileri belirlenmiştir.

3.2.6. SNP haplotiplerin belirlenmesi

DNA nükleotid dizi analizleri başarıyla tamamlanan COIb ve Cytb gen bölgelerine ait sekans görüntüleri FinchTV yazılımında açılarak tek tek gözden geçirilmiştir. Böylece, sekans cihazından kaynaklanan hatalı okunan bölgeler varsa düzeltilmiştir. Değerlendirilmeye alınacak ve alınamayacak sekans sonuçları tespit edilmiştir. Kötü DNA dizileri analizden çıkartılmıştır. Değerlendirilebilir sonuçlar veren sekansların çalışılan mtDNA gen bölgelerine ait olup olmadığı BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) yazılımı ile kontrol edilmiştir. PCR çalışmalarında kullanılan özgün primerlerin doğru sonuçlar verdiğinin kesinleştirilmesinden sonra her bir gen bölgesi için tüm sekans bilgileri MEGA6 yazılımına yüklenerek DNA dizi hizalaması (alignment) yapılmıştır. Yanlış sonuçlar veren DNA dizileri analizden çıkartılmıştır. Kullanılabilir sekanslar DnaSP v.5 yazılımına yüklenerek SNP bölgeleri belirlenmiştir. Aynı bireye ait bir DNA dizisi tespit edilen SNP allel sayısı kadar çoğaltılmıştır. Böylece her bir allel için bir DNA sekansı kullanılmıştır. DNA dizisi belirlenen SNP bölgeler kullanılarak haplotipler oluşturulmuştur.

3.2.7. İstatistik analizler

Proje konusu mtDNA COIb ve Cytb gen bölgelerine ait nükleotid dizi analizleri tamamlandıktan sonra sekansların kullanılabilirliği Finch TV yazılımı ile kontrol edilmiştir. Kontrolleri tamamlana DNA dizilerini hangi gene ait olduğu, PCR analizlerinde kullanılan primerlerin doğru gen bölgelerini sentezleyip sentezlemediği BLAST yazılımında kontrol edilmiştir. Çalışılan gen bölgelerinin doğruluğu kesinleştikten sonra her bir gen bölgesi için tüm bireylere ait kullanılabilir DNA dizileri alt alta sıralanacak şekilde Fasta formatına getirilerek MEGA6 yazılımına yüklenmiştir. Burada hizalama (alignment) yapılan sekanslardaki hatalar giderilmiştir. MEGA formatında kaydedilen dosya DnaSP5 (Rozas vd 2010) yazılımında açılmış ve burada haplotip analizleri yapılmıştır. Haplotip analizler sonucunda belirlenen haplotip bilgileri Arlequin 2.00 (Schneider vd 2000) yazılımında istatistikî analizler için kullanılmıştır. İstatistikî analizler sonucunda proje materyali olan 12 *B. terrestris* popülasyonuna ait grup içi ve gruplar arası genetik varyasyonlar (F istatistikleri), grup içi ve gruplar arası genetik mesafeler (genetic distance) hesaplanmıştır. Çalışılan popülasyonların birbirlerine olan genetik mesafe bilgileri SplitsTree 4.0 (Huson ve Bryant, 2006) yazılımına yüklenerek filogenetik analizler yapılmıştır. Böylece, proje

materyalini oluşturan 12 farklı lokasyona ait 12 popülasyon arasındaki filogenetik ilişkiler mtDNA COIb ve Cytb gen bölgeleri bakımından belirlenmiştir.

Popülasyonlarda evrim sürecinde meydana gelen seleksiyon, göç ve bireylerin atasal kayıtları hakkında tanımlayıcı bilgilerin elde edilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Aynı ırkın farklı popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliği incelemek ve popülasyonlar ya da ırklar arası farkı tanımlayabilmek için fiksasyon indeksleri (F istatistikleri) kullanılmaktadır. Bu indeksler Wright (1978) tarafından geliştirilmiştir. F_{ST} bir lokus açısından popülasyonları karşılaştırmada kullanılır. Alt popülasyonlardan rastgele ele alınan iki gametin ortak atadan gelme ihtimali olup, alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılığın ölçüsüdür. F_{ST} , 0 ile 1 arasında bir değer alır. Belirlenen F_{ST} değeri 1'e ne kadar yakın ise alt popülasyonlar ortak atadan oldukça uzaktır denilebilir.

Eğer F_{ST} değeri;

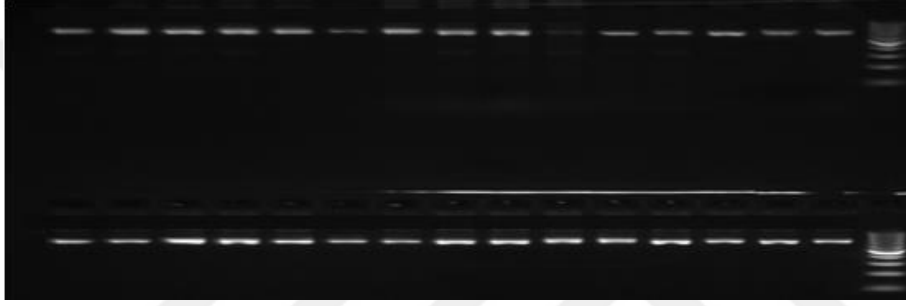
- 0 – 0,05 arasında bir değer alıyor ise küçük bir genetik farklılaşma;
- 0,05 – 0,15 arasında bir değer alıyor ise orta düzeyde farklılaşma;
- 0,15 – 0,25 arasında bir değer alıyor ise büyük bir genetik farklılaşma;
- 0,25'ten büyük değerler alıyorsa çok büyük bir genetik farklılaşmanın mevcut olduğu söylenebilir.

Kısacası, F_{ST} değeri küçük olduğu zaman popülasyonların arasındaki varyasyon da azdır. Yani iki popülasyon birbirine genetik olarak benziyor demektir (Hartl ve Clark 2007).

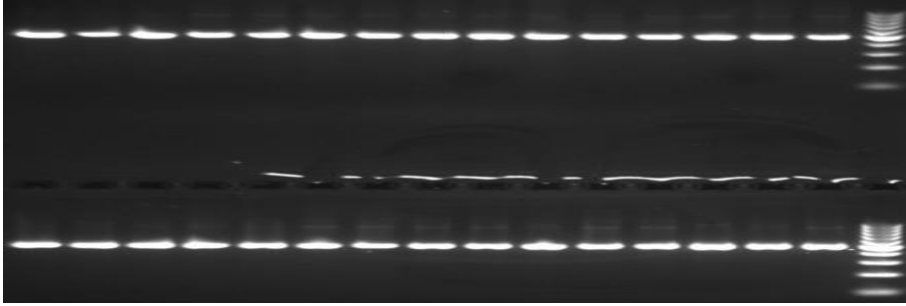
4. BULGULAR

4.1. PCR Bulguları

Proje konusu olan 3 gen bölgesine (mtDNA COIa, COIb ve Cytb) özgün primerler (Çizelge 3.4) kullanılarak yapılan PCR uygulamaları sonucunda COIa için beklenen kalite ve sayıda veriye ulaşılamamıştır. Bu sebeple proje öngörüsünde çalışılması düşünülen mtDNA COIa gen bölgesi deneme dışında tutulmuştur. Bu tip beklenmeyen olumsuzluklar göz önünde bulunulduğu için mtDNA'ya ait 3 gen bölgesi seçilmiştir. Seçilen gen bölgelerinden COIb ve Cytb projenin devamı için gerekli bilgiyi üretmiştir. PCR uygulamaları sonucunda COIb gen bölgesine ait 758 bp uzunluğunda ve Cytb gen bölgesine ait 434 bp uzunluğunda DNA fragmenti tüm bireyler için başarıyla amplifiye edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. PCR amplifikasyonu sonucunda Faselis bölgesine ait 30 bireyde amplifiye edilen COIb gen fragmentlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü



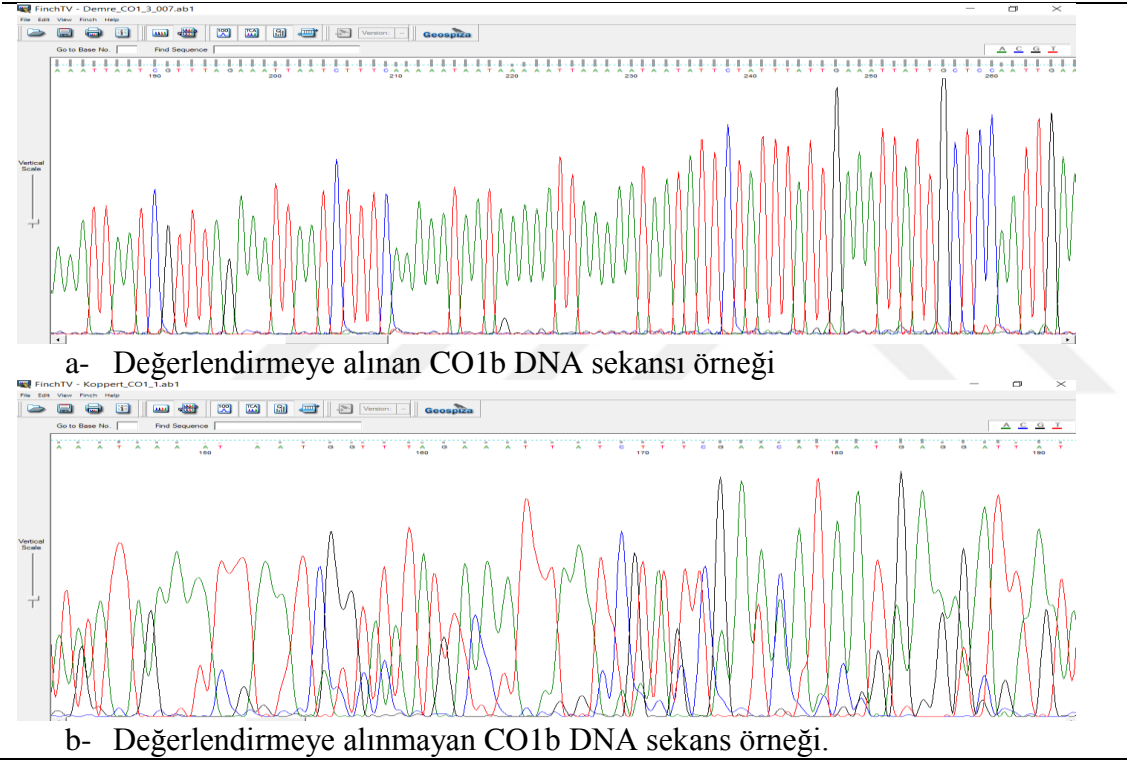
Şekil 4.2. PCR amplifikasyonu sonucunda Faselis bölgesine ait 30 bireyde amplifiye edilen Cytb gen fragmentlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

4.2. DNA Nükleotid Dizilerinin Belirlenmesine ve SNP Haplotiplerinin Tespiti

Toplamda 12 farklı kaynağa ait 12 farklı *B. terrestris* arı popülasyonundan 360 bireyin mtDNA COIb ve Cytb gen bölgelerinin PCR amplifikasyonları tamamlandıktan sonra popülasyondan en iyi PCR sonuçlarını veren 15'şer örnek ile DNA sekans analizlerine devam edilmiştir. Toplamda Cytb için 180 adet ve COIb için 180 adet DNA sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Başarıyla çalışılan COIb ve Cytb gen bölgeleriyle ilgili sonuçlar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

4.2.1. COIb bulguları

Sekans analizlerinin başarısı FinchTV yazılımında kontrol edilerek sonraki analizler için kullanılabilir sekanslara karar verilmiştir. Değerlendirilmeye alınmayacak kadar kötü olan DNA sekansları deneme dışında tutulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda tespit edilen mtDNA COIb gen bölgesine ait sekans örnekleri

Ortaya çıkartılan sekans sonuçlarının doğru gen bölgesine ait olup olmadığı NCBI (The National Center for Biotechnology Information) verilerinden yararlanılarak BLAST yazılımı ile kontrol edilmiştir (Çizelge 4.1).

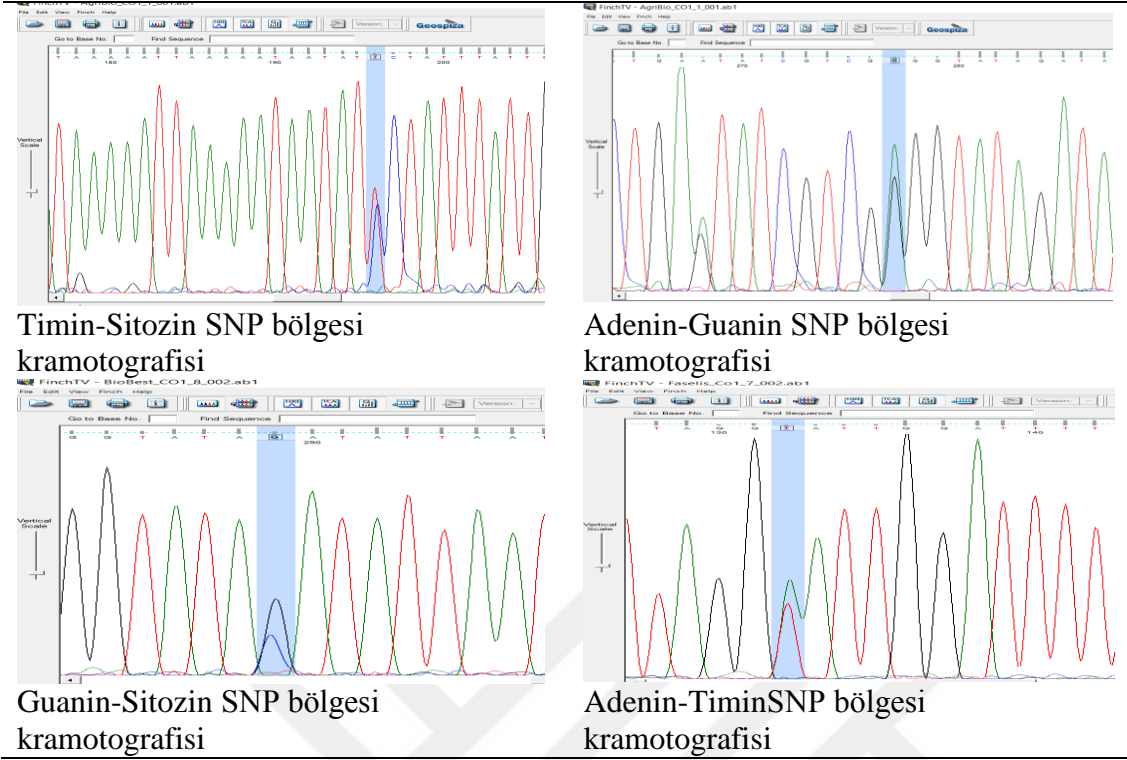
BLAST analizi sonucunda sekans analizlerinden elde edilen DNA nükleotid dizisinin %97 oranında *B. terrestris* arısı mtDNA COI gen bölgesine ait olduğu ve birçok çalışmayla aynı sonuçları verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. mtDNA COIb gen bölgesinin DNA nükleotid dizisi ile yapılan BLAST analiz sonucu

Query	14	AAATTATTATAAAATGAAAGAGGTAAAAAGAAACCTTTGGAAATTTAAGAATAATTTAT	73
Sbjct	51	AAATTATTAT-AAATGAAAGAGGTAAAAAGAAACCTTTGGAAATTTAAGAATAATTTAT	109
Query	74	GGTATATTAGGTATTGGATTTTTAGGTTTTATTGTTTGAGCTCCTCATATATTTACTGTA	133
Sbjct	110	GCTATATTAGGAATTGGATTTTTAGGTTTTATTGTTTGAGCTCATCATATATTTACTGTA	169
Query	134	GGATTAGACGTTGATACACGAGCATATTTACATCAGCTACAATAATTATTGCCGTACCT	193
Sbjct	170	GGATTAGACGTTGATACACGAGCATATTTACATCAGCTACAATAATTATTGCCGTACCT	229
Query	194	ACAGGAATTAAGTTTTTAGATGATTAGCAACATATCATGGTTCAAAAATAAATTTCAAT	253
Sbjct	230	ACAGGAATTAAGTTTTTAGATGATTAGCAACATATCATGGTTCAAAAATAAATTTCAAT	289
Query	254	ATTACAATTATTTGATCAATTGGATTTATTTTAATATTTACAATTGGAGGATTAAGTGGT	313
Sbjct	290	ATTACAATTATTTGATCAATTGGATTTATTTTAATATTTACAATTGGAGGATTAAGTGGT	349
Query	314	GTAATACTTTCTAATTCATCAATTGATATTATTTACATGATACATATTATGTAGTAGGT	373
Sbjct	350	GTAATACTTTCTAATTCATCAATTGATATTATTTACATGATACATATTATGTAGTAGGT	409
Query	374	CATTTTCACTATGTTTTATCAATAGGAGCAGTTTTTCGCTATTATTACAAGTATTATTCAT	433
Sbjct	410	CATTTTCACTATGTTTTATCAATAGGAGCAGTTTTTCGCTATTATTACAAGTATTATTCAT	469
Query	434	TGATTTCCAATAATTACAGGTTTAAACAATAAATCAAAAATGATTAATAAATTCATTTTATT	493
Sbjct	470	TGATTTCCAATAATTACAGGTTTAAACAATAAATCAAAAATGAATAAATAAATTCATTTTATT	529
Query	494	ATAATATTTATTGGTGTAATATAACATCTTTCCTCAACATTTTTTAGGATTAATATCT	553
Sbjct	530	ATAATATTTATTGGTGTAATATAACATCTTTCCTCAACATTTTTTAGGATTAATATCT	589
Query	554	ATACCTCGACGATATTCAGATTACCCAGATTCATATTATTGTTGAAATTTAATTCTCTTC	613
Sbjct	590	ATACCTCGACGATAYTCAGATTAYCCAGATTCATATTATTGTTGAAATTTAA-TCTCTTC	648
Query	614	AATTGGAGCAATAAATTTCAATAAATAGGAAatattatnttttaaatnttttattatntttga	673
Sbjct	649	AATTGGAGCAATAAATTTCAATAAATA-GAATATTATTTTT--AATTTTTATTATTTTTGA	705
Query	674a	-gattttaatttCCTAAACGATCA--TTTATTAAATCCCATCAATCATCACTTGAATGG	730
Sbjct	706	AAGATT-AAATTC-TAAACGATTAATTTATTAAATCCCATCAATCATCACTTGAATG-	762
Query	731	ATTAAAATAAATTA	744
Sbjct	763	ATTAAA-TAA-TTA	774

Karşılaştırılan çalışmanın GenBank Kayıt numarası (Sequence ID: [JQ820651.1](#) Uzunluk: 849. Benzerlik: 713/734 (%97).

Denemede kullanılan primerlerin doğru sonuçları verdiğini kesinleştirdikten sonra değerlendirilmeye alınan sekans görüntüleri görsel olarak incelenmiş ve SNP bölgeler belirlenmiştir (Şekil 4.5). Daha sonra populasyonları temsilen seçilen bireysel DNA sekansları fasta formatında alt alta sıralanarak MEGA6 yazılımına yüklenmiştir. Burada DNA dizi hizalaması (alignment) yapılarak tüm sekansların eşit uzunlukta ve aynı nükleotid hizasında olması sağlanmıştır. Tespit edilen SNP bölgelerin doğruluğu bir kez daha gözden geçirilmiştir.



Şekil 4.4. DNA sekanslarında tespit edilen SNP lokus örnekleri

MEGA6 yazılımında alignment yapılan DNA dizileri “meg” formatında kaydedilmiş ve toplam 296 sekans DnaSP5 yazılımında açılarak haplotip analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Haplotip analizleri sonucunda 40 haplotipin varlığı tespit edilmiştir. 134 bireyin haplotip-1 (h1) sekansına sahip olduğu ve bu sekansın en yaygın haplotip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. mtDNA COIb bakımından tespit edilen SNP haplotipler.

No	Frekans	Sekans
h1	134	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATATTGCTTTATTA
h2	1	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATTTTGCTTTATTA
h3	2	CAAATCGAGCTTATATTTCTTTTCAGTACCTAATGTCATACTA
h4	1	TTATACTCGCTTATATTTTGATTTTCACATATTGCTTTATTA
h5	2	TTCTACTCGCTTATATTTTGATTTTCACATATTGCTTTATTA
h6	24	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTACATATTGCTTTATTA
h7	2	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACAAATTGCTTTATTA
h8	1	TTATACTTGCTTATTTTTCATTTTACATATTGCTCTATTA
h9	1	TTACTACTCGCATATAATTTTCATTTTCACATATTGCTCTATTA
h10	1	TTACTACTCGCTTATTATTCCATTTTACATATTGCTCTATTA
h11	1	TTATACTTCGCATAATTTTCATTTTCACATATTGCTCTATTA
h12	2	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATATTGCTCTATTA
h13	1	TTATACTCGCTTATATTTTCCATTTTCACATATTGCTCTATTA
h14	1	TTACTACTTGCTTATTATTTCATTTTACATATTGCTCTATTA
h15	1	TTACTTTTGCATATTATTCCATTTTACATATCGCTCTATTA
h16	1	TTACTACTCGCTTATATTTTCCATTTTACATATCGCTCTATTA
h17	3	TTACTACTTGCATATTATTCCATTTTACATATTGCTCTATTA
h18	1	TTATACTCGCATATTATTCCATTTTACATATTGCTCTATTA
h19	5	TTATACTCGCTTATATTTTCCATTTTCACATATTGCTTTATTA
h20	6	TTACTACTTGCTTATTATTCCATTTTACATATTGCTTTATTA
h21	1	TTACTACTCGCTTATAATTCCATTTTACATATTGCTTTATTA
h22	1	TTACTACTCGCTTATATTTTCCATTTTCACATATTGCTTCATTA
h23	1	TTATACTCGCTTATTATTTCATTTTACATATTGCTTCATTA
h24	1	TTACTACTCGCTTATAATTCCATTTTCACATATTGCTTTATTA
h25	1	TTATACTTGCTTATTATTCCATTTTACATATCGCTTCATTA
h26	1	TTACTACTCGCATATTTTTCATTTTCACATATCGCTTCATTA
h27	1	TTACTACTTGCTTATAATTTTCATTTTACATATTGCTTTATTA
h28	13	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTAAAAATTGCTTTATTA
h29	1	TTATACTCGCTTATATTTCTCACTTTACAAATTGCCTTACAA
h30	3	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTACAAATTGCTTTATTC
h31	1	TTATACTCGCTTATATGTTTCATTTTCACATATTGCTTTATTA
h32	16	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTCTCATATTGCTTTATTA
h33	12	TTATACTCGCTTATATTTTCCATTTCTCATATTGCTTTGTTA
h34	15	TTATACTCGCTTATATTTTCCATTTTACAAATTACTTTGTTA
h35	26	TTATACTCGCTTATATTTTCCATTTTACATATTGCTTTATTA
h36	4	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTCAAATATTGCTTTATTA
h37	1	TTATACTCGCTTATATTTCTTATTTTACATATTGTCATATTA
h38	1	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATATTACTTTATTA
h39	4	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATATTGCTTCATTA
h40	1	TTATACTCGCTTATATTTTCATTTTCACATATCGCTTCATTA

Toplamda 17 haplotip sekansın birden çok bireyde olduğu 23 haplotipin ise sadece birer bireyde olduğu bulunmuştur. Haplotip analizlerinden sonra Arlequin yazılımında varyasyon analizleri (AMOVA) yapılmış ve genetik farklılaşma değerleri (FST) hesaplanmıştır. AMOVA analizleri sonucunda toplam varyasyonun %28.54'ünün

populasyonlar arasında ve %71.46'sının populasyonlar içinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Populasyonlara ait FST değer ortalaması 0.285, en yüksek FST derğeri Aksu yöresinde 0.309 ve en düşük FST derğeri Firma-1 arılarında 0.243 hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). FST derğeri üzerinden 12 populasyonun mtDNA COIb gen bölgesi bakımından genetik benzerlik ve farklılık derğeri hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.3. mtDNA COIb gen bölgesinin AMOVA analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi (df)	Kareler toplamı	Varyasyon bileşenleri	Varyasyon oranı
Populasyonlar Arası	11	117,139	0,394	28,54
Populasyonlar İçi	284	280,128	0,986	71,46
Toplam	295	397,267	1,380	

Çizelge 4.4. mtDNA COIb gen bölgesi bakımından çalışılan populasyonların FST derğeri

No	Populasyon	FST
1	Firma-1	0,243
2	Firma-2	0,307
3	Firma-3	0,252
4	Firma-4	0,283
5	Firma-5	0,285
6	Aksu	0,309
7	Demre	0,292
8	Kumluca	0,299
9	Bayatbademler	0,299
10	Faselis	0,306
11	Geyikbayırı	0,284
12	Termessos	0,276
	Ortalama	0,285

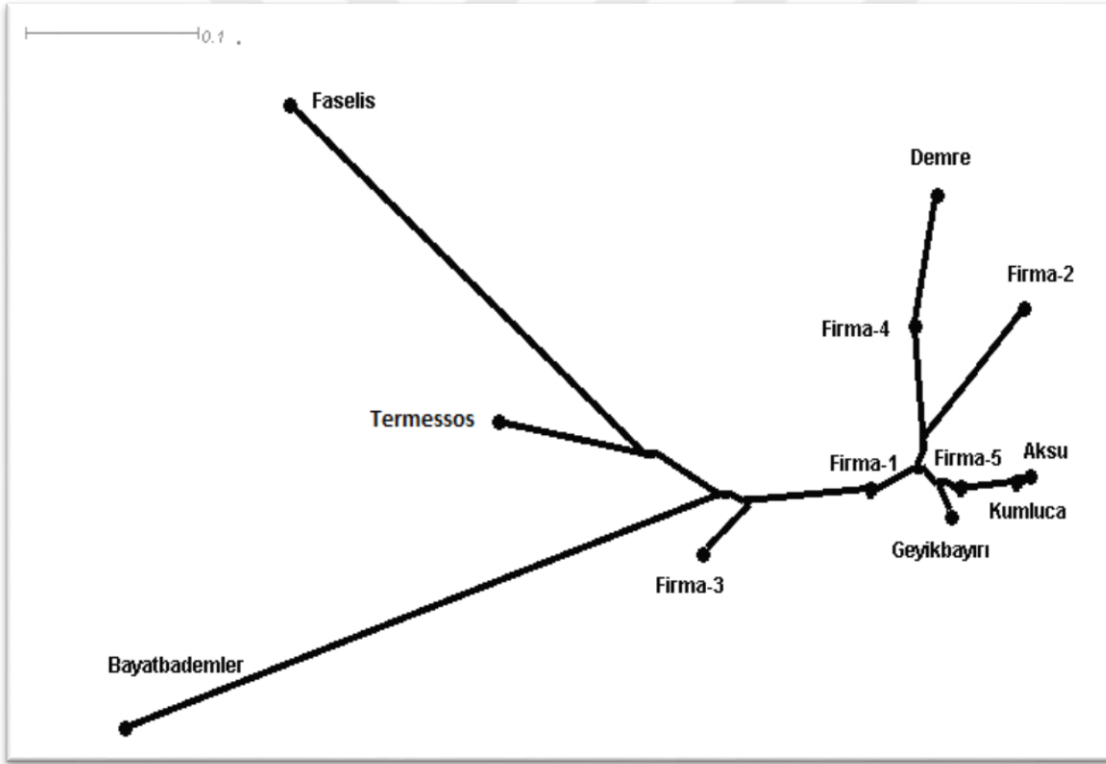
Çizelge 4.5. mtDNA COIb gen bölgesi bakımından çalışılan *B. terrestris* popülasyonlarının genetik uzaklıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,00000											
2	0,06759	0,00000										
3	0,10704	0,26803	0,00000									
4	0,03941	0,13544	0,21037	0,00000								
5	0,00664	0,05807	0,12854	0,04189	0,00000							
6	0,00850	0,34251	0,21043	0,10730	0,00164*	0,00000						
7	0,12290	0,22394	0,29327	0,05171	0,14407	0,22527	0,00000					
8	0,04263	0,12510	0,21285	0,11986	0,01274	0,00424	0,21946	0,00000				
9	0,33848	0,67452	0,42730	0,53637	0,47643	0,61315	0,58851	0,56855	0,00000			
10	0,28659	0,58957	0,27275	0,49725	0,40332	0,70118	0,53083	0,56860	0,71900#	0,00000		
11	0,03491	0,16544	0,09976	0,11569	0,01040	0,05604	0,16953	0,06045	0,47079	0,42749	0,00000	
12	0,22380	0,37292	0,27953	0,23009	0,24051	0,34251	0,29727	0,35712	0,48128	0,36782	0,29654	0,00000

1: Firma-1, 2:Firma-2, 3: Firma-3, 4:Firma-4, 5: Firma-5, 6:Aksu, 7:Demre, 8:Kumluca, 9: Bayatbademler, 10:Faselis, 11:Geyikbayırı, 12: Termessos

* En düşük genetik mesafe, # En yüksek genetik mesafe

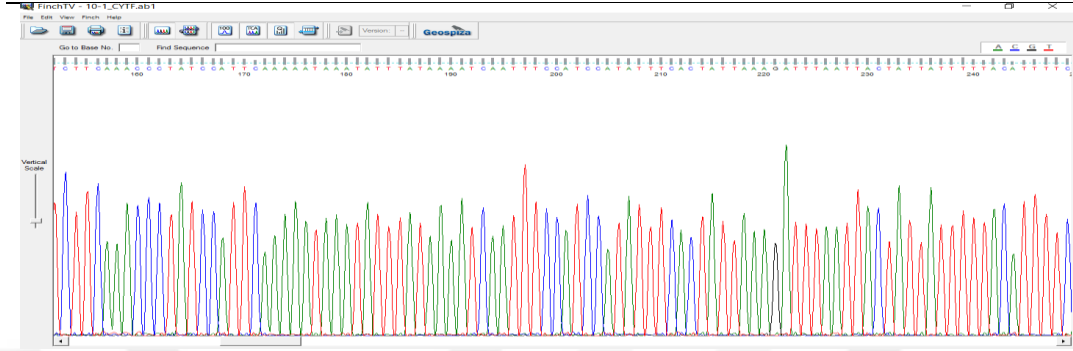
mtDNA COIb bakımından yapılan DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda belirlenen SNP haplotipler üzerinden proje materyalini oluşturan 12 farklı bölgeye ait 12 farklı populasyon arasındaki filogenetik ilişkiler Neighbour Joining (Saitou ve Nei, 1987) metodu ile görselleştirilmiştir. Bu ilişkiler görsel olarak Şekil 4.6’te verilmiştir. Ortaya çıkan dendrogram, hiçbir ticari arının ulaşamadığı doğal *B. terrestris* arı populasyonlarının ticari arı üreten firma kolonilerinden ve yoğun ticari kolonilerin kullanıldığı sera bölgelerindeki populasyonlardan farklılık gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Dendrogram incelendiğinde Faselis, Termessos ve Bayatbademlere ait populasyonların diğer popülasyonlara mesafeli olduğu ve tek bir dal üzerinde teşkil ettiği görülmektedir. Ticari firmalara ait populasyonlar ve yoğun seracılık faaliyetlerinin yürütüldüğü bölgelerdeki arılar birbirlerine daha yakın ve aynı dallar üzerinde yer almıştır. Yayla seracılığının son birkaç yıldır yapılmaya başlandığı Geyikbayırı-Sinan Değirmeni mevkii arı populasyonu doğal populasyonlardan uzak, ticari firma ve sera bölgelerindeki arı populasyonlarına yakın mesafede tespit edilmiştir. Bu görüntü, yayla seracılığı yapan işletmelerinde de artık ticari üretilmiş *B. terrestris* arı kolonileri kullandığını düşündürmektedir.



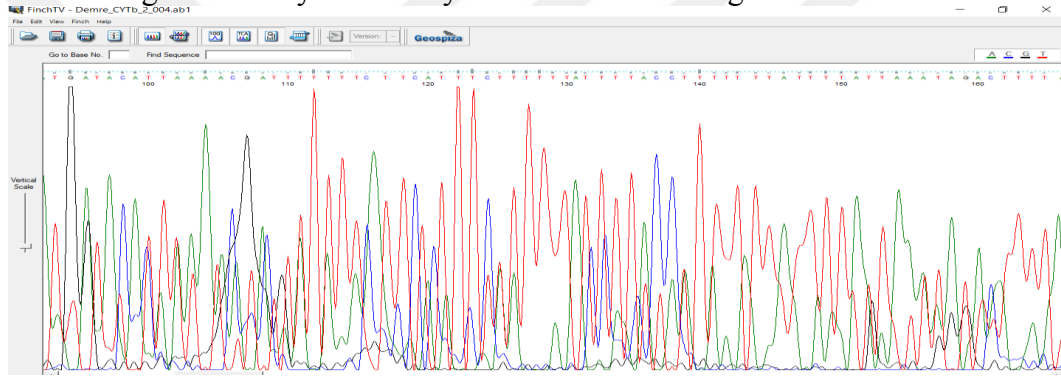
Şekil 4.5. mtDNA COIb gen bölgesinde tespit edilen SNP haplotiplere göre populasyonlar arasındaki genetik mesafeleri gösteren dendrogram

4.2.2. Cytb bulguları

Sekans analizlerinin başarısı FinchTV yazılımında kontrol edilerek sonraki analizler için kullanılabilir sekanslara karar verilmiştir. Değerlendirilmeye alınamayacak kadar kötü olan DNA sekansları deneme dışında tutulmuştur (Şekil 4.7).



a- Değerlendirmeye alınan Cytb DNA sekansı örneği



b- Değerlendirmeye alınmayan Cytb DNA sekansı örneği.

Şekil 4.6. DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda tespit edilen mtDNA Cytb gen bölgesine ait sekans örnekleri

Ortaya çıkartılan sekans sonuçlarının doğru gen bölgesine ait olup olmadığı NCBI (The National Center for Biotechnology Information) verilerinden yararlanılarak BLAST yazılımı ile kontrol edilmiştir (Çizelge 4.6) BLAST analizi sonucunda sekans analizlerinde elde edilen DNA nükleotid dizisinin %99 oranında *B. terrestris* arısı mtDNA Cytb gen bölgesine ait olduğu ve birçok çalışmayla yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

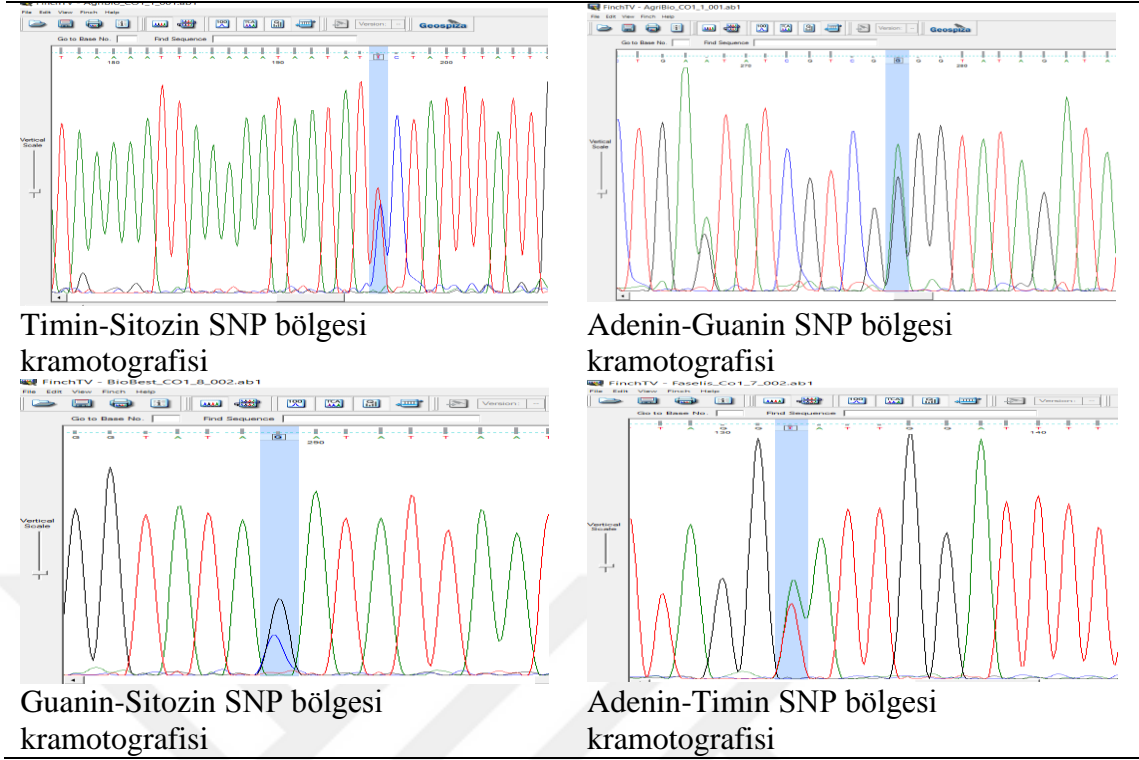
Denemede kullanılan primerlerin doğru sonuçları verdiğini kesinleştirdikten sonra değerlendirilmeye alınan sekans görüntüleri görsel olarak incelenmiş ve SNP bölgeler belirlenmiştir (Şekil 4.8). Daha sonra populasyonları temsilen seçilen bireysel DNA sekansları fasta formatında alt alta sıralanarak MEGA6 yazılımına yüklenmiştir. Burada DNA dizi hizalaması (alignment) yapılarak tüm sekansların eşit uzunlukta ve aynı nükleotid hizasında olması sağlanmıştır. Tespit edilen SNP bölgelerin doğruluğu bir kez daha gözden geçirilmiştir.

Çizelge 4.6. mtDNA Cytb gen bölgesinin DNA nükleotid dizisi ile yapılan BLAST analiz sonucu

Query	1	AGTAATCACAAATTTAATTCAGCAATTCATATATGGTCAATTTACTGTTGAATGAAT	60
Sbjct	27	AGTAATCACAAATTTAATTCAGCAATTCATATATGGTCAATTTACTGTTGAATGAAT	86
Query	61	TTGAGGAGGATTTTCAATCAATAATGATACATTAATCGattttattcatttcattttat	120
Sbjct	87	TTGAGGAGGATTTTCAATCAATAATGATACATTAATCGATTTTATTCATTTCAATTTAT	146
Query	121	tttaccattttattattttattaatagattttatacatTTtaataattttacacattacaGG	180
Sbjct	147	TTTACCATTATTATTTTATTAATAGTATTATACATTTAATAATTTTACACATTACAGG	206
Query	181	TTCTTCAAACCTATCCATTCAAAATAAATATTATAAAAATCAATTTCCATCCatattt	240
Sbjct	207	TTCTTCAAACCTATCCATTCAAAATAAATATTATAAAAATCAATTTCCATCCATATT	266
Query	241	cactattaagattttaactattatttttacattttcaatatttatattaattaattt	300
Sbjct	267	CACTATTAAGATTTAATCACTATTATTTTACATTTTCAATATTATATTAATTAATTT	326
Query	301	acaattaccttttatattaGGAGATCCTGATAATTTAAAATAGCAAATCCTATAATTAC	360
Sbjct	327	ACAATTACCTTTTATATTAGGAGATCCTGATAATTTAAAATAGCAAATCCTATAATTAC	386
Query	361	ACCAATTCATATTAACCTGAATGATACTTCTTATTGTCATATTCAATTTTACGAACAAT	420
Sbjct	387	ACCAATTCATATTAACCTGAATGATACTTCTTATTGTCATATTCAATTTTACGAACAAT	446
Query	421	TCCTAATAAATTA 433	
Sbjct	447	TCCTAATAAATTA 459	

Karşılaştırılan çalışmanın GenBank Kayıt numarası (Sequence ID): JQ820683.1
Uzunluk: 459. Benzerlik: 432/433 (%99)

MEGA6 yazılımında alignment yapılan DNA dizileri “meg” formatında kaydedilmiş ve 276 sekans DnaSP5 yazılımında açılarak haplotip analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.7). Haplotip analizleri sonucunda 29 haplotipin varlığı belirlenmiştir. Tespit edilen haplotiplerin 169 adedi haplotip-1 sekansına sahip olduğu ve bu sekansın en fazla bireyde görülen haplotip olduğu görülmüştür. Toplamda 15 haplotip sekansın birden çok bireyde olduğu 14 haplotipin ise sadece birer bireyde olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.7. DNA sekanslarında tespit edilen SNP lokus örnekleri

Haplotip analizlerinden sonra Arlequin yazılımında varyasyon analizleri (AMOVA) yapılmış ve F_{ST} değerleri hesaplanmıştır. AMOVA analizleri sonucunda toplam varyasyonun %24.52'sinin populasyonlar arasında ve %75.48'inin populasyonlar içinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Populasyonlara ait F_{ST} değer ortalaması 0.245, en yüksek F_{ST} derğeri Firma-5 populasyonunda 0.278 ve en düşük F_{ST} değeri Bayatbademler yöresinde arılarında 0.227 olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9). Proje materyalini oluşturan 12 populasyonun mtDNA Cytb gen bölgesi bakımından genetik uzaklık değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.7. mtDNA Cytb bakımından tespit edilen SNP haplotipler

Haplotip	Frekans	Sekans
h1	169	ACAATGATATATATACAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h2	8	CCCCTCCTCTATATATAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h3	1	ACAATGATATATATATAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h4	1	CCCCTCCTCTCTCTCCCCCACCCTCATCCCCATTTTTGC
h5	7	CCCCTCCTCTCTCTCCCCCACCATCATCCCCCCTTTTTGC
h6	1	CCCCTCCTCTCTCTCCCCCACCCTCATCCCCCCTTACGC
h7	13	CCCCTCCTCTCTCTCCCCCACCCTCATAAACATTTTTGC
h8	2	CCCCTCCTCTCTCTCCCCCACCCTCATCAACATTTTTGC
h9	1	ACAATGATATACATATAATAATTCATAACAAACATTTACGC
h10	11	CCCCTCCTCTCCCTCTCACCATTTATAACAAACATTTACGC
h11	3	CCCCTCCTCTCTCTCTCACAATTTATAACAAACATTTTTGC
h12	3	ATCACGACACACACATAATACTTTACACCAAACATCCTTGC
h13	1	ACAATGATATATATACAATAACTCATAATAAACATTTTTGA
h14	1	ATAATCCTCTCTCTCTCCCCATCTCTCACCCTATTTTTCAT
h15	2	ATAATGATATATATATACCAATTTATAACAAATATTTTTCAT
h16	1	ATAATGATATATATATACCAATTTATAACAAATATTTTTCAC
h17	10	ATAATCCTCTCTCTCTCCCCATCCCTCATCCCCATTTTTCAT
h18	1	ACAATCCTCTCTCTCTCCCCATCCCTCACCCTCATTTTTCAT
h19	1	ACAATCCTCTCTCTCTCCCCATCCCTCACCCTCATTTTTCAC
h20	12	ATAATGATATCTCTCTACCCATTTATAACAAATATCCACAT
h21	1	ATAATGATATCTCTCTAACCATTTATAACAAATATCCACAT
h22	14	ATAATCCTCTCTCTCTACCCATTTATCACAAATATCCACAT
h23	2	ATAATGATATATATACAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h24	1	CCAATGATATATATACAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h25	1	CCCATCCTCTCTCTCCCCCACCCTCATAAACATTTTTGC
h26	4	ATAATGATATCTCTATAACAATTTATAACAAATATCCACAT
h27	1	ACAATGATATATATACAACAACTCATAATAAACATTTTTGC
h28	2	ACAATGATATACATATAATAACTCATAATAAACATTTTTGC
h29	1	ACAATGATATACATACAATAACTCATAATAAACATTTTTGC

Çizelge 4.8. mtDNA Cytb gen bölgesinin AMOVA analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi (df)	Kareler toplamı	Varyasyon bileşenleri	Varyasyon oranı
Populasyonlar Arası	11	354,436	1,243	24,52
Populasyonlar İçi	264	1009,839	3,825	75,48
Toplam	275	1364,275	5,068	

Çizelge 4.9. mtDNA Cytb gen bölgesi bakımından çalışılan populasyonların FST değerleri

No	Populasyon	FST
1	Firma-1	0,264
2	Firma-2	0,236
3	Firma-3	0,247
4	Firma-4	0,243
5	Firma-5	0,278
6	Aksu	0,232
7	Demre	0,277
8	Kumluca	0,276
9	Bayatbademler	0,227
10	Faselis	0,232
11	Geyikbayırı	0,229
12	Termessos	0,255
	Ortalama	0,245

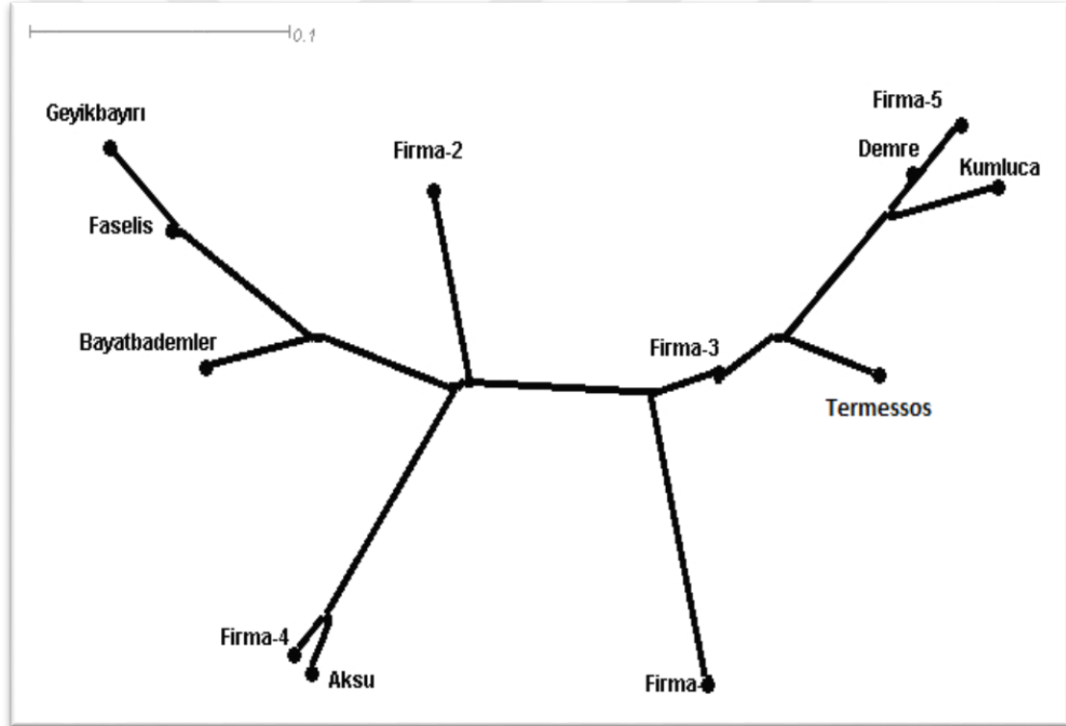
Çizelge 4.10. mtDNA Cytb gen bölgesi bakımından çalışılan *B. terrestris* popülasyonlarının genetik uzaklıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,00000											
2	0,22522	0,00000										
3	0,08864	0,13621	0,00000									
4	0,23696	0,16967	0,20856	0,00000								
5	0,24793	0,31896	0,10038	0,32597	0,00000							
6	0,26063	0,17547	0,22624	0,03631	0,32904	0,00000						
7	0,22053	0,29384	0,07976	0,30223	0,02284*	0,30328	0,00000					
8	0,23411	0,31560	0,09721	0,34061	0,08162	0,34572	0,05633	0,00000				
9	0,30889	0,19466	0,22330	0,18433	0,32004	0,14894	0,29327	0,32986	0,00000			
10	0,36063	0,18718	0,21310	0,29084	0,33863	0,28073	0,31249	0,34722	0,12466	0,00000		
11	0,38091	0,20121	0,26609	0,28750	0,40167	0,27705	0,37454	0,41219#	0,13042	0,03889	0,00000	
12	0,21498	0,20441	0,04812	0,28427	0,13882	0,28992	0,10951	0,14363	0,20958	0,14095	0,22676	0,00000

1: Firma-1, 2:Firma-2, 3: Firma-3, 4:Firma-4, 5: Firma-5, 6:Aksu, 7:Demre, 8:Kumluca, 9: Bayatbademler, 10:Faselis, 11:Geyikbayırı, 12: Termessos

* En düşük genetik mesafe, # En yüksek genetik mesafe

MtDNA Cytb gen bölgesi bakımından yapılan DNA nükleotid dizi analizleri sonucunda belirlenen SNP haplotipler üzerinden proje materyalini oluşturan 12 farklı bölgeye ait 12 farklı populasyon arasındaki filogenetik ilişkiler Neighbour Joining (Saitou and Nei, 1987) metodu ile belirlenmiştir. Bu ilişkiler görselleştirilmiş olarak Şekil 4.9'te verilmiştir. Dendrogramda görüldüğü gibi, doğal *B. terrestris* habitatlarından toplanan arı örnekleri ile ticari arı üreten firma kolonilerinden ve yoğun ticari kolonilerinin kullanıldığı sera bölgelerindeki populasyonlar açıkça kümelenmiştir. Dendrogram incelendiğinde Faselis, Bayatbademler ve Geyikbayırı populasyonlarının aynı dal üzerinde şekillendiği ve diğer populasyonlara mesafeli olduğu görülmektedir. Ticari firmalara ait populasyonlar ve yoğun seracılık faaliyetlerinin yürütüldüğü bölgelerdeki arılar birbirlerine daha yakın ve aynı dallar üzerinde bulunmuştur. Yayla seracılığının son birkaç yıldır yapılmaya başlandığı Geyikbayırı-Sinan Değirmeni mevki arı populasyonu Cytb gen bölgesi sonuçlarına göre doğal populasyonlara yakın ama ticari firma ve sera bölgelerindeki arı populasyonlarına uzak mesafede tespit edilmiştir. Bu görüntü, yayla seracılığı yapılan Geyikbayırı mevkiinde hala doğal populasyonların mevcut olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 4.8. mtDNA Cytb gen bölgesinde tespit edilen SNP haplotiplere göre populasyonlar arasındaki genetik mesafeleri gösteren dendrogram

5. TARTIŞMA

Tamamlanan bu çalışma kapsamında, Antalya yöresinde seracılık faaliyetlerinin yoğun yapıldığı ve bu faaliyetlerde ticari *B. terrestris* kolonilerinin en yoğun kullanıldığı 3 yerde (Aksu, Demre, Kumluca) bulunan seraların yakın çevresinden, ticari üretim yapan 5 firmadan, dışarıdan koloni girişinin olmadığı doğal alanlardan (Bayatbademler, Faselis, Termessos) ve yayla seracılığının birkaç yıl önce yapılmaya başlandığı Geyikbayırı bölgesinden 30'ar işçi arı örneği toplanmıştır. Tüm arılardan bireysel total DNA ekstraksiyonu yapılmış ve mtDNA üzerinde bulunan üç gen bölgesine (COIa, COIb ve Cytb) özgün primerler kullanılarak PCR'da çoğaltılmıştır. Kullanılan primerlerden COIa değerlendirilebilir sonuçlar vermediği için sonraki analizlerde kullanılmamıştır. Tüm populasyonlar için PCR'da başarıyla amplifikasyonu yapılan mtDNA COIb ve Cytb gen bölgelerini temsilen her populasyondan en iyi sonucu veren 15'er PCR ürününün DNA nükleotid dizi analizi yapılmıştır. Proje materyalini oluşturan 12 populasyonu temsilen COIb ve Cytb gen bölgeleri için 180'er DNA sekansı yapılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda, COIb ve Cytb gen bölgelerinde tespit edilen tek nükleotid polimorfizimleri (SNP) kullanılarak haplotipler oluşturulmuş ve bu haplotipler kullanılarak 12 adet *B. terrestris* populasyonu arasında genetik ilişkiler ortaya çıkartılmıştır.

MtDNA COIb gen bölgesi için belirlenen DNA nükleotid dizisinde bulunan SNP'lere göre 40 haplotip tespit edilmiştir. Haplotip verilerine göre yapılan varyans analizleri COIb için tespit edilen toplam varyasyonun %28.54'ünün populasyonlar arasında ve %71.46'sının populasyonlar içinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu durum, proje materyali olan 12 farklı *B. terrestris* populasyonun COIb bakımından birbirlerine oldukça benzer olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, populasyonların ortak atadan gelme ihtimalinin yüksek olduğu söylenebilir. Populasyon içi varyasyonun yüksek olması örnek alınan lokasyonlarda çok miktarda kraliçenin olduğunu ve populasyonlar içi benzemeyenler çiftleşme oranının yüksek olduğunu düşündürmüştür. Ortalama FST değeri 0.285 olarak hesaplanmış ve en yüksek FST değeri Aksu yöresinde 0.309 ve en düşük FST değeri ise Firma-1 kolonilerinde 0.243 hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Belirlenen FST değeri 1'e ne kadar yakın ise alt populasyonlar ortak atadan oldukça uzaktır denilebilir (Hartl ve Clark 2007). Bu durumda COIb gen bölgesi verilerine ne göre hesaplanan FST değerleri dikkate alındığında, proje materyalini oluşturan 12 populasyonun ortak atadan gelme olasılığının yüksek olduğu söylenebilir. FST değerleri üzerinden hesaplanan populasyonlar arası genetik mesafe değerleri (Çizelge 4.5) incelendiğinde en uzak mesafe 0.719 Bayatbademler ile Faselis populasyonu arasında ve en yakın mesafe 0.00164 Firma-5 ile Aksu populasyonları arasında bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında firmalar ile sera bölgelerindeki populasyonlar arası genetik benzerlik daha yüksek bulunurken doğal populasyonlar ile diğerleri arasındaki benzerlikler daha düşük olarak hesaplanmıştır. Yayla seracılığının yeni yeni başladığı Geyikbayırı-Sinandegirmeni yöresindeki populasyonun firmalara yakın ama doğal populasyonlara daha uzak genetik benzerlik göstermesi, burada artık ticari olarak üretilmiş kolonilerin kullanılmaya başladığını göstermektedir. Faselis ve Bayatbademler'de bulunan populasyonların diğer populasyonlara göre birbirlerinden ve

diğerlerinden daha uzak genetik mesafede olması bu populasyonların doğallığını koruduğu ve dışarıdan gen akışının olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Filogenetik ilişkileri gösteren dendrogram (Şekil 4.6) incelendiğinde, Doğal populasyonlar ile ticari firmalar ve sera bölgelerindeki populasyonların çok net bir şekilde farklı dallarda kümelendiği görülmektedir. mtDNA COIb gen bölgesi üzerinde tespit edilen SNP haplotipler bakımından üretilen tüm bu sonuçlar, seracılık faaliyetlerinde ticari üretilmiş kolonilerin kullanıldığı yörelerde (Aksu, Demre, Kumluca) polinasyon amacıyla sera içerisine bırakılan kolonilerden doğaya geçişlerin olduğu ve yörede bulunan doğal bireyler ile ticari üretilmiş bireyler arasında çiftleşmelerin meydana geldiği söylenebilir.

Türkiye bombus populasyonlarının DNA seviyesinde tanımlanmasına yönelik olarak yapılan bir araştırmada (Gürel ve Basım 2003), AFLP yönteminden yararlanılarak Batı Akdeniz ve Ege bölgesindeki yerel bombus türlerinin tanımlanması ve ithal edilen ticari bombus arıları ile yerel arılar arasındaki olası melezlemelerin saptanması hedeflenmiştir. Projede, 25 farklı AFLP primeri ve poliakrilamid jel (PAGE) elektroforez sisteminden yararlanılarak genotiplerin belirlenmesi ve populasyonların heterozigotluk seviyelerinin tespit edilmesine çalışılmıştır. AFLP yöntemine göre çalışılan primerler bakımından populasyonlar içinde ve arasında yeterli seviyede polimorfizm tespit edilememiştir. Ortaya çıkan populasyonlar arası düşük polimorfizm ve dolayısıyla yüksek benzerlik sonuçları, bu tez çalışmasında tespit edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada ise yerli ve ticari *B. terrestris* populasyonları arasındaki genetik varyasyon 5 mikrosatellit markır kullanılarak belirlenmiştir (Meydan vd 2016). Burada, 2 adet Türkiye doğal florasından ve 2 adet ticari firma populasyonundan alınan örnekler üzerinden yapılan analizler sonucunda populasyonlar içi genetik varyasyonun populasyonlar arası genetik varyasyondan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bildirilen bu sonuçlar ile bu tez çalışmasının sonuçları arasında yüksek benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Estoup vd (1996) ana kara ve ada arasında *B. terrestris* arılarında mikrosatellite lokuslar ve mitokondriyal COII geninin kısmi sekansını çalışmışlardır. Bu iki grup arı populasyonlarının önemli derecede birbirlerinden ayrıldıklarını bulmuşlardır. Kıta populasyonları arasında önemli sayılabilecek bir fark yokken ada populasyonlarının kıta populasyonlarından çok farklı olduğunu göstermişlerdir. *B. terrestris* mitokondriyal DNA (COII) geni düşük nükleotid farklılığı göstermiş ve sadece bir SNP bakımından arı populasyonları arasında fark olduğu bildirilmiştir. Yoon vd (2003) Kore yarımadasında bulunan yedi bölgeden 44 bireyin mitokondriyal COI genini nükleotid belirlemişler ve dört haplotip arasında bir dominant haplotip olduğunu bulmuşlardır. Çalıştıkları bölge içerisinde düşük sekans farklılığının olduğunu göstermişlerdir. Kore'de *Bombus ardens* populasyonlarında farklı bir çalışma yapılmış ve 15 farklı bölgeyi temsil eden bu arının mitokondriyal COI genindeki dizi farklılıkları incelenmiş ve sonuç olarak biyocoğrafik bariyerlere maruz kalmadığı ve genetik alt yapılarının homojen olduğu tespit edilmiştir (Kim vd 2009). Pedersen (1996) bombus arıları üzerinde yaptığı çalışmada, mitokondriyal COI genine ait 532 bç uzunluğundaki fragmentin nükleotid dizisini belirleyerek 11 bombus türünün filogenetik ilişkisini

ortaya çıkartmıştır. Tokoro vd (2010) yerel Japon bombus arılarında genetik bozulma riskini ve dışarıdan gen akışını belirlemek için Japonya, Çin ve Kore'den topladıkları örneklerin mitokondriyal COI (1048 bp) geni üzerinde çalışmışlar ve 15 haplotip belirlemişlerdir. Yapılan analizler sonucunda Japon adalarında bulunan arıların yerel olduğu ve Asya kıtasından bir gen akışının olmadığı belirlenmiştir.

Yukarıda özetlenen çalışmalardan elde edilen sonuçlar populasyonlar arası genetik farklılığın düşük olduğunu göstermesi bakımından bu tez çalışmasında COIb gen bölgesinden elde edilen sonuçlarıyla uyumludur.

MtDNA Cytb gen bölgesi için belirlenen DNA nükleotid dizisinde bulunan SNP'lere göre 29 haplotipin varlığı gösterilmiştir. Haplotip sonuçlarına göre yapılan varyans analizleri Cytb için tespit edilen toplam varyasyonun %24.52'sinin populasyonlar arasında ve %75.48'inin populasyonlar içinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Bu sonuç, 12 farklı yerden toplanan 12 farklı *B. terrestris* populasyonunun genetik olarak oldukça benzer olduğunu göstermektedir. Gruplar arası farklılığın düşük olması, populasyonların ortak atadan gelme ihtimalinin yüksek olduğu söylenebilir. Populasyon içi varyasyonun yüksek olması örnek alınan lokasyonlarda çok miktarda koloni olduğunu ve koloniler arası çiftleşme oranının yüksek olduğunu düşündürmektedir. Cytb gen bölgesine göre, ortalama genetik farklılaşma katsayısı (FST) 0.245, en yüksek FST değeri Firma-5 yöresinde 0.278 ve en düşük FST değeri Bayatbademler populasyonunda 0.243 hesaplanmıştır (Çizelge 4.9). Belirlenen FST değeri 1'e ne kadar yakın ise alt populasyonlar ortak atadan oldukça uzaktır denilebilir (Hartl ve Clark 2007). FST değerleri üzerinden hesaplanan populasyonlar arası genetik mesafe değerleri (Çizelge 4.10). incelendiğinde en uzak mesafe Kumluca ile Geyikbayırı populasyonu arasında 0.02284 ve en yakın mesafe Firma-5 ile Demre populasyonları arasında bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında Cytb gen bölgesine göre populasyonlar arası genetik uzaklıklar COIb gen bölgesine göre daha düşük bulunmuştur. Ancak, benzer şekilde doğal populasyonlar ile diğer populasyonlar arası genetik mesafeler yüksek çıkmıştır. Cytb gen bölgesine göre, yayla seracılığının yakın zamanda başladığı Geyikbayırı-Sinandığirmeni yöresindeki populasyonun doğal populasyonlara (Faselis, Bayatbademler) yakın ama firmalara ve sera bölgelerindeki populasyonlara daha uzak genetik benzerlik göstermesi, buradaki populasyonun henüz daha doğallığını yitirmediğini düşündürmektedir. Faselis ve Bayatbademler'de bulunan populasyonların diğer populasyonlara göre doğallığını koruduğu ve dışarıdan gen akışının olmadığı açıkça görülmektedir.

Neighbour Joining yöntemine göre çizilen dendrogram (Şekil 4.9) incelendiğinde, doğal populasyonlar ile ticari firmalar ve sera bölgelerindeki populasyonların çok net bir şekilde farklı dallarda kümelendiği görülmektedir. COIb gen bölgesi sonuçlarından farklı olarak Termessos doğal populasyonu diğer populasyonlara uzak ama ticari kolonilere ve sera bölgelerindeki kolonilere yakın bulunmuştur. mtDNA Cytb gen bölgesi üzerinde tespit edilen SNP haplotipler bakımından üretilen tüm bu sonuçlar, seracılık faaliyetlerinde ticari üretilmiş kolonilerin kullanıldığı yörelerde (Aksu, Demre, Kumluca) polinasyon amacıyla sera içerisine bırakılan kolonilerden doğaya geçişlerin olduğu ve yörede bulunan doğal bireyler ile ticari üretilmiş bireyler arasında çiftleşmelerin meydana geldiği söylenebilir.

Widmer vd (1998) mikrosatellit ve mitokondriyal DNA (cytochrome b)'dan faydalanarak Madeira ve Kanarya adalarındaki *B. terrestris* populasyonlarının genetik yapı ve kolonizasyon hikayesini araştırmıştır. Gruplar ve adalar arasındaki genetik farklılaşma sonuçlarına göre Kanarya adalarındaki arı populasyonları birbirlerine daha yakinken Madeira populasyonu genetik olarak kıta populasyonlarına daha yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermiştir ki ata haplotipler Kanarya adalarında oluşmuş. Oysa, türev haplotip Avrupa kıtasında bulunmuştur. Bundan başka Kanarya ve Madeira adalarındaki bombus arıları genel kolonizasyon hikayesini paylaşmadıkları ortaya çıkmıştır. Koulianos ve Hempel (2000) Avrupada bulunan 16 bölgeden ve Kuzey ve Güney Amerikada bulunan 3 bölgeden toplanan 19 bombus türünde mitokondriyal sitokrom b (Cytb) ve sitokrom oksidaz I (COI) genlerini kullanarak genetik farklılıkları ve akrabalık ilişkilerini araştırmışlardır. Sonuçta bu iki gen bölgesi kullanılarak çalışılan türler arasındaki ilişkiler filogenetik olarak başarıyla gösterilmiştir. Morath (2007) yaptığı çalışmada bombus impatiens arılarında genetik varyasyonu belirlemek için mtDNA Cytb genini kullanmıştır. Pirounakis vd (1998) Cytb geninin bombus arılarında coğrafik alttürlerini belirlemek için başarıyla kullanılabileceğini bildirmiştir. Cytb geninin kullanıldığı başka bir çalışmada Afrika körfezinde bulunan iki ada üzerindeki *B. terrestris* arılarının genetik yapısı çalışılmış ve heterojen oldukları belirlenmiştir (Widmer vd 1998). Polonya'da 3 adet sera ve sera çevresindeki doğal populasyonlardan alınan bombus arıları kullanılarak araştırma yapılmış ve ticari olarak üretilen *B. terrestris* kolonilerinden doğal populasyondan alınan bombus arısına doğru genotip değişikliğine sebep olacak herhangi bir gen aktarımının bulunup bulunmadığına bakılmış ve ticari üretimi yapılan arılardan, materyal olarak kullanılan doğal populasyon arılarına doğru gen aktarımının meydana geldiği belirtilmiştir (Kraus vd 2011). Williams vd (2012) yaptığı bir çalışmada 33 ülkeden 279 bölgeden toplanan 579 arının mtDNA-COI bölgesinin DNA sekansı belirlenmiştir. Türlerin birbirine olan akrabalıkları incelenmiş ve 17 tür sınıflandırılarak 7 lokasyona ayrılmıştır. Bu sayede küresel olarak türler teşhis edilmiş ve coğrafi aralıkları belirlenmiştir.

Tamamlanan bu tez projesinde mtDNA üzerinde bulunan iki gen bölgesi (COIb ve Cytb) üzerinden ortaya çıkartılan sonuçlar ile literatür sonuçlarının yüksek uyum gösterdiği söylenebilir.

6. SONUÇ

Ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerine özellikle örtü altı domates yetiştiriciliğinde meyve verim ve kalitesini artırılması, hormon ve kimyasal ilaç kullanımını azaltılması gibi birçok faydalarından dolayı tüm dünyada giderek artan bir talep oluşmaktadır. Ancak, doğaya kaçan ticari kolonilerin yuva yeri ve besin kaynakları bakımından yerel arı populasyonları ile rekabet, yerel bombus alttür ve ekotipleri ile melezlenme gibi doğal ekosisteme zarar verebilecek bazı sorunlara yol açabileceği bildirilmektedir. Ayrıca ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonileri doğal populasyonlara oranla daha fazla ana arı üretebilmekte (bir koloni uygun ortamda 100'den fazla ana arı üretebilmektedir) ve daha rekabetçi olmaktadır ve böylece seradan doğaya çıktıklarında onların yerini alabilmektedirler (Goka vd 2001).

Dünyada ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerini en fazla kullanan bölgelerden birisi olmamıza rağmen bu kolonilerden doğal populasyonlara gen akışının olup olmadığı henüz tam olarak çözülmüş değildir. Ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerinin belirli alanlarda (özellikle Batı Akdeniz sahil kesiminde) çok yoğun kullanılması, ülkemizde seraların içindeki *B. terrestris* arılarının sera dışına çıkmasını engelleyecek ölçüde izolasyonunun sağlanmamış olması, sera içindeki ticari kolonilerin ekonomik ömrü tükendiğinde sera dışına atılmaları, bir koloninin genellikle yaşam dönemi sonuna doğru çok sayıda ana arı ve erkek arı üretmesi gibi birçok etkenden dolayı ülkemizde seralarda kullanılan ticari kolonilerden bombus arıları sera dışına çıkabilmekte, koloni oluşturabilmekte ve sera çevresindeki doğal populasyonla etkileşim içine girebilmektedir (Gürel ve Gösterit 2007, Gürel vd 2008).

Dünyada tek tip tarımın yaygınlaşması ve doğal yaşam alanlarının yok edilmesi gibi sebeplerden dolayısıyla çok sayıda bombus türü yok olma tehdidi altındadır. Yok olma hızını artıran faktörlerden en önemlisi bombus kolonilerinin az sayıda bireylerden oluşmasıdır. Bu sebeple genetik çeşitliliklerin tespit edilmesi ve doğada bulunan bombus arılarının populasyon büyüklükleri hakkında çalışmalar yapılmaktadır (Herrmann vd 2007).

Türkiye yerel *B. terrestris* populasyonlarına yönelik çalışmalarla genetik çeşitliliğin tespit edilmesi ve bu çeşitlilikten gen kaynağı olarak koruma stratejilerinde faydalanılması oldukça önemlidir. *B. terrestris* türünün renk yapısı büyük ölçüde sabittir ve alttür ve ekotip düzeyindeki tanımlamalarda morfolojik özellikler yetersiz kaldığı için güvenilir moleküler materyal ve yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, hayvansal mitokondriyal DNA (mtDNA) nükleer DNA ile karşılaştırıldığında yüksek evölüsyon oranına sahip olmasından dolayı populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalarda güvenilir ve etkili bir materyal olarak tercih edilmektedir.

Yaklaşık 250 türü tanımlanan bombus arılarında tozlaşma amacıyla ticari yetiştiriciliği yapılan 5 tür bulunmaktadır ve bu türler arasında en yaygın (Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Güney Amerika'da) kullanılanı *B. terrestris*'tir. Bu tür günümüzde Türkiye dahil 57 den fazla ülkede kullanılmakta olup bu ülkelerden 16'sında doğal bir tür değildir. Dünya genelinde doğal bombus arı populasyonları azalmakta ve bombus türlerinin % 11'i yok olma tehlikesi altındadır. Avrupa genelinde

4 bombus türünün nesli tükenmiş, 13 bombus türünün ise en az bir Avrupa ülkesinde nesli tükenmiştir. Benzer sorunlar birçok bombus alt türünün yaygın olarak yaşadığı ülkemiz için de geçerlidir. Bu nedenle Türkiye yerel *B. terrestris* populasyonlarına yönelik çalışmalarla genetik çeşitliliğin tespit edilmesi ve bu çeşitlilikten gen kaynağı olarak koruma stratejilerinde faydalanılması oldukça önemlidir.

Özellikle Antalya yöresi *B. terrestris* arısının doğal habitatta yaygın olarak bulunduğu bir tür olup birçok alt türüne de rastlanmaktadır. Bununla birlikte ülkemizin ve Avrupa'nın en yoğun seracılık yapılan ve bu seralarda ticari yetiştirilmiş bombus kolonilerinin en yoğun kullanıldığı yerdir. Ticari *B. terrestris* kolonilerinin yoğun kullanımı sonucunda bu kolonilerden doğaya kaçan arı populasyonunda artış olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan kolonilerin yayılması doğal populasyonlar ile rekabetin artmasına, hastalıkların yayılmasına ve yerel genotiplerle kontrolsüz melezlenmeye sebep olmaktadır (Dafni 1998; Goka vd 2001). Yabancı firmalardan alınan ticari kolonilerin genetik yapıları ve bunların yerel genotiplere yapabileceği olası etkiler de tam olarak bilinmemektedir. Bu sebeplerden dolayı, Türkiye *B. terrestris* populasyonlarının genetik farklılıkları belirlenmeden kaybedilme riski bulunmaktadır. Coğrafik varyasyonun genetik temelleri ve populasyon yapısı ile ilgili elde edilecek bilgi bombus arılarının kullanımı ve korunması hakkında önemli bir kaynak sağlayacaktır. Ancak bugüne kadar bombus arıları hakkındaki çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Bu projenin amacı Antalya yöresi doğal ve ticari *B. terrestris* populasyonlarında genetik yapının, filogenetik ilişkilerin ve coğrafik varyasyonunun mitokondriyal DNA üzerinde bulunan üç gen bölgesi üzerinden belirlenmesi olmuştur. Çalışılan gen bölgelerinden iki tanesi (COIb ve Cytb) projenin kapsam ve amacına uygun sonuçlar vermiştir. Tamamlanan bu proje kapsamında, Antalya yöresini temsilen yapılacak örnekleme çalışmasında rastgele seçilen 12 farklı populasyonda toplam 360 bireyin mtDNA'sında moleküler genetik çalışmalarda referans olarak kullanılan iki gen bölgesi (COIb ve Cytb)'nin DNA nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu diziler üzerinde bulunan SNP'ler karşılaştırılarak ticari ve doğal *B. terrestris* populasyonları arasındaki genetik ilişkiler ortaya çıkartılmıştır.

Böylece;

- ✓ Mitokondriyal DNA polimorfizmlerinden yararlanılarak Antalya faunasında doğal olarak bulunan *B. terrestris* populasyonlarını moleküler seviyede tanımlanmıştır,
- ✓ *B. terrestris* tür/alttür tescil çalışmaları, soy kütüğüne dayalı yetiştirme ve gen kaynağı olarak korunmasında kullanılabilecek özgün alleller gösterilmiştir,
- ✓ Ticari genotiplerden Antalya yerli *B. terrestris* populasyonlarına herhangi bir gen akışının olduğu gösterilmiştir,
- ✓ İthal edilen *B. terrestris* kolonilerinin üretiminde kullanılan ana arıların yerli gen kaynaklarımızla yakın genetik özelliklere sahip olduğu ortaya çıkartılmıştır,
- ✓ Önemli yerli gen kaynaklarımızdan biri olan *B. terrestris*'inde gen bankası oluşturulmasına yönelik biyoinformatik alt yapıya katkı sağlanmıştır.

Türkiye gibi dünyada ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerini en fazla kullanan ülkelerin başında gelen bir ülkede konunun bilimsel verilerle açıklanması bütün dünyada konu ile ilgili bilim insanlarının dikkatini çekecektir. Ayrıca araştırmada

kullanılan yöntem ve moleküler markırların son yıllarda çok güncel ve güvenilirliğinin ispatlanmış olması, proje çıktılarının etki değeri yüksek dergi ve platformlarda yayınlanabilecek bilimsel makalelere dönüşmesini sağlayacaktır.

Bu projenin başarıyla sonuçlanması, Batı Akdeniz Bölgesinde bombus arısı konusunda DNA temelinde önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu sayede, proje çıktıları ile ilgili hem İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü teknik elemanlarına hem de bombus arısı yetiştiren firmaların üretimden sorumlu teknik elemanlarına bilgilendirme yapılabilir.



7. KAYNAKLAR

- ARBETMAN, M.P., MEEUS, I., MORALES, C.L., AIZEN, M.A., SMAGGHE, G. 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*, 15, 489-494.
- ARGUN KARSLI, B. 2011. Akdeniz Bölgesi Doğal *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Mikrosatelit Markerler Kullanılarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- AVISE, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd Ed., Chapman and Hall, 684 p., New York.
- AYTEKİN, A.M., 2001. *Bombus* Arılarının Türkiye'deki Durumu ve Geleceği, *Teknik Arıcılık*, 74, 16-20.
- BEEKMAN, M. and VAN STRATUM, P. 2000. Does the diapause experience of bumblebee queens *Bombus terrestris* affect colony characteristics? *Ecol. Entomol.* 25, 1-6.
- BENTON, T. 2000. *The bumblebees of Essex. The Nature of Essex Series, No: 4*, Loginga Books, Essex, Pp 179.
- BEUZEN, N.D., STEAR, M.J. AND CHANG, K.C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary Journal*, 160; 42-52.
- BOORE, J.L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27(8), 1767-1780.
- CAMERON S.A., HINES H.M., WILLIAMS, P.H. 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*), *Biological journal of the Linnean Society*, 91, 161-188.
- COPPEE, A. 2010. *Bombus terrestris* (L. 1758) :A complex species or a species complex? Intraspecific pheromonal and genetic variations of *Bombus terrestris* (L.). Impacts on the speciation. Université De Mons, Faculté Des Sciences, Laboratoire De Zoologie, PhD thesis.
- DAFNI, A. 1998. The threat of *Bombus terrestris* spread. *Bee World*, 79: 113-114.
- DU, Q., BI, G., ZHAO, E., YANG, J., ZHANG Z., LIU, G. 2015. Complete mitochondrial genome of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal 27 (6), 4455-4456.
- DUCHATEAU, M.J. and VELTHUIS, H.H.W. 1988. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. *Behaviour*, 107: 186-207.

- ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., COURNET, J.M., GOUDET, J. and SCHOLL, A. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology*, 5(1): 19-31.
- GEGEAR, R.J., OTTERSTATTER, M.C. and THOMSON, J.D. 2005. Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower - handling techniques. *Animal Behaviour*, 70: 209-215.
- GOKA, K. 1998. Estimating colony number of *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae) queens foraging in Biratori, Hokkaido, Japan *Appl. Entomol. Zool.* 43 (1): 19–23.
- GOKA, K., OKABE, K., YONEDA, M., NIWA, S. 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites, *Molecular Ecology*, 10, 2095-2099.
- GOULSON, D. and HANLEY, M.E. 2004. Distribution and forage use of exotic bumblebees in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, 28: 225-232.
- GOULSON, D; LYE, G C; DARVILL, B. 2008. Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53: 191-208.
- GÖSTERİT, A. and GÜREL, F. 2005. Comparison of development patterns of imported and native *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Mediterranean Coastal Region. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 29: 393–398.
- GÖSTERİT, A., GÜREL, F. 2014. *Bombus* arısı (*Bombus terrestris* L.)' nın ticari yetiştiriciliği için temel gereklilikler. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9(2): 102-111.
- GÜREL, F., GENÇER, V., EFENDİ, Y., TALAY, R. 1998. Antalya çevresindeki seralarda kullanılan *Bombus terrestris* kolonilerinin performanslarının değerlendirilmesi. *Derim*, 15, 150–161.
- GÜREL, F., EFENDİ, Y., MUTAF, S. 1999a. Doğadan toplanan *Bombus terrestris* ana arılarının laboratuvar koşullarında koloni oluşturma ve koloni gelişimi özellikleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 379–384.
- GÜREL, F., TALAY, R., EFENDİ, Y., BALCIOĞLU, M.S. 1999b. Örtü altı domates yetiştiriciliğinde *Bombus terrestris* polinasyonunun verim ve kaliteye etkileri. GAP I. Tarım Kongresi. Urfa.
- GÜREL, F. ve BASIM, H. 2003. Batı Akdeniz ve Ege Sahil Bölgesi' ndeki yerel *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) genotiplerinin AFLP tekniği ile belirlenmesi ve yabancı genotip introduksiyonunun saptanması. TÜBİTAK, Proje No: TOGTAĞ - TARM 2575-2.

- GÜREL, F. ve GÖSTERİT, A. 2007. *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) arısının yıl boyu kitlesel üretiminde uygulanan teknikler ve karşılaşılan sorunlar. 5. Ulusal Bilim Kongresi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 5 - 8 Eylül Van, 1-10.
- GÜREL, F., GÖSTERİT, A. and EREN, Ö. 2008. Life-cycle and foraging patterns of native *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in the Mediterranean region. *Insectes Sociaux*, 55: 123-128.
- GÜREL F. ve GÖSTERİT A. 2009. The Suitability of Native *Bombus terrestris* dalmatinus (Hymenoptera: Apidae) Queen for Mass Rearing, *Journal of Apicultural Science*, 53 (1), 67-73.
- HALL, H.G. 1990. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA-RFLPs. *Genetics*, 125: 611-621.
- HARRIS, E.L.V. and ANGAL, S.T. 1995. Protein purification methods: a practical approach. P. imprenta: 1, pp. 317, Oxford.
- HARTL, D.L. and CLARK, A.G. 2007. Principles of Population Genetics, Fourth Edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL, AND J. R. DEWAARD. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 270:313-321.
- HEINRICH, B. 1979. Bumblebee economics. Harvard University Press, Cambridge, 200 pp.
- HERRMANN, F., WESTPHAL, C., ROBIN, F.A. and MORITZ-STEFFANDEWENTER, I. 2007. Genetic diversity and mass resources promote colony size and forager densities of a social bee (*Bombus pascuorum*) in agricultural landscapes. *Molecular Ecology*, 16: 1167-1178.
- HINGSTON, A.B., SMEDLEY, J.M., DRISCOL, D.A. and CORBETT, S. vd 2002. Extent of Invasion of Tasmanian Native Vegetation by the Exotic Bumblebee *Bombus terrestris* (Apoidea: Apidae). *Austral. Ecology*, 27: 162-172.
- HINGSTON, A.B. 2006. Is the exotic bumble bee *Bombus terrestris* really invading Tasmanian native vegetation. *Insect Conservation*, 10: 289-293.
- HOLLEY, R.W., EVERETT, G.A., MADISON, J.T. and A. ZAMIR. 1965. *Journal of Biological Chemistry*. 240:2122.
- HUSON, D.H. AND BRYANT, D.2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267.

- INGS, T.C., INGS, N.L., CHITTKA, L., RASMONT, P. 2010. 'A failed invasion? Commercially introduced pollinators in Southern France', *Apidologie*, 41, 1-13.
- INOUE, M.N., YOKOYAMA, J. and WASHITANI, I. 2008. Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation*, 12: 135-146.
- KARAMAN, S. 2002. Antalya İlinde Cam Sera Domates Yetiştiriciliğinde *Bombus Arısı* Kullanımının Ekonometrik Analizi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
- KIM, M.J., H.J. YOON, H.H. IM, H. U. JEONG, M.I. KIM, S.R. 2009. Mitokondriyal DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12:133-139.
- KOULIANOS, S. and HEMPEL, P.S. 2000. Phylogenetic Relationships among Bumble Bees (*Bombus*, Latreille) Inferred from Mitokondriyal Cytochrome b and Cytochrome Oxidase I Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3): 335-341.
- KRAUS, F.B., SZENTGYORGYI, H., ROZEJ, E., RHODE, M., MORON, D., WOYCIECHOWSKI, M. and MORITZ, R.F.A. 2011. Greenhouse bumblebees (*Bombus terrestris*) spread their genes into the wild. *Conservation Genetics*, 12: 187-192.
- MEYDAN, H., KARSLI, B.A., GÜREL, F., BALCIOĞLU, M.S., YILDIZ, M.A. 2016. Bazı Türkiye Yerli ve Ticari *Bombus terrestris* Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Mikrosatelit Markerler Kullanılarak Belirlenmesi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 2016, 56 (2) 48-55.
- MICHENER, C. D. 2000. *The Bees of the World*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 913 pp.
- MORATH S.U. 2007. Assessing genetic variation among *Bombus Impatiens* (Hymenoptera: Apidae) in two boroughs of New York City using mitokondriyal DNA. Fordham University. 441 E Fordham Road. Bronx, NY 10458.
- MORITZ, R.F.A., HAWKINS, C.F., CROZIER, R.H. and MACKINLEY, A.G. 1986. A mitokondriyal DNA polymorphism in honeybees *Experientia*, 42; 322-324.
- MURRAY, T.E., COFFEY, M.F., KEHOE, E., HORGAN F.G. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation* 159.
- OSBORNE, J.L., MARTIN, A.P., CARRECK, N.L., SWAIN, J.L., KNIGHT, M.E., GOULSON, D., HALE, R.J. and SANDERSON, R.A. 2009. Bumblebee flight distances in relation to the forage landscape. *J. of Animal Ecology*, 77: 406-415.

- ONO, M. 1998. Why now bumblebee (in Japanese). *The Nature and Insects*, 33(6):2-3.
- ÖKSÜZ, D.P., 2014. *Poecilimon Similis* (Orthoptera: Tettigonidae)'in Doğu Karadeniz Populasyonları Arasındaki Genetik Çeşitlilik-Coğrafi Dağılım İlişkisinin Merkez-Perifer Hipotezi Çerçevesinde Sınanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- ÖZBEK, H. 1997. Bumblebee fauna of Turkey with distribution maps (Hymenoptera: Apidae, Bombinae) Part 1: *Alpigenobombus* Skorikov, *Bombias* Robertson and *Bombus latreille*. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 21(1): 37-56.
- ÖZDİL, F. 2007. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye'nin Farklı Yörelere Ait Bal Arılarının Tanımlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- PEDERSEN, B.V. 1996. A Phylogenetic Analysis of Cuckoo Bumblebees (*Psithyrus*, *Lepelletier*) and Bumblebees (*Bombus*, *Latreille*) Inferred from Sequences of the Mitokondriyal Gene Cytochrome Oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 5, No. 2, April, pp. 289–297.
- PIROUNAKIS, K., KOULIANOS, S. and HEMPEL, P.S. 1998. Genetic variation among European populations of *Bombus pascuorum* (Hymenoptera: Apidae) from mitokondriyal DNA sequence data. *European Journal of Entomology*, 95: 27-33.
- ROKAS, A., LADOUKAKIS, E. and ZOUROS, E. 2003. Animal mitokondriyal DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (8); 411-417.
- ROZAS, J., LIBRADO, P., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X., AND ROZAS, R. 2010. Universitat de Barcelona Current Released Version: 5.10.1
- SAITOU, N. And NEI, M.1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*.4:406-425.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- SCHNEIDER, W.S. ROESSLI, D. EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver. 2.00: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Genevai, Switzerland.
- SHAO, Z.Y., MAO, H.X., FU, W.J., ONO, M., WANG, D.S., BONIZZONI, M., ZHANG, Y.P. 2004. Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidea). *J. of Heredity*. 9(1), 4652.
- SOLIGNAC, M. 1991. Preparation and visualization of animal mitokondriyal DNA for RFLP analysis. NATO ASI series, Vol. H57. *Molecular Techniques in Taxonomy* (Edited by G.M. Hewitt et al.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- SPERLING, F.A.H., HICKEY, D.A. 1994. Mitokondriyal DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11, 656–665.
- TOKORO, S., YONEDA, M., KUNITAKE, Y.K., and GOKA, K. 2010. Special Feature for Ecological Risk Assessment of Introduced Bumblebees Geographic variation in mitokondriyal DNA of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Appl. Entomol. Zool.* 45 (1): 77–87.
- VELTHUIS, H.H.W. and DOORN, A. 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37: 421-451.
- WILLIAMS, P.H. 1998. An annotated checklist of bumblebees with an analysis of patterns of description. *Bulletin of the Natural History Museum: Entomology Series* 67, 79-152.
- WILLIAMS, P.H. and OSBORNE, J.L. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40: 367-387.
- WILLIAMS, P.H., BROWN M.J.F., CAROLAN J.C., AN, J., GOULSON, D., AYTEKİN, A.M., BEST, L.R., BYVALTSEV, A.M., CEDERBERG, B., DAWSON, R., HUANG, J., ITO, M., MONFARED, A., RAINA, R.H., SCHMID-HEMPEL, P., SHEFFIELD, S., PETER SIMA – ZENGHUA XIE. 2012. Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus* s. str. worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae) *Systematics and Biodiversity*, 10(1): 21–56.
- WIDMER, A. and HEMPEL, P.S. 1999: The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology*, 8: 387-98.
- WIDMER, A., HEMPEL, P.S., ESTOUP, A., SCHOLL, A. 1998. Population Genetic Structure and Colonization History of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira, *Heredity*, 81, 563-572.
- YOON, H.J., KIM, S.E., LEE, M.L., KIM, I., BAE, J.S., SOHN, H.D., JIN, B.R. 2003. Genetic homogeneity of the Korean native bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae), detected by mitokondriyalCOI gene sequences. *Int. J. Indust. Entomol.* 6, 63–6.

ÖZGEÇMİŞ



Şadiye TAŞBAŞ, 13.02.1991 tarihinde Afyonkarahisar'da doğdu. 2010 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümüne başlamış ve 2014 yılında Ziraat Mühendisi ünvanıyla mezun olmuştur. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalında açılan Yüksek Lisans başvurmuş, Hayvansal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Halen aynı anabilim dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

