DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

BAZI ÖNEMLİ BOMBUS ARISI (*Bombus terrestris* L.) PARAZİTLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Identification of Some Important Bumblebee (*Bombus terrestris* L.) Parasites by Molecular Methods

(Extended Abstract can be found a the end of the Article)

Bahar ARGUN KARSLI[1*], Fehmi GÜREL[2]

[1*]Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Antalya, bhrargun@akdeniz.edu.tr

[2]Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi: 10.10.2014, Kabul Tarihi: 17.12.2014

ÖZ

Bombus arıları tarımsal ve doğal ekosistemlerin en önemli tozlaştırıcıları arasındadır. Ancak son yıllarda doğal bombus arısı populasyonları ve tür çeşitliliği bütün dünyada azalmaktadır. Bu durumun nedenlerinden biri olarak patojenler gösterilmektedir. En sık bildirilen bombus arısı patojenleri *Nosema bombi,Crithidia bombi, Apicystis bombi* mikrosporları ve bir trake akarı olan *Locustacarus buchneri'*dir. Genellikle bu parazitler koloni kurma, hayatta kalma ve üreme üzerine olumsuz etkilere sahiptirler. Bu nedenle, bombus arısı parazitlerinin doğru bir şekilde tanımlanması çok önemlidir. Günümüzde enfekte bombus arılarını belirlemek amacıyla, güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilen moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu derlemede, bombus arılarında en yaygın görülen parazitler ve moleküler yöntemlerle tespitleri hakkında bilgiler özetlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Bombus arısı, moleküler tespit, *Nosema bombi, Crithidia bombi, Locustacarus buchneri,*

ABSTRACT

Bumblebees are among the most important pollinators in agricultural and natural ecosystems. On the other hand in recent years, the natural abundance and diversity of bumblebee species is in decline all over the world. One of reasons for this situation is shown as pathogens. The most commonly reported bumblebee protozoan pathogens are the microsporodium *Nosema bombi,Crithidia bombi, Apicystisbombi* and the tracheal mite, *Locustacarus buchneri.* Generally,these parasites have detrimental effects on colonization, survival and reproduction. Therefore, the accurately identification and control of bumble bee diseases and parasites are very important. Today, in order to identify infected bumblebees molecular methods have been developed to provide highly sensitive, reliable and fast results. In this review, the most common bumblebees diseases, ways of spread and identified by molecular methods are summarized.

Keywords: Bumblebee, molecular identification, *Nosema bombi, Crithidia bombi, Locustacarus buchneri*

GİRİŞ

Dünya üzerinde yaklaşık 20 bin türü tanımlanan arılar, doğal florada genetik çeşitliliğin ve üremenin kültür bitkilerinde ise verimliliğin sağlanmasında etkilidirler (Michener,2000). Bal arılarına göre daha iri yapılı, yoğun tüylü ve göz alıcı renklere sahip olan bombus arıları bal arılarından sonra hem doğal hem de kültüre alınmış bitkilerin en önemli tozlaştırıcılarıdır. Yaklaşık 250 türü tanımlanan bombus arıları başta Avrupa olmak üzere Asya, Kuzey Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir yayılma alanına sahiptir (Wildmer ve ark.,1998; Goka ve ark., 2001). Tozlaşmadaki önemleri yaklaşık yüz yıl önce belirlenen bombus arıları, geçtiğimiz 25 yıldır kitlesel olarak üretilmekte ve örtüaltı yetiştiricilikte tozlaştırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Dünyada ticari olarak yılda bir milyondan fazla bombus arısı üretilmekte bunun da % 90'nından fazlasını *B. terrestris* türü oluşturmaktadır (Velthuis ve Dorn, 2006)

Bombus arıları, yaşam dönemlerinin farklı evrelerinde çok çeşitli iç ve dış parazitler, protozoa, virüs ve bakteri gibi hastalık yapan organizmaların saldırısı altındadır(Macfarlane ve ark., 1995). Doğal ve ticari bombus populasyonlarında yaygın olarak bulunan bu patojenler genellikle bombus ana arılarının yuva kuramamalarına ya da ölmesine neden olmaktadır. Ayrıca kitlesel üretim yapan işletmelerde bu patojenlerin bulunması büyük ölçeklerde arı ölümlerine, verimliliğin düşmesine ve maliyetlerin artmasına yol açmaktadır(Eldeniz ve ark., 2006).

Son yıllarda bombus arısı türlerinde sayısal olarak azalış ve yerel yok oluşlar bildirilmiştir. İngiltere'de altı bombus türüne ait populasyonlarda önemli azalma saptanmış (Williams ve Osborne, 2009), Avrupa kıtasında dört türün yok olmaya başladığı(Kosior ve ark., 2007), Britanya adalarında ise iki türün tamamen yok olduğu belirtilmiştir (Goulson ve ark., 2008). Kuzey Amerika ve İrlanda'da da benzer şekilde bombus populasyonlarının azaldığı saptanmıştır(Fitzpatrick ve ark., 2007; Grixti ve ark. 2009). Habitat parçalanması, pestisit kullanımı ve yanlış tarımsal uygulamalar bu azalış ve yok oluşların önemli sebepleri arasında sayılırken, son yıllarda yapılan çalışmalarla parazit ve patojenlerin de önemli miktarda koloni kayıplarına yol açtığı belirlenmiştir. (Cox-Foster ve ark. 2007; Goulson ve ark. 2008; Cameron ve ark. 2011).

Bombus arısı kolonilerinin uluslararası ticaretinin güvenilir bir şekilde yapılabilmesi ve yerel türlerin zarar görmesini engellemek için patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir. Günümüzde, enfekte arıların tespiti mikroskobik ve moleküler teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Patojenlerin mikroskobik olarak tespitinin doğruluğu ve hassasiyeti tartışmaya açıktır (Weiss 1995). Moleküler yöntemlerde ise, patojenlerin ribozomal RNA (rRNA), ribozomal DNA (rDNA) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz 1 (CO1) gen parçalarının PCR tekniği ile çoğaltılmasına dayalı daha doğru ve güvenilir olarak tespiti yapılabilmektedir(Weiss ve Vossbrinck 1999; Goka ve ark., 2006). Bu çalışmada; bombus arılarında yaygın görülen parazitler, semptomlarıve moleküler yöntemlerle tespitleri hakkında bilgiler derlenmiştir.

BOMBUS ARILARINDA YAYGIN GÖRÜLEN PARAZİT VE HASTALIKLAR

Doğadaki tüm canlılarda olduğu gibi bombus arılarında da hastalık yapıcı veya öldürücü çok sayıda iç-dış parazitler ve patojenler saptanmıştır. En sık bildirilen bombus arısı patojenleri *Nosema bombi*, *Crithidia bombi*(Lipa ve Triggiani, 1980),*Apicystis bombi (Mattesia bombi)* (Liu ve ark., 1974; Lipa ve Triggiani, 1992), protozoaları ve bir trake akarı olan *Locustacarus buchneri*'dir(Baker ve Wharton, 1952). Bu patojenler çoğunlukla bombus ana arılarının yuva kuramamalarına, ömürlerinin kısalmasına, yuva kuranların ise yavrularının gelişmemesine, ana arıların ölmesine ve kolonilerin sönmesine neden olmaktadır.

Nosema bombi ilk kez Fantham ve Porter tarafından 1914 yılında zorunlu hücre-içi paraziti olarak tanımlanmıştır. *N. bombi* bombus arılarında oldukça yaygındır ve konak içinde spor formunda bulunmaktadır. *N. bombi* sporlarının boyutlarının 2.66-7.35 µm arasında değiştiği ve her birinin 1-4 çekirdekli, oval ya da füze görünümünde olduğu belirtilmiştir(Shykoff ve Schmid-Hempel, 1991; Macfarlane ve ark., 1995). İlk olarak malpighi tüpleri ve orta bağırsak dokularını enfekte etmektedirler (McIvor ve Malone, 1995). Ayrıca kas dokusu, yağ dokusu, trake ve beyin dahil sinir dokularını da enfekte ettikleri tespit edilmiştir. *N. bombi* 'nin etkisi öldürücüden çok kroniktir ve enfekte bireyler hiçbir dış belirti göstermemektedir (McIvor ve Malone, 1995; Fries ve ark. 2001; Larsson 2007). Hatta çok ağır enfekte bireyler bile normal davranışlar gösterebilir (Otti, 2008).*Nosema'* lı bombus arılarının yaşayabilirliğinin azaldığı, ömürlerinin kısaldığı ve enfekte kolonilerde daha az kraliçe üretildiği ve kraliçelerin koloni kurma özelliklerinin önemli ölçüde azaldığı saptan-

mıştır (Eijnde ve Vette 1993; Otti ve Schmid-Hempel 2007; Van der Steen 2008).*N. bombi* sporları enfekte olmuş kraliçe, işçiler veya enfekte yiyecekler aracılığıyla koloni içinde yayılmaktadır (Fisher ve Pomeroy 1989; Rutrecht ve ark. 2007; Van der Steen 2008).

Kamçılı bir trypanozom olan ***Crithidia bombi***, bombus arılarında görülen diğer bir yaygın protozoadır.*C. bombi* sporlarının konak üzerinde çok hızlı çoğaldığı ve konağına çok çabuk uyum sağladığı belirtilmiştir. Böylece parazitin neden olduğu enfeksiyon koloni içinde kolayca yayılmaktadır(Imhoof ve Schmid-Hempel 1998).*N. bombi*' nin aksine hücre dışı parazit olan *C. bombi* genellikle orta bağırsak ve rektum duvarını enfekte etmektedir. *C. bombi* koloni üretimi ve işçilerin yiyecek arama davranışlarını etkilerken, ömür uzunluklarını etkilememekte ve tek başına ölümlerine sebep olmamaktadır (Shykoff ve Schmid-Hempel 1991; Schmid-Hempel ve Durrer 1991; Gegear ve ark. 2005). Ancak, işçi arıların yumurtalıkları geliştiğinden koloni büyüme hızı yavaşlamakta ve koloni gücü azalmaktadır(Brown ve ark. 2003;Otterstatter ve Thomson 2006).*C.bombi* sporları hem koloni içinde hem de toplayıcı işçiler tarafından çiçeklere bulaşma yoluyla koloniler arasında iletilmektedir (Schmid-Hempelve Schmid-Hempel 1993).

Apicystis bombi yine bombus türlerinde görülen yayılma potansiyeli yüksek bir protozoadır. İlk kez 1988 yılında İtalya'da keşfedilmiştir ve ticari olarak üretilen bombus türleri de (Meeus ve ark. 2011; Murray ve ark. 2013)dahil olmak üzere yaklaşık 20 bombus türünde kaydedilmiştir (Lipa ve Triggiani 1992;Lipa ve Triggiani, 1996). Bombus kraliçe, işçi ve erkek arılarının sindirim sistemlerinde ve yağ dokularında tespit edilmişlerdir (Liu ve ark., 1974;Lipa ve Triggiani 1992). Parazit bombus arılarının dokuları içinde çoğalırken, arının vücut yağı yok edilmektedir (Schmid-Hempel, 2001) ve enfekte bahar kraliçeleri koloni kuramamakta, ölüm oranları yüksek olmaktadır(Macfarlane ve ark. 1995; Rutrecht ve Brown, 2008).

Locustacarus buchneri parazitleri bombus arılarına özelleşmiş, trake ve abdomendeki hava keselerinde yaşayan oldukça yaygın bir iç parazittir. Kuzey yarımküre üzerinde yaklaşık 30 yerli bombus türünde tespit edilmiştir (Goka ve ark., 2006; Rozej ve ark., 2012). *L. buchneri* yumurta, larviform ve ergin olarak adlandırılan yaşam formları gösterirler. Yetişkin erkek ve larviform dişi aktifken, yetişkin dişi hareketsizdir. Dişilerden daha küçük olan erkek akarların ağız parçaları gelişmemiştir ve konağı terk etmezler. Sadece yetişkin dişiler bombus arılarının trakeleri içinde hemolenfle beslenebilmektedir ve bir dişi trakeye 50 civarında yumurta bırakmaktadır. *L. buchneri* ile enfekte olmuş kraliçe arılar canlılığını sürdürmekte ancak enfeksiyonun yoğun olduğu kraliçelerin abdomenleri küçülmekte, ishale yakalanmakta, yuva kurmakta gecikmekte, birinci yumurta kümesinden sonra yumurtlamayı bırakmakta ve yavru üretimini durdurmaktadırlar (Husband ve Sinha, 1970). Yani, parazitlenme sonrası konak fizyolojisinde değişiklikler meydana gelmekte, uyuşuk davranışlar görülmekte, yaşam ömrü kısalmakta ve koloni zayıflamaktadır (Otterstatter ve Whidden, 2004; Otterstatter ve ark., 2005).

HASTALIKLARIN TEŞHİS YÖNTEMLERİ

Bombus arıları ticari olarak üretilip tarım sektöründe yoğun bir şekilde kullanılmakta ve dünyanın her tarafına ihraç edilmektedir. Dolayısıyla, ticari türlerde bulunan patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmaları gerekmektedir. Aksi takdirde hastalıklar birçok ülkeye taşınmakta ve yerel türlere de bulaşmaktadır. Enfekte arılardaki enfeksiyon kaynağını belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Genel olarak, bu yöntemler mikroskobik ve moleküler olarak adlandırılmaktadır. Işık ve elektron mikroskobunun kullanıldığı mikroskobik yöntemler zahmetli, zaman alıcı ve güvenilir değildir. Çünkü tür ayrımı net bir şekilde yapılamamaktadır. Öte yandan, moleküler yöntemler pahalı da olsa sonuçlar daha doğru ve güvenilirdir.

Bombus arılarında hastalığa neden olan *N. bombi*, *C. bombi, A. bombi* mikrosporları ve *L. buchneri* akarı tek veya çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), 12S-/16S-rRNA ve ITS bölgelerinin dizi analizi ya da mikrosatellit analizleri gibi moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla hatasız olarak tespit edilirler. Moleküler metotlarda öncelikle patojenlerin DNA izolasyonu yapılmakta ve daha sonra kullanılacak yönteme göre türlere özgü geliştirilen hassas primerler ile istenilen DNA bölgeleri çoğaltılmaktadır. Çoğaltılan bu bölgeler değerlendirilerek sonuçlar yorumlanmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde, mikrosporların ve akarların moleküler tespitlerinde çok sayıda primer çiftinin kullanıldığı görülmektedir. Bu primerler ile patojenlerin rRNA geni üzerindeki

büyük (LSU), küçük alt üniteleri (SSU) ve internal ara bölge (ITS) genleri PCR ile çoğaltılmakta ve tür düzeyinde tespitleri yapılmaktadır. Araştırmalarda yoğun olarak kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. PCR ve RT-PCR' da kullanılan bazı primerlerin listesi

Table 1. List of some primers used for PCR and RT-PCR

Parazit	Primer	Kullanılan Moleküler Yöntem	Baz dizilimi (5'-3')	Fragment Büyüklüğü (bç)
Nosema bombi	SSUrRNA-f1 SSUrRNA-r1b	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	CACCAGGTTGATTCTGCCT TGTTCGTCCAGTCAGGGTCGTCA	545 [Tay ve ark.,2005]
	SSUrRNA-f2 SSUrRNA-r2	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	CTGTATAGTTGGGAGAGAGATGAA TTAGATAGCGACGGGCGGTGTG	646 [Tay ve ark.,2005]
	ITS-f1 ITS-r1	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	TGAATGTGTCCCTGTTCTTTGTAC TAATTATAATCTCCTTGGTCCGTG	635-639 [Tay ve ark.,2005]
	LSUrRNA- f1 LSUrRNA-r1	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	CACATGGGATCAATAGGGTACCA AACATGTATAGTTCACTGTGTGTTTCG	527 [Tay ve ark.,2005]
	LSUrRNA-f2 LSUrRNA-r2	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	GGATAACTGGCTTGTAGCAGGC ATAAAAGCAGTAACCTCAAGATGTCG	405 [Tay ve ark.,2005]
	Nbombi-SSU-Jf1 Nbombi-SSU-Jr1	PCR, Nosema rRNA sının Sekans Analizi	CCATGCATGTTTTTGAAGATTATTAT CATATATTTTTAAAATATGAAACAATAA	323 [Klee ve ark.,2006]
	BOMBICAR	RT-PCR	GGCCCATGCATGGTTTTTGAAGATTATTAT CTACACTTTAACGTAGTTATCTGCGG	101 [Plischuk ve Lange,2009; Erler ve ark.,2012]
	qSNP-ITSf qSNP-ITSr	PCR, ITS bölge sekansı	CAGGATCATAATCAGGAAGTATAAGTTTAT CGACCTTCATCGTTATGGTATCC	85 [Cordes ve ark.,2012]
	qSSUf qSSUf	PCR, ITS bölge sekansı	CGCCCGTCGCTATCTAAG TATGATCCTGCTAATGGTCTCC	122 [Cordes ve ark.,2012]
Crithidia bombi	CB-SUrRNA-F2 CB-SUrRNA-B4	PCR, DNA Sekans Analizi	CTTTTGACGAACAACTGCCCTATC AACCGAACGCACTAAACCCC	632 [Schmid-Hempel ve Tognazzo,2010]
	CB-ITS1-F CB-ITS1-B	PCR, DNA Sekans Analizi	GGAAACCACGGAATCACATAGACC AGGAAGCCAAGTCATCCATCGC	276 [Schmid-Hempel ve Tognazzo,2010]
	GB-Cytb2-F GB-Cytb2-B	PCR, DNA Sekans Analizi	GT(A/T)TT(G/A)TTTTT(G/A)TG(G/A)GATTTG CATAAACG(T/C)TCACAATAAAATGC	416 [Schmid-Hempel ve Tognazzo,2010]
	Cri 4	Multiplex PCR ,Mikrosatelit RT-PCR	CATCCAGACTGAGTGTTTTCC GACCTGTGAACGCAATGAAC	130 [Schmid-Hempel ve Funk,2004; Fouks ve Lattorf.2014]
	Cri 16	Multiplex PCR ,Mikrosatelit RT-PCR	GCGGCTGTTGCGAACCTC CGGTGATGGCGATTGCAG	119 [Schmid-Hempel ve Funk,2004; Fouks ve Lattorf.2014]
	Cri 1. A5	Multiplex PCR ,Mikrosatelit RT-PCR	CCATGCTCACTCTTCCTTCGATG AACCCATTCTGCTTGGCTGACCAG	150 [Schmid-Hempel ve Funk,2004; Fouks ve Lattorf.2014]
	Cri 1. B6	Multiplex PCR ,Mikrosatelit RT-PCR	GCAAACCCATTCTGCTTGGC CCATGCTCACTCTTCCTTCGATG	151 [Schmid-Hempel ve Funk,2004; Fouks ve Lattorf.2014]
Apicystis bombi	MyD88	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, qPCR	TTGCCTTCTGAAAATGGATTAC TTGCTGTTGCCAAACTGTTA	115-192 [Schlüns ve ark.,2010]
	ApUF1 ApUR1	PCR, Multiplex PCR	TCAATTGGAGGGCAAGTCTG CACGCAAAGTCCCTCTAAGAA	850 [Meeus ve ark.,2010]
	ApUF2 ApBR1	PCR, Multiplex PCR	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT TGAAAGCGGCGTATACATGA	890 [Meeus ve ark.,2010]
Locustacarus buchneri	ApiITS732F ApiITS732R	PCR, DNA Sekans Analizi	TGGAAACAAGTCATTTTTGGAA CCTGTTCACTCGCCGTTACT	730 [Goka ve ark.,2001;Goka ve ark.,2006]

PATOJENLERİN MOLEKÜLER OLARAK TESPİTİ İLE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

Günümüzde mikrosporların tanısında PCR temelli moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmalar, türe özgü ve hassas primerler ile özellikle rRNA üzerindeki bölgelerin çoğaltılması ile yapılmaktadır. *N. bombi*'nin moleküler tespitinde rRNA'nın SSU ve ITS bölgelerinin karşılaştırmalı dizi verilerinden yararlanılmıştır. İlk olarak, Fries ve ark. (2001) *B. lucorum, B. terrestris* ve *B. hortorum* türlerinden izole edilen *N. bombi* mikrosporunun rRNA SSU bölgelerinin gen diziliminin aynı olduğunu göstermişler ve *N. bombi*'nin farklı bombus türlerini enfekte ettiğini kanıtlamışlardır. Benzer şekilde Tay ve ark.,(2005) 9 primer çifti kullanarak rRNA geninin LSU, SSU ve ITS bölgelerinin çoğaltılmasıyla yaptıkları çalışmada *B. hypnorum, B. jonellus, B. lapidarus, B. lucorum, B. pratorum, B. subterraneus, B. pascourum* ve *B. terrestris* konak arılarını enfekte eden *N. bombi* mikrosporu ve varyantlarını tanımlamışlardır. Klee ve ark. (2006)da bu patojene özgü bir primer çifti geliştirmişlerdir. Nbombi-SSU Jf1/Jr1 adlı primer çiftinin sadece *N. bombi*'de 323 bç'lik bir bölgeyi çoğalttığını saptamışlardır. Aynı çalışmadaki ITS-f2/r2 primer çiftinin ise, son derece hassas olduğu ve 10 spora kadar bile tespit yapabildiği belirtilmiştir.

RT-PCR yönteminin kullanıldığı bir denemede, dokuz çift *Nosema spp*. primeriyle çalışılmış ve altı çiftinin *N. bombi* tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu primerlerden üç çiftinin (BOMBICAR, N.b.a ve Nbombi-SSU-J) *N. bombi*'ye özgü olduğu bildirilirken, iki çiftinin (BOMBICAR, N.b.a) ise, son derece hassas olduğu ve on spora kadar tespit yapabildiği gösterilmiştir (Erler ve ark., 2012).Başka bir araştırmada ise, Amerika'nın yerli türleri olan *B. impatiens* ve *B. sandersoni* arı örneklerinde mikroskobik ve PCR yöntemleri kullanılmıştır. Nbombi-SSU-Jf1/Jr1 ve SSUrRNA-f1-r1c adlı primer çiftleriyle yapılan PCR çalışmalarında her iki türde de *N. bombi* mikrosporu tanımlanmıştır (Sokolova ve ark., 2010).

Küresel olarak tozlaştırıcıların azalışına çevre koşulları, insan kaynaklı müdahaleler, virüsler, bakteriler, mikrosporlar ve akarlar da dahil olmak üzere çeşitli patojenler neden olmaktadır. Son yıllarda, bal arısı ve bombus arısı gibi iki önemli tozlaştırıcının azalışı Amerika ve Avrupa'da izlenir ve kayıt altına alınır olmuştur(Ghazoul, 2005; Biesmeijer ve ark., 2006; Goulson ve ark., 2008; Potts ve ark., 2010; Cameron ve ark., 2011).*N. bombi, N. apis, N. ceranae* ve *C. bombi* gibi mikrospor türlerinin bu azalışta etkili olduğu bildirilmiştir(Paxton ve ark., 2007; Bromenshenk ve ark., 2010; Higes ve ark., 2010). Kuzey Amerika'da bombus türlerindeki hızlı azalışın nedenini araştırmak için Cordes ve ark.,(2012) PCR ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak 36 bombus türünde *N. bombi* ve *C. bombi* varlığını araştırmıştır. Araştırma sonucunda 15 türde *C. bombi*, 22 türde ise *N. bombi* mikrosporları tespit edilmiştir. Li ve ark.,(2012)ise Çin'den topladıkları 27 farklı bombus türünde DNA sekans analizi ile *Nosema spp.*tespiti yapmışlardır. 12 bombus türünün mikrosporlar tarafından enfekte olduğunu bildirmişlerdir.

Bombus arıları gibi konak populasyonlarında bulunan patojenlerin genetik yapısının bilinmesi konak-parazit etkileşimleri, ekolojisi ve evrimi ile ilgili bilgi vermektedir. Örneğin, hastalık oluşturma, savunma stratejileri geliştirme, konak içinde çoğalabilme ve genetik çeşitliliği sürdürmede parazitlerin olası rolü bilinmelidir. Schmid-Hempel ve Funk,(2004) doğal bir *B. terrestris* populasyonunda, *C. bombi* parazitinin genotipinin belirlenmesi ve farklı konak genotipleri üzerinde nasıl bir dağılış gösterdiklerinin saptanması için geliştirdikleri 8 çift mikrosatelit primer ile çalışmışlar ve enfekte sekiz koloni içinde 38 farklı *C. bombi* genotipi tespit etmişlerdir.

Bombus arısı türlerinde hastalığa neden olan *C. bombi* türünün kökeni hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. İsviçre ve Alaska'dan toplanan bombus arılarından izole edilen *C. bombi* ve *C. mellificae* protozoalarının kökeni araştırılmıştır. *C. bombi* örnekleri A ve B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. *C. mellificae*'dan elde edilen sekans analizleri sonucu yapılan filogenetik ağaçta *C. bombi*' nin her iki grubundan da farklı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada A grubuna *C. bombi*, B grubuna ise *C. expoeki* denilmesi önerilmiştir (Schmid-Hempel ve Tognazzo, 2010). *C. bombi* ve *A. bombi* mikrosporlarının filogenetik olarak yerinin incelendiği başka bir çalışmada *C. bombi*filogenetik olarak trypanosomatidler ile kümelenmiş, *A. bombi*'nin ise Mattesia grubu içinde olmadığı, bu grup ile yakın kardeş grup olduğu bildirilmiştir (Ghazoul, 2005).

Bombus arılarının ticari olarak kullanımıyla birlikte hastalıkların dünya çapında yayılması biyolojik çeşitlilik açısından önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Özellikle patojenlerde yeni ırk ve suşların ortaya çıkışı, tozlaştırıcı populasyonların azalışında olası bir etken olarak görülmektedir. Arjantin'in Patagonya bölgesinde kullanılan*B.*

*terrestris*ticari kolonilerinde yüksek oranda *A. bombi* protozoası saptanmıştır. Arbetman ve ark., (2013) bu bölgedeki *B. ruderatus* ve *B. dahlbomii* yerel bombus türlerinde tespit edilen *A. bombi* parazitinin *B. terrestris* ticari kolonilerden geçip geçmediğini incelemişlerdir. İlk olarak, PCR yöntemi kullanılarak, *B. terrestris* girişinden önce ve sonra toplanan yerel bombus türlerinde parazitin varlığı taranmıştır. Sonra da, NeoF ve NeoR primer çiftiyle 18 rDNA bölgesi sekanslanarak parazit tanımlanmış ve Avrupalı sekans dizisiyle de karşılaştırılarak *A. bombi* olduğu doğrulanmıştır. Önceki çalışmalarda Arjantin'deki yerel bombus türlerinde bu parazit tespit edilememiştir (Plischuk ve Lange, 2009). Sonuçta, *B. ruderatus* ve *B. dahlbomii* türlerinde *A. bombi*'nin varlığı ilk kez raporlanmıştır. Başka bir çalışmada ise, Arjantin ve Avrupa'daki arılarda saptanan *A. bombi* parazitinin ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri çoğaltılarak tür içi genetik varyasyonu incelenmiştir. Arjantin'de tespit edilen en yaygın haplotip ile Avrupa'da tespit edilen en yaygın haplotip aynı bulunmuştur (Maharramov ve ark., 2013).

Bombus arıları gibi sosyal arılar ve diğer sosyal böcekler çeşitli mikroorganizmalar tarafından enfekte olmaktadırlar. Böceğin fizikokimyasal bariyerlerini aşıp vücut boşluğu içerisine giren mikroorganizmalar böceğin kendinden olmayanı algılaması sonucu bağışıklık tepkileriyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Patojene karşı antimikrobiyal peptit ve proteinler salgılanarak bir immun cevap geliştirilmektedir. RT-PCR gibi moleküler yöntemlerle hem bu proteinleri kodlayan genler tespit edilebilmektedir, hem de ifade edilen proteinlerin miktarı ölçülebilmektedir. Schlüns ve ark. (2010) *B. terrestris* arısının bağırsaklarında enfeksiyona neden olan *C. bombi* protozoasının varlığını tespit etmek için bu metodu kullanmışlardır. Sağlıklı veya hasta *B. terrestris* işçi arılarında RT-PCR yöntemini kullanarak bağışıklıkla ilişkili dört genin (Hemomucin, MyD88, Relishve TEP7) ifade edilen miktarını ölçmüşlerdir. Bu şekilde hem patojen tespit edilmiş hem de konağın enfeksiyona olan tepkisi değerlendirilmiştir.

TÜRKİYE'DEKİ DURUM VE ÖNERİLER

Bombus arıları, Türkiye biyolojik zenginliğinin önemli bir parçasıdır. Türkiye'de farklı iklim ve floraya uyum sağlamış çok sayıda bombus tür, alt tür ve ekotipi bulunmaktadır. Az sayıda yapılan çalışma ile yaklaşık 48 adet bombus türü tanımlanmıştır (Rasmont ve Flagothler 1996). Ancak Türkiye'deki bombus türlerinin mevcut durumu, ülke genelindeki dağılımı ve populasyon yoğunlukları konusunda da çok az çalışma yapılmıştır. Tüm dünyada bir taraftan bombus arılarının tozlaşma amacıyla kullanımına yönelik yoğun bir ilgi ve talep oluşmakta diğer taraftan ise ticari olarak üretilmiş bombus arılarının kullanımı sonucunda ekosistem üzerinde oluşabilecek olası olumsuz etkiler de araştırılmaktadır. Tozlaşma amacıyla seralarda kullanılan bombus kolonilerde koloni yaşamının sonlarına doğru çok sayıda ana ve erkek arı üretilmektedir. Üretilen ana ve erkek arılar sera dışına çıkabilmekte ve doğal ortamda koloni oluşturabilmektedirler. Ticari üretilmiş *B. terrestris* arılarının bu şekilde yayılmasının yuva yeri ve besin kaynakları bakımından yerel arı populasyonları ile rekabet, yerel arı populasyonları ile melezlenme ve ticari üretilmiş kolonilerden doğal populasyonlara hastalık ve parazitlerin yayılması gibi olası olumsuz etkilere yol açabileceği bildirilmektedir(Gösterit ve Gürel, 2005).Bombus arılarının ticari üretiminde koloni gelişimi için sağlanan sınırsız besleme, uygun çevre koşulları gibi ideal koşullar aynı zamanda patojen ve parazitlerin gelişimi için de en uygun koşullardır. Bu nedenle ticari olarak yetiştirilen arı türleri bir ölçüde patojen ve parazitlerin kaynağı, rezervuarı olarak işlev görmektedir. Ticari populasyonlar içinde ve ticari ve doğal populasyonlar arasındaki patojen iletimi yüksek konak yoğunluğuyla artmaktadır. Nitekim ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerinin kullanıldığı seraların yakınlarından toplanan arı örneklerinde daha uzaktan toplanan arı örneklerine oranla patojenlerin yaygınlığı daha yüksek bulunmuştur (Power ve Mitchell,2004). Sonuç olarak, patojenlerin biyolojik çeşitlilik için önemli bir tehdit ve çeşitli yaban hayatı populasyonlarının yok olması veya azalmasında dikkate alınması gereken önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir.

Dünyada ticari olarak üretilen ve tozlaşma amacıyla kullanılan *B. terrestris* kolonilerinin %10 dan fazlası (150-200 bin koloni/yıl) Türkiye'de üretilmekte ve kullanılmakta ve kullanılan koloni sayısı da her geçen yıl önemli ölçüde artmaktadır. Bu nedenle ticari üretilmiş *B. terrestris* kolonilerinden doğal arı populasyonlarına hastalık ve parazitlerin taşınması Türkiye için çok daha önemli ve öncelikli bir konudur. Ayrıca Türkiye'de faaliyet gösteren ticari bombus arısı işletmelerinin zaman zaman hastalık ve parazitler nedeniyle çok ciddi üretim kayıpları yaşadıkları da bilinmektedir. Bu göstergeler de ticari firmalar tarafından üretilen kolonilerin hastalık ve parazitler açısından risk taşıdığını ve hem ticari

üretimin daha verimli yapılması hem de ekolojikrisklerin azaltılması için hastalık ve parazitlerin saptanması ve mücadele yöntemlerinin belirlenmesi konularında çalışmaların yoğunlaştırılması gereğini ortaya koymaktadır. Bombus hastalık ve parazitlerine yönelik olarak bugüne kadar ülkemizde iki çalışma yapılmıştır. Bu araştırmaların ilkinde Ankara ili ve çevresinden toplanan *B.terrestris ana* arılarında %20.9 oranında *Acarus farris,* %74.63 oranında *Nosema bombi* bulaşıklığı saptanmıştır (Aytekin ve ark. 2002). Diğer araştırmada ise Ege ve Akdeniz kıyı şeridinden toplanan *B.terrestris* ana arı örneklerinde %12.96 oranında*Nosema bombi*, %8.99 oranında *Crithidia bombi,* %6.89oranında *Apicystis bombi ve* %5.28oranında*Locustacarus buchneri*bulaşıklığı (enfeksiyonu) saptanmıştır (Eldeniz 2000).

SONUÇ

Bombus arısının ticari üretiminde hastalık ve zararlıların doğal populasyonlara bulaşması ve yayılmasını önlemek, koloni ve ana arı kayıplarını en az düzeye indirmek ve koloni kalitesini ve miktarını arttırmak için hastalık ve zararlılarla etkili bir şekilde mücadele edilmelidir. Yetiştirme prosesinin tüm aşamalarında hijyen kurallarına titizlikle uymak ve hastalıklara dirençli arı materyali ile çalışmanın yanı sıra hem damızlık kolonilerinde hem de üretim kolonilerinde düzenli ve periyodik olarak hastalık ve zararlı kontrolü yapılmalıdır. İpekböceği yetiştiriciliğinde olduğu gibi tamamıyla hastalıklardan ari üretim modeli geliştirilmediği sürece bombus arısının kitlesel üretimi sürekli risk altındadır. Bu nedenle bombus koloni veya ana arılarında bulunan parazit ya da patojenlerinin kısa sürede tespit edilmesi oldukça önemlidir. Mikroskobik yöntemlerle birlikte daha etkili ve kesin sonuçlar veren moleküler yöntemler kullanılarak, ticari ve doğal bombus kolonilerindeki parazitlerin tespiti yapılmalıdır. Parazit ve patojenlerin tespitinde kullanılan moleküler yöntemler detaylı olarak araştırılmalı ve ülkemizde yaygın kullanımı sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

Arbetman, M.P., Meeus, I., Morales, C.L., Aizen, M.A., Smagghe, G. 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biol. Invasions.,* 15: 489-494.

Aytekin, A.M., Çağatay, N., Hazır, S. 2002. Floral Choices, Parasites and Micro-organisms in Natural Populations of Bumblebees (Apidae: Hymenoptera) in Ankara Province. *Turkish Journal of Zoology*, 26: 149-155.

Baker, E.W., Wharton, G.W. 1952. An introduction to acarology. Macmillan, New York, pp 159-162.

Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer. M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, A.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313: 351-354.

Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbaour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., Welch, P.M., Williams, T., Firth, D.R., Skowronski, E., Lehmann, M.M., Bilimoria, S.L., Gress, J., Wanner, K.W., Cramer, R.A. 2010. Jr Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *Plos ONE*, 5(10): e13181.

Brown, M.J.F., Schmid-Hempel, R., Schmid-Hempel , P. 2003. Strong context-dependent virulence in a host parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology,* 72: 994-1002.

Cameron, S.A., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F., Griswold, T.L. 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. In: Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.

Cordes, N., Huang, W.F., Strange, J.P., Cameron, S.A., Griswold, T.L., Lozier, J.F., Solter, L.F. 2012. Interspecific geographic distribution and variation of the pathogens *Nosema bombi* and *Crithidia* species in United States bumblebee populations. *Journal of Invertebrate Pathology,* 109: 209-216.

Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., van Engelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science,* 318: 283-287.

Eldeniz, N. 2000. Ege ve Akdeniz Kıyı şeridinde doğal olarak kışlayan Bombus (*Bombus*

terrestris L.) ana arılarında bazı hastalık ve parazitlerinin tanısı ve enfeksiyon oranlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Eldeniz, N., Cankaya and Kaftanoglu, O. 2006. An Investigation on Some Diseases and Parasites of Bumblebee Queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey. *Pakistan Journal of Biology Science,* 9: 1282-1286.

Erler, S., Lommatzsch, S., Lattorf, G.M.H. 2012. Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitol. Res.*,110: 1403-1410.

Fantham, H.B., Porter, A. 1914. The morphology, biology and economic importance of *Nosema bombi*, parasitic in various bumble bees (Bombus spp.). *Ann. Trop. Med. Parasit*ol., 8: 623-638.

Fisher, R.M., Pomeroy, N. 1989. Incipient colony manipulation, *Nosema* incidence and colony productivity of the bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). J of the Kansas Ent Soc, 62(4): 581-589.

Fitzpatrick, U., Murray, T.E., Paxton, R.J., Breen, J., Cotton, D., Santorum, V., Brown, M.J.F. 2007. Rarity and decline in bumblebees - A test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biology Conservation*, 136: 185-194.

Fouks, B., Lattorff, H.M. 2014. Comparison of two molecular diagnostic tools for the quantification of *Crithidia bombi*, a parasite of bumblebees. *Entomo.l Exp. App.,* 150: 191-197.

Fries, I., de Ruijter, A., Paxton, R.J., da Silva, A.J., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J. 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporodia: Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea). *J. Apicult. Res.,* 40: 91-96.

Gegear, R.J., Otterstatter, M.C., Thomson, J.D. 2005. Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flowerhandling techniques? *Anim. Beh.*, 70: 209-215.

Ghazoul, J. 2005. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends Ecol. Evol.,* 20: 367-373.

Goka, K., Okabe, K., Yoneda, M., Niwa, S. 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10: 2095-2099.

Goka, K., Okabe, K., Yoneda, M. 2006. Worldwide migration of parasitic mites as a result of bumblebee commercilization. *Popul. Ecol*., 48(4): 285-291.

Goulson, D., Lye, G.C., Darvill, B.2008. Decline and conservation of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.*,53: 191-208.

Grixti, J.C., Wong, L.T., Cameron, S.A., Favret, C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biology Conservation*, 142: 75-84.

Gösterit, A., Gürel, F. 2005. *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) arılarının yayılmasının ekosistem üzerine etkileri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 5(3): 115-121.

Higes, M., Martin-Hernandez, R., Martinez-Salvador, A., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Berna, J. 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2: 243-250.

Husband RW, Sinha RN. 1970. A revision of the genus *Locustacarus* with a key to genera of the family Podapolipidae (Acaria). *Annals of the Ent. Soc. ofAmerica*, 63(4): 1152-1162.

Imhoof, B., Schmid-Hempel, P. 1998. Colony success of *Bombus terrestris* and microparasitic infections in the field. *Insect Soc.*, 46: 223-238.

Klee, J., Tay, W.T., Paxton, R.J. 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia:Nosematidae) in bumble bees (Bombus spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *Journal of İnvertebrate Pathology,* 91: 98-104.

Kosior, A., Celary, W., Olejniczak, P., Fijal, J., Król, W., Solarz, W., Plonka, P. 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx*, 41: 79-88.

Larsson,J.I.R. 2007. Cytological variation and pathogenicity of the bumble bee parasite *Nosema bombi* (Microspora, Nosematidae). *Journal of İnvertebrate Pathology,* 94: 1-11.

Li, J., Chen, W., Wu, J., Peng, W., An, J., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R. 2012. Diversity of Nosema associated with bumblebees (Bombus spp.) from China. *International Journal of Parasitology,* 42: 49-61.

Lipa, J.J., Triggiani, O. 1980. *Chrithidia bombi* sp.n., a flagellata parasite of a bumble-bee (*Bombus terrestris* L.) (Hymenoptera; Apidae). *Acta. Protozool.*, 27(3/4): 287-290.

Lipa, J.J., Triggiani, O. 1992. A newly recorded Neogregarine (Protozoa, Apicomplexa), parasite in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* spp.). *Apidologie,* 23(6): 533-536.

Lipa, J.J., Triggiani, O. 1996. Apicystis gen nov and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb nov (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of Bombus and Apis (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie,* 27(1): 29-34

Liu, H.J., Macfarlane, R.P., Pengelly, D.H. 1974. *Mattesia bombi* n. sp. (Neogregarinida: Ophrocystidae); a parasite of Bombus (Hymenoptera: Apidae). *J. Inv. Parthol.*, 23: 225-231.

MacFarlane, R.P., Lipa, J.J., Liu, H.J. 1995. Bumble bee pathogens and internal enemies. *Bee World,* 76(3): 130–148.

Maharramov, J., Meeus, I., Maebe, K., Arbetman, M., Morales, C., Graystock, P., Hughes, W.O.H., Plischuk, S., Lange, C.E., de Graaf, D.C., Zapata, N., de la Rosa, J.J.P., Murray, T.E., Brown, M.J.F., Smagghe, G. 2013. Genetic variability of the Neogregarine *Apicystis bombi,* an etiological agent of an emergent bumblebee disease. *Plos ONE,* 8(12): e81475.

McIvor, C.A., Malone, L.A. 1995. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus terrestris* (L.). *New Zeal. J. Zool.,*22: 25-31.

Meesus, I., de Graaf, D.C., Jans, K., Smagghe, G. 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *J. Appl. Microbiol.,*109: 107-115.

Meeus, I., Brown, M.J.F., de Graaf, D.C., Smagghe, G. 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Biol. Cons.*, 25(4): 662–671.

Michener, C.D. 2000. The Bees of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 913 pp.

Murray, T.E., Coffey, MF, Kehoe E, Horgan FG. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biol. Cons.*, 159, 269-276.

Otterstatter, M.C., Whidden, T.L. 2004. Patterns of parasitism by tracheal mites (*Locustacarusbucneri*) in natural bumble bee populations. *Apidologie,* 35: 351-357.

Otterstatter, M.C., Gegear , R.I., Colla, S.R., Thomson, J.D. 2005. Effects of parasitic mites and protozoa on the flower constancy and foraging rate of bumble bees. *Behav. Ecol. Socbiol.,*58: 383-389.

Otterstatter, M.C., Thomson, J.D. 2006. Within-host dynamics of an intestinal pathogen of bumble bees. *Parasitology*, 133: 749-761.

Otti, O., Schmid-Hempel, P. 2007. *Nosema bombi* : a pollinator parasite with detrimental fitness effects. *J. İnvert. Pathol.,*96: 118-124.

Otti, O. 2008. Impact of *Nosema bombi* on colony development and its transmission possibilities. In: Biodiversity, Impact and Control of Microsporidia in Bumble Bee (*Bombus* spp) Pollinators: Technical report from the “Pollinator Parasite” project group, 95-105.

Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie,* 38: 558-565.

Plischuk, S., Lange, C.E. 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplasrea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *J. İnvert. Pathol.,*102(3): 263-265.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.,* 25: 345-353.

Rasmont, P., Falagothler, D. 1996. Biogéographie et choix floraux des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Turquie.

Université de Mons Belgium. Rapport préliminaire. NATO-TU Project. 68 pp.

Power , A.G., Mitchell , C.E. 2004. Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist,* 164: 78-89.

Rozej, E., Witalinski, W., Szentgyörgyi, H., Wantuch, M., Moron, D., Woyciechowski, M. 2012. Mite species inhabiting commercial bumble bee (*Bombus terrestris*) nests in Polish greenhouses, *Exp. Appl. Acarol.,* 56: 271-282.

Rutrecht, S.T., Klee, J., Brown, M.J.F. 2007. Horizontal transmission of *Nosema bombi* to its adult bee hosts: effect of dosage, spore source and host age. *Parasitology,* 134: 1719-1726.

Rutrecht, S.T., Brown, M.J.F. 2008. Within colony dynamics of *Nosema bombi* infections: disease establishment, epidemiology and potential vertical transmission. *Apidologie,* 39: 504-514.

Schmid-Hempel, P., Durrer, S. 1991. Parasites, floral resources and reproduction in natural populations of bumblebees. *Oikos*, 62: 342-350.

Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R. 1993. Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. *Behav. Ecol. Sociobiol.,* 33: 319-327.

Schmid-Hempel, P. 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: adressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften,* 88: 147-158.

Schmid-Hempel, P., Reber Funk, C. 2004. The distribution of genotypes of the trypanosome parasite, *Crithidia bombi*, in populations of its host, *Bombus terrestris*. *Parasitology*, 129: 147-158.

Schmid –Hempel, R., Tognazzo, M. 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J. Eukoryat. Microbiol.,* 57: 337-345.

Schlüns, H., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Crozier, R.H. 2010. Infection with the trypanosome *Crithidia bombi* and expression of immune-related genes in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.,*34: 705-709.

Shykoff ,J.A., Schmid-Hempel, P. 1991. Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 28: 371-376.

Sokolova, Y.Y., Sokolov, I.M., Carlton, C.E. 2010. Idendification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microspridia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA). *Journal of Invertebrate Pathology,* 103: 71-73.

Tay, W.T., O'Mahony, M., Paxton, R.J. 2005. Complete rRNA gene sequences reveal that the Microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (Bombus spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *J. Eukaryot Microbiol.*, 52(6): 505-513.

Van den Eijnde, J., Vette N. 1993. Nosema infection in honeybees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Proc. Exp. Appl. Entomol.,* 4: 205-208.

Van der Steen, J.J.M. 2008. Infection and transmission of *Nosema bombi* in *Bombus terrestris* colonies and its effect on hibernation, mating and colony founding. *Apidologie*, 39: 273-282.

Velthuis, H.H.W., 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.

Weiss, J.B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.*,8: 113-130.

Weiss, L.M., Vossbrinck, C.R. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology, Washington, DC, 129-171.

Wildmer, A., Hempel, P.S., Estoup, A., Scholl, A. 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity*, 81: 563-572.

Williams, P.H., Osborne, J.L. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40: 367-387.

EXTENDED ABSTRACT

Goal

Bumblebees are recognized as one of the world's most important pollinators in agricultural and natural ecosystems. They are responsible for pollinating a wide range of flowering plants and many consumable products including tomatoes, red and green peppers, watermelon and cucumber. Therefore, some bumblebee species are commercially produced and extensively used for greenhouse pollination. On the other hand in recent years, the natural abundance and diversity of bumblebee species is in decline all over the world. There are many factors regarding the causes of bumblebees decline, climate change, habitat fragmentation with diminished floral resources and pathogens. The most important of these factors are considered as pathogens.The aim of the study, the frequently seen bumblebee diseases is to draw attention.

INTRODUCTION

Natural and commercially bumblebee colonies are exposed to many pathogenic internal and external parasites. The most commonly reported bumblebee protozoan pathogens are the microsporodium *Nosema bombi,Crithidia bombi, Apicystisbombi* and the tracheal mite, *Locustacarus buchneri.* Generally,these parasites have detrimental effects on colonization, survival and reproduction. Therefore, the accurately identification and control of bumble bee diseases and parasites are very important. Thus, both the spread of diseases can be prevented and the development of the colonies and pollination efficiency will be provided.Getting to know these diseases briefly.

*Nosema bombi*is an obligate, intracellular, spore forming microsporidium that primarily effects the malpighian tubules and the midgut tissues, but can be found in fat body, tracheae and even nerve cells in the brain. The effects of *N. bombi*have been documented: reduced life span, reduced individual reproductive rate, increased productivity of sexual and reduced colony growth. Once a*N .bombi* infection is introduced into a *Bombus spp*. colony, via workers that were infected in larval stage, the infection is transmitted to future generations and adults.

Crithidia bombi is extracellular trypanosomatid parasites that occur in the midgut lumen and rectum of bumblebees. The replication in the host is rapid but the effects are subtle, including reduced pollen loads carried in foraging trips, variation in foraging behavior, increased development of ovaries in workers, slower colony growth rate and reduction in colony fitness.*C. bombi* can be transmitted from mother to offspring. Also, horizontal transmission occurs within the colony and during foraging trips, where the pathogen can be contracted from contaminated flowers.

Apicystis bombi was first discovered in Italy in 1988 and has now been recorded in nearly 20 bombus species including in commercially produced bumble bee colonies. The potential spread of the neogregarine *A. bombi* is a cause for great concern. The fat body of infected bumble bees is destroyed due to the proliferation of the pathogen, and its presence correlates with high mortality in infected spring queens, preventing them from establishing colonies.

*Locustacarus buchneri*parasitizes specifically bumble bees. It has been found associated with nearly 30 bombus species, all native to the Northern Hemisphere, invading tracheae and air sacs of larvae, pupae and adult bees, where the mite develop and reproduces. Parasitization may alter host physiology, causing lethargic behavior, reduced life span, decreased foraging and weakened colony.

CONCLUSION

Today various microscobic and molecular methods have been developed in order to identify infected bumblebees. Microscopic determination of microsporidia infections is laborious, time-consuming and not completely reliable in terms of species differentiation. Molecular methods are preferred because they provide highly sensitive, reliable and fast results. Spesific gene fragments on ribosomal RNA, ribosomal DNA, ITS and CO1 gene regions of pathogens are amplified by PCR is the most commonly method. In this review, the most common bumblebee diseases, ways of spread and identification by molecular methods are summarized.