Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 8(2): 372-379, 2020
DOI: https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i2.372-379.3061

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology

Available online, ISSN: 2148-127X | www.agrifoodscience.com | Turkish Science and Technology

Comparison of Genetic Structure Using Molecular Markers in Estivated and Hibernated Native *Bombus terrestris* (L.) Populations

Bahar Argun Karsli[1,a,*], Fehmi Gürel[1,b]

[1]*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey*
[*]*Corresponding author*

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 05/11/2019
Accepted : 08/01/2020

Keywords:
Bumble bees
Diapause
Estivation
Hibernation
Genetic differences

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate genetic differences between estivated Phassalis and hibernated Termessos native *B. terrestris* populations based on 20 microsatellite loci and two mtDNA gene regions (COI and cytb). The mean number of allele per locus, observed heterozigosity and inbreeding coefficients were determined 12.00 and 11.00, 0.68 and 0.65, 0.22 and 0.26 in Termessos and Phassalis populations, respectively. Pairwise F_{ST} value was calculated as 0.023 by using 20 microsatellite loci. According to the mtDNA COI gene region, all samples in both two populations were included in a single haplotype (Haplotype B). Four different haplotypes (Haplotypes 1-4) were determined according to the mtDNA cytb gene region. Pairwise F_{ST} value was calculated as 0.0013 according to the mtDNA cytb gene region. There were no significant differences between these two natural *B. terrestris* populations in terms of the 20 microsatellite and two mtDNA loci examined. According to results, life cycle differences of different native *B. terrestris* population are probably determined by environmental factors (photoperiod, temperature, flora, moisture, altitude etc.) rather than genetic influences.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(2): 372-379, 2020

Estivasyon ve Hibernasyon Gösteren Doğal *Bombus terrestris* (L.) Populasyonlarında Genetik Yapıların Moleküler Markerler Kullanılarak Karşılaştırılması

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 05/11/2019
Kabul : 08/01/2020

Anahtar Kelimeler:
Bombus arısı
Diyapoz
Estivasyon
Hibernasyon
Genetik farklılıklar

ÖZ

Bu çalışmada estivasyon gösteren Faselis ve hibernasyon gösteren Termesos doğal *B. terrestris* popülasyonları arasındaki genetik farklılıkların 20 mikrosatellit lokus ve iki mtDNA gen bölgesi (COI ve cytb) temelinde incelenmesi amaçlanmıştır. Termesos ve Faselis popülasyonlarında sırasıyla; lokus başına ortalama allel sayısı 12,00 ve 11,00 olarak, gözlenen heterozigotluk değeri 0,68 ve 0,65 olarak, akrabalı yetiştirme katsayısı ise 0,22 ve 0,26 olarak tespit edilmiştir. İkişerli F_{ST} değeri 20 mikrosatellit lokus kullanılarak 0,023 olarak hesaplanmıştır. mtDNA COI gen bölgesine göre Termesos ve Faselis popülasyonlarındaki tüm örneklerin tek bir haplotipe dâhil olduğu (Haplotip B) belirlenmiştir. mtDNA cytb gen bölgesine göre 4 farklı haplotip (Haplotip 1-4) belirlenmiştir. mtDNA cytb bölgesine göre ikişerli F_{ST} değeri 0,0013 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, estivasyon ve hibernasyon gösteren bu iki doğal *B. terrestris* popülasyonu arasında incelenen 20 mikrosatellit ve iki mtDNA lokus bakımından önemli genetik farklılıklar bulunmamıştır. Araştırma sonuçlarına göre farklı *B. terrestris* doğal popülasyonlarının yaşam döngüsü bakımından farklılıklarının genetik etkilerden çok çevresel faktörler (fotoperiyod, sıcaklık, nem, yükseklik, bitki örtüsü vs.) ile şekillendiği anlaşılmaktadır.

[a] bhrargun@akdeniz.edu.tr http://orcid.org/0000-0002-1762-9847 | [b] fgurel@akdeniz.edu.tr https://orcid.org/0000-0003-1492-8910

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Farklı iklim ve habitat koşullarına uyum sağlayabilen bombus arıları, dünyanın ılıman bölgelerinden Kutup Dairesi'ne kadar uzanan geniş bir coğrafyada bulunmaktadır (Williams ve ark., 2014). Türkiye'nin en doğusundan en batısına, kuzeyinden güneyine, deniz seviyesinden 4000 metre yüksekliğe kadar hemen her yerinde bombus türlerine rastlanmıştır (Aytekin, 2001; Rasmont ve ark., 2009). Bombus arıları doğal yetişen ve kültürü yapılan pek çok bitkinin tozlaşmasında oldukça önemli bir role sahip olmaları nedeniyle ticari olarak üretilmekte ve özellikle örtü altı yetiştiricilikte tozlaşmayı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bombus türleri içerisinde *Bombus terrestris, Bombus lucorum, Bombus ignitus, Bombus impatiens* ve *Bombus occidentalis* türlerinin kitlesel olarak ticari yetiştiriciliği yapılmaktadır. *B. terrestris* bu türler içinde ticari yetiştiriciliği en çok yapılan, doğada en yaygın görülen ve üzerinde en fazla bilimsel çalışma yapılan türdür (Velthuis ve Doorn, 2006).

B. terrestris türü doğal yayılma alanlarının ötesinde önemli ekolojik esneklik göstererek farklı habitatlarda ve olumsuz koşullar altında da yaşamını sürdürebilmektedir (Dafni, 1998). Bu türün farklı iklim ve coğrafi koşullara adapte olmasında sosyal bir canlı olması, koloni yaşamı sürdürmesi, çok sayıda bitkiden nektar ve polen kaynağı olarak faydalanabilmesinin yanı sıra, yaşam döngüsünü ve koloni gelişimini bulunduğu ortama göre düzenleme yeteneği de etkilidir (Dafni ve ark., 2010). *B. terrestris* türü Türkiye ve Akdeniz Bölgesi doğal faunasında yaygın olarak bulunmakta ve çok geniş bir habitatta tozlaşma yapmaktadır (Özbek, 1997). Anadolu'da *B. terrestris* popülasyonları 0-2200 metre aralığında görülmektedir. Bu popülasyonlardan %80'i 2-1510 metre yükseklikte tespit edilmiştir (Rasmont ve Flagothier, 1996). Toroslar'da ise popülasyonların % 75'i 500 metrenin altında bulunmuştur (Kaftanoğlu 2000).

Mevsimsel ve çevresel değişimlerden (sıcaklık, nem, besin gibi) kurtulma yeteneği canlıların yaşam döngülerini tamamlamaları ve belirli coğrafi bölgelere yayılmaları açısından kritik öneme sahiptir. Tüm hayvan ve bitki taksonlarının temsilcileri, mevsimsel değişikliklere cevap olarak yaşam geçmişlerinde bir tür uyuşukluk (kış uykusu-hibernasyon, yaz uykusu-estivasyon) geliştirmiştir. Böceklerde uyuşukluğun fizyolojik şekli diyapoz olarak bilinmektedir. Diyapoz, böceklerin zor koşullarda hayatta kalmak için fizyolojilerini değiştirmelerine ve farklı ortamlarda yaşayabilmelerine olanak sağlayan bir adaptasyon şeklidir (Denlinger, 2002). Bombus arılarında diyapoz tepkileri açısından büyük ekolojik esneklik görülmektedir. Kuzey Avrupa'da ana arılar toprak sıcaklığı 5°C'nin altına düştüğünde diyapoz sürecine girmekte ve ilkbaharda toprak sıcaklığı 6-7°C olduğunda diyapozdan çıkmaktadırlar. *B. terrestris* arıları doğal yaşam alanlarında 3-8 ay arasında değişen süreyle diyapozda kalmaktadır. Yeni Zelanda gibi daha sıcak bölgelerde 3-4 ay diyapozda kalan arılar Kuzey Avrupa gibi soğuk bölgelerde 6-8 ay diyapozda kalırlar (Beekman ve ark., 1998). Türkiye doğal faunasında yaşayan *B. terrestris* kolonilerinin yaşam döngülerinde de çok büyük varyasyon gözlenmektedir. Ege ve Akdeniz sahil kesiminde doğal yaşam alanlarında Ekim-Aralık aylarında diyapozdan çıkan *B. terrestris* ana arıları iç bölgelerde Şubat-Mayıs aylarında diyapozdan çıkmaktadır. Bombus ana arıları olumsuz çevre şartlarında hayatta kalmak amacıyla yaşamsal fonksiyonlarını yavaşlatarak (vücut ısısının azaltılması, metabolik faaliyetlerin minimum seviyelere indirilmesi vs.) birkaç ay süren diyapoz dönemine girerler. Yaz mevsiminin aşırı sıcak ve kurak döneminde geçirilen diyapoz estivasyon, kış aylarında geçirilen diyapoz ise hibernasyon olarak adlandırılmaktadır (Denlinger 2008). Aynı bölgede değişik yükseklikler de bile farklılıklar görülebilmektedir. Örneğin Gürel ve ark. (2008) Antalya'nın sahil kesiminde bulunan Faselis (rakım 0-100 arası) bölgesinde yerel *B. terrestris* ana arılarının diyapozdan sonbaharda, daha iç kesimlerde kalan Termesos (rakım 500-700 arası) bölgesinde ise ilkbaharda çıktığını bildirmişlerdir. Gürel ve ark. (2008) Antalya ilinde farklı yükseklik ve habitatlarda yerel *B. terrestris* popülasyonlarının yaşam döngülerinin (diyapozdan çıkış tarihleri, yaşam döngüsü uzunluğu vb.) farklılık göstermesinin populasyonların farklı ekolojik koşullara adapte olmasında kolaylık sağladığını bildirmişlerdir. Ancak bombus arılarının yaşam döngülerinde görülen bu farklılığın genetik etkilerle mi yoksa çevresel faktörlerle mi şekillendiği konusunda araştırmaya rastlanılmamıştır.

Bu bağlamda gerçekleştirilen çalışma kapsamında, Antalya ilinde Faselis ve Termesos bölgelerinde bulunan yerel *B. terrestris* popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik ve popülasyonlar arasındaki genetik farklılıklar 20 mikrosatellit lokus ve iki mtDNA (COI ve cytb) gen bölgesi kullanılarak incelenmiştir. Bu sayede daha önce Faselis ve Termesos bölgelerinde bulunan yerel *B. terrestris* popülasyonları arasında tespit edilen çeşitli yaşam döngüsü farklılıklarının (diyapozdan çıkış tarihleri, yeni ana ve erkek arıların ortaya çıktığı tarihler ve yaşam döngülerinin uzunluğu vs.) genetik alt yapısının değerlendirilmesi ve günümüzdeki mevcut popülasyon yapısının moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Antalya sahil kesimindeki Faselis (0-100 m) ve iç kesimlerde kalan daha yüksek rakımlı Termesos (500-700 m) bölgelerindeki doğal yaşam alanlarından 2017 yılının Nisan ve Mayıs aylarında toplanan 30'ar adet *B. terrestris* işçi arı araştırmanın arı materyali olarak kullanılmıştır. Bu bölgeler, doğal *B. terrestris* popülasyonlarının bulunduğu ve ticari olarak üretilen kolonilerin kullanılmadığı izole alanlar olarak bilinmektedir (Gürel ve ark., 2008). Farklı habitat koşullarının görüldüğü (farklı yükseltilerde bulunan, estivasyon ve hibernasyon gösteren vb.) bu alanlardan arı örnekleri toplanırken çok geniş bir alan taranmış ve mümkün olduğunca farklı kolonilere ait arı örneklerinin toplanmasına çalışılmıştır. Toplanan arı örnekleri %95'lik etanol çözeltisine konulmuş ve laboratuvarda +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Metot

Popülasyonlar içindeki genetik çeşitlilik parametreleri ve popülasyonlar arasındaki genetik benzerlik ile farklılıklar mikrosatellit lokuslar ve mtDNA'ya ait iki lokus (COI ve cytb) kullanılarak incelenmiştir. Bu sayede

hem otozomal hem de anasal kalıtım izlenerek iki popülasyon arasındaki ilişkiler moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu her bir bombus arısının toraksı kullanılarak %10 Chelex 100 metoduyla (Walsh ve ark., 1991) yapılmıştır. DNA'lar agaroz jelde kontrol edildikten sonra PCR işlemine geçilmiştir. Mikrosatellit lokusların seçiminde Estoup ve ark., 1995, 1996, Funk ve ark., 2006 ve Stolle ve ark., 2009 çalışmaları incelenerek yaygın olarak kullanılan 20 adet lokus belirlenmiştir. Çalışılan lokuslara ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 1'de özetlenmiştir. Faselis ve Termesos popülasyonlarından 30'ar örnek olmak üzere toplam 60 arı örneği her lokus için tek tek genotiplendirilmiştir. PCR işlemi için 2-2,5 µl kalıp DNA (50 ng//µl), 2 µl 10X buffer (Geneall), 1,2 µl HQ buffer (Geneall), 2 µl dNTPs (2,5mM), her bir primerden 0,3 µl (10 pmol), 2,5u/µl Taq polimeraz (Geneall) toplam hacim 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR işlemi için termal koşullar ilk denatürasyon 94°C'de 3 dk, denatürasyon 94°C'de 30 sn, yapışma 48-60°C' de 30 sn, uzama 72°C'de 30 sn ve son uzama 72°C'de 10 dk olmak üzere, 35 döngü olarak uygulanmıştır.

PCR ürünlerinin büyüklüklerinin belirlenmesi için yapılan fragment analizi işlemi 96'lık otomatik kapiller sistem kullanılarak (Advanced Analytical Technologies-AATI, Ames, Iowa, USA) gerçekleştirilmiştir. Cihazda DNF-900 35-500 bp kit üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Kapiller elektroforez işleminden sonra bantların görüntülenmesi için PROSize® 2.0 version 1.3.1.1 programı (Advanced Analytical Technologies, Inc., Ames, IA, USA) kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokuslara ait bazı tanımlayıcı bilgiler
Table 1. Some descriptive information about microsatellite loci used in the study

Lokus	Tekrar motifi	Primer dizileri (5'→3')	A	AR	R
B100	$(CT)_{12}GTC(CT)_3$	F: CGTCCTCGTATCGGGCTAAC R: CGTGGAAACGTCGTGACG	58	146-178	1
B118	$(CT)_{11}AG(CT)_3$	F: CCTAAGTCGCTATATCTTCG R:GAAACACGTATCTACATCTACAG	58	221-223	1
B119	$(CT)_7CG(CT)_4$	F: GATCGTGCTAGAAAAGGAAG R: CCACAGTGCAAAGTTTCTG	52	130-136	1
B124	$(CT)_8TCCTCTTCCAC(CT)_{14}$ $CCTC(GC)_3(GGCT)_8$	F: GCAACAGGTCGGGTTAGAG R: CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG	57	242-256	2
B126	$(CT)_{12}GT(CT)_{10}$	F: GCTTGCTGGTGAATTGTGC R: CGATTCTCTCGTGTACTCC	57	176-182	2
B132	$(CT)_{12}TC(CT)_3$	F: GAAATTCGTGCGGAGGG R: CAGAGAACTACCTAGTGCTACGC	58	148-213	1
B96	$(CG)_3(CT)_6TT(CT)_3T(CT)_4T$ $(CT)_7CGTT(CT)_3$	F: GGGAGAGAAAGACCAAG R: GATCGTAATGACTCGATATG	52	230-248	1
B11	$(CT)_5….(CT)_{10}(ATCT)_6…$ $(CT)_3(ATCT)_3$	F: GCAACGAAACTCGAAATCG R: GTTCATCCAAGTTTCATCCG	52	154-180	2
BT06	$(TC)_{23}$	F: AGTCGTCGCTTTGGGATTC R: GAACTATCGGGCTCTGTTAGC	52	156-176	3
BT09	$(TC)_{28}$	F: CAGTCGTCTGGAACTAGATCCG R: AACGTCGATTACCGTCACCGAG	52	128-174	3
BT10	$(CT)_{19}$	F: TCTTGCTATCCACCACCCGC R: GGACAGAAGCATAGACGCACCG	53	151-175	3
BT20	(CT)21	F: TTCCACAGCGTTTTCTTAAGTC R: ATGGACGGCGAGATCGTGAG	52	127-145	3
BT26	$(TG)_{33}$	F: AGCGGGACCTGGTAAAAACG R: CGATTCTCTTCGTGGTCAGTTCTCC	52	119-191	3
BT28	$(GTT)_3.(GTT).(GTTGCT)_4$	F: TTGCTGACGTTGCTGTGACTGAGG R: TCCTCTGTGTGTTCTCTTACTTGGC	53	181-196	3
BTMS0033	AAG	F: CGTTGCATGCCGTTAAAATA R: TTCGCGTATAACGACGTCAC	51	202-247	4
BTMS0119	TC	F: GTGCGAGCTTCTCGAGGATA R: GCGCATGCATAAGTCTCGTT	60	334-372	4
BTMS0131	GA	F: TACAAACGATGCGTGAGG R: AGTCAAGTAAGTCCTACCG	48	209-326	4
BTMS0082	TTTTC	F: TCGCGATCTTGGTGATAATGA R: TCAGACAGAAACTGTGGAAAAC	60	381-402	4
BTMS0124	TC	F: CGCCGTAATGTTAACTCC R: ACTCAATCCAAACGCCACC	54	242-324	4
BTMS0045	GA	F: GAAATTCCCCACGAAATACG R: GCGGATACAGTTTCGAGCAT	60	236-287	4

A: Yapışma Sıcaklığı (ºC); AR: Allel Genişliği; R: Referanslar; 1: Estoup ve ark. (1996); 2: Estoup ve ark. (1995); 3: Funk ve ark. (2006); 4: Stolle ve ark. (2009)

Popülasyonlar arasındaki benzerlik ya da farklılıkları anasal kalıtımı izleyerek araştırmak amacıyla mtDNA COI ve cytb gen bölgeleri incelenmiştir. mtDNA sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesi için 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' ve 5'-GGTCAAACAAATCATAAAGATATTGG-3' primerleri, mtDNA sitokrom b (cytb) gen bölgesi için 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' ve 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' primerleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için Coppee (2010) tarafından bildirilen PCR programı ve içeriği kullanılmıştır. PCR işleminde mtDNA COI bölgesi için 658 bç ve cytb bölgesi için 433 bç uzunluğundaki bantlar elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri DNA dizi analizlerinin yapılması için sekans analizine gönderilmiştir. Çalışmada her popülasyondan iki gen bölgesi için beşer örneğin DNA sekans analizi hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Fragment analiz cihazında elde edilen mikrosatellit verileri Excel'e CONVERT programı (Glaubitz 2004) formatında girilmiştir. Allel frekansları ve özgün allel sayıları ile verilerin diğer programların formatına dönüştürülmesi CONVERT programı ile yapılmıştır. Popülasyonlardaki temel genetik çeşitlilik parametreleri (Allel genişliği-AG, Allel sayısı-Na, Etkili allel sayısı-Ne, Gözlenen Heterozigotluk-Ho ve Beklenen Heterozigotluk-He) POPGENE (Yeh ve ark., 1997) programıyla, Polimorfik Bilgi İçeriği (PIC) değerleri POWERMARKER (Liu ve Muse 2005) programıyla ve Akrabalı Yetiştirme Katsayısı (Fis) FSTAT v.1.2 (Goudet 1995) programıyla hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası genetik farklılaşma değerleri (ikişerli F_{ST}) Arlequin (Excoffier ve ark., 2006) paket programı ile belirlenmiştir.

mtDNA gen bölgelerine ait sekanslar ClustalX2 programı (Larkin ve ark., 2007) kullanılarak hizalanmıştır. Ardından çalışılan mtDNA gen bölgelerinin bombus arılarına ait olup olmadığı BLAST 2.2.20 (Zhang ve ark., 2000) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Her bir örneğin kimliği ve primerlerin doğru sonuçlar verdiğinin kesinleştirilmesinden sonra iki gen bölgesi için de tüm sekans bilgileri MEGA6 programına (Tamura ve ark., 2013) yüklenerek DNA dizi hizalaması yapılmıştır. SNP bölgelerinin tespiti için sekanslar DnaSP v.5 (Rozas ve ark., 2010) yazılımına yüklenmiş ve haplotipler oluşturulmuştur. Daha sonra haplotip bilgileri Arlequin 2.00 (Excoffier ve ark., 2006) yazılımında istatistiki analizler için kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Yapılan araştırmada Termesos popülasyonunda 20 mikrosatellit lokusta elde edilen genetik çeşitlilik parametreleri, PIC değerleri ve akrabalı yetiştirme katsayıları Tablo 2'de verilmiştir. Termesos popülasyonunda gözlenen allel sayısı en düşük 4 ile B119 ve BTMS0082 lokuslarında, en yüksek ise 18 allel ile BTMS0131 lokusunda elde edilmiştir. Lokus başına gözlenen allel sayısı 12, lokus başına ortalama etkili allel sayısı ise 8,21 olarak hesaplanmıştır. Termesos popülasyonunda tüm lokuslarda PIC değeri 0,50'den yüksek ve ortalama 0,83 olarak hesaplanmıştır. Ho değerlerinin 0,27 (BT28) ile 0,93 (B132) aralığında, He değerlerinin ise 0,65 (BTMS0082) ile 0,93 (BT09) aralığında değiştiği görülmüştür. Ortalama Ho ve He değerleri sırasıyla 0,68 ve 0,87 olarak hesaplanmıştır. TM popülasyonunda çalışılan 20 mikrosatelit lokusta Fis değeri en düşük B132 lokusunda (-0,02), en yüksek ise BTMS0082 lokusunda (0,70) tespit edilirken ortalama Fis değeri 0,22 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.Termesos popülasyonunda 20 mikrosatellit lokus için genetik çeşitlilik parametreleri
Table 2. Genetic diversity parameters for 20 microsatellite loci in Termessos population

Lokus	N	AG	Na	Ne	H_o	H_e	PIC	F_{is}
B100	30	150-176	11	8,70	0,73	0,90	0,87	0,19*
BTMS0033	29	208-220	5	3,41	0,55	0,72	0,66	0,24*
BTMS0119	30	332-378	14	8,78	0,77	0,90	0,88	0,15*
B119	28	130-136	4	3,19	0,36	0,70	0,63	0,49**
BT28	22	178-199	8	5,04	0,27	0,82	0,78	0,67**
BTMS0131	29	206-328	18	8,72	0,45	0,90	0,88	0,51**
BT20	28	121-147	13	10,05	0,86	0,92	0,89	0,07
B126	29	158-198	15	10,38	0,93	0,92	0,90	-0,01
BTMS0045	29	236-288	14	9,78	0,69	0,91	0,89	0,25**
BT26	30	115-163	17	12,68	0,80	0,94	0,92	0,15*
B96	30	224-246	9	6,98	0,50	0,87	0,84	0,43**
BT06	24	142-164	11	8,86	0,71	0,91	0,88	0,22*
B124	25	238-272	16	9,69	0,88	0,92	0,89	0,04
BT09	28	144-186	16	12,06	0,93	0,93	0,91	0,01
B118	25	209-243	14	10,00	0,76	0,92	0,89	0,17*
B132	30	153-179	14	10,47	0,93	0,92	0,90	-0,02
B11	25	146-172	12	7,18	0,80	0,88	0,85	0,09
BTMS0082	25	396-411	4	2,75	0,20	0,65	0,56	0,70**
BT10	25	141-167	14	9,77	0,88	0,92	0,89	0,04
BTMS0124	27	244-268	11	5,79	0,67	0,84	0,81	0,21*
Ortalama±Std.Sap.			12,00± 0,15	8,21±0,86	0,68±0,22	0,87±0,08	0,83±0,10	0,22**

(**P<0,01; *P<0,05, Hady-Weinberg dengesinden sapma önemli); N: Her bir lokusta kullanılan toplam örnek sayısı; AG: Allel genişliği; Na: Allel sayısı; Ne: Etkili allel sayısı; H_O: Gözlenen heterozigotluk; H_E: Beklenen heterozigotluk. PIC: Polimorfik bilgi içeriği. F_{IS}: Akrabalı yetiştirme katsayısı

Tablo 3. Faselis popülasyonunda 20 mikrosatellit lokus için genetik çeşitlilik parametreleri
Table 3. Genetic diversity parameters for 20 microsatellite loci in Phassalis population

Locus	N	AG	Na	Ne	Ho	He	PIC	Fis
B100	28	152-176	11	8,62	0,57	0,90	0,87	0,37**
BTMS0033	29	205-220	6	4,47	0,52	0,79	0,74	0,35**
BTMS0119	28	330-360	15	11,28	0,64	0,93	0,91	0,31**
B119	28	130-136	4	2,89	0,46	0,67	0,60	0,31**
BT28	26	178-199	7	5,50	0,23	0,83	0,79	0,73**
BTMS0131	32	206-328	16	5,31	0,41	0,82	0,79	0,51**
BT20	23	121-147	9	7,84	0,83	0,89	0,86	0,08
B126	23	166-196	12	8,02	0,83	0,89	0,86	0,08
BTMS0045	31	222-292	14	9,20	0,71	0,91	0,88	0,22**
BT26	27	115-137	11	8,10	0,93	0,89	0,86	-0,04
B96	25	224-246	9	6,19	0,60	0,86	0,82	0,30**
BT06	31	140-156	9	5,64	0,68	0,84	0,80	0,19*
B124	29	244-278	16	11,93	0,86	0,93	0,91	0,08
BT09	31	136-180	19	15,02	0,58	0,95	0,93	0,39**
B118	29	189-243	15	10,85	0,62	0,92	0,90	0,33**
B132	25	145-183	17	10,68	0,88	0,92	0,90	0,05
B11	28	146-176	15	9,62	0,68	0,91	0,89	0,26**
BTMS0082	27	391-416	6	3,56	0,56	0,73	0,68	0,25**
BT10	25	143-167	12	9,62	0,96	0,91	0,89	-0,05
BTMS0124	27	246-278	12	7,48	0,48	0,88	0,85	0,46**
Ortalama ± St. Sapma			11,00±4,07	8,09±3,06	0,65±0,18	0,87±0,07	0,84±0,08	0,26**

(**P<0,01; *P<0,05, Hady-Weinberg dengesinden sapma önemli); N: Her bir lokusta kullanılan toplam örnek sayısı; AG: Allel genişliği; Na: Allel sayısı; Ne: Etkili allel sayısı; HO: Gözlenen heterozigotluk; HE: Beklenen heterozigotluk. PIC: Polimorfik bilgi içeriği. FIS: Akrabalı yetiştirme katsayısı

Faselis popülasyonunda elde edilen genetik çeşitlilik parametreleri, PIC değerleri ve akrabalı yetiştirme katsayıları Tablo 3'de verilmiştir. Faselis popülasyonunda gözlenen allel sayıları 4 (B119) ile 19 (BT09) aralığında değişirken, etkili allel sayıları 2,89 (B119) ile 15,02 (BT09) aralığında değişmiştir. Lokus başına düşen ortalama allel ve etkili allel sayıları sırasıyla 11 ve 8,09 olarak hesaplanmıştır. Lokus başına ortalama PIC değeri 0,84 olarak saptanmıştır. Faselis popülasyonunda en düşük ve en yüksek gözlenen heterozigotluk değerleri sırasıyla BT28 (0,23) ve BT10 (0,96) lokuslarında, en düşük ve en yüksek beklenen heterozigotluk değerleri ise sırasıyla B119 (0,67) ve BT09 (0,95) lokuslarında tespit edilmiştir. Ortalama Ho ve He değerleri sırasıyla 0,65 ve 0,87 olarak hesaplanmıştır. Faselis popülasyonundaki akrabalı yetiştirme katsayısı en düşük BT10 lokusunda (-0,05), en yüksek BT28 lokusunda (0,73) saptanırken, tüm lokusların ortalaması 0,26 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmada 20 mikrosatelit lokusun polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada Termesos (0,83) ve Faselis (0,84) popülasyonlarında elde edilen ortalama PIC değerleri Moreira ve ark. (2015) tarafından bildirilen PIC değerleri (0,85) ile benzerlik gösterirken, Dreier ve ark., (2014) ile Jha ve Kremen (2013) tarafından bildirilen PIC değerinden (sırasıyla 0,79 ve 0,72) yüksektir. PIC değerleri çalışılan lokusların genetik çeşitliliği belirlemedeki gücünü ifade etmektedir. Bu çalışmada elde edilen PIC değerleri lokus seçimin doğru olduğunu ve seçilen lokusların bombus arılarında genetik çeşitliliğin belirlenmesi için kullanışlı markerler olduğunu ifade etmektedir.

Sonuçlar Termesos popülasyonunda belirlenen ortalama Ho (0,68) ve He (0,87) değerleri ile Faselis popülasyonunda belirlenen ortalama Ho (0,65) ve He (0,87) değerlerinin oldukça benzer olduğunu göstermektedir. Bu değerler Schmid-Hempel ve ark. (2007) tarafından Tazmanya ve Yeni Zelanda popülasyonu için bildirilen Ho değerlerinden (sırasıyla 0,53 ve 0,73) ve Lozier ve ark. (2011) tarafından Kuzey Amerika bombus popülasyonları için bildirilen Ho (0,53-0,77 arası) değerlerinden yüksektir. Ancak çalışmada tespit edilen Ho değeri Dreir ve ark. (2014)'nin *B. terrestris* popülasyonu için bildirdikleri ortalama Ho (0,79) değerlerinden düşük, Goulson ve ark. (2011) tarafından *B. hortorum* popülasyonunda bildirilen Ho (0,65) değeri ile Moreira ve ark. (2015) tarafından *B. terrestris* popülasyonunda bildirilen Ho (0,63) değerine ise benzerdir.

Termesos popülasyonunda elde edilen temel genetik çeşitlilik parametreleri (Na:12; Ne:8,21; Ho:0,68 ve He:0,87) ile Faselis popülasyonunda elde edilen temel genetik çeşitlilik parametreleri (Na:11; Ne:8,09; Ho:0,65 ve He:0,87) popülasyonlarda genetik çeşitliliğin yeterli seviyelerde olduğuna işaret etmektedir. Ancak her iki popülasyonda da akrabalı yetiştirme katsayısı heterozigot eksikliğine bağlı olarak yüksek çıkmıştır. Fis değeri Faselis popülasyonunda 0,22 iken Termesos popülasyonunda 0,26 olarak belirlenmiştir. Herrmann ve ark. (2007)'de on üç farklı lokasyondan toplanan *B. pascuorum* popülasyonlarında Fis değerlerini -0,074 ile 0,356 aralığında, ortalamasının ise 0,193 olduğunu bildirmişlerdir. Goulson ve ark. (2011) tarafından *B. hortorum* popülasyonları için Fis değerleri -0,032 ile 0,248 arasında saptanırken ortalaması 0,11 olarak hesaplanmıştır. Moreira ve ark. (2015)'de yirmi dört bombus popülasyonunda Fis değerlerinin 0,06 ile 0,60 arasında değiştiğini, ortalamasının ise 0,20 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışılan iki popülasyonda elde edilen yüksek akrabalığın Termesos ve Faselis bölgelerinin coğrafi yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu popülasyonlar Antalya ilindeki diğer bombus popülasyonlarına göre daha izole bir alanda yaşamaktadır.

Ancak tespit edilen akrabalık seviyesi yüksek olmakla beraber popülasyonların geleceğini tehdit edecek seviyelerde olmadığı anlaşılmaktadır. Fis değerinin 0,05'in altında olması ırkların tehlike altında olmadığını, 0,05 ile 0,15 aralığında olması tehlike potansiyeli olduğunu, 0,15 ile 0,25 olması minimum tehlike seviyesi, 0,25-0,40 arasında olması tehlike altında olduğunu, 0,40'ın üzerinde olması ise kritik seviyeye ulaşıldığını ve popülasyonda koruma çalışmalarına başlanılması gerektiğini ifade etmektedir (Simon ve Buchenauer, 1993).

Gürel ve ark., (2008) Termesos ve Faselis bölgelerinde yaptıkları gözlemsel araştırmada yerel *B. terrestris* popülasyonları arasında çeşitli yaşam döngüsü özellikleri (diyapozdan çıkış tarihleri, cinselliğin ortaya çıktığı tarihler ve yaşam döngülerinin uzunluğu vs.) bakımından farklılıklarının olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın ana amacını oluşturan Faselis ve Termesos bölgelerinde bulunan yerel *B. terrestris* popülasyonları arasında genetik farklılıkların olup olmadığını belirlemek için öncelikle mikrosatellit lokuslar ile ikişerli F_{ST} ve özgün allel sayıları incelenmiştir. Termesos ve Faselis popülasyonları arasında 20 mikrosatellit lokus ile hesaplanan ikişerli F_{ST} değeri 0,023 olarak belirlenmiş ve elde edilen değer istatistiki olarak önemsiz (P>0,05) bulunmuştur. Popülasyonlar arası genetik farklılaşmanın bir diğer göstergesi de özgün allellerdir. Sadece bir popülasyonda bulunan allellere özgün (private-benzersiz) allel denilmektedir. Popülasyonlar arasında genetik farklılaşma arttıkça özgün allel sayısı artmakta, azaldıkça özgün allel sayısı azalmaktadır (Petit ve ark., 1998). Genellikle bir allelin özgün olarak kabul edilmesi için frekansının %10'un üzerinde olması istenir. Çünkü daha düşük frekanslar fragment analiz cihazı kaynaklı hatalardan kaynaklanabilmektedir. Bu çalışmada 20 mikrosatellit lokus için frekansı %10' un üzerinde olan 7 özgün allel tespit edilmiştir. Bu rakam ikişerli F_{ST} değerine benzer olarak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın önemsiz olduğuna işaret etmektedir.

Termesos ve Faselis popülasyonlarında genetik farklılıklar olup olmadığı mikrosatellit markerlerin yanı sıra mtDNA markerleri kullanılarak da incelenmiştir. Bu amaçla mtDNA COI ve cytb gen bölgeleri çoğaltılmış ve her iki popülasyondan beşer örneğin sekans analizi yaptırılmıştır. Analizler sonucunda mtDNA COI gen bölgesi için 633 bç'lik sekansın, cytb bölgesi için 428 bç'lik sekansın kullanılabileceği anlaşılmıştır. mtDNA COI ve cytb gen bölgeleri için elde edilen sekans dizileri sırasıyla Tablo 4 ve Tablo 5'de verilmiştir.

Bombus arıları mtDNA COI gen bölgesinde yapılan daha önceki çalışmalarda COI gen bölgesi için iki haplotip tespit edilmiştir (Moreira ve ark., 2015; Bossert ve ark., 2016). Haplotip A ve B şeklinde adlandırılan bu haplotiplere ait DNA dizileri Gen Bankasında sırasıyla KP670306.1, KP670307.1 numaralarıyla girilmiştir. Bu çalışmada Termesos ve Faselis popülasyonlarında sekans analizi yapılan tüm örnekler Haplotip B ile %100 oranında benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla mtDNA COI gen bölgesi bakımından çalışılan popülasyonlarda hiçbir farklılık bulunmamıştır.

Bu çalışmada mtDNA cytb gen bölgesinin dizi analizi ile toplam 4 farklı haplotip (Haplotip 1-4) belirlenmiş ve Tablo 6'da bu haplotiplere ait nükleotit farklılıkları gösterilmiştir. Faselis popülasyonunda bir örnek haplotip 1, dört örnek ise haplotip 2'de yer almıştır. Termesos popülasyonunda ise 3 örnek haplotip 2, bir örnek haplotip 3 ve bir örnekte haplotip 4'de yer almıştır.

Tablo 4. COI gen bölgesi için elde edilen 633 bç'lik nükleotit dizisi
Table 4. Nucleotide sequence of 633 bp obtained for COI gene region

NP	Nükleotid Dizisi
1-60	GGATTGGGTC TCCTCCTCCT ATTGGGTCAA AAAATGAAGT ATTAAAATTT CGATCAAATA
61-120	ATAATATAGT AATTGCACCG GCTAATACTG GTAAAGATAG AATTAATAAA ATTACTGTAA
121-180	TACATACTGA TCATGAAAAT AAATTAATTT GATCATAATT TAATGAAAAA TTTTTTATTAA
181-240	TAAAATAGTA ACGATAAAAT TTAATGATCC AATAATTGAA GAGATTCCTG ATATATGTAA
241-300	AGAAAAAATT GCAATATCAA TTGAAGGTGA TGAATGAAAT AAATAAGAAG ATAAAGGAGG
301-360	ATATACAGTT CATCCTGTAC CTACATTAGG TGTAAATATA TTTCTTAATA ATAATATGAA
361-420	TAATGATGGA GGTAGAAGTC AAAATCTAAT ATTATTTATT CGAGGAAAA GCTATATCTG
421-480	GGGATCCTAA TATTAATGGA ATTAGATAAT TTCCAAATCC ACCAATTATA AAAGGTATAA
481-540	CTATAAAAAA AATTATTAAA AATGCATGTC TTGTTACTAA AGAATTATAA ATTTGATCAT
541-600	TATTAATTCA TATACCTGGA TGTCTTAATT CTATTCGAAT TAATAATCTT ATAGATGAAC
601-633	CAATTATTCC TGATCATATA GCAAAAATAA AGT

NP: Nükleotid Yerleşimi

Tablo 5. Cytb gen bölgesi için elde edilen 428 bç'lik nükleotit dizisi
Table 5. Nucleotide sequence of 428 bp obtained for cytb gene region

NP	Nükleotid Dizisi
1-60	TCACAAATTT AATTTCAGCA ATTCCATATA TTGGTCAATT TACTGTTGAA TGAATTTGAG
61-120	GAGGATTTTC AATCAATAAT GATACATTAA ATCGATTTTA TTCATTTCAT TTTATTTTAC
121-180	CATTTATTAT TTTATTAATA GTATTTATAC ATTTAATAAT TTTACACATT ACAGGTTCTT
181-240	CAAACCCTAT CCATTCAAAA ATAAATATTT ATAAAATCAA TTTCCATCCA TATTTCACTA
241-300	TTAAAGATTT AATTACTATT ATTTTTACAT TTTCAATATT TATATTAATT AATTTACAAT
301-360	TACCTTTTAT ATTAGGAGAT CCTGATAATT TTAAAATAGC AAATCCTATA ATTACACCAA
361-420	TTCATATTAA ACCTGAATGA TACTTCTTAT TTGCATATTC AATTTTACGA ACAATTCCTA
421-428	ATAAATTA

NP: Nükleotid Yerleşimi

Tablo 6. MtDNA cytb gen bölgesine ait haplotipler
Table 6. Haplotypes belonging to mtDNA cytb gene region

	Haplotip 1	Haplotip 2	Haplotip 3	Haplotip 4
1-79 bç	…	…	…	…
80. nük.	T	T	T	C
81-131 bç	…	…	…	…
132. nük.	T	C	C	T
133-166 bç	…	…	…	…
167. nük.	C	C	C	T
168-184 bç	…	…	…	…
185. nük.	C	C	C	T
186-190 bç	…	…	…	…
191. nük.	C	C	C	T
192-211 bç	…	…	…	…
212. nük.	T	T	T	C
213-235 bç	…	…	…	…
236. nük.	C	C	C	T
237-253 bç	…	…	…	…
254. nük	T	C	T	C
255-256 bç	…	…	…	…
257. nük	T	T	T	C
258-272 bç	…	…	…	…
273. nük	T	T	T	A
274-314 bç	…	…	…	…
315. nük	G	G	G	A
316-382 bç	…	…	…	…
383. nük.	C	C	C	T
384.428 bç	…	…	…	…

Haplotip çeşitliliği (Hd), nükleotit çeşitliliği (π) ve nükleotit farklılıklarının ortalaması (k) Termesos popülasyonunda sırasıyla 0,334, 0,002336 ve 1,000 olarak, Faselis popülasyonunda ise sırasıyla 0,267, 0,001869 ve 0,800 olarak hesaplanmıştır. Termesos ve Faselis popülasyonları arasında mtDNA cytb bölgesine göre hesaplanan ikişerli F_{ST} değeri 0,0013 olarak belirlenmiş ve elde edilen değer istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$).

Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen bulgular Antalya ili Termesos ve Faselis bölgelerindeki doğal *B. terrestris* popülasyonlarında yeterli genetik varyasyonun olduğunu ortaya koymuştur. Daha önceki çalışmada estivasyon ve hibernasyon gösterdiği bildirilen bu iki doğal *B. terrestris* popülasyonu arasında incelenen 20 mikrosatellit ve iki mtDNA lokus bakımından önemli genetik farklılıklar tespit edilmemiştir. Farklı doğal popülasyonlar arasında yaşam döngüsü bakımından gözlemlenen farklılıkların genetik etkilerden çok çevresel faktörler (fotoperiyod, sıcaklık, nem, yükseklik, bitki örtüsü vs.) ile şekillendiği anlaşılmaktadır. Ancak bu popülasyonların genetik yapılarının özellikle Yeni Nesil Sekans analizlerinden elde edilebilen yüksek yoğunluktaki tek nükleotit polimorfizm verileri ile karşılaştırılması da bilimsel değerlendirme açısından fayda sağlayacaktır.

Teşekkürler

Bu makalede kullanılan iki popülasyona ait veriler birinci yazarın doktora tezinden elde edilmiştir. Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-1568 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Aytekin AM. 2001. Bombus Arılarının Türkiye'deki Durumu ve Geleceği. Teknik Arıcılık, 74: 16-20.

Beekman M, Van Stratum P, Lingeman R. 1998. Diapause survival and post diapause performance in bumblebee queens. Entomol Exp Appl, 89: 207-214. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1998.00401.x

Bossert S, Gereben-Krenn BA, Neumayer J, Schneller B, Krenn HW. 2016. The Cryptic *Bombus lucorum* Complex (Hymenoptera: Apidae) in Austria: Phylogeny, Distribution, Habitat Usage and a Climatic Characterization Based on COI Sequence Data. Zool Stud, 55: 13. DOI: 10.6620/ZS.2016.55-13.

Coppee A. 2010. A complex species or a species complex? Intraspecific pheromonal and genetic variations of *Bombus terrestris* (L.). PhD thesis, Laboratoire de Zoologie, Université de Mons, Belgium, 120 pp.

Dafni A. 1998. "The threat of *Bombus terrestris* spread". Bee World, 79: 113-114. DOI: 10.1080/0005772X. 1998.11099392.

Dafni A, Kevan P, Gross C, Goka K. 2010. "*Bombus terrestris*, pollinator, invasive, and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes". Appl Entomol Zool., 45(1): 101-113. DOI: 10.1303/aez.2010.101.

Denlinger DL. 2002. Regulation of Diapause. Annu Rev Entomol., 47: 93-122. DOI: 10.1146/annurev.ento. 47.091201.145137.

Denlinger DL. 2008. Why study diapause? Entomol Res., 38: 1-9. DOI: 10.1111/j.1748-5967.2008.00139.x.

Dreier S, Redhead JW, Warren IA, Bourke AFG, Heard MS, Jordan WC, Sumner S, Wang JI Carvell C. 2014. Fine-scale spatial genetic structure of common and declining bumble bees across an agricultural landscape. Mol Ecol, 23: 3384-3395. DOI: 10.1111/mec.12823.

Estoup A, Scholl A, Pouvreu A, Solignac M. 1995. Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera; Bombinae) as evidenced by highly variable microsatellites. Mol Ecol, 4: 89-93.DOI: 10.1111/j.1365-294x.1995.tb00195.x

Estoup A, Solignac M, Cournet JM, Goudet J, Scholl A. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. Mol Ecol, 5(1): 19-31. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1996. tb00288.x

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2006. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. University of Bern, Institute of Zoology, Switzerland. http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3.

Funk CB, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. 2006. Microsatellite loci for *Bombus* spp. Mol Ecol Not., 6: 83-86. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01147.x

Glaubitz JC. 2004. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Mol Ecol Not., 4(2): 309-310. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00597.x

Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. J Hered., 86: 485-486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627.

Goulson D, Kaden JC, Lepais O, Lye GC, Darvill B. 2011. Population structure, dispersal and colonization history of the garden bumblebee *Bombus hortorum* in the Western Isles of Scotland. Conserv Genet, 12: 867-879. DOI: 10.1007/s10592-011-0190-4.

Gürel F, Gösterit A, Eren Ö. 2008. Life-cycle and foraging patterns of native *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in the Mediterranean region. Insect Soc., 55: 123-128. DOI: 10.1007/s00040-008-0984-7.

Hermann F, Westphal C, Robin FA, Moritz-Steffan-Dewenter I. 2007. Genetic diversity and mass resources promote colony size and forager densities of a social bee (*Bombus pascuorum*) in agricultural landscapes. Mol Ecol, 16: 1167-1178. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03226.x.

Jha S, Kremen C. 2013. Bumble bee foraging in response to landscape heterogeneity. Proc Natl Acad Sci., 8: 555-558.

Kaftanoğlu O. 2000. The diversity and faunistics of bumblebees for pollination in greenhouses. Insect pollination in Greenhouses: proceedings of the specialists. Meeting held in Soesterberg, The Netherlands, 30 September to 2 October 1999. Universiteit Utrecht, 220 pp.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal version 2.0. Bioinformatics, 23(21): 2947-2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.

Liu K, Muse S. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 21: 2128-2129. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti282.

Lozier JD, Strange JP, Stewart, IJ, Cameron SA. 2011. Patterns of range-wide genetic variation in six North American bumble bee (Apidae: Bombus) species. Mol Ecol, 20: 4870-4888. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05314.x.

Moreira AS, Horgan FG, Murray TE, Kakouli T. 2015. Population genetic structure of *Bombus terrestris* in Europe: Isolation and genetic differentiation of Irish and British populations. Mol Ecol, 24: 3257-3268. DOI: 10.1111/mec.13235.

Özbek H. 1997. Bumblebee fauna of Turkey with distribution maps (Hymenoptera: Apidae, Bombinae) Part 1: Alpigenobombus Skorikov, Bombias Robertson and *Bombus latreille*. Turk Entomoloj Dergisi, 21(1): 37-56. Kayıt no: 20097200234.

Petit R, Mousadik AE, Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv Biol.12: 844-855. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1998.96489.x

Rasmont P, Flagothier D. 1996. Biogéographie et choix floraux des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Turquie", N.A.T.O.-O.T.A.N. TU-Pollination Project rapportpréliminaire, Université de Mons-Hainaut, Çukurova Üniversitesi, Adana, pp. 69.

Rasmont P, Aytekin AM, Kaftanoğlu O, Flagothier D, 2009**.** The bumblebees of Turkey. Atlas Hymenoptera, Université de Mons, Gembloux Agro-Biotech, Mons, Gembloux. http://www.atlashymenoptera.net/page.asp? ID=103.

Rozas J, Librado P, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R**.** 2010. Universitat de Barcelona Current Released Version: 5.10.1.

Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Brunner PC, Seman OD, Allen GR. 2007. Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. Heredity, 99: 414-422. DOI: 10.1038/sj.hdy.6801017.

Simon DL, Buchenauer D. 1993. Genetic diversity of European livestock breeds. Results of Monitoring by the EAAP Working Group on Animal Genetic Resources; EAAP Animal Genetic Data Bank, Institute of Animal Breeding and Genetics, School of Veterinary Medicine, Hannover, EAAP Publication, No. 66, Wageningen Pers, Wageningen, 591 pp.

Stolle E, Rohde M, Vautrin D, Solignac M, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Moritz RAF. 2009. Novel microsatellite DNA loci for *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758). Mol Ecol Resour., 9(5): 1345-1352. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02610.x.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Stecher G, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol., 30(12): 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.

Velthuis HHW, Van 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. DOI: 10.1051/apido:2006019.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques, 7: 506-513.

Williams PH, Thorp R, Richardson L, Colla S. 2014. Bumble bees of North America. Princeton University Press, Princeton. ISBN: 9780691152226.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Zhang Z, Schwartz L. Wagner, Miller W. 2000. A greedy algorithm foraligning DNA sequences. J Comput Biol., 7: 203-214. DOI: 10.1089/10665270050081478.