

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ARILARDAKİ PROTOZOON PARAZİTLERİN BELİRLENMESİNDE  
MOLEKÜLER TEKNİKLERİN OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Hande BAYRAKTAR**

**EYLÜL 2011  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ARILARDAKİ PROTOZoon PARAZİTLERİN BELİRLENMESİNDE  
MOLEKÜLER TEKNİKLERİN OPTİMİZASYONU**

**Biyolog Hande BAYRAKTAR**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22.08.2011  
Tezin Savunma Tarihi : 15.09.2011**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR**

**Trabzon 2011**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Hande BAYRAKTAR tarafından hazırlanan**

**ARILARDAKİ PROTOZOON PARAZİTLERİN BELİRLENMESİNDE  
MOLEKÜLER TEKNİKLERİN OPTİMİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31/05/2011 gün ve 1407 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ** .....

**Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR** .....

**Üye : Doç. Dr. İlknur TOSUN** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Arılardaki Protozoon Parazitlerinin Belirlenmesinde Moleküler Tekniklerin Optimizasyonu” çalışmasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, laboratuarda her zaman maddi ve manevi desteklerde bulunan hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tez çalışmalarının gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarından istifade etmemi sağlayan ve her konuda bana yardımcı olan Gent Üniversitesi (Belçika), Crop Protection bölümü Agrozooloji öğretim üyelerinden Prof. Dr. ir. Guy SMAGGHE’e ve Dr. Ivan MEEUS’a teşekkürü bir borç bilirim ve bu tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakar aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Hande BAYRAKTAR

Trabzon 2011

## **TEZ BEYANNAMESİ**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Arılardaki Protozoon Parazitlerin Belirlenmesinde Moleküler Tekniklerin Optimizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç.Dr. İsmail DEMİR ‘in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 05/10/2011

Hande BAYRAKTAR

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Bombus Arıları .....	4
1.2.1. Sistematiği .....	4
1.2.2. Yapısı.....	4
1.2.3. Doğal Yaşam Döngüsü .....	6
1.3. Bombus Arısının Kitlesel Üretimi .....	8
1.4. Türkiye’de Bombus Arısı Üretimi.....	9
1.5. Bombus Arılarıyla Tozlaşma.....	10
1.6. Yaban Arılarında Azalmanın Sebepleri.....	12
1.6.1. Floral Kaynaklarda Azalmalar.....	12
1.6.2. Yuva Alanlarının Kaybı.....	13
1.6.3. Pestisitler.....	13
1.6.4. Yerli Olmayan Arıların Etkileri.....	14
1.7. Yaban Arı Patojenleri .....	16
1.7.1. <i>Nosema bombi</i> .....	18
1.7.2. <i>Nosema cerenea</i> .....	19
1.7.3. <i>Locustacaris buchneri</i> .....	19
1.7.4. <i>Apicystis bombi</i> .....	20
1.7.5. <i>Crithidia bombi</i> .....	20
1.8. Çalışmanın Amacı .....	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Böceklerin Toplanması.....	24
2.2. Böceklerin Mikroskopik İncelenmesi.....	24

2.3.	DNA Ekstraksiyonu.....	25
2.4.	Gen Seçimleri .....	26
2.4.1.	<i>Crithidia bombi</i> İçin Genlerin Seçimi .....	26
2.4.2.	<i>Apicystis bombi</i> İçin Genlerin Seçimi.....	26
2.5.	<i>Crithidia bombi</i> Genlerinin Farklı Primer Kombinasyonlarıyla Çoğaltılması.....	27
2.5.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları.....	27
2.5.2.	PCR Ürün Saflaştırılması .....	28
2.5.3.	<i>C. bombi</i> 'nin ITS Bölgesinin Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi .....	29
2.5.4.	<i>C. bombi</i> 'nin <i>GAPDH</i> ve <i>Cytb</i> Genlerinin Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi.....	29
2.5.5.	<i>C. bombi</i> İçin Kullanılan <i>Cytb</i> -Leis ve <i>GAPDH</i> -741 Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması .....	30
2.6.	<i>Apicystis bombi</i> Genlerin Farklı Primer Kombinasyonlarıyla Çoğaltılması.....	30
2.6.1.	<i>A. bombi</i> 'nin <i>CoxI</i> Geninin Çoğaltılması.....	30
2.6.2.	<i>A. bombi</i> 'nin <i>ITS</i> Bölgesinin Çoğaltılması ve Dizi Analizi.....	30
2.6.2.1.	<i>A. bombi</i> 'nin <i>ITS</i> Bölgesinin Moleküler Klonlanması .....	31
2.6.3.	<i>A. bombi</i> 'nin <i>ITS</i> Bölgesinin Çoğaltılması İçin Farklı Primer Grubunun Kullanılması.....	32
2.6.3.1.	<i>A. bombi</i> İçin Kullanılan Yeni Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması .....	32
2.7.	Soliter Arılarda Tripanosomlar .....	32
2.7.1.	<i>Osmia cornuta</i> 'da Yeni Bir SE Tripanosom .....	32
2.8.	Filogenetik Analiz .....	33
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	<i>Crithidia bombi</i> İçin Seçilen Genlerin PCR ile Çoğaltılmaları .....	34
3.1.1.	<i>C. bombi</i> 'nin <i>GAPDH</i> ve <i>Cytb</i> Genlerinin Çoğaltılmasının PCR ile Çoğaltılmaları .....	35
3.1.2.	Çoğaltılan Genlerin Dizi Analizleri.....	36
3.1.2.1.	<i>Cytb</i> -Leis Primerleri ile Çoğaltılan Bölgenin Dizi Analizi .....	36
3.1.2.2.	<i>GAPDH</i> -741 Primerleri ile Çoğaltılan Bölgenin Dizi Analizi.....	38
3.1.3.	<i>C. bombi</i> İçin Kullanılan <i>Cytb</i> -Leis ve <i>GAPDH</i> -741 Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması .....	39
3.2.	<i>Apicystis bombi</i> 'nin <i>ITS</i> Bölgesinin PCR Sonuçları.....	40
3.2.1.	Farklı $MgCl_2$ Konsantrasyonların PCR'a Etkisi.....	40
3.2.2.	Farklı Bağlanma Sıcaklıkların PCR'a Etkisi .....	41
3.3.	<i>ITS</i> Bölgesinin Klonlama Sonuçları.....	42

3.3.1.	<i>A. bombi</i> ITS Bölgesi İçin Seçilen Farklı Primerlerin PCR ile Çoğaltılması.....	42
3.3.1.1.	Primer Grubu 18SFa/28R1100a'nın Geçerliliğın Onaylanması.....	43
3.4.	Soliter Arı <i>Osmia cornuta</i> 'da Yeni Bir SE Tripanosom DNA Dizi Onaylanması .....	44
4.	TARTIŞMA.....	47
5.	SONUÇLAR.....	52
6.	ÖNERİLER.....	53
7.	KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek Lisans Tezi

## ÖZET

### ARILARDAKİ PROTOZoon PARAZİTLERİNİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER TEKNİKLERİN OPTİMİZASYONU

Hande BAYRAKTAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. İsmail DEMİR  
2011, 63 Sayfa

Son yıllarda ekosistem bütünlüğü ve gıda güvencesi açısından pollinatörlerin önemi sürekli artmaktadır. Bu önemlerine karşılık, çeşitli parazit ve patojenlerin etkisiyle polinatörler güç kaybına uğramakta ve sayıları her geçen gün azalmaktadır. Polinatörlerdeki bu parazitlerin hızlı ve kesin bir şekilde tespit edilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, moleküler olarak tanımlanan (Meeus vd., 2010) iki önemli yaban arısı paraziti olan *Crithidia bombi* ve *Apicystis bombi*'nin tespiti için moleküler yöntemler geliştirildi. *Cytb*, *GAPDH* ve *ITS* genleri için primerler dizayn edildi. *Crithidia bombi* için *Cytb*-Leis (5'-GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG-3'/5'-CTACAATAAACAAATCATAATATATATAACAATT-3') ve *GAPDH*-741 (5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') primerlerin geçerliliği başka arı türlerinde test edildi ve %75 duyarlılığa sahip olduğu hesaplandı. *Apicystis bombi* için 18SFa/28R1100a (TTACGTCCCTGCCCTTTGTA- TCGGAGGGAACCAGCTACTA) primer çiftinin geçerliliği kabul edildi ve %90 duyarlılığa sahip olduğu hesaplandı. Sonraki çalışmalar belli bir coğrafik bölgede belli bir türün genetik orijini ortaya çıkarabilir ve bu parazitin yerel veya yaban arıların ticari taşınmasından dolayı meydana gelen patojen dağılımından olup olmadığını kanıtlayabilir.

Ayrıca, soliter arılarda bir protozoon parazit araştırmasında *Osmia cornuta*'yı enfekte eden yeni bir tripanosom bulundu. Muhtemelen soliter arılar, *Apicystis bombi* parazitini bir araç olarak kullanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Osmia cornuta*, *Crithidia bombi*, *Apicystis bombi*

Master Thesis

## SUMMARY

### OPTIMIZATION OF MOLECULAR TOOLS FOR THE DETECTING OF PROTOZOAN PARASITES IN BEES

Hande BAYRAKTAR

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. İsmail DEMİR  
2011, 63 Pages

The importance of pollinators for ecosystem integrity and food security has been repeatedly increased in recent years. In response to this importance, pollinators decrease numbers with effect of different parasites and pathogens day by day. With the object of fast and crisply detecting of this parasites in pollinators, molecular tools were developed for detecting two important bumblebee parasites *Crithidia bombi* and *Apicystis bombi*, which were recently molecularly identified (Meeus vd., 2010). Primers were designed for *Cytb*, *GAPDH*, *ITS* which enable us in the genome of *A. bombi* and *C. bombi*. For *C. bombi*, validation of this primers *Cytb*-Leis (5'-GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG-3'/5'-CTACAATAAACAAATCATAATATATATACAATT-3') and *GAPDH*-741 (5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') were tested and calculated 75% sensitivity. For *A. bombi*, validation of 18SFa/28R1100a (5'-TTACGTCCTGCCCTTTGTA-3'/5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3') was accepted and calculated 90% sensitivity. Later studies can derive the genetic origin of a certain species in a certain geographic region and prove if this parasite was native or recently spilled over because of commercial transport of bumblebees.

Also, an exploratory survey of protozoan parasites in solitary bees revealed a new trypanosome infecting *Osmia cornuta* and probably that solitary bees could function as a reservoir species for *Apicystis bombi*.

**Key Words:** *Osmia cornuta*, *Crithidia bombi*, *Apicystis bombi*

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Nektar toplamakta olan bir erkek <i>Bombus terrestris</i> .....	6
Şekil 2. Bir bombus kolonisi.....	7
Şekil 3. Kanada populasyonu yerel ve ticari olarak yetiştirilen arılardaki enfeksiyon oranları ve parazit yoğunluğu.....	16
Şekil 4. <i>Nosema bombi</i> sporları .....	18
Şekil 5. <i>Apicystis bombi</i> sporları (600x).....	20
Şekil 6. <i>Crithidia bombi</i> sporları (400x).....	22
Şekil 7. Patagonia ve Doğu Flaman Bölgesi.....	24
Şekil 8. <i>C. bombi</i> 'nin seçilen farklı genlerinin %2 agaroz jeldeki görüntüsü .....	34
Şekil 9. Yaban arısı DNA örneklerinin Cytb-Leis ve GAPDH-741 primerleriyle çoğaltılmasının %2 agaroz jeldeki görüntüsü.....	36
Şekil 10. <i>Crithidia bombi</i> 'nin Cytb gen bölgesinin baz sırası .....	37
Şekil 11. <i>C. bombi</i> 'nin Cytb geninin benzerleriyle olan filogenetik ilişkisi.....	37
Şekil 12. <i>Crithidia bombi</i> 'nin GAPDH gen bölgesinin baz sırası .....	38
Şekil 13. <i>Crithidia bombi</i> 'nin GAPDH-741 primerleriyle filogenetik analizi .....	39
Şekil 14. <i>A. bombi</i> 'nin ITS bölgesinin farklı primerlerle farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında çoğaltılması.....	41
Şekil 15. <i>A. bombi</i> enfekte ve enfekte olmayan örneklerin EndF/ASCO-28S-R primer çiftiyle farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında ve farklı bağlanma sıcaklıklarında çoğaltılması .....	42
Şekil 16. Farklı primerlerle <i>A. bombi</i> ITS bölgesinin çoğaltılması.....	43
Şekil 17. Farklı <i>A. bombi</i> pozitif arı örneklerin 18SFa/28R1100a primerin çoğaltılması.....	44
Şekil 18. Cr-ITS-807 primer çiftiyle elde edilen <i>Osmia cornuta</i> 'yı enfekte eden tripanosomun DNA dizisi .....	45
Şekil 19. SE tripanosom enfekte <i>Osmia cornuta</i> .....	46

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.	Bombus arısının bilimsel sistematığı.....	4
Tablo 2.	Türkiye’de yıllara göre bombus arısı ithalat ve ihracat değerleri.....	10
Tablo 3.	<i>C. bombi</i> haplotiplendirmesi için kullanılan farklı genler .....	26
Tablo 4.	<i>A. bombi</i> haplotiplendirmesi için kullanılan farklı genler .....	26
Tablo 5.	<i>Crithidia bombi</i> ’de farklı genleri çoğaltmak için kullanılan primerler .....	27
Tablo 6.	<i>Crithidia bombi</i> ’de farklı genleri çoğaltmak için kullanılan diğer primerler .....	29
Tablo 7.	<i>A. bombi</i> ’nin <i>Cox1</i> genini çoğaltmak için kullanılan primerler .....	30
Tablo 8.	<i>A. bombi</i> ’nin ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler .....	31
Tablo 9.	<i>A. bombi</i> ’nin <i>ITS</i> bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler.....	32
Tablo 10.	Farklı primer çiftlerinin hassasiyeti ve özgüllükleri .....	39
Tablo 11.	800 bp fragmenti içeren 3 plazmitin çoğaltılma özellikleri.....	42

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Çiçekli bitkilerde tohum ve meyve oluşması için çiçeğin anterlerinde meydana gelen polenlerin herhangi bir yolla dişi organ üzerine taşınması gerekmektedir. Bu olaya tozlaşma adı verilir. Tozlaşma meyve oluşumu için ilk ve önemli bir aşamadır (Gürel, 1997). Bitki kendi poleni ile tohum ve meyve bağlıyorsa kendine döller, kendi poleni ile döllenmeyi engelleyecek mekanizmalara sahip ise kendine kısırır. Bazı bitki türleri ise poleni yine aynı türden fakat, farklı bir bireyden alarak tohum ve meyve oluşturur. Buna yabancı tozlaşma adı verilir. Kendine döller bitkilerde bile yabancı tozlaşma olduğunda daha kaliteli ve fazla ürün elde edilmektedir. Bitkilerde tozlaşma değişik yollarla meydana gelir. Bunun büyük bir bölümü rüzgar ve böcekler yardımıyla olmaktadır. Böcekler içinde en ideal ve etkili tozlayıcı ise arılardır (Özbek, 2002a).

Dünyada 25.000, ülkemizde 2000'e yakın türü bulunan arılar, yabancı döllenmeye ihtiyaç duyan kültür bitkileri ve yabani bitkilerde tozlaşmayı gerçekleştirerek büyük yarar sağlamaktadır. Arılar içinde en önemli tozlayıcılar ise bal arılarıdır. Bal arısı, bal mumu, arı sütü, arı zehiri ve propolis üreterek bu değerli ürünleri insanoğluna sunarken, bunlardan daha önemlisi yaban arıları ile birlikte kültür bitkilerinde yabancı tozlaşmayı gerçekleştirerek, ürünün nicelik ve nitelik yönünden üstün olmasını sağlamaktır. Bal arısı çok iyi bir tozlayıcı olmakla birlikte, birçok bitki türünde etkili olamamaktadır. Bu bitkilerde yaban arıları tozlama görevini başarılı bir şekilde yürütmektedir (Free, 1993; Özbek, 2002b).

Gerek doğada gerekse örtüaltında yetiştirilen birçok bitkinin tozlaşmasını sağlayan bombus arılarına karşı olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Vücutlarının iri ve renklerinin göz alıcı olması nedeniyle doğada hemen herkesin ilgisini çeken bu arılar, taksonomik olarak Hymenoptera (zar kanatlılar) takımından Apidae familyasının Bombinae alt familyasında yer almaktadır (Özbek, 1983). Yapılan çok sayıda taksonomik çalışmayla dünyada bombus arılarına ait 239 tür belirlenmiştir. Bunlardan sadece birkaçı tropik bölgelerde yer almaktadır (Benton, 2000). Tozlaşmadaki önemlerinden dolayı bombus arılarıyla ilgili çalışmalara çok önceleri başlanmıştır. Darwin 1859'da yazdığı 'Türlerin Orijini' adlı kitabında bu arıların tozlaşmadaki önemlerinden bahsetmiştir.

Örtüaltı yetiştiricilikte bombus arıları uzun dilleri, iri vücutları, yüksek tarlacılık kapasiteleri, yüksek sıcaklık ve ışık yoğunluğunda çalışabilmeleri ve sera dışına daha az çıkma eğilimi göstermeleri gibi özellikleriyle bal arılarına üstünlük sağlar. Bu nedenle örtüaltı yetiştiricilikte bombus arısı kullanımı bal arılarına göre daha yaygındır. Bombus arıları içinde ticari yetiştiriciliği en çok yapılan tür ise *Bombus terrestris*'tir. Örtüaltı yetiştiricilikte tozlaşma amacıyla yaygın olarak kullanılan bu türün kitlesel üretiminin kolay olması ve koloni popülasyonunun kalabalık olması, diğer bombus arı türlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır (Gürel ve Gösterit, 2001).

Yapılan çalışmalarla bombus arısı kullanımının birçok bahçe bitkisinin üretiminde büyük faydalar sağladığı kanıtlanmıştır (Fisher ve Pomeroy, 1989; Eijende, 1994; Gürel vd 1998; Gürel vd., 1999a). Örtüaltında en çok yetiştirilen ve erselik çiçek yapısına sahip domates, biber ve patlıcan gibi sebzeler büyük oranda kendine tozlanır. Ancak, sera içindeki havanın oransal neminin yüksek ve hava sirkülasyonunun az olması nedeniyle tozlaşmada önemli sorunlar yaşanmaktadır. Özellikle örtüaltında yetiştirilen ve polenin stamenden açığa çıkması zor olan domates bitkisinde tozlaşma için yardıma ihtiyaç duyulmaktadır. Bombus arısı kullanılmadan önce yaygın olarak vibratör ve benzeri araçlarla titreşim yapılarak tozlaşma sağlanmaktaydı. Bu uygulamalara ek olarak özellikle ülkemizde kış aylarında örtüaltında yetiştirilen domateslerde dölllenme sorununun çözümü için sektörde hormon olarak adlandırılan ve dölleneden meyve oluşumunu sağlayan bitki gelişimini düzenleyici (BGD) maddeler kullanılmaktadır (Gürel vd., 2001a). Verimi artırmak amacıyla bilinçsizce kullanılan bu maddelerin uygulanmasındaki yanlışlıklar verim ve kaliteyi olumsuz etkilemekte kof, memeli ve düşük kaliteli meyveler oluşmaktadır (Çetinkaya vd., 1996). Ayrıca, hormon kullanılarak elde edilen ürünlerin pazarlanmasında da hem iç hem de dış piyasada ciddi sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle seralarda hormon uygulamasına alternatif olarak bombus arısı kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Belirtilen tüm bu uygulamalar maliyet olarak bombus arısından daha pahalı olmamasına rağmen, iş gücü dikkate alındığında maliyetleri bombus arısı kullanımından doğan maliyetten daha fazla olabilmektedir. Ayrıca, bombus arısı kullanılarak üretilen ürünlerde meyve bağlama oranı, meyve iriliği, meyvedeki tohum sayısı ve tek tiplilik artmakta, deforme meyve oranı azalmakta ve daha kaliteli, lezzetli meyveler üretilmektedir (Fisher ve Pomeroy, 1989; Eijende, 1994; Gürel vd., 1998; Gürel vd., 1999a).

Ülkemizde bombus arılarına ait 40'a yakın tür saptanmıştır. *Bombus terrestris* türü özellikle Akdeniz ve Ege Bölgesinde yaygın olarak görülmektedir. Bombus arıları ülkemiz gündemine 1989-1992 yılları arasında Ege Bölgesinden binlerce bombus ana arısı ve yuvasının doğadan toplatılarak yurt dışına götürülmesiyle girmiştir. Akrabalığı önlemek, kontrollü yetiştiriciliğe göre daha ekonomik olması nedeniyle bazı yabancılar için doğadan arı toplamak çekici gelmiştir. Bu uygulamayla *Bombus terrestris* doğal populasyonlarının azalacağı ve bu nedenle birçok bitkide tozlaşma yetersizliği ve verim kaybı olacağı düşünülmüş ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 10.07.1992 tarihinde aldığı kararla bu arıların doğadan toplanmasını yasaklamıştır (Gürel vd., 2001a).

Bombus arılarının yurt dışına çıkarılması yasaklandıktan sonra bu konu ülkemiz tarımının gündeminden çıkmamıştır. Türkiye örtüaltı yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı ülkelerden birisidir. Bu nedenle bombus arılarının ülkemiz seracılık sektöründe kullanılabilirliği tartışılmaya başlanmış ve üniversite ve araştırma kurumlarınca çalışmalar başlatılmıştır. Ülkemizde son yıllarda sera alanlarının 18.000 hektara kadar çıktığı ve bu alanın giderek arttığı görülmektedir. Seracılık özellikle kış mevsiminin ılıman olduğu Akdeniz ve Ege Bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Toplam sera alanının %76'sı plastik, %24'ü ise cam seralardan oluşmaktadır. Bu seraların %97'sinde sebze, %2'sinde çiçek ve %1'inde meyve üretimi yapılmaktadır. Sebze üretiminde kullanılan seraların %50'sinde domates, %22'sinde salatalık, %15'inde biber, %9'unda patlıcan, %2'sinde kabak, %1'inde fasulye, %1'inde kavun üretimi yapılmaktadır (Abak, 1994).

Bombus arısı kullanımı ülkemiz örtüaltı yetiştiricileri tarafından benimsenmiştir ve kullanılan koloni sayısı her geçen yıl önemli artış göstermektedir. Ortalama 50–60 adet işçi arı içeren bir koloni 80–100 dolara satılmakta ve serada iki ay kullanılmaktadır. İlk kez yaygın olarak 1997 Ekim–1998 Mayıs ayları arasındaki sera üretim döneminde 1.500–2.000 dekar sera alanında 3.500–4.000 adet koloni kullanılmış ve 4-5 yıl içinde bu veriler yaklaşık 6 kat artarak yaklaşık 12.000 dekar sera alanına ve 25.000 adet koloniye ulaşmıştır. Ülkemiz örtüaltı alanları dikkate alındığında 2010 yılında yılda kullanılacak bombus arısı kolonisi sayısının 100.000 adete, kullanılan sera alanının da 50.000 dekara ulaştığı tahmin edilmektedir (Gürel vd., 2001a).

Bu arılar, dağılım alanları ve konak bitkileri açısından birbirlerinden farklılık gösterirler. Örneğin, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, İçel ve Hatay) bombus arı türleri üzerine faunistik ve taksonomik çalışmalar yapan Mahmut Murat Aslan'ın saptamalarına göre, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan 16 bombus türünden yalnızca *Bombus terrestris*

*lucoformis* deniz seviyesinden 1500 m yüksekliklere kadar dağılım gösterirken, diğer 15 tür yalnızca 1000 m yükseklikten sonra görülebilmektedir. Bu türlerin ziyaret ettiği bitki türleri incelendiğinde, *Bombus terrestris lucoformis* ve *Bombus armeniacus* türlerinin 10'dan fazla bitki türünü ziyaret ettikleri, *Bombus erzurumensis*, *Bombus melanurus* ve *Bombus persicus evermanniellus* türlerinin ise sadece bir bitki türünü ziyaret ettikleri saptanmıştır.

Genel ifadeyle, böceklerle tozlaşma bitki açısından zorunlu olmasa bile, meyve ve tohum kalitesi böceğin bitkiyi ziyaretiyle artıyor. Aynı zamanda böceklerle tozlaşma, ürünün daha erken oluşmasını ve daha olgun olmasını sağlıyor.

## 1.2. Bombus Arıları

### 1.2.1. Sistematığı

Bombuslar hayvanlar alemi böcekler sınıfında yer alan arılar ailesindedir (Tablo 1). Dünya'da yaklaşık 250 türü olan bu arıların ülkemizde 100'den fazla türü bulunmaktadır.

Tablo 1. Bombus arısının bilimsel sistematığı

Taksonomik Grup	Adlandırma
Alem	Animalia
Şube	Arthropoda
Alt Şube	Hexpoda
Sınıf	Insecta
Takım	Hymenoptera
Familya	Apidae
Alt Familya	Apinae
Cins	Bombus
Tür	<i>Bombus terrestris</i>

### 1.2.2. Yapısı

Bombus, renkli tüyleri olan, türdeşlerine göre oldukça iri yapılı ve genelde toprak altında yaşayan bir yaban arısı türüdür. Bombusların uzun dilli türleri, çiçek borusu uzun olan çiçeklerden de çiçek tozu ve bal özü alabilir. Bu, diğer arılar için oldukça zor hatta imkansız bir işlemdir. Hatta bazı türler, bal özüne ulaşabilmek için önce çiçeğin dış



kısmını ısırır ve açtıkları delikten dillerini içeri sokarak kolayca beslenir. Bombusların göğüs bölgesinde tutunma ve yürümei sağlayan üç çift bacakları vardır (Şekil 1). Bu bacaklardan birinci çift, antenlere bulaşan çiçek tozlarını ve diğer tozları temizlemek için özel temizlik gereçleri ile donatılmıştır. Bu sayede koku alma organı olan antenler sürekli temiz tutulur. Bombusun 1 çift anteni, bileşik gözlerin orta kısmına yakın bir yerden çıkar. Antenler, dişi ve işçi bombuslarda 12 bölüttten, erkek bombuslarda ise 13 bölüttten meydana gelir. Koku alma işlevini üstlenmiş olan antenler çok miktarda çiçek tozu ve balözüyle bulaşık olmasına rağmen, bombuslar bacakların birinci çifti sayesinde yine de çok etkin çalışır. Seçtikleri çiçekler çoğunlukla tatlı kokulu, çok renkli ve büyük boyutludur. Bombuslar insanların kokusuz diye bildiği bazı çiçeklerin kokularını bile ayırt edecek kadar hassastır. Bombusların üçüncü çift bacaklarında çiçek tozu taşımak için sepetçikler ve çiçek tozlarını doldurmaya, gerektiğinde sıkıştırmaya yarayan fırçalar bulunur.

Bombuslar vücut ağırlıklarının yarısı kadar yükü rahatlıkla taşıyabilir. Bu nedenle, iri olan işçi bireyler daha etkin besin toplayıcısıdır. Zar şeklindeki iki çift kanatları sayesinde uçarlar. Birinci çift kanadın arka kenarında, ikinci çift kanadın ise ön kenarında bir seri kanca bulunur. Bunlar uçuş sırasında birbirine kenetlenir, böylece ön ve arka kanatlar birlikte ve daha güçlü hareket edebilir. Bombuslar kendi etrafında dönen bir türbülans yaratır ve bu sayede düşmeden uçabilirler. Uçuş için ısı üretimi zorunludur. Bombuslar toraks (göğüs) bölgesinin sıcaklığını 30°C'e ya da daha üst düzeylere çıkarabilir. Aktif olarak uçan bir bombusta toraks bölgesinin sıcaklığı 35-40°C olur. Bunun için uçuşa geçmeden önce bir ısınma süreci geçirir. Bombusların hemen her mevsimde uçabilmelerinin sırrı da uçuş kaslarındaki enzim etkinlikleri ile vücut sıcaklığını artırabilmelerinde yatar. Bu enzimler belirli şekerleri parçalayarak enerji açığa çıkarır. Bombus çiçeğe konduğunda vücut sıcaklığını düşürür. Eğer karahindiba ve ayçiçeği gibi bitkiler üzerinden besin topluyorsa, bir çiçekten diğerine uçmak yerine yürümei tercih eder ve bu sırada toraks bölgesinin sıcaklığı uçuş için gerekenden daha alt sınıra düşer. Arı, uçmaya karar verdiğinde yeniden ısınmaya başlar.



Şekil 1. Nektar toplamakta olan bir erkek *Bombus terrestris* (URL-1, 2011).

### 1.2.3. Doğal Yaşam Döngüsü

*Bombus* arılarının yaşam döngüsü bal arılarından oldukça farklıdır. Ancak, bu arılar da ana, erkek ve işçi arıdan oluşan koloni düzeni içinde yaşar ve kendi aralarında iş bölümü yapmaları nedeniyle sosyal böcekler içinde yer alırlar (Şekil 2). *Bombus* arılarında koloni yaşamı, bir önceki yıla ait kolonilerde üretilen ana arıların, diyapoz amacıyla girdikleri toprak altından çıkarak çiçekleri ziyaret etmeleri ve polen ve nektarla beslenip yuva kurmak için uygun bir yer bulmaları ile başlar (Free, 1982). Daha sonra ana arılar yuva içinde yumurtlar. Bu yumurtalardan oluşan larvalar ana arı tarafından bal ve polen karışımı bir yiyeceklerle beslenir.

İlk yumurta kümesinden işçi arılar çıktıktan sonra ana arı tarlacılık faaliyetlerine son verir ve ikinci yumurta kümesindeki larvalar bu işçiler tarafından beslenir. Kolonideki işçi arı kadrosu en üst düzeye ulaştığı zaman ana ve erkek arılar üretilmeye başlanır. Bu aşamaya dönüşüm aşaması denir (Duchayeau ve Velthuis, 1988). *Bombus terrestris* kolonilerinde erkek arılar 2-4 günlük yuvayı terk eder ve tekrar geri dönmezler. Yaşlı işçi arılar ölmeye başladığı için yuvada çok az sayıda işçi arı ile birlikte yaşlı ana arı kalır. Bir süre sonra bu bireylerde ölür ve koloni yaşamı sona erer.



Şekil 2. Bir bombus kolonisi (URL-2, 2011).

Bir sonraki yıla ait kolonileri oluşturacak genç ana arılar iki hafta yuvada kaldıktan sonra güneşli bir günde yuva dışında erkek arılarla çiftleşip vücutlarında yağ depoladıktan sonra kışlama yeri bularak diyapoz sürecine girerler. Diyapoz, düşük kış sıcaklığı, yüksek yaz sıcaklığı, kuraklık dönemleri ve gerekli besinin elde edilemediği süreçler gibi uygun olmayan çevre koşulları süresince gelişimin baskı altına alındığı, genetik ve çevresel faktörler tarafından da belirlenen bir uyum mekanizmasıdır. Bu çevresel faktörler bombus arılarının doğal yaşam alanlarında yararlandıkları bitkilerin çiçeklenme zamanları ve diğer ekolojik faktörleri de içermektedir (Goodwin ve Steiner, 1997).

*Bombus terrestris* kolonilerinde üretilen işçi, erkek ve ana arı sayılarında önemli farklılıklar gözlenmektedir. Ayrıca, ana arının erkek ve ana arı üretimine başladığı dönüşüm noktası ve işçi arılarla ana arı arasındaki çatışmanın başladığı rekabet noktasının zamanında da büyük varyasyon görülmektedir. Bombus arılarında bal arılarında da olduğu gibi erkek tozlamada etkili değildir ve bu arılarda kolonilerde ana ve/veya erkek arı üretiminin başlaması koloni yaşamının sonuna yaklaşıldığının önemli bir göstergesidir. Kolonilerde üretilen işçi arı, ana arı ve erkek arı sayısı ortalama olarak sırasıyla 150, 50, 300 adet civarındadır. Dönüşüm ve rekabet noktasının zamanı ise ilk işçi arılar çıktıktan sonra sırasıyla 15 ve 20 gün olmaktadır. Ancak, bu sayı ve zamanlar bakımından koloniler arasında büyük farklılıklar görülmektedir. Bu farklılıkların temelinde yuvadaki işçi arı yoğunluğu, işçi arı/larva oranı, hormonlar, yuva içi ve dışı çevre koşulları, besin durumu, kurucu ana arının niteliği, hastalık ve zararlılar gibi bir çok faktör rol oynamaktadır

(Michener, 1974; Greetenkord ve Drescher, 1997; Beekman vd., 1999; Beekman ve van Stratum, 2000; Cnaani vd., 2000a; Yeninar vd., 2000).

*Bombus terrestris* arılarının seralarda kullanılma süreleri iki ay kadardır. Seraya konulan kolonilerde 50-80 adet işçi ve bir adet sağlıklı ana arının bulunması gerekmektedir. Kontrollü koşullarda kitlesel üretim yapan firmalarda bile üretime alınan ana arıların yarısından daha azı tozlaşmada kullanılacak uygunlukta koloni oluşturabilmektedir. Bu kayıpta ana arı ölümleri ve ana arıların yumurtlamamalarının yanı sıra, ana arıların geç ve yavaş yumurtlamaları ve erken dönemde erkek ve ana arı üretimine başlamaları da önemli rol oynamaktadır. *Bombus terrestris* arılarının ekonomik değeri ve tozlaşma amacıyla on binlerce koloninin kullanıldığı düşünüldüğünde yaşanan bu sorunlar işletmelere önemli bir yük getirmekte ve arıların daha pahalı satılmasına yol açmaktadır. Bu nedenle ana arıların koloni oluşturma oranının, kolonilerdeki işçi arı popülasyonunun ve koloni ömrünün artırılması, ana ve erkek arı üretiminin geciktirilmesi oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

### **1.3. Bombus Arısının Kitlesel Üretimi**

*Bombus* arılarının kitlesel üretimi yaklaşık 30 yıl önce Hollanda ve Belçika'daki birkaç ticari firmanın yoğun çalışmaları sonucunda gerçekleşmiştir. *Bombus* arıları ticari olarak günümüzde de az sayıda firma tarafından üretilmektedir. Yılda bir milyondan fazla *bombus* kolonisi üreten bu firmalar kolonileri direk ihraç ederek ya da çeşitli ülkelerde kurdukları ortaklıklarla pazarlamaktadır. Ticari firmalar; ana arılardan koloni oluşturma, kolonilerden ana arı ve erkek arı yetiştirme, çiftleştirme, çiftleşmiş ana arıların diyapoz dönemini kontrol etme ve diyapozdan çıkan ana arıların koloni oluşturmalarını sağlamak gibi *bombus* arılarının tüm yaşam evrelerini kontrollü koşullarda denetim altına alarak yıl boyu kitlesel üretimi gerçekleştirmektedir. Bu evrelerin her aşamasında kayıplar yaşanmaktadır. Ayrıca, *bombus* kolonilerinde üretilen işçi, ana ve erkek arı sayıları ve ana ve erkek arıların üretim zamanları bakımından da önemli farklılıklar gözlenmektedir (Duchateau ve Velthuis, 1988; Prys Jones ve Corbet, 1991). Genel olarak kolonideki işçi arı kadrosu en üst noktaya ulaştığı zaman erkek ve ana arı üretilmesine karşın koloni gelişiminin başlangıcında da ana ve erkek arı üretilmektedir. Bazı koloniler sadece erkek ya da ana arı üretirken, bazıları hem ana arı hem de erkek arı üretebilmektedir. Yuvadaki arı yoğunluğu, işçi arı/larva oranı, hastalık ve zararlılar, yuva içi ve dışı çevre

koşulları, besin miktarı ve kalitesi, kurucu ana arının niteliği, uygulanan diyapoz yöntemi gibi bir çok faktörün koloni oluşturma oranını ve kolonilerin ana ve erkek arı yetiştirme zamanı ve miktarını etkilediği tahmin edilmektedir (Duchateau ve Velthuis, 1988; Gösterit ve Gürel, 2005). Yüksek koloni oluşturma oranı, hızlı koloni gelişimi, kalabalık işçi arı popülasyonu ve koloni yaşamının sonuna doğru ana ve erkek arı üretimi ticari yetiştiricilikte aranılan en önemli özelliklerdir. Bu nedenle erken dönemde ana ve/veya erkek arı üreten, koloni gelişimi yavaş ve işçi arı sayısı düşük olan koloniler tozlaşma amacıyla kullanılmaya uygun değildir. Ticari firmalar üretim tekniklerini sürekli geliştirerek hem iş gücü maliyetini düşürmekte hem de çeşitli evrelerdeki kayıpları en aza indirerek ürettikleri ana arıların tozlaşmaya uygun koloni oluşturma oranını artırmaktadır. Bombus arılarının yıl boyu kitlesel üretimi iki önemli aşamada gerçekleşir. Bunlardan birincisi ana arı üretimidir. Bu aşama ana arıların çiftleştirilmesi ve diyapozun kontrolünü de içermektedir. İkincisi ise çiftleşmiş ve kontrollü diyapoz uygulanmış ana arılardan seralarda kullanılacak nitelikte kolonileri üretme aşamasıdır. Başlangıçta ticari firmalar Türkiye, İtalya, Yunanistan, İspanya gibi bir çok ülkede diyapoz evresini geçirmiş çok sayıda ana arıyı doğadan toplayarak damızlık kolonilerini oluşturmuşlar ve sonra geliştirdikleri üretim teknikleri ile yıl boyu doğaya bağlı kalmadan kitlesel üretimi başarmışlardır. İlk yıllarda bir çok *B. terrestris* alt türü ve ekotipi ticari üretimde kullanılmış ancak, Türkiye’de de yaygın bulunan *B. terrestris dalmatinus* genotipi ticari yetiştiricilik için çok uygun özellikler taşıması nedeniyle en çok tercih edilen genotip olmuştur (Velthuis ve Doorn, 2006).

#### **1.4. Türkiye’de Bombus Arısı Üretimi**

Türkiye’de bombus arısı üretim faaliyetlerine yaklaşık 10 yıl önce başlanmıştır. Bu süreç içerisinde 8 firma kurulmuş ancak, bu firmalardan 5 tanesi özellikle kitlesel üretimde yaşadıkları çeşitli sorunlar nedeniyle faaliyetlerini durdurmuştur. Türkiye’de bir sera üretim döneminde kullanılan yaklaşık 55 000 adet bombus kolonisi Antalya’da kurulmuş olan üç firma tarafından üretilip, satılmaktadır. Bu üç firmada da ana arı üretim işletmeleri Hollanda ve Belçika’da bulunan ve dünya bombus üretiminin tamamına yakını üreten yabancı firmaların ortaklığı bulunmaktadır. Hollanda bağlantılı Koppert adlı firma, hem yurt içinde üretim hem ithalat, Biobest adlı firma da Belçika bağlantılı ithalat yapmaktadır. Firmalar ilk yıllarda yalnızca koloni ithalatı yapmıştır.

Tarım Bakanlığı'nın koloni ithalatına sınırlama getirmesi, Türkiye'de bombus arılarına olan talebin sürekli artması ve maliyetlerin yüksekliği yabancı ortakların Türkiye'de yatırım yapmasını hızlandırmış ve firmalar koloni yerine yurt dışındaki ortaklarından ana arı alarak Türkiye'deki işletmeleri koloni üretmeye başlamışlardır. Ana arı üretimini de Türkiye'de yapmak için gerekli yatırımları başlatan firmalar birkaç yıl içerisinde ana arı üretimi de yapmayı planlamaktadır. Bu gelişmelere koşut olarak koloni ithalatı 2004 yılına kadar artış gösterirken, 2007 yılında hiç ithalat gerçekleştirilmemiştir (Tablo 2). Buna karşın ana arı ithalatı 2000 yılında başlamış ve sürekli artarak 2006 yılında 341 938 adede ulaşmıştır. Ana arı miktarındaki bu çok yüksek artışta Belçikalı firmanın Türkiye'de ortaklığı bulunan işletmesini önemli bir üretim merkezi yapması ve burada üretilen kolonileri Belçika üzerinden pazarlamasından kaynaklanmıştır.

Tablo 2. Türkiye'de yıllara göre bombus arısı ithalat ve ihracat değerleri (URL-3).

Yıl	İthalat		İhracat
	Koloni (adet)	Ana arı (adet)	Koloni (adet)
1999	4 000	-	-
2000	6 850	30 100	1 600
2001	5 276	53 640	246
2002	10 444	73 000	2 248
2003	12 048	49 600	1 083
2004	14 490	102 577	55
2005	1 599	214 079	1 093
2006	135	341 938	105 645
2007 (ilk çeyrek)	-	58 868	43 130

### 1.5. Bombus Arılarıyla Tozlaşma

Geçmişte üreticiler döllemeyi, ürünün çeşidine bağlı olarak bal arıları, elle veya hormon ile yapmaktaydılar. Kullanılan bu sistemlerin şu dezavantajları vardır. Bal arıları seralarda veya plastik tünellerde çok iyi çalışmaz. Elle dölleme yapmak hem çok zor olur, hem de zaman kaybına neden olur. Hormon kullanımı sonucunda genellikle ihracat için uygun olmayan kalitesiz meyveler oluşur (yumuşak, şekilleri bozuk ve tohumuz meyve). Üretici, özellikle patlıcan ve domateste yaptığı hormon uygulamaları ile nem oluşumuna neden olmakta, böylece Botrytis (pas) hastalığına davetiye çıkarmaktadır. Bombus arıları, kolonilerini oluşturmak için protein kaynağı olan polene, aynı zamanda enerji kaynağı olarak da bir karbonhidrat olan (bal özü) nektara ihtiyaç duyulur.

Bazı bitkilerin (örneğin domates) nektarı yoktur. Bu nedenle, koloninin enerji ihtiyacını karşılamak için şekerli bir şurup verilir. Biogluc®, kullanıma hazır bir şurup olup Biobest tarafından üretilmiştir. Yapılan şuruba renkli bir madde ilavesiyle şurupluktaki seviye kolaylıkla izlenebilir hale getirilmiştir. Bombus arıları uygun olmayan koşullarda bile mükemmel dölleme yapar. Bal arılarından farklı olarak, bombus arıları kötü hava koşullarından daha az etkilenir. Sıcaklığın 15°C'nin altına düştüğü, yağmurlu ve bulutlu havalarda bal arılarının %70'i kovanlarından çıkmaz. Bombus arıları ise hiçbir engelleme olmaksızın görevlerine devam eder. Bal arıları bir dakikada ortalama 5 çiçeği dölleyen, bombus arıları 40 çiçeği dölleyebilir. Biobest, bombus arılarını tüm yıl boyunca üreticilerin hizmetine sunduğundan hem erken hem de geç ekimlerde dölleme sorun olmaktan çıkmıştır.

Bombus arıları çok yönlü işçilerdir. Sadece seralarda ve plastik tünellerde değil, aynı zamanda açık arazide de çok iyi bir dölleyicidir. İşçilikten ve kimyasal kullanımından büyük tasarruf sağlarlar. Bombus arıları kullanılmaya başladığından beri kimyasal girdilerde %50'lere varan bir azalma görülmüştür. Domates, biber, çilek ve bunun gibi birçok üründe bombus arılarıyla yapılan dölleme sonucunda içi tamamen çekirdek ile dolu, standart büyüklükte, daha kaliteli üretim mümkün olmaktadır. Yabani bitkilerin geniş bir çoğunluğu ağırlıklı olarak veya yalnızca yaban arılar sayesinde, bazen de belirli yaban arı türleriyle tozlaşır (Goulson, 2003). Bununla birlikte, tozlaşma ağlarından tozlayıcıların kalkmasının etkileriyle ilgili çalışmalar yaban arı gibi önemli tozlayıcıların ve bitki tür çeşitliliğinin azalmasına neden olduğunu gösterdi (Memmott, 2004).

Birçok tarlada meyve ve sebze verimi yaban arı ziyareti sayesinde artmaktadır (Goulson, 2003). Örneğin, Avrupa'da tarla fasülyesi uzun dilli *B. pascuorum* ve *B. hortorum* gibi türler sayesinde tozlaşır (Free ve Williams, 1976). Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalıktan, pestisitlerin hatalı kullanımı, devlet yardımlarının azalışıyla ilgili sebeplerden dolayı bal arı (*Apis mellifera*) popülasyonlarında devam etmekte olan bir azalma vardır (Kremen vd., 2002). Amerika'da bal arılar sayesinde ürün tozlaşmasının değeri yılda 5 milyon ile 14 milyar dolar arasında olduğu tahmin ediliyor. Ancak, arıcılık geçtiğimiz 50 yıl boyunca yaklaşık %50 azaldı (Kremen vd., 2002). Bu azalma salatalık, bal kabağı, karpuz, yaban mersini gibi böcek tozlayıcı ürünlerin gelecek kaygısına neden olacaktır (Delaplane ve Mayer, 2000; Kremen vd., 2002; Richards, 2001).

## 1.6. Yaban Arılarında Azalmanın Sebepleri

Önemli ticari tozlayıcı *Apis mellifera*'nın sayısal düşüşüne bağlı olarak, doğal tozlaşma ve besin güvenliği stres altındadır (Steffan-Dewenter vd., 2005). Diğer tozlayıcıların da sayısal düşüşlerinin farkına varılmaktadır (Potts vd., 2010). Son 10 yılda, özellikle Batı Avrupa ve Kuzey Amerika gibi gelişmiş bölgelerde, birçok yaban arı türünde azalma olduğuna dair kanıtlar vardır (Goulson, 2003). Avrupa'da, yaklaşık son 60 yılda bu azalmalar belgelendi. Bu durumun en önemli sebepleri habitat kaybı ve tarımsal yoğunluktan kaynaklanan floral zenginlikte azalmalardır. Bununla birlikte, yaban arılarının ticarileşmesiyle Kuzey Amerika'da doğal yaban arı faunasındaki hızlı azalmalar için ortaya çıkan parazitlerin şu anda ve gelecekte önemli bir rol oynayabilirliği neden olarak öneriliyor (Colla vd., 2006). Azalma için gösterilen sebepler daha da ayrıntılı olarak incelenmiştir.

### 1.6.1. Floral Kaynaklarda Azalmalar

Arı popülasyonlarının önceki kayıtlarıyla yapılan karşılaştırmada, dört türün (*Bombus occidentalis*, *B. pensylvanicus*, *B. affinis* ve *B. terricola*) popülasyonunun %96 oranında azaldığı, sadece son 20 yılda bu türlerin coğrafi alanlarının %23 ile %87 oranında düştüğü belirlendi. Batı Avrupa'da yaban arı azalmaların başlıca sebebi tarımsal faaliyetlerin yoğunluğudur. Bu bölgede 1932 ve 1984 yılları arasında, ova çayırların yaklaşık %90'ı kayboldu (Howard vd., 2003). Toprağı sürmek, çayırları yeniden tohumlamak ve bataklık alanları boşaltmak gibi işlemler yapıldı. Bu da işlenmemiş toprakların ve gelişmeyen ekili toprakların alanların azalmasına sebep oldu. Kuzey Amerika'da bazı bölgelerde, tarımsal yoğunluk; doğal fragmentasyon, yarı doğal habitat ve bioçeşitlilikte kayıplara sebep olur. Örneğin; Iowa'da kara alanının %85'i yaban arılarına iyi bir habitat sağlayan büyük çayırlandı. Ancak günümüzde bu alanın %0.1'den daha az alan kalmıştır. Karanın geri kalanı, ürünlerin monokültürleriyle veya kentsel alanlar sayesinde genişçe çevrildi (Hines ve Hendrix, 2005).

Yaban arıların yem bitkilerinin aşırı azalmalara uğradığını gösteren kanıtlar vardır. İngiltere'de bir çalışmada tercih edilen 97 yaban arısının %71'i alan azalmasından, %76'sı ise son 80 yılda çeşitliliğin azalmasından sıkıntı çekmektedir (Carvell vd., 2006).



Yağ şalgamı gibi çiçekli ürünler, ekilebilir topraklarda yaban arı popülasyonunu önemli ölçüde desteklemektedir (Westphal vd., 2003). Bununla beraber yaban arı kolonilerin iyi gelişmesi, Nisan'dan Ağustos'a kadar çiçeklerin birbirini takip eden devamlı bir sıraya ihtiyaç duyar.

### 1.6.2. Yuva Alanlarının Kaybı

Floral kaynaklara ek olarak, yaban arıların uygun yuvalara da ihtiyacı vardır. *Bombus pascuorum* yoğun ot öbeği içinde, *B. terrestris* ise yerin altında oyuklarda yuva yapar. Her iki grup genellikle kemiricilerin yuvalarını kullanır. Bu türlerin toprağın üzerindeki yuvaları tarla makineleriyle yeşillik veya otların kesilmesiyle yok edildi (Goulson, 2003). Modern çiftlikte, yabancı otların ve tarla çiçeklerin azlığı daha az tohumların olduğunu gösterir ve bu da tarla fareleri için daha az besin anlamına gelir. Bu memelilerin daha düşük popülasyonları, hem yer altı hem de yer üstünde yuva yapan yaban arı türleri için daha az yuva alanlarına sebep olacaktır. Kentsel alanlarda uygun yuva alanlarının azlığı için bazı kanıtlar var. San Fransisco'da şehir parklarında yaban arı bolluğu kemirici hayvan çukurlarının sayılarıyla tam olarak ilgili olduğu ve bu alanların sınırlayıcı bir faktör olabileceği öneriliyor (McFrederick ve LeBuhn, 2006).

### 1.6.3. Pestisitler

Pestisitlerin risk değerlendirmesi her zaman bal arıları için uygulanır. Ancak, bu sonuçlar muhtemelen doğrudan yaban arıları için uygulanabilir değildir (Thompson ve Hunt, 1999). Örneğin, bal arılarından kaçınmak için yaban arılarının aktif olduğu sabahın erken saatleri veya akşamları çiçekli yağ şalgamına pyrethroid'ler yaygın olarak uygulanır. Sera ürünlerin tozlaşmasında yaban arı kullanımının gelişmesine karşılık olarak yaban arıları için uygun laboratuvar ve tarlaya dayalı bioassayler geliştirildi, ama bunlar genişçe kullanılmadı ve bunun için sadece birkaç toksikolojik bilgi mevcuttur (Thompson, 2001).

Şu ana kadar yapılan hemen hemen bütün testler toksisitesinin bal arılarındakine benzer olduğu ileri sürülen *B. terrestris* üzerinde gerçekleştirildi. Bunu ortaya çıkarmanın spreyle direk temas (çiçekli ürünlerde), kontamine olmuş bitki yapraklarıyla temas ve

nektarda kimyasalların alınımı şeklinde 3 yolu vardır. Son yol büyük ihtimalle sistemik insektisitlerdir. Carbofuran ve dimethoate'li testler, seçici olarak yüksek konsantrasyonlara ulaşabildiği nektarda taşındığını göstermektedir (Davis ve Shuel, 1988).

Koloniler genişlediğinde, işçilerin bazılarının eksikliği tolero edilebilir. Bununla birlikte, ilkbaharda kraliçe yem aradığında ve akabinde yuvalar küçük ve sadece birkaç işçi içerdiğinde, ölüm önemli bir etkiye sahip olabilir (Thompson, 2001). Bu nedenle, pestisitlerin ilkbahar uygulamaları çok büyük etkiye sahip olabilir.

#### 1.6.4. Yerli Olmayan Arıların Etkileri

Batı Avrupa'ya karşın Amerika Birleşik Devletlerinde, yaban arıları için en önemli tehdit yetiştirilen yaban arı kovanlarının yaygın ticaretinden dolayı hastalığın yayılışı olabilir (Thorp ve Shepherd, 2005). İsrail, Kore, Japonya, Kuzey Amerika ve Avrupa gibi dünyanın çeşitli yerlerinde sera tozlaşması için ticari yaban arı kovanları kullanılmaktadır (Goulson, 2003). Amerika Birleşik Devletlerinde, 1990'lardan beri *Bombus impatiens* ve *Bombus occidentalis*'in kolonileri domates (Whittington ve Winston, 2004) ve tatlı biber (Shipp vd., 1994) gibi sera ürünlerinin tozlaşması için yetiştirilmektedir. Yaban arılarına spesifik protozoon patojenlerden *Crithidia bombi* ve *Nosema bombi* ve trakeal bit *Locustacarus buchneri*'nin yüksek yaygınlığıyla beraber bu koloniler yerel kolonilerden daha iyi bir parazit yüküne sahiptir. Bu parazitler koloni yaşamını ve çoğalmasını ve/veya yaşayan işçilerin yem aramasını olumsuz etkiler (Brown vd., 2003; Gegear vd., 2005; Otterstatter vd., 2005). Son zamanlarda Japonya'da, yerel olmayan *B. terrestris*'in yabani kolonileri yaygındır (Inari vd., 2005). Kanada'da yapılan bir çalışmada polenin %73'ü sera dışında ticari kolonilere ait işçiler tarafından taşındığı belirlendi (Whittington vd., 2004).

Çiçekler sayesinde ticari olarak yetiştirilen arılarda ve yerel arılar arasında yüksek bir ihtimalle etkileşim olması, ticari popülasyondan yerel popülasyona patojen dağılımını sağlar. Ticari seraların yakınındaki yerel arılarda *Crithidia bombi* ve *Nosema bombi*'nin yaygınlığında önemli artışlar olduğu görülmektedir (Colla vd., 2006).

Kuzey Amerika'da yaban arı üretim tesislerinde 1998'de bir *Nosema bombi* salgını rapor edildi. Belki de bu olay 1995 ve 1996'da Meksika'da enfekte Avrupalı *B. terrestris* kolonilerin ithalatı sonucu meydana gelmiştir (Winter vd., 2006). Benzer olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde, ticari yaban arı kullanımı başladıktan sonra sadece *Crithidia bombi* bulundu ve bu parazit Amerika Birleşik Devletlerine ait olmayabilir (Winter vd., 2006).

Ticari olarak yetiştirme için 1990 başlarında Amerika'dan Avrupa'ya *B. occidentalis* kraliçelerin nakliyatının sonucunda da meydana gelebilir (Colla vd., 2006; Winter vd., 2006).

*Bombus terreicola*, *Bombus affinis*, *Bombus franklini* ve *Bombus occidentalis* gibi türlerin yerel olmayan bir patojene maruz kalmaları yaban arıların azalmalarının olası sebebidir (Thorp, 2005; Thorp ve Shepherd, 2005; Whittington ve Winston, 2004). Bununla birlikte, yaban arı türlerinin parazitlere duyarlılığında veya bu parazitlerin doğal dağılımıyla ilgili bilgiler yetersizdir ve bu nedenle, evcil yaban arı kovanlarının taşınmasında daha sıkı kontroller gereklidir.

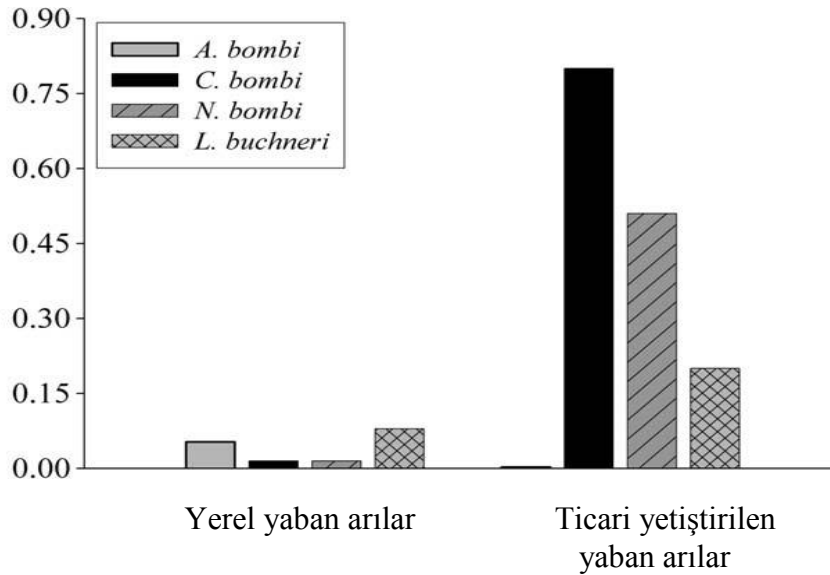
Yaban arı ticaretiyle ilgili başka riskler de vardır. Amerika'da, Güneydoğu Avrupa alt türü (*B. terrestris dalmatinus*)'nün yaklaşık olarak 10.000 kolonisi her yıl ithal edilmektedir. Britanya bu arının endemik bir alt türü olan *Bombus terrestris audax*'a sahiptir. Bu alt tür üstün yem arama etkisine ve üreme oranına sahiptir. Ayrıca, *B. terrestris dalmatinus* ve *B. terrestris audax* kolayca melezlenir; bu nedenle, yerel türler hibridizasyon boyunca kaybolabilir (Ings vd., 2005). Bu da İngiliz türlerinde parazit bulaşımı için tehlike oluşturmaktadır (Ings vd., 2006).

Son çalışmalar bal arılarının yaban arıları üzerinde negatif etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Walther-Hellwig ve arkadaşları (Walther-Hellwig vd., 2006) günün geç saatlerinde bombus arı türlerinin yem arama sırasında kullandıkları bitkilerden çıkarken kısa dilli yaban arıların bal arı kovanlarına yakın yem alanlarından kaçındıklarını ortaya koydu. Thomson (Thomson, 2004) deneysel olarak bal arıları üretti ve kovanlara yakınlığın, *B. occidentalis* kolonilerin çoğalma başarısını ve yem arama oranlarını önemli derecede azalttığını buldu.

Afrikan bal arı zararlısı *Aetina tumida* son zamanlarda Kuzey Amerika, Mısır, Avusturalya ve Avrupa'yı istila etti ve saldırılar *Bombus impatiens* kolonileri için önemli oranda zarara sebep oldu (Spiewok ve Neumann, 2006). Viral bal arı patojeni deformed wing virüsü, *B. terrestris* ticari kolonilerinde bulundu (Genersch vd., 2006). Bu virüs bal arılardan daha yüksek şiddette yaban arılarında ortaya çıktı ve bu bulgular bal arıları ve yaban arıları arasında karşılıklı infektivite ve aktarım hakkında soruları arttırdı.

### 1.7. Yaban Arı Patojenleri

Ticari olarak yetiştirilen yaban arılarının doğal olanlara göre çeşitli patojenleri daha yüksek oranda ihtiva ettiklerine dair artan kanıtlar vardır. Birkaç çalışmada, ticari yaban arılarında intestinal protozoon *Crithidia bombi* (Lipa ve Triggiani) (Kinetoplast: Trypanosome), *Nosema bombi* (Fantham ve Porter) (Microsporidia: Nosematidae) ve trakeal bit *Locustacarus buchneri* (Stammer) (Acari: Podapolipidae) gibi patojenlerin yerel yaban arılarından daha fazla olduğu bulundu (Şekil 3). Yaban arıların yağ dokusunu enfekte eden protozoon *Apicystis bombi* (MacFarlane vd.,1995) (Neogregarine: Ophrocystidae) ise ticari arılarda yerel arılardan daha yaygın olmadığı görüldü (Otterstatter, yayınlanmadı).



Şekil 3. Kanada popülasyonu yerel ve ticari olarak yetiştirilen arılardaki enfeksiyon oranları ve parazit yoğunluğu. (Yerel arılar: MacFarlane vd., 1995 [*A. bombi*, n = 2977 kraliçe arı]; Liu, 1973 [*C. bombi*, *N. bombi*, n = 133 kraliçe arı]; Otterstatter and Whidden, 2004 [*L. buchneri*, n = 1016 kraliçe, işçi, erkek arı]; ticari olarak yetiştirilen arılar: Otterstatter M.C., yayınlanmadı [*A. bombi*, *C. bombi*, n = 20 koloni]; Whittington ve Winston, 2003 [*N. bombi*, n = 49 koloni] Avrupa popülasyonun da dikkate alınan ticari arılarda ([n = 367 colonies, Goka vd., 2000]) *L. buchneri* üzerindeki çalışmalar hariç olmak üzere).

*Nosema bombi*, *Locustacaris buchneri*, *Apicystis bombi*, *Crithidia bombi* gibi parazitlerin hepsi yaban arı türlerini enfekte eder ve kolonilere geniş ölçüde yayılır.

Böylece, koloni yaşamının veya işçi arıların yem arama etkilerinin azalmasına sebep olur (Brown vd., 2003; Otterstatter vd., 2005; Fisher ve Pomeroy, 1989; Husband ve Sinha, 1970; Mac-Farlane vd., 1995). Bunun sonucu olarak, yaban arılarının uluslararası taşınımı, seralardan kaçan arılardan yaban arılarına patojen dağılımına yol açabilir (Colla vd., 2006) ve yaban arı türünün azalmasına sebep olabilir (Williams ve Osborne, 2009).

Patojen dağılımı, genellikle domestik veya ticari populyasyondan simpatrik populyasyona infeksiyöz etmenlerin (parazitler veya patojenler) iletimi olarak tanımlanabilir (Dazsak vd., 2000; Power ve Mitchell, 2004). Örneğin, ticari olarak yetiştirilen balık, alabalık çiftliklerinden kaçtıktan sonra parazitik deniz biti (*Lepeophtheirus salmonis*) doğal alabalık (*Oncorhynchus* spp.) populyasyonlarında tespit edildi (Morton vd., 2004). Parazite hem Kanada (Morton vd., 2004) hem de Avrupa'da (McVicar, 1997; McVicar, 2004) doğal balık populyasyonlarında rastlanıldı.

Patojen dağılımı biyoçeşitlilik için önemli bir tehdit gibi görülmekte ve çeşitli populyasyonlarda azalma veya nesil tükenmesinin bu dağılımla ilgili olduğu düşünülmektedir (Altizer vd., 2003). Patojen dağılımlarını araştırmada yaban arı parazitlerini karakterize etmek için moleküler araçlar geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Dağılımın tekerrürü veya varoluşunun bilinmesi yerel populyasyonun etkili bir şekilde korunma için ülke yönetimini harekete geçirmiştir.

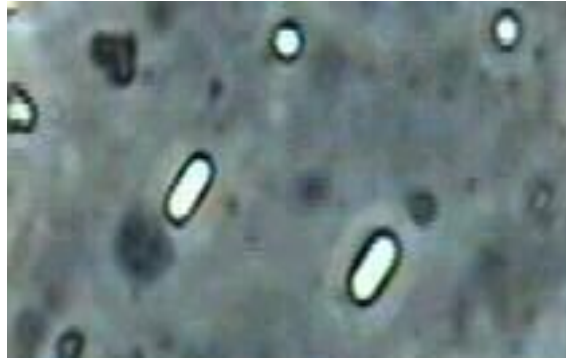
Doğal yaban arı kraliçe ve kolonileri birçok patojene maruz kalmaktadır (virüs, bakteri, fungus, protozoa gibi). Ağır enfekte kraliçeler kolonileri kuramaz. Sonbahar ve ilkbaharda yetiştirme merkezlerinde doğal olarak çiftleşen ve kış uykusuna yatan kraliçeleri yakalama ve onları alma gibi eylemler parazitlerin ve patojenlerin girişine sebep olabilir. Ayrıca, ticari koloniler taşınma ve karantina süresince strese etkilenir. Böyle bir durumda koloni içerisinde herhangi bir patojen varsa buna bağlı olarak bazı hastalıklar gelişebilir. Koloniler taşınmadan önce dikkatlice incelenmelidir çünkü yuva kutusundaki enfekte koloniler pamuk tabakasıyla kaplı kuluçka alanından farkedilmeden diğer ülkelere gidebilir. Bu nedenle yaban arı hastalıklarının ve parazitlerin kontrolü ve tanımlanması, yayılmalarını önlemede çok önemlidir. Hastalıklı koloniler hızlı gelişemez ve sağlıklı kolonilerden daha az arı sayısına sahip olur.

Bal arılarının gelişme dönemleri pek çok hastalık etmeni ve zararlı için uygun bir ortam oluşturabilmektedir. Bu sebeple çok sayıda patojen bal arılarında değişik hastalıklar oluşturabilmektedir (Tutkun ve Boşgelmez, 2003). Bununla birlikte, kıtalar ve ülkelerarası arı, arı ürünleri ve arıcılık malzemeleri ticareti arı hastalıklarının kısa sürede tüm ülkelere

yayılmaya neden olmuştur (Öztürk, 2001). Bal arısı hastalık ve zararlıları ülkemizde arıcılığın gelişmesini yavaşlatan ve üretim etkinliğini sınırlandıran en önemli faktörlerden biridir (Doğaroğlu, 1999). Arı hastalıkları ülkemiz arıcılığında önemli kayıplara yol açmakta olup, bilinçli bir ilaç kullanımı olduğunu söylemek oldukça zordur (Aydın vd., 2003).

### 1.7.1. *Nosema bombi*

*N.bombi* yaban arıların önemli parazitlerinden biridir. *N. bombi* sporları 4.6–7.0 µm uzunluğunda ve 1.8–4.0 µm genişliğindedir ve *Nosema apis*'den daha geniş ve daha uzundur (Şekil 4) (Weiser, 1978; Mc Ivor, 1990; Eijnde ve Vette, 1993; Macfarlane vd., 1995). Etmen abdomene yayılır ve ishale sebep olur ve yaban arılarda çiftleşmeyi engeller (Macfarlane vd., 1995). Ağır enfekte kraliçeler kış uykusuna yatmayabilir ve ölmeyebilir. Hafif enfekte kraliçeler kış uykusu boyunca canlı kalabilir. Bununla birlikte, koloni başlaması gecikir ve kolonilerin gelişmesi engellenir. Koloni gelişimi boyunca enfekte kraliçeler sağlıklı kraliçelerden daha az yaşarlar.



Şekil 4. *Nosema bombi* sporları (Eldeniz ve Kaftanoğlu, 2006).

*N. bombi*, doğal populasyonların ve ticari arıların sayılarının azalmasında önemli bir etmendir. Bu durum büyük ölçüde, yaşayan arılar üzerinde bu parazitin daha kolayca incelenen etkisinden dolayıdır (Enfekte hayvanlar sakat kanatlara sahiptir ve kraliçelerde karın şişliği olabilir ve çiftleşme için uygun olmayabilir) (Otti ve Schmid- Hempel, 2007). Başarılı enfeksiyonun ergin dönem sırasında olması çok az bir ihtimaldir. Bu nedenle bulaşma, büyük ihtimalle sporların larvadan beslendiği zaman meydana gelir (Eijnde ve

Vette, 1993; Rutrecht vd., 2007). Bununla birlikte, tarlada *N. bombi*'nin yaygınlığı ve koloni seviyeleri daha kolay bulaşan *Crithidia bombi*'den daha düşüktür (Baer ve Schmid-Hempel, 1999, 2001).

Avrupa ve Kuzey Amerika'da ticarileşmeden önce *Crithidia spp.* gibi *N. bombi* doğal olarak bulunur (MacFarlane vd., 1995; Schmid-Hempel, 1998). Laboratuvar deneyleri, *N. bombi*'nin ticari *B. terrestris* kolonilerinden, *B. hypocrite* ve *B. diversus* gibi yerel Japon türlerine bulaşabileceği gösterildi (Niwa vd., 2004). Ergin arıların yem arama sırasında kolayca bulaşan tripanozomlara karşın, *N. bombi* daha zor bulaşır. Bununla birlikte, koloniler tarlada enfekte olur (Imhoof ve Schmid-Hempel, 1999; Baer ve Schmid-Hempel, 1999) ve bu 3 yolla meydana gelebilir. Birincisi, doğmayan kolonilerin içerisinde enfekte işçi arıların toplanması; ikincisi, yem arama sırasında sporların toplanması nedeniyle erginlerin enfeksiyonu; üçüncüsü, yem arama sırasında kontamine polenlerin toplanıp, bu polenlerle beslenen larvanın enfeksiyonudur. Son çalışmalar bulaşma olasılığı üzerinde konak türlerin bir etkisinin olmadığını gösterdi (Rutrecht vd., 2007). Ancak, konak yaşamı parazit virulansını etkileyebilir (Rutrecht ve Brown, 2009).

### **1.7.2. *Nosema cerenea***

*Nosema cerenea*, Kuzey Amerika'da yaban arılarında tespit edildi (Plischuk vd., 2009). Diğer coğrafik alanlarında olmamasına rağmen (Fries, 2010; Williams vd., 2010), bu türün İspanya'da bal arılarının azalmasına sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Higes vd., 2009). Ancak, bir şekilde bu mikrosporida *Nosema bombi*'ye, bal arı mikrosporidasi *Nosema apis*'den daha yakın akrabadır (Shafer vd., 2009). Yaban arılarında *Nosema cerenea*'nin patojenik etkileri eğer varsa değerlendirilmesine ihtiyaç duyar. Çünkü, bu parazit gelecekte doğal ve ticari yaban arı populasyonlarında önemli hastalıkları belirtebilir.

### **1.7.3. *Locustacaris buchneri***

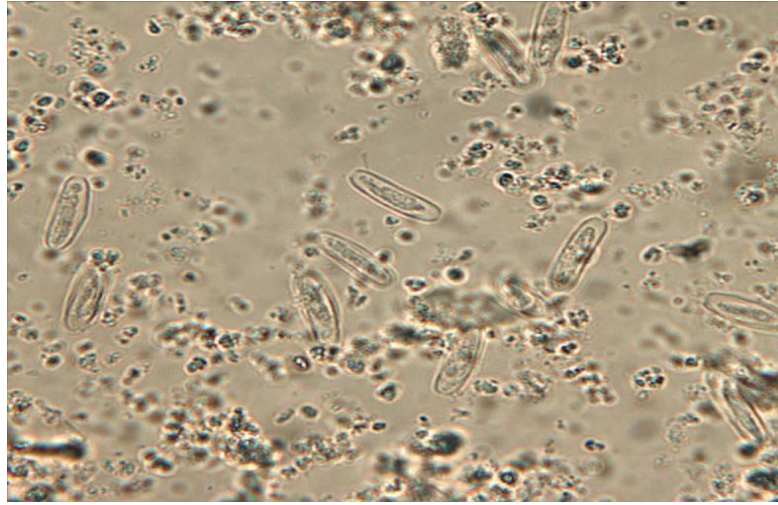
*Locustacaris buchneri* (trakeal bit), ticaret ıslahçıları tarafından kontrol edilebilen yaban arı parazitlerinden biridir (Goka vd., 2006). Bu kontrol, ticari yaban arılarının patojen dağılımının olası tehdit durumunda araştırılmasıdır (Goka vd., 2006). Böyle

kontroller devam ettikçe, *L. buchneri*'nin patojen dağılımı yoluyla gelecek bir tehdit oluşturması mümkün değildir. Koloniler arasındaki patojen taşınımı tam olarak bilinmiyor. Bu olay, ya çiçeklerle (Schwarz ve Huck, 1997) ya da çiftleşme sırasında enfekte erkeklerden yeni kraliçeye bulaşmayla meydana gelebilir.

#### 1.7.4. *Apicystis bombi*

*Apicystis bombi*, 11.1–14.4 µm uzunluğunda ve 3.6–5.4 µm genişliğinde sosis şeklinde spora sahiptir (Şekil 5). *Nosema bombi*'den 2-3 kat daha uzun ve geniştir (Lipa ve Triggiani, 1992, 1996; Macfarlane vd., 1995). *A. bombi* genellikle yağ dokuda bulunur.

*A. bombi* ile ağır enfekte olan kraliçeler kolayca tanımlanan beyaz yağ dokuya sahiptir. Normal kraliçelerin yağ dokuları sarı renktedir ve yaşına göre esmerleşir ve kahverengiye dönüşür. Patojen, kraliçelerin ömrünü kısaltır ve ilkbahar başlarında ölüme neden olur.



Şekil 5. *Apicystis bombi* sporları (600x) (Plischuk ve Lange, 2009).

#### 1.7.5. *Crithidia bombi*

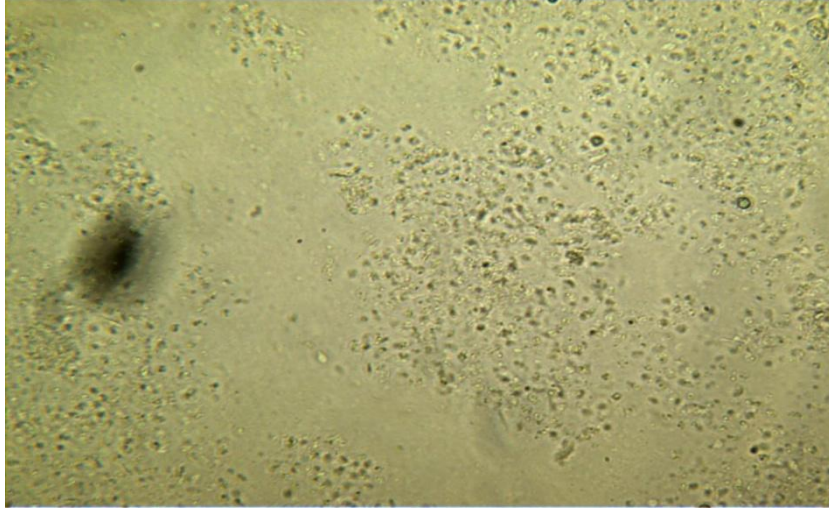
Gorbunov (1987) ve Lipa ve Triggiani (1988) tarafından morfolojisine dayanarak yaban arıların bağırsağında bulunan ilk protozoon flagellat *Crithidia bombi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) olarak tanımlandı. *C. bombi* vektörsüz direk olarak bulaşır. Bu parazit *B. terrestris* konağında ve bağırsağında çok yaygındır. Konağın arka



bağırsağında yaşar ve konak dışında sadece çok kısa süre canlı kalabilir (Schmid–Hempel vd., 1999). Yeni enfeksiyonlar, yuva materyaliyle veya enfekte bir arının daha önceden ziyaret etmiş olduğu çiçeklerle ilişki olarak meydana gelir (Durrer ve Schmid-Hempel, 1994). *Crithida bombi*, konakların sonraki jenerasyonuna ulaşmak için koloni dönüşünün sonunda üretilen genç kraliçeleri enfekte etmek zorundadır. *C. bombi* enfeksiyonu enfekte kraliçelerin sağlığını azaltır (Brown vd., 2003) ve bu nedenle yaban arıların önemli ve tehlikeli bir parazittir. Son zamanlarda, tozlaşma için *Bombus terrestris*'in artan kullanımı sayesinde bu parazitin diğer türlere de veya yaban arıların şimdiye kadar tespit edilmediği popülasyonlara yayılabileceği şüpheleri vardır (Colla vd., 2006; Winter vd., 2006). Bu görüşler, *C. bombi*'nin taksonomik yerinin yeniden kontrol edilmesine sebep olur. Trypanosomatidae familyası morfolojik dönemlerin yorumlanmasındaki zorluklardan dolayı hala birçok taksonomik zorluklar ortaya çıkarır (McGhee ve Cosgrove, 1980; Podlipaev vd., 2004; Westernberger vd., 2004; Yurchenko vd., 2008). Günümüzde, trypanosomatidlerin sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında sürekli olarak moleküler markerlar kullanılmaktadır (Örnek, Banuls vd., 2000; Desquesnes vd., 2002; Hamilton vd., 2005; Kostygov vd., 2004; Maslov vd., 2007; Yurchenko vd., 2009). Popülasyon çalışmaları, türler arası çeşitliliği ortaya çıkarır (Örnek, Brisse vd., 2000; Brisse vd., 2001; Cuervo vd., 2004; Da Silva vd., 2004; Tibayrene, 2003).

Bugüne kadar, *C. bombi* sadece morfolojik olarak tanımlandı (Gorbunov, 1987; Lipa ve Triggiani, 1988). *C. bombi*'nin maximum uzunluğu 8.1 µm, vücutları armut şeklindedir. Kamçısı 8-12 µm uzunluğundadır (Lipa ve Triggiani, 1980) (Şekil 6). Enfeksiyon seviyeleri kraliçelerde %54–81, işçilerde %75-80, erkeklerde %47-71'e kadar ulaşabilir. Bununla birlikte, koloni gelişimindeki etkileri hakkında yeterince bilgi yoktur (Skou vd., 1963; Shykoff ve Schmid–Hempel, 1991a, b).

Son zamanlarda, mikrosatellit bilgisi konak popülasyonda bir çok klonun deveren ettiğini böylece, birden fazla suşun birlikte enfeksiyonunun yaygın olabileceğini gösterdi (Schmid-Hempel ve Reber Funk, 2004). Şimdiye kadar, *Bombus spp.*'de bulunan bütün enfeksiyonlar aynı trypanosomatid tür *C. bombi*'de meydana gelmeseydi bu türler hala bilinmezdi. Bu nedenle, *Bombus spp.*'de bulunan trypanosomatidlerin çeşitliliğini moleküler olarak belirlemek için enfekte *Bombus terrestris* kullandık.



Şekil 6. *Crithidia bombi* sporları (400x) (Biobest, Belgium).

### 1.8. Çalışmanın Amacı

*Crithidia bombi* ve *Apicystis bombi* parazitlerinin gerek ticari olarak üretilen ve gerekse doğal yaban arıları üzerindeki etkileri oldukça önemlidir. Bunlar özellikle ticari üretimde, önemli kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca, doğal yaban arılarında biyoçeşitlilik ve doğal tozlaşma açısından da çok ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu parazitlerin tespiti genellikle makroskobik ve mikroskobik olarak yapılmaktadır. Ancak, bu parazitlerin hızlı bir şekilde tespit edilmeleri ve populasyon içerisindeki yoğunlukların belirlenmesi parazitlerin yakınlık derecelerinin ortaya çıkarılması oldukça önemlidir. Bu nedenle, bu çalışmada enfekte yaban arılardaki *C. bombi* ve *A. bombi* parazitlerinin moleküler olarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, moleküler olarak tanımlanan (Meeus vd., 2010) iki önemli yaban arı paraziti olan *Crithidia bombi* ve *Apicystis bombi* üzerinde duruldu. *A. bombi* ve *C. bombi* genomunda haplotiplerin tanımlanmasında farklı genlerin kullanımı için konak çevreden parazit saflaştırmadan primer dizayn edildi. Bu primer dizaynında, türler arası çeşitliliği çalışmak için farklı yüksek değişken genler seçildi. İlk olarak, yaban arılardaki önemli parazit *C. bombi* için *ITS* (Inter Translated Spacer), *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ve *Cytb* (Cytochrome b) bölgeleri için primerler dizayn edildi. Aynı yol *Apicystis bombi* için *Cox1* ve *ITS* genlerine odaklanarak takip edildi. Primerlerin kullanımını değerlendirmek için farklı türlerle bir doğrulama yapıldı.

Bu sayede, belli coğrafik bölgede belli bir parazit türünün genetik orijini çıkarılabilir ve bu parazitin yerli veya yaban arıların ticari taşınımından dolayı dağılmış olup olmadığı kanıtlanabilir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Böceklerin Toplanması

*Crithidia bombi* pozitif *Bombus terrestris* örnekleri (primer optimizasyonu için) serada yetiştirilen makroskobik olarak enfekte olduğu tahmin edilen bir koloniden 2009 yılında alındı. *Apicystis bombi* pozitif *Bombus terrestris* örnekleri ise Patagonia (Arjantin) bölgesinden Ocak 2009 ve 2010 yıllarında toplandı (Şekil 7). Tripanosom enfekte soliter arı (*Osmia cornuta*) da zoofizyoloji laboratuvar grubundan Dries Laget tarafından Belçika'nın Doğu Flaman Bölgesinden Nisan 2010 yılında toplandı.



Şekil 7. Patagonia ve Doğu Flaman Bölgesi

### 2.2. Böceklerin Mikroskobik İncelenmesi

Patagonia ve Doğu Flaman Bölgesinden toplanan arı örneklerinin makroskobik ve mikroskobik incelenmesi yapıldı. Enfekte örnekler belirlendi. Bu örnekler moleküler testler için kullanıldı.

### 2.3. DNA Ekstraksiyonu

Ergin arılar (*Bombus terrestris* ve *Osmia cornuta*) karın bölgesinden ikiye bölündü ve parçaları 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Her bir tüpe 0.3 g Zirconia/Silica (BioSpec Products, Bartlesville, USA), 3-4 tane 2.5 mm cam boncuklar (Bio Spec Products) ve Ezna Insect® DNA Isolation Kit'den (Omega Bio- Tek, Inc) 350 µl DNA izolasyon CTL tamponu ilave edildi. Karışım hücre parçalayıcısı (Precellys 24; Bertin, Montigny- le- Bretonneux, France) ile homojenize edildi. Üretici firmanın önerileri takip edilerek DNA izole edildi.

Homojenizatörden çıkan tüplere 350 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) karışımı ilave edildi ve vortekslendi. Karışım oda sıcaklığında 2 dakika 10.000xg'de santrifüj edildi. Üst faz temiz bir mikrofüj tüpüne dikkatlice transfer edildi. Daha sonra karışıma 1 miktar CBL tamponu eklendi, mikrosantrifüjde maksimum hızda 15 saniye vortekslendi ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonra karışıma 1 miktar saf ethanol (oda sıcaklığında, %96–100) eklendi ve maksimum hızda 15 saniye vorteksle iyice karıştırıldı. Diğer yandan 2 ml'lik toplama tüpüne bir HiBind ®DNA kolum yerleştirildi. Kolum içine 100 µl dengeleme tamponu eklendi, 4 dakika beklendi ve maksimum hızda 20 dakika sanrifüj edildi. Elde edilen karışımın 750 µl'si yeni HiBind ®DNA koluma eklendi, oda sıcaklığında 10.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve toplama tüpü tekrar kullanıldı. HiBind®DNA kolum, toplama tüpüne geri yerleştirildi, geriye kalan karışımdan eklendi ve belirtildiği gibi tekrar sanrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. Daha sonra yeni bir 2 ml toplama tüpüne colum yerleştirildi ve 500 µl HB tamponu eklendi, 30 dakika 10.000xg'da santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, kullanılan aynı toplama tüpüne colum yerleştirildi ve saf alkol ile seyreltilen 700 µl DNA yıkama tamponu ile yıkandı. 10.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı. Etanol ile seyreltilmiş 700 µl DNA yıkama tamponu ile tekrar yıkandı. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, boş toplama tüpüne colum yerleştirildi ve 15.000xg'da 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Temiz bir 1.5 mL mikrofüj tüpüne column yerleştirildi. DNA'yı ayırtmak için 50–100 µl önceden 60°C-70°C'de ısıtılmış Elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika emilmesine izin verildi. 10.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi. Elüsyon tampon adımı 50–100 µl ile tekrarlandı. Sonunda DNA miktarı nanodrop ile ölçüldü.

## 2.4. Gen Seçimleri

### 2.4.1. *Crithidia bombi* İçin Genlerin Seçimi

Amaçta da belirtildiği gibi farklı haplotiplerin tanımlanması için *C. bombi*'nin farklı genlerinin dizi analizleri yapılmalıdır (Tablo 3). Türler arası farklılıkları görebilmek için seçilen genlerin yeterince değişken olması gereklidir. Ayrıca, genler evrensel primerler sayesinde tespit edilmeye yarayan bölgelere sahip olmalıdır. Çalışmada kullanılan ilk primer sık sık yüksek bir mutasyonun görüldüğü mitokondrial genomda bulunan genlere karşıdır.

Tablo 3. *C. bombi* haplotiplendirmesi için kullanılan farklı genler

Gen	Yer	n = Haplotiplerin sayısı
ITS (Internal transcribed spacer)	Nüklear	<i>Trypanosoma evansi</i> (n=67) <i>Trypanosoma congolense</i> (n=8)
GAPDH (Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase)	Mitokondrial	<i>Trypanosoma vivax</i> (n=7) <i>Trypanosoma dionisii</i> (n=3)
Cytb (Cytochrome b)	Mitokondrial	<i>Leishmania braziliensis</i> (n=20) <i>Leishmania mexicana</i> (n=22)

### 2.4.2. *Apicystis bombi* İçin Genlerin Seçimi

*Apicystis bombi*'nin farklı haplotiplerin tanımlanması için farklı genlerin dizi analizlerinin yapılması gereklidir. Genlerin seçimi *C. bombi* için açıklanan ilkelere göre gerçekleştirildi. Literatüre dayanılarak *ITS* (Internal transcribed spacer) ve *Cox1* (Cytochrome c oxidase I) genleri seçildi (Tablo 4).

Tablo 4. *A. bombi* haplotiplendirmesi için kullanılan farklı genler

Gen	Konum	n = Haplotiplerin sayısı
ITS (Internal transcribed spacer)	Nüklear	<i>Trypanosoma evansi</i> (n=67), <i>Trypanosoma congolense</i> (n=8)
Cox1 (Cytochrome c oxidase I)	Mitokondrial	<i>Toxoplasma gondii</i> (n=3)

## 2.5. *Crithidia bombi* Genlerinin Farklı Primer Kombinasyonlarıyla Çoğaltılması

Bir yaban arı DNA ekstraktında primerlerin parazit materyalini belirleyip belirlemeyeceğini görmek için PCR koşullarını ve primerleri daha uygun hale getirilerek 3 örnek kullanıldı. Örnekler; i) (Cr+), bir yaban arının toplam DNA ekstraktı (*C. bombi* pozitif), ii) (Cr-) bir yaban arının toplam DNA ekstraktı (*C. bombi* negatif), iii) (Crg+) bir yaban arının bağırsak DNA ekstraktı (*C. bombi* pozitif) şeklinde oluşturuldu.

İlk olarak seçilen genleri (Tablo 3) çoğaltmak için Schmid-Hempel ve Tognazzoet (2010) tarafından dizayn edilen primer grubu kullanıldı (Tablo 5). Cr-ITS1 istenilen sonucu vermedi ve yeni evrensel primerler dizayn edildi. İlgili tripanozomların 18S rRNA ve 28S rRNA sıraları alt alta dizilerek karşılaştırıldı. Bu korunmuş bölgeler yüksek değişken ITS bölgelerini kapsar. Farklı tripanosomların 18S ve 28S sekansları sıralamadan alındı ve primer 3 software ile primer dizaynı için kullanıldı ve primer Cr-ITS-807 olarak isimlendirildi.

Yeni dizayn edilen Cr-ITS-807 primerleri ve Cytb ve GAPDH için yayınlanan primerler belirtilen sıcaklıklarda (Cr-Cytb-50°C, Cr-GAPDH-55°C, Cr-ITS-807-55°C) kullanıldı.

Tablo 5. *Crithidia bombi*'de farklı genleri çoğaltmak için kullanılan primerler

Primerler	Sekans	Orijin
Cr-GAPDHf	TTYGCCGYATYGGYCGCATGG	Schmid- Hempel ve Tognazzoet (2010)
Cr-GAPDHR	GTTYTGCAAGSGTCGCCTTGG	
Cr-ITS1 f	GGAAACCACGGAATCACCATAGACC	Schmid- Hempel ve Tognazzoet (2010)
Cr-ITS1 r	AGGAAGCCAAGTCATCCATCG	
Cr-Cytb F	WTTRTTTTTTRTGRGATTTTG	Schmid- Hempel ve Tognazzoet (2010)
Cr-Cytb R	CATAAACGYTCACAAT	
Cr-ITSf-807	CTCTGCGGGATTCCCTTTGTA	Ivan Meeus (2010)
Cr-ITSr-807	AGGAAGCCAAGTCATCCATC	

### 2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları

Bütün PCR reaksiyonları, 1 µl (değişken konsantrasyon) DNA içeren toplam 25 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Karışım, 1x Reaction- Buffer, 0.5 µl 0.2 mM dNTP'den, 1.25 µl 10 µM her bir primerin, 0.5U Taq DNA Polimeraz'dan oluşmaktadır.

Bütün PCR reaksiyonları aşağıdaki gibi yürütüldü; 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu için bekletildikten sonra 30 döngü halinde, zincirlerin ayrılması için 94°C'de 30 saniye, kullanılan primerlere uygun olarak 30 saniye çeşitli bağlanma sıcaklıklarında bekletildi (Örnek, *ITS1*=55°C, *GAPDH*=56°C, *Cytb*=50°C) ve sentez için 1 dakika 72°C'ye maruz bırakıldı. Son olarak 10 dakika 72°C'de bekletilerek reaksiyon tamamlandı. PCR reaksiyonundan oluşan ürünlerden 10 µl alınarak %2 agaroz jelde yürütüldü.

### 2.5.2. PCR Ürün Saflaştırılması

PCR ürünleri, E.Z.N.A.® Cycle-Pure-Spin veya ExoSAP (Exonuclease I- Shrimp Alkaline Phosphatase) metodu (Hanke ve Wink, 1994; Werle vd., 1994) kullanılarak saflaştırıldı.

E.Z.N.A.® Cycle-Pure-Spin için aşağıdaki yol izlenildi: PCR ürünleri temiz mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi, bir miktar CP (Cycle-Pure) tamponu ilave edildi (PCR ürününün büyüklüğüne göre). Karışım vortekslendi ve HiBind DNA Mini kolumun yerleştirildiği toplama tüpüne aktarıldı. Daha sonra karışım oda sıcaklığında 13.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve aynı toplama tüpüne kolum yerleştirildi. DNA yıkama tamponundan 700 µl eklendi ve 1 dakika 13.000xg'da santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, aynı toplama tüpüne HiBind DNA Mini kolum geri yerleştirildi. Daha sonra 500 µl DNA yıkama tamponu eklendi, 13.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı aynı toplama tüpüne HiBind DNA Mini kolum geri yerleştirildi. Boş HiBind DNA Mini kolum maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi, 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi. Son ürünün istenilen konsantrasyonuna bağlı olarak 30-50 µl Elüsyon tamponu (10Mm Tris, pH=8.5) veya direk olarak kolum tam ortasına su eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. DNA'yı ayrıştırmak için 13.000xg'da 1 dakika santrifüj edildi (Bu DNA'nın ortalama %80-90'nını gösterir).

ExoSAP (Exonuclease I- Shrimp Alkaline Phosphatase) metodu için aşağıdaki yol izlenildi: Bu metot sekanstan önce fazla dNTPs ve primerlerin kaldırılmasını sağlar. 5 µl PCR ürünü için 0.5 µl Eksoonukleaz I (20u/µl) ve 1 µl SAP (1u/µl) kullanıldı. Karışım 37°C'de 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra 80°C'de 15 dakika etkisiz hale getirildi.



DNA dizi analizi için LGC Genomics GmbH Berlin/Almanya şirketine gönderildi. Elde edilen DNA dizileri tür tayinlerini doğrulamak için PubMed GenBank'ta yer alan DNA dizileri ile karşılaştırıldı ve sonra filogenetik analizleri yapıldı.

### 2.5.3. *C. bombi*'nin ITS Bölgesinin Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi

Şekil 8'de gösterildiği gibi Cr-ITS-807 primeri *C. bombi*'nin ITS bölgesi çoğaltıldıktan sonra oluşan DNA bandı saflaştırıldı ve dizi analizine gönderildi. Ancak, sekans başarısız oldu. ITS genin sekansını elde etmek için moleküler klonlama gereklidir.

### 2.5.4. *C. bombi*'nin *GAPDH* ve *Cytb* Genlerinin Çoğaltılması ve DNA Dizi Analizi

Önceki Cr-Cytb primerlerin çalışmasına rağmen, toplam DNA ekstraktında istenilen büyüklükte tek bir bant elde edilmedi. Bu nedenle *ITS* bölgesinde olduğu gibi yeni primerler dizayn edildi (Tablo 6). Aynı şekilde *GAPDH* için de yeni primerler dizayn edildi (Tablo 6). Primer çiftlerinden sadece Cytb–Leis ve *GAPDH*-741 ile beklenen büyüklükte bantlar elde edildi (Şekil 8). Elde edilen PCR ürünlerini saflaştırmak için ExoSAP metodu veya E.Z.N.A.® Cycle-Pure-Spin kiti kullanılarak DNA dizi analizi yapıldı.

Tablo 6. *Crithidia bombi*'de farklı genleri çoğaltmak için kullanılan diğer primerler

Primerler	Sekans	Orijin
Cytb-TrypC-F	GACAGGAATTGAGAAGCGAGAGAG	Barnabe
Cytb-TrypC-R	CAAACCTATCACAAAAGCATCTG	vd.,2000
Cytb-Leis-F	GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG	Luyo-Acero
Cytb-Leis-R	CTACAATAAACAAATCATAATATATATACAATT	vd.,2004
Cytb-F-599	AAGCGGAGAGAAAAGAAAAGG	Ivan Meeus,
Cytb-R-599	TCACAAAACCATCAGAACTCA	2010
GAPDHF-741	CCGAGTACTTCGCGTACCAG	Ivan Meeus,
GAPDHR-741	CGAGGATGCCCTTCATGT	2010

### 2.5.5. *C. bombi* İçin Kullanılan Cytb-Leis ve GAPDH-741 Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması

Sekans analizi, primerlerin doğru parazit genlerini çoğaltabileceğini ispatladı. Bundan başka farklı örneklerde performansı ve duyarlılığı test edildi. Primer çiftlerini onaylamak için 4 farklı *C. bombi* enfekte yaban arısı ve negative yaban arıları (n=4) ve Cytb-Leis: 50°C, GAPDH-741: 56°C bağlanma sıcaklıkları kullanıldı.

## 2.6. *Apicystis bombi* Genlerin Farklı Primer Kombinasyonlarıyla Çoğaltılması

### 2.6.1. *A. bombi*'nin *Cox1* Geninin Çoğaltılması

*Cox1* (cytochrome c oxidase 1) geni için Cox1Greg ve GregCox1-Cyb primerleri dizayn edildi (Tablo 7). Cox1Greg primeri için, 56°C bağlanma sıcaklığı, DNA polimerazlar, sırasıyla 1.5 mM, 2.5 mM, 3.5 mM, 4.5 mM konsantrasyonlarda MgCl<sub>2</sub> gibi adımlar denendi. Bununla birlikte her iki primer için PCR sonuç vermedi.

Tablo 7. *A. bombi*'nin *Cox1* genini çoğaltmak için kullanılan primerler

Primerler	Sekans	Orijin
Cox1Greg-F	TTGGDGGWGGWACWGGATG	Ivan Meeus, 2010
Cox1Greg-R	TGCTANATCHACTGCTGCAT	
GregCox1-Cyb-2000F	TTGTTGCACATTTCCATTTTG	Ivan Meeus, 2010
GregCox1-Cyb-2000R	GCACCCCAGAACTCATTG	

### 2.6.2. *A. bombi*'nin *ITS* Bölgesinin Çoğaltılması ve Dizi Analizi

Literatür çalışmasında diğer bir gregarinin *ITS* bölgesini çoğaltabilen bazı farklı primerler bulundu. Bunlar; ITS-F1 (5'-CCAAATCATCTGAAGAATGAGAAA-3'), ITS-F2 (5'-CGCAAGTCATTAGCTTGTGC-3'), EndF/ASCO-28S-R (5'-CCAGCATGGAATAACATGTAAGG-3'/5'-CAGTGGGTAGCCTTGTC-3')'dir (Tablo 8). Bununla birlikte ilk adım farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denenmesine rağmen beklenen büyüklükte temiz bir bant (800 bp) oluşmadı. Sonra enfekte ve enfekte olmayan yaban arı kullanarak EndF/ASCO-28-R primerleri 1.5 mM, 2.5 Mm, 3.5 mM, 4.4 mM

MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ve 48°C'den 52°C'ye farklı bağlanma sıcaklıkları ile optimize edilmeye çalışıldı (Şekil 15).

Tablo 8. *A. bombi*'nin ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler

Primerler	Sekans	Orijin
ITS-F1	CCAAATCATCTGAAGAATGAGAAA	Morales vd.,2005
ITS-F2	CGCAAGTCATTAGCTTGTGC	Morales vd.,2005
ASCO-28S-R	CAGTGGGTAGCCTTGTC	Morales vd.,2005
EndF	CCAGCATGGAATAACATGTAAGG	Ivan Meeus, 2010

### 2.6.2.1. *A. bombi*'nin ITS Bölgesinin Moleküler Klonlanması

Bir önceki adımda çoğaltılan ITS bölgesi jelden temizlendi ve DNA fragmentleri Sticky-End klonlama protokolünü kullanarak pJET1.2 vektörüne klonlandı. Blunting reaksiyonu, her bir gen için 10 µl 2x reaksiyon tamponu, 4 µl DNA fragmenti, 1 µl ddH<sub>2</sub>O, 2,5 µl DNA blunting enzim bir araya getirilerek 17,5 µl'lik hacimde buz içerisinde gerçekleştirildi. Karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edildi ve tekrar buza konuldu. Diğer yandan buzun içinde Ligasyon reaksiyonu için 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl), 1 µl T4 DNA Ligaz ve 0.5 µl dATP ile toplam 20 µl'lik karışım hazırlandı ve blunting reaksiyon karışımına eklendi. Karışım vortekslendi ve damlaların toplanması için 3-5 saniye santrifüj edildi. Karışım oda sıcaklığında (22°C) 1 saat inkübe edildi. Daha sonra transformasyon için rekombinant DNA molekülleri kompetent hücrelere (*Escherichia coli*) aktarıldı (40 µL competent hücre + 2 µl ligasyon reaksiyon). Örnekler 30 dakika buz içerisinde bekletildi. Sıcak şok için 42 saniye 42°C'de bekletildikten sonra 2 dakika tekrar buza konuldu. Daha sonra önceden 42°C'de ısıtılmış 0,5 mL LB eklendi. Örnekler 37°C'de 1 saat sallayıcıda sallandı. Daha sonra örneklerden 100 µl alınarak antibiyotikli agara ekildi. 1 gece 37°C'de inkübe edildi. Seçilen rekombinant DNA plazmitlerin izolasyonu Plasmid Isolation Kit® kullanarak yapıldı.

### 2.6.3. *A. bombi*'nin ITS Bölgesinin Çoğaltılması İçin Farklı Primer Grubunun Kullanılması

*A. bombi* DNA'sının çoğaltılması Tablo 8'deki primerlerle sonuç vermediğinden yeni primerler dizayn edildi (Tablo 9). *A. bombi*'nin 18S Rna baz sırası bilinir (Meeus vd., 2010) ve ilgili parazitlerin 28S rRNA baz sıralarının birkaçı Gen bankasından alındı. Tablo 9'daki farklı primer grupları kombine edildi ve standart PCR koşulları *A. bombi* enfekte yaban arıları ve enfekte olmayan yaban arılarının performanslarını değerlendirmede kullanıldı (Şekil 16).

Tablo 9. *A. bombi*'nin ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler

F primerler (18S) ve Sekans		R primerler (28S) ve Sekans	
18SFa	TTACGTCCTGCCCTTTGTA	28SR1100a	TCGGAGGGAACCAGCTACTA
18SFb	CGTGATGGGGATAGACGATT	28SR1300a	CATCGCCAGTTCTGCTTACC
28SF1100a	TAGGGGCGAAAGACTAATCG	28SR2200	CGAGGCATTTGGCTACCTTA

#### 2.6.3.1. *A. bombi* İçin Kullanılan Yeni Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması

Primer grubu 18SFa/28R1100a'nın duyarlılığını onaylanmak istendi. *A. bombi* için 21 farklı pozitif örnek test edildi. Bunlardan 16 örnek kesin bir şekilde pozitif olarak sonuçlandı. Önceden örnekler pozitif iken 3'ü zayıf pozitif ve 2'si negatif olarak tanımlandı (Şekil 17).

## 2.7. Soliter Arılarda Tripanosomlar

### 2.7.1. *Osmia cornuta*'da Yeni Bir SE Tripanosom

Bu son kısımda, laboratuarda Belçika'dan toplanan soliter arılardan tripanosomları tespit etmek için dizayn edilen primerler kullanıldı. Soliter arı *Osmia cornuta*'da keşfedilen yeni bir SE tripanosomdur. Bu örnek L1 olarak adlandırıldı. Bunun 18S rRNA sekansı *C. bombi*, *C. expoeki*, *C. mellifcae*'den farklı olduğunu gösterdi ve bu çalışmayla Hymenoptera'yı enfekte eden SE tripanosomu olarak belirlendi. *Osmia cornuta*'yı enfekte

eden SE tripanosomun farklı tür statüsü *Cytb* genin sekansı sayesinde filogenetik ağaç çizilerek onaylandı (Şekil 19).

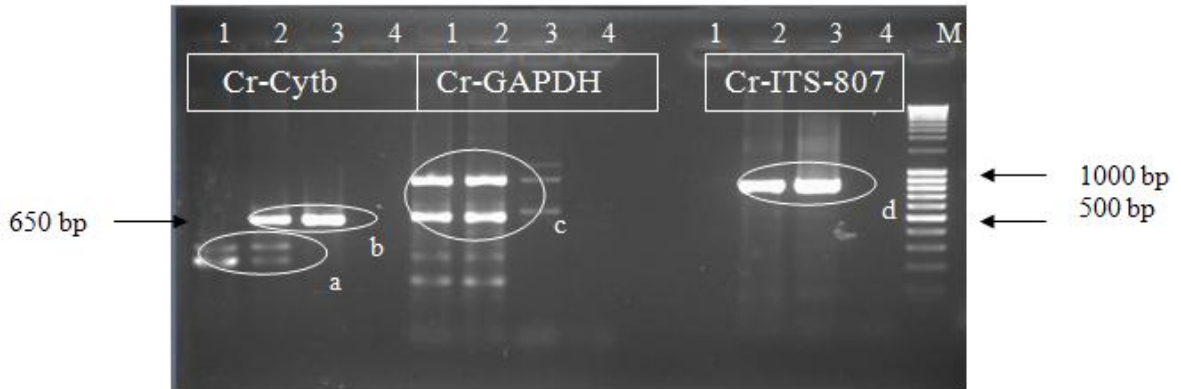
## **2.8. Filogenetik Analiz**

Elde edilen bütün DNA dizileri BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile düzenlendi ve Pubmed GenBank'ta blastlanarak GenBank'ta yer alan diğer DNA dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. DNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak Clustal W programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA4 (Tamura vd.,2007) filogenetik programı yardımıyla Neighbor-Joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA4 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 2000 tekrarlı olacak şekilde (Felsenstein, 1985) test edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Crithidia bombi* İçin Seçilen Genlerin PCR ile Çoğaltılmaları

*C. bombi* ile enfekte olan yaban arılarındaki enfeksiyonu moleküler olarak belirlemek için Cytb (5'-WTRTTTTTTTTTRTGRGATTTTG-3'/5'-CATAAACGYTCACAAT-3') ve GAPDH (5'-TTYGCCGYATYGGYCGCATGG-3'/5'-GTTYTGCAAGSGTCGCCTTGG-3') ve yeni dizayn edilen Cr-ITS-807 (5'-CTCTGCGGGATTTCCTTTGTA-3'/5'-AGGAAGCCAAGTCATCCATC-3') primerleri kullanıldı. Sırasıyla Cr-Cytb: 50°C, Cr-GAPDH: 56°C, Cr-ITS-807: 55°C sıcaklıklarda farklı bantlar üretti (Şekil 8).



Şekil 8. *C. bombi*'nin seçilen farklı genlerinin %2 agaroz jeldeki görüntüsü. Hat 1: *C. bombi* (-) (Negatif kontrol), Hat 2: *C. bombi* (+) (Pozitif kontrol), Hat 3: *C. bombi* bağırsak (+) (*C. bombi* enfekteli bağırsak ekstraktı), Hat 4: Kontrol (Kalıp DNA içermeyen), M: Marker.

Cr-Cytb primerleri (solda) spesifik olmayan DNA bantları (a) ve beklenen büyüklükte bantlar (b) verdi. GAPDH primerleri (ortada) ise spesifik olmayan bantlar üretti (c). Sadece Cr-ITS-807 primerleri (sağda) enfekte örneklerde beklenen büyüklükte bantlar verdi.

Cr-Cytb primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR *C. bombi*'yi saptayabilir. Çünkü, enfekte bağırsak ekstraktından beklenen büyüklükte (650 bp) tek bir bant elde edildi (Şekil 8b). Bununla birlikte, yaban arı DNA örneklerinde spesifik olmayan DNA bantları (300 bp) da ortaya çıktı (Şekil 8a). Bu sonuç, kullanılan primerlerin toplam DNA

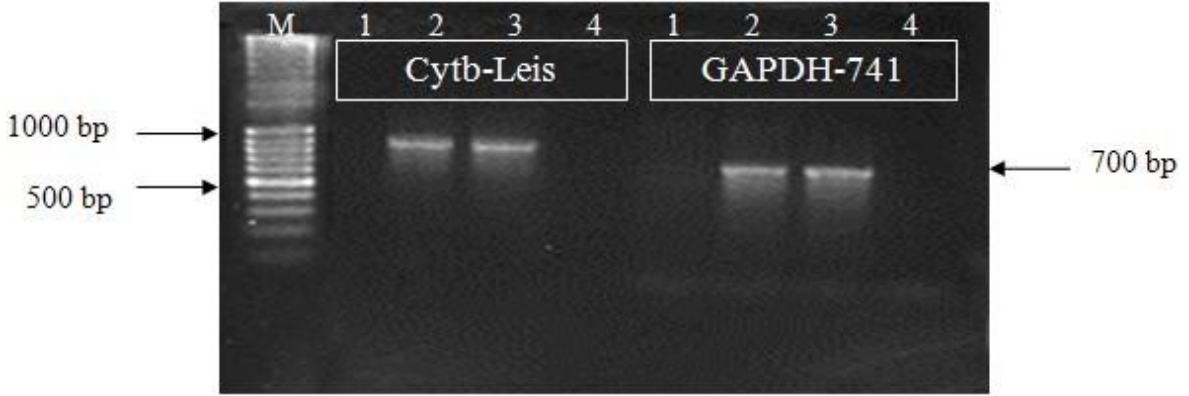
ekstraktı için çok uygun olmadığını gösterdi. *GAPDH* genini çoğaltmak için kullanılan primerler PCR reaksiyonunda spesifik olmayan bantlar (900 bp ve 500 bp) üretti (Şekil 8c). *C. bombi* genlerini belirlemek ve çoğaltmak için her iki primer sırası (Cr-Cytb ve Cr-GAPDH) önceden kullanılmıştı (Schmid Hempel ve Tognazzoet, 2010). Bu çalışmada ilgili genleri belirlemek için primerlerin bombus DNA'sı ile reaksiyon gösterildi.

Yeni dizayn edilen Cr-ITS-807 primerler beklenildiği gibi reaksiyon verdi ve parazit DNA'sına ait 800 bp büyüklüğünde *ITS* bölgesini çoğalttı (Şekil 8d).

### 3.1.1. *C. bombi*'nin *GAPDH* ve *Cytb* Genlerinin Çoğaltılmasının PCR ile Çoğaltılmaları

Önceki Cr-Cytb primerlerin çalışmasına rağmen, toplam DNA ekstraktından yapılan PCR sonucunda beklenildiği gibi tek bir bant görülmedi (Şekil 8). Bu nedenle *ITS* bölgesinde yapıldığı gibi yeni primerler dizayn edildi (Tablo 6). Bunlardan sadece primer çifti, Cytb-Leis (5'-GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG-3'/5'-CTACAATAAACAAATCATAATATATATACAATT-3') ve GAPDH-741 (5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') beklenen büyüklükte (Cytb-Leis: 900 bp, GAPDH-741: 700 bp) bantlar üretildi (Şekil 9).

PCR koşulları ve farklı primer çiftlerinin test edilmesinden sonra her bir gen için beklenen büyüklükte parazit DNA'sını çoğaltan bir primer çifti tanımlandı (Şekil 9'daki 2. ve 3. hatlar). Enfekte olmayan yaban arı DNA örneklerinde bant gözlenmedi. Elde edilen bantların parazit DNA'sı olarak onaylanması için PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderildi.



Şekil 9. Yaban arısı DNA örneklerinin Cytb-Leis ve GAPDH-741 primerleriyle çoğaltılmasının %2 agaroz jeldeki görüntüsü. Hat 1: *C.bombi* (-) (Negatif kontrol), Hat 2: *C. bombi* (+) (Pozitif kontrol), Hat 3: *C. bombi* bağırsak (+) (*C. bombi* enfekteli bağırsak ekstraktı), Hat 4: Kontrol (Kalıp DNA içermeyen), M: Marker.

### 3.1.2. Çoğaltılan Genlerin Dizi Analizleri

#### 3.1.2.1. Cytb-Leis Primerleri ile Çoğaltılan Bölgenin Dizi Analizi

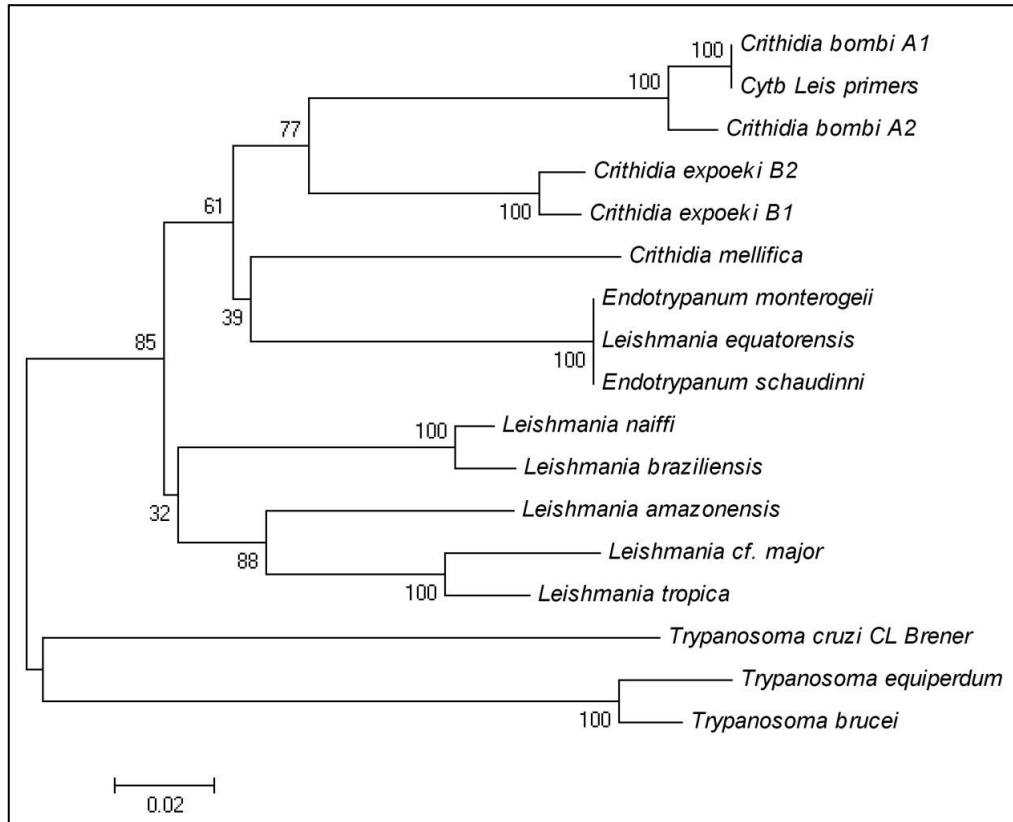
Cytb-Leis (5'-GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG-3'/5'-CTACAATAAACAAATCATAATATATATACAATT-3') ve GAPDH-741(5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') primer çiftlerinin parazitin doğru genlerini çoğalttığını onaylamak ve baz sıralarını belirlemek için elde edilen PCR ürünleri dizi analizine gönderildi (Şekil 9). Analiz için ileri primer ve saflaştırma için ExoSAP prosedürünün kullanıldığı ilk yöntem başarısız oldu. Geri primerleriyle ve E.Z.N.A.® Cycle-Pure-Spin kiti kullanılarak doğru bir dizi analizi yapıldı.

Şekil 11'de, Cytb-Leis primerleriyle elde edilen diziler BLAST araştırmasıyla en yakın dizilerle karşılaştırıldı. Elde edilen DNA ürünü *C. bombi* izolatu A1'in *Cytb* (Şekil 10) sırası ile % 100 benzerlik gösterdi ve bu nedenle dizayn edilen primerler toplam bir yaban arı DNA örneği *C. bombi* DNA'sından *Cytb* genini çoğalttı. BLAST sonuçları bir filogenetik ağaç oluşturmak için kullanıldı.



AATAAAATAACCATTAATAATAAACCTGTAAATTTATCTGGCACAGCCTTTAAAAAA  
 CCGAACAAAGAATAAAAAAATCATTTCAGGTAATATCTTATCAGAAGTTTTTAATGTA  
 TCAACTATAACTCACGATTCTTCATGAAAAACAAAATATCAATTAATAAAAAATAAAA  
 TACATCATACAAAATAAAAATAAAAAATGCTAAAAACATATCTCTTAAATAAAATCAC  
 ATACAAAAACATAAACGTTTACAATAAAATGCAAAACGATCACAAAAACCATCTGA  
 ACTCATAAAAATAATGTAAACAAAACAAATGCATTACAATAACTAAAATTA AAAACAAA  
 TGGCAATAAAACATGCAACACATGTAATTTTCAGTAACGTA AAAATCATTAAATAAATTC  
 ACTTCCTCAAATTCATAACACAATCATAAACCAATAACTGGTACAGTGGCCAAAAT  
 ATTACTAAAACTGTTAATCCTCAATAAGACATCATTGTACACGGTAAAACATAACCT  
 ATAAAACCTATTACAACAATAAAAATATAAATAACAAATCCAACAGCCCACACTAAA  
 ATATGAGTATCAAATAATATAATTA AAACGATTGCTTTAAAAATATGTACATACAAT  
 AAAAAAATAATAATGACGTAAAACAATATGAACACTTCTAATAACAAATCCTAAAT  
 CAAAATCTCATAAAAATAATACAAAATATCAATTAGTACATATAAAGCAACTAAAAA  
 ATAATCATGCTAAACATATTCCACAAACAATTTGCATACATATAAAAAAACCTAA

Şekil 10. *Crithidia bombi*'nin *Cytb* gen bölgesinin baz sırası (Gen Bank No: GU321188.1).



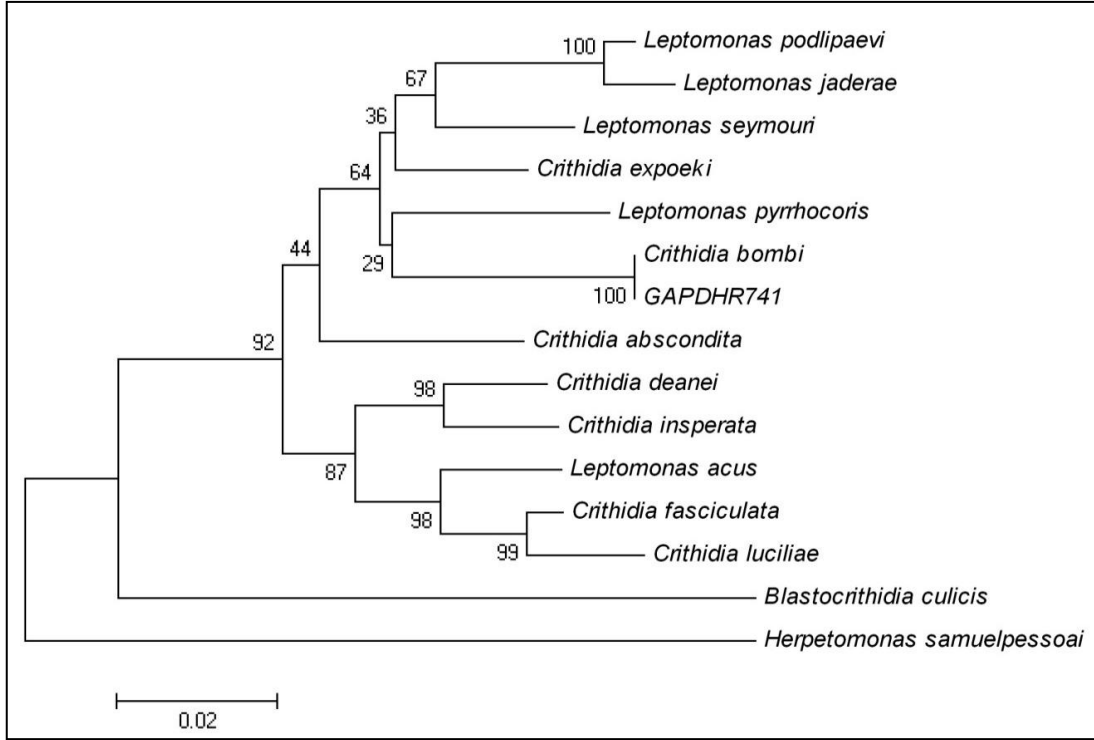
Şekil 11. *C. bombi*'nin *Cytb* geninin benzerleriyle olan filogenetik ilişkisi (MEGA4 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 2000 tekrarlı olacak (Felsenstein, 1985) şekilde test edildi).

### 3.1.2.2. GAPDH-741 Primerleri ile çoğaltılan Bölgenin Dizi Analizi

Bir önceki işlem GAPDH-741 (5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') primerleri için de takip edildi. GAPDH-741 primerleriyle elde edilen diziler BLAST araştırmasıyla en yakın dizilerle karşılaştırıldı (Şekil 13). Elde edilen DNA ürünü *GAPDH* sırası (Şekil 12) ile %100 benzerlik gösterdi. Bu nedenle dizayn edilen primerler toplam bir yaban arı DNA örneğinden parazit *C. bombi* DNA'sının *GAPDH* genini spesifik olarak çoğaltabilir.

```
TCGATCTCCTGGATCGACGTGTCGCGGGTCGCGCGGAACGTCAGGTCCACCACCGAC
ACATCCGGCGTCGGCACGCGGAAGGACATGCCGGTCAGCTTGCCCTTCGTCGACGG
GATCACCATACCCACGGCCTTGGCGGCACCCGTCGTGGACGGGATGATGTTACCGC
AGCAGCGCGGCCACCACGCCAGTCCTTGATCGACACGCCGTCCACCGTCTTCTGCGT
GGCAGTGTAGGAGTGGATGGTCGTCATCAGGCCGGTCTCGATGCCAAAGTTCTCCTT
CGTCAGCACGTGCACGATCGGGGCGAGGCAGTTGGTCGTGCAGGACGCGTTCGACA
CCACGTGGTGCGTCGCCGGGTTGTA CTCTGCTGGTTCACGCCATCACGATCGTCT
TGGCACCCGCGGACGCCGGAGCGCTGATCACCACCTTCTTCGCGCCACCCTTCACGT
GGCCCTCAGCCTTCGCCTTGTTTCGTGAACAGACCCGTCGACTCGATCACGTAGTCCA
CACCCAGCTTGCCCCACGGCAGGTCCGCAGGGTTGCGCTGCGCCTTCACGCACAGG
ATGCGGTGGCCGTTACCAACAAGCACATCCGGCTTCTTCACACCCGGCGAGCTCTTG
GCAACCTCCACCGTGTACTTCGGGCGACCGTGCACCGTATCAACTTCATCTGG
```

Şekil 12. *Crithidia bombi*'nin *GAPDH* gen bölgesinin baz sırası (Gen Bank No: GU321192.1).



Şekil 13. *Crithidia bombi*'nin GAPDH-741 primerleriyle filogenetik analizi (MEGA4 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 2000 tekrarlı olacak (Felsenstein, 1985) şekilde test edildi).

### 3.1.3. *C. bombi* İçin Kullanılan Cytb-Leis ve GAPDH-741 Primerlerin Geçerliliğinin Onaylanması

Dizi analizi, Cytb-Leis ve GAPDH-741 primerlerinin doğru parazit genlerini çoğaltabileceğini gösterdi. Bununla birlikte, aynı primerlerin farklı örneklerdeki performans ve duyarlılığı da test edildi. Primer çiftlerini onaylamak için *C. bombi* ile enfekte 4 farklı yaban arısı ve negatif kontrolleri kullanıldı.

Her iki primer çifti de bütün negatif yaban arı örneklerini negatif olarak gösterdi ve bu nedenle %100 spesifik olarak kabul edildi. Bununla birlikte, %25 hatayla 4 pozitif örnekten sadece 3'ü doğru sonuç verdi ve bu da primerlerin düşük hassasiyete sahip olduğunu gösterdi (Tablo 10).

Tablo 10. Farklı primer çiftlerinin hassasiyeti ve özgülükleri

Primerler	Spesifisite	Hata negatifler	Hassasiyet	Hata pozitifler
Cytb-Leis	4/4 (%100)	1/4	3/4 (%75)	0/4
GAPDH-741	4/4 (%100)	1/4	3/4 (%75)	0/4

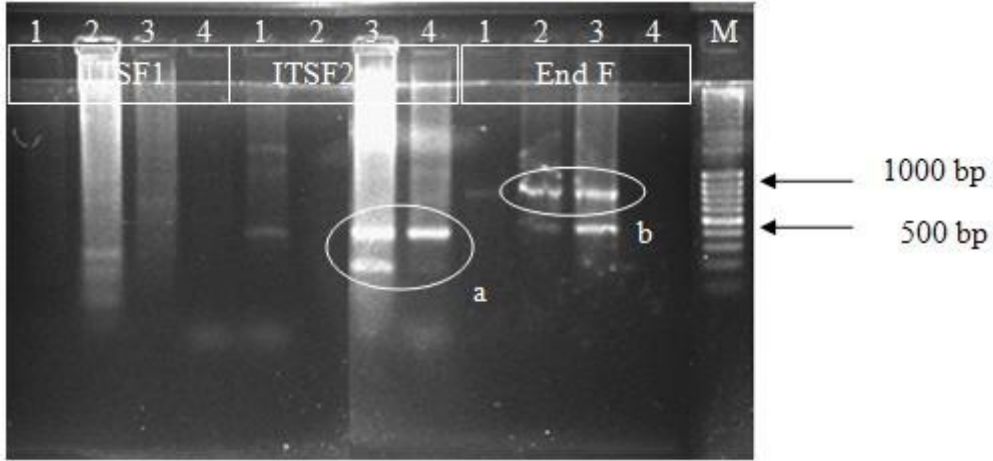
Kullanılan enfekte yaban arıları bu primerler sayesinde belirlenebilen bir çok parazite sahip olabilir. Bununla birlikte, pozitif bir örneğin negatif sonucu da meydana gelebilir. Çünkü, yaban arısı primer sekansında bir mutasyonla farklı bir haplotiple enfekte olabilir. Bu soruları açıklığa kavuşturmak ve farklı haplotipleri bulmak için dizi analizi gereklidir.

### **3.2. *Apicystis bombi*'nin ITS Bölgesinin PCR Sonuçları**

Literatürden bir gregarinin ITS bölgesini çoğaltabilen bazı farklı primerler bulunmaktadır. Ancak, bu primerlerle PCR da sonuç vermedi (Tablo 8). Bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için daha sonra enfekte yaban arıları kullanılarak  $MgCl_2$  konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıkları optimize edilmeye çalışıldı.

#### **3.2.1. Farklı $MgCl_2$ Konsantrasyonların PCR'a Etkisi**

$MgCl_2$  miktarındaki artış, farklı büyüklükte DNA bantlarının oluşmasına neden oldu (Şekil 14). Çünkü, *A. bombi*'de ITS'in mevcut uzunluğu hakkında şu anda kesin bir bilgi olmamasına rağmen, beklenen uzunluk birkaç baz çiftinden yüz baz çiftine kadar ulaşabilir. Bununla birlikte, EndF primerleriyle en büyük bantlar (900 bp) daha doğru olabilirken (Şekil 14b), ITS2 primerleriyle gözüken bantlar (400 bp) çok küçüktür (Şekil 14a). Buna ilave olarak 2.5 mM  $MgCl_2$  konsantrasyonunda belirgin bir DNA bandı oluştu. EndF/ASCO-28S-R primerleri farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında (1.5 mM, 2.5 mM, 3.5 mM) ve farklı bağlanma sıcaklıklarında (48°C ve 52°C) enfekte ve enfekte olmayan yaban arı örneklerini karşılaştırılarak optimize edildi (Şekil 15).

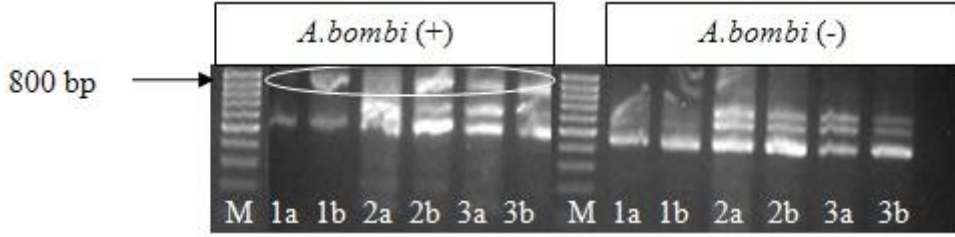


Şekil 14. *A. bombi*'nin *ITS* bölgesinin farklı primerlerle farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında çoğaltılması. ITSF1/ASCO-28-R (solda), ITSF2 /ASCO-28S-R (ortada) ve EndF/ASCO-28S-R (sağda). Hat 1: 1.5 mM, Hat 2: 2.5 mM, Hat 3: 3.5 mM, Hat 4: 4.5 mM  $MgCl_2$  ve M: Marker.

### 3.2.2. Farklı Bağlanma Sıcaklıkların PCR'a Etkisi

Enfekte olmayan ve *A. bombi* enfekte örnekten izole DNA örnekleri EndF/ASCO-28S-R (5'-CCAGCATGGAATAACATGTAAGG-3'/5'-CAGTGGGTAGCCTTGTC-3') primer çiftleriyle çoğaltıldı. Reaksiyonda 1.5 mM, 2.5 mM ve 3.5 mM  $MgCl_2$  konsantrasyonları kullanıldı ve bağlanma sıcaklığı da 48°C'den 52°C'ye artırıldı.

Pozitif örnekte beklenen büyüklükte tek ve temiz bir bant gözükmemesine karşın, analiz edilmesi gereken karışık bir bant örneği ortaya çıktı. Negatif örneklerde ise spesifik olmayan DNA bantlarıdır, sadece *A. bombi* pozitif örneklerde görünen yaklaşık 800 bp olan tek bant en büyük DNA bantıdır (Şekil 15). Parazite spesifik olan bu DNA bantını tanımlamak için sekans analizi gereklidir. Ancak, *C. bombi*'nin *ITS* bölgesinin direkt sekansı başarılı olmamıştı. Bu nedenle, PCR ürününün moleküler klonlanması ve 800 bp'lik tek bantın sekansı gereklidir.



Şekil 15. *A. bombi* enfekte ve enfekte olmayan örneklerin EndF/ASCO-28S-R primer çiftiyle farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında ve farklı bağlanma sıcaklıklarında çoğaltılması. ((a) 48°C, (b) 52°C,  $MgCl_2$  konsantrasyon Hat 1: 1.5 mM , Hat 2: 5 mM ve Hat 3: 3.5 mM, M: Marker)

### 3.3. ITS Bölgesinin Klonlama Sonuçları

PCR ürünü sonucu üretilen 800 bp bant (Şekil 14b) Sticky-End klonlama prosedürüne göre klonlandı. Klonlamadan sonra sadece 3 plazmit, 800 bp'e eş bir fragment içerdi. Bu plazmitler saflaştırıldı ve DNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü (Tablo 11). Plazmitler dizi analizine gönderildi ve sıralar belirlendi. Bununla beraber blast analizi fragmentin atık DNA olduğunu ortaya koydu. Sonuç olarak, primerlerin *ITS* bölgesini çoğaltmadığı gösterildi.

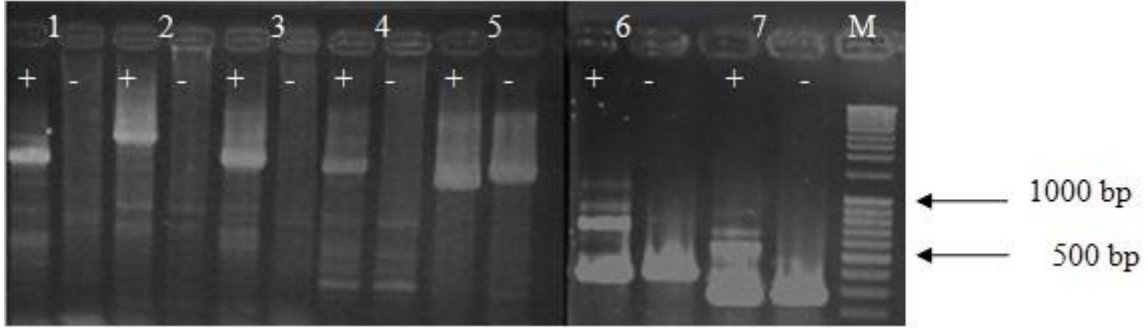
Tablo 11. 800 bp fragmenti içeren 3 plazmitin çoğaltılma özellikleri

Klon	DNA miktarı (ng/ $\mu$ l)	DNA yoğunluğu	
		260/280	260/230
<i>A. bombi</i> (klon1)	42,3	1,77	1,93
<i>A. bombi</i> (klon5)	47,8	1,51	1,88
<i>A. bombi</i> (klon8)	162,9	1,55	1,95

#### 3.3.1. *A. bombi* ITS Bölgesi İçin Seçilen Farklı Primerlerin PCR ile Çoğaltılması

Farklı primerlerin değerlendirmesinde, Tablo 9'da belirtilen 4 primer grubu  
 18Fa/28SR1100a (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'/5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3'), 18SFb/28SR2200 (5'CGTGATGGGGATAGACGATT-3'/5'-CGAGGCATTTGGCTACCTTA-3'),  
 18SFb/28SR1100a (5'-CGTGATGGGGATAGACGATT-3'/5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3'), 18SFb/28SR1100b (5'-

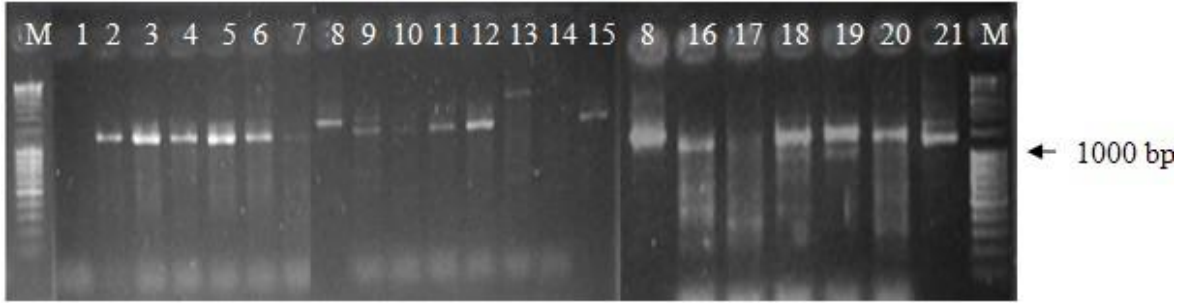
CGTGATGGGGATAGACGATT-3'/5'-TCGGAGGGGAACCAGCTACTA-3') sadece pozitif örneklerde beklenen büyüklükte bir bant oluşturdu (Şekil 16). Diğer primer çiftleri genel olarak çok küçük bantlarla sonuçlandı. Pozitif örneklerde, sadece ilk 4 kombinasyon yoğun bir DNA bandı üretti.



Şekil 16. Farklı primerlerle *A. bombi* ITS bölgesinin çoğaltılması. (+ : *A. bombi* enfekte örnekler, - : enfekte olmayan örnekler) ve M: Marker. Her iki örnek için soldan sağa primerler: Hat 1: 18Fa/28SR1100a; Hat 2: 18SFb/28SR2200; Hat 3: 18SFb/28SR1100a; Hat 4: 18SFb/28SR1100b; Hat 5: 28SF/28SR2200; Hat 6: 28SF/28SR1300b; Hat 7: 28SF/28SR1300a).

### 3.3.1.1. Primer Grubu 18SFa/28R1100a'nın Geçerliliğin Onaylanması

*A. bombi* için 21 farklı pozitif örnek test edildi. 5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'/5'-TCGGAGGGGAACCAGCTACTA-3' sıralarına sahip primerlerin kullanıldığı 16 örnek net bir şekilde pozitif olarak görüldü (Şekil 17). Önceden örnekler pozitif iken 3'ü zayıf pozitif ve 2'si negatif olarak belirlendi. Enfekte olduğu bilinen 21 örneğin 19'u yine pozitif olarak belirlendi. Sonuçta primer hassasiyeti %90 olarak hesaplandı.



Şekil 17. Farklı *A. bombi* pozitif arı örneklerin 18SFa/28R1100a primerin çoğaltılması. Sırasıyla (İlk jel için) Hat 1: 16R; Hat 2: 3T; Hat 3: 6T; Hat 4: 9T; Hat 5: 10T; Hat 6: 12T; Hat 7: 13T; Hat 8: B10; Hat 9: 14T; Hat 10: 15T; Hat 11: 17T; Hat 12: 18T; Hat 13: 9T; Hat 14: 20T; Hat 15: 11T; sırasıyla (ikinci jel için) Hat 8: B10; Hat 16: B5; Hat 17: B6; Hat 18: B7; Hat 19: B8; Hat 20: B9; Hat 21: 11T.

#### 3.4. Soliter Arı *Osmia cornuta*'da Yeni Bir SE Tripanosom DNA Dizi Onaylanması

Bu çalışmada, Belçika'dan toplanan soliter arı enfeksiyonlarını karakterize etmek için dizayn edilen primerler kullanıldı. Cr-ITS-807 (5'-CTCTGCGGGATTTCCTTTGTA-3'/ 5'-AGGAAGCCAAGTCATCCATC-3') primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda soliter arı *Osmia cornuta*'da yeni bir SE (slowly evolving) tripanosom keşfedildi. Bu örnek L1 olarak adlandırıldı. Bu örneğin dizi analizi parazitin *C. bombi*, *C. expoeki* ve *C. mellificae*'den farklı olduğunu gösterdi.

ITS1 bölgesi tamamen farklı iken Cr-ITS-807 primerleriyle ITS bölgesini klonlaması sadece 2 mutasyonla 18S rRNA'sının *C. bombi*'ye benzer olduğu sonucunu ortaya çıkardı (Şekil 18). *Osmia cornuta*'yı enfekte eden SE tripanosomun farklı tür statüsü *Cytb* genin dizi analizi ile onaylandı (Şekil 19). Filogenetik ağaç, bal arılarında bulunan *C. mellifica* ve yaban arılarında bulunan *C. bombi* ve *C. expoeki* tripanosomlarının *O. cornuta*'da bulunan tripanosomdan ayrı olduğunu net bir şekilde ortaya koydu.

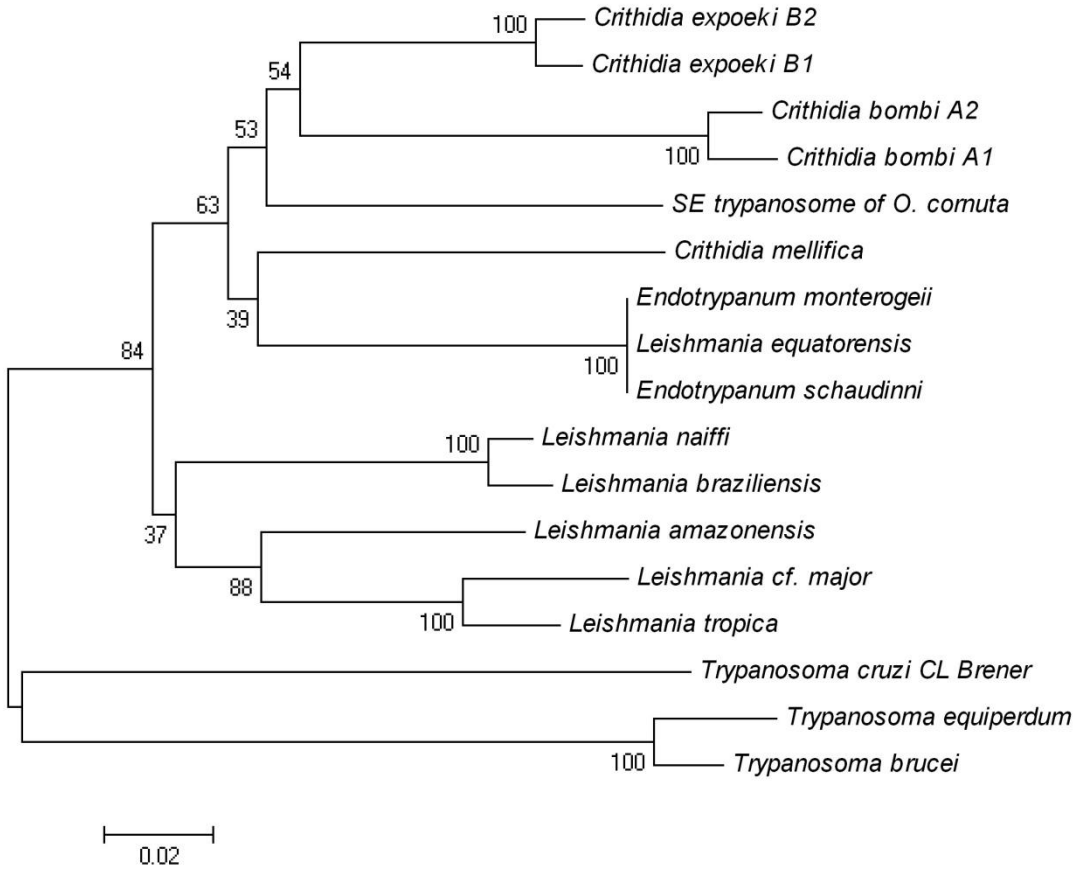


```

          10      20      30      40      50      60
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi 18S  GGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCGAGGATTGCAATTATTGGTCGCGCA
          70      80      90      100     110     120
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi 18S  ACGAGGAATGTCCTCGTAGGCGCAGCTCATCAAACGTGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTG
          130     140     150     160     170     180
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi 18S  TACACACCCGCCGTGTTGTTTCCGATGATGGTGCAATACAGGTGATCGGACAGGCCGGAT
          190     200     210     220     230     240
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi 18S  GTTTCATCTGCCGAAAGTTCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACA
          250     260     270     280     290     300
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
18S - ITS1  AGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTTATACCAAAAACA--
          310     320     330     340     350     360
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi ITS1  ---ACATACAAC---AACCCCTACCGCTGATAGAGGGTGT-GTGGATATGGG-----
          370     380     390     400     410     420
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi ITS1  ACTATATATAT.TGTGT.TA...TGTG.ATAT.T.TA.ACGTATATGTGTTACTCGTTG
          430     440     450     460     470     480
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi ITS1  TGTGA-----GGGGAGAGAGAAAAGAGAATGTAGGGAGGTCTCCTCTCTATATCTTTT
          490     500     510     520     530     540
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi ITS1  G.AA.GAGAGTCTACAC.CTCTCTTTCTCT.ACACACA.ACAAA..AAA.ACACATAAC.
          550     560     570     580     590     600
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
C. bombi ITS1  CTTTCCTC--CTCTCACACCTTCCGCT--TCTCCCCTCTGTCTAGCACAAATACAAACAC
          610     620     630     640     650     660
L1      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ITS1 5.8S  AACGGCTCACAT-----AACGTGTCGGGATGGATGA
          670
L1      ....|....|
C. bombi 5.8S  CTTGGCTTCCT

```

Şekil 18. Cr-ITS-807 primer çiftiyle elde edilen *Osmia cornuta*'yı enfekte eden tripanosomun DNA dizisi



Şekil 19. SE tripanosom enfekte *Osmia cornuta* (MEGA4 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 2000 tekrarlı olacak (Felsenstein, 1985) şekilde test edildi).

#### 4. TARTIŞMA

Yaban arı türlerin yaygın bir şekilde azalması hem çiçekler hem de ürünler için tozlaşma servislerinde önemli düşümlere neden olmaktadır. İşlenmemiş çiçekli çayırlar yaban arıların en önemli habitatlarından biridir. Ancak, tarımdan dolayı tüm dünyada yaban arıları sayısında önemli azalmalar olmuştur. Bu habitat alanların yenilenmesi yaban arı popülasyonlarını artırabilir ve işlenmiş alanlar yakınında tozlaşma servisleri kurulabilir (Carvell, 2002; Carvell vd., 2007). Ayrıca, yonca aşılması ile de önemli faydalar elde edilebilir (Örneğin, *Trifolium pratense*). Çünkü yonca, azalan birçok yaban arı türlerin önemli bir besin kaynağıdır.

Pestisit zehirlenmesi yaban arı azalmasında etkili olmakta (Thompson ve Hunt, 1999; Thompson, 2001) ve yaban arıları için pestisitlerin tehlikelerinin risk değerlendirmesi yetersizdir (Thompson ve Hunt, 1999). Ek olarak yaban arıları üzerinde pestisitlerin öldürücü etkilerini açık bir şekilde değerlendirmeye ihtiyaç vardır.

Sera tozlaşması için ticari olarak yetiştirilen yaban arıları arasında patojenler yaygındır (Goka vd., 2000; Houbert vd., 1986; Kwon vd., 2003; MacFarlane vd., 1995; Niwa vd., 2004; Otterstatter vd., 2005; Whittington ve Winston, 2003). Bununla birlikte, seralardan kaçan ticari kolonilerdeki arıların büyük bir kısmı imkan dahilinde yerel arılarla çiçekleri paylaşmaktadır (Whittington vd., 2004). Böyle durumların, hastalıkların taşınmasına sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, ticari yaban arılarından yerel yaban arılara hastalık taşınmasına 'patojen dağılımı' olarak adlandırıldı (Power ve Mitchell, 2004). Aslında, İngiltere'nin Leamington bölgesinde ticari seraların yakınında beslenen yerel yaban arıların %15'i ve Exeter Bölgesinde ise %27'sinde intestinal patojen *Crithidia bombi* enfeksiyonu olduğu bulundu. Ancak, başka bir yerden toplanan yaban arılarda herhangi bir enfeksiyon tespit edilmedi. Bundan başka, Leamington bölgesinde seralara yakın yaban arıları arasında ikinci intestinal patojen *Nosema bombi*'ye daha fazla rastlanıldı. Her iki patojen, *C. bombi* ve *N. bombi* ticari arılarında yaygındır (Otterstatter vd., 2005; Whittington ve Winston, 2003) ve çiçekler sayesinde yerel arılara yayılma gerçekleşebilir (Durrer ve Schmid- Hempel, 1994; Schmid- Hempel , 1998). Tam tersine, ticari yaban arılarında varlığı bilinmeyen patojen *Apicystis bombi* patojeni bütün bölgelerde yakın seviyelerde tespit edildi.

Kanada'da ticari yaban arıların kullanımından önce, MacFarlane (1974) ve Liu (1973) Güney Ontario'da (ortalama arıların %2'sinden az) yerel arılarda çok az bir oranda *C. bombi* ve *N. bombi* enfeksiyonu tespit edildi. MacFarlane, Liu ve arkadaşları (Belwood ve Guelph) tarafından örneklenen aynı alanların tekrar incelendiğinde, intestinal patojenlerin sadece ticari seralara uzak yerlerde az olduğu kararına varıldı (ortalama enfekte arıların %4'ünden az). Ticari yaban arılarından seralara yakın yerel arılara patojenlerin dağılımı büyük olasılıkla bu örneklerin sebebidir.

Yerel ve ticari arılar arasında patojen yayılışına tam olarak tanık olamayışımıza rağmen (benzer tarlalarda), bu durumun mevcudiyeti güçlü bir şekilde düşünülmektedir. Çünkü, Leamington (Morandin vd., 2001) ve Exeter bölgelerindeki (M.C. Otterstatter, kişisel araştırma) seralardan sık sık kaçan ticari yaban arılarının olması, bunların sera dışında çeşitli bitki türlerini ziyaret etmesi ve ortak paylaşılan çiçek kullanımı yaban arıları (Durrer ve Schmid-Hempel, 1994) ve koloniler (Imhoof ve Schmid-Hempel, 1999) arasında intestinal protozoonun taşınması için yeterlidir. Bundan başka, 2003-2005 boyunca Kanada Toronto Üniversitesi Zooloji Laboratuvarında yapılan çalışmalar patojenlerin yüksek bir yaygınlığını ortaya çıkardı. Yine de onların yerel benzerlerine karşı yaban arı durumunun riskini tamamen değerlendirmek için ticari ve yerel populasyonlar arasında patojen yoğunluğunu açık bir şekilde karşılaştıran başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Leamington ve Exeter'de tüm yaban arıları arasında incelenen patojen yoğunluğu hastalığın yaban arıları arasında yayılabileceğini göstermektedir. Çünkü, ortak besin kaynaklarında hayvanların birleşmesi enfeksiyonun meydana gelmesini sağlar (Dobson ve Foufopoulos, 2001). Eğer, enfekte işçiler kendilerinden başka kolonilere girerse, ticari yaban arılardan yerel yaban arılara patojen yayılması mümkündür (Schmid-Hempel, 1998). Bu ticari yaban arılarında neden trakeal bit *L. buchneri*'nin yaygın olduğunu açıklayabilir (Goka vd., 2000). Bununla birlikte, işçiler yolu ile yaban arıları arasında patojen yayılımının olup olmayacağına karar vermek için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son çalışmalar, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yerel yaban arı populasyonlarının azalmakta olduğunu göstermektedir (Williams vd., 2005). Habitat kaybı (Osborne ve Corbet, 1994; Williams, 1986) ve arılarda artan rekabetin (Goulson, 2003; Thomson, 2004) bu azalmalara katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bir çok durumda sebepler anlaşılabilir kalmaktadır (Goulson vd., 2005). Önemli ölçüde, patojen kanıtı olmasına rağmen, hastalıkların rolü bu hususta yeterince dikkate alınmadı. Örneğin, *C. bombi* yaban

arı kolonilerin %40'ının üreme verimini (Brown vd., 2003) ve besin azlığında işçilerin yaşamasını %50 azaltabilir (Brown vd., 2000).

Kuzey Amerika'da *N. bombi* patojeninin de ticari olarak yetiştirilen *B. occidentalis* popülasyonlarının azalmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Whittington ve Winston, 2004).

Büyük arıların yem aramaya (Goulson vd., 2002) daha fazla vakit ayırma eğilimleri onları daha fazla enfeksiyon riskine maruz bırakır. Çünkü, ticari arılar bütün yıl boyunca geniş seralarda kullanılır, patojenlerin dağılımı yerel arılar aktif olduğunda ilkbahar ve yaz ayları boyunca devamlı olarak meydana gelir. Bugünlerde, Avusturalya, İsrail, Japonya ve Kuzey Amerika bölgeleri ve Avrupa (Asada ve Ono, 2002; Dag ve Kammer, 2001; de Ruijter, 1997; Hingston, 2005) ve ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada (Stubbs ve Drummond, 2001; Whidden, 1996) ve Yeni Zelanda'da (Griffin vd., 1991) açık meyve bahçelerinde yaban arıları kullanılmaktadır.

Mikroparazitler durumunda parazit taranması pahalı olacaktır. Ticari yetiştirme işlemleri içinde steril teknik kullanılması gerekmektedir. Moleküler tekniklerin geliştirilmesi (Meeus vd., 2010) taramaları kolaylaştırabilir ve hızlandırabilir. Ek olarak, RNA teknolojisinin son çalışmaları (Maori vd., 2009) ve bakteriyel topluluklar (Forsgren vd., 2010) yaban arıları hastalık ve parazitleri tedavi etmesinde kullanılabilir.

Parazitler güçlü bulaşıcıdır, yeni geliştirilen tedaviler (RNAi veya probiyotik bakteri) nesil tükenmesini aza indirmeye yarayan yol olabilir. Sonuç olarak, doğal ve ticari popülasyonlar arasında etkileşimi önlemek için ulusal seviyede politik kararların alınması gereklidir. Kuzey Amerikan Polinasyon Koruma Şirketi gibi bilim adamları, ulusal kurumlar ve ticari yetiştiriciler aynı amaç için ortak bir çaba sarf ederse patojen dağılımı tehdidi ortadan kalkabilir.

Trypanosomatidae familyası morfolojik dönemlerini yorumlamadaki zorluklardan dolayı hala birçok taksonomik zorluklar ortaya çıkarır (McGhee ve Cosgrove, 1980; Podlipaev vd., 2004; Westenberger vd., 2004; Yurchenko vd., 2008). Bugünlerde trypanosomatid türlerini sınıflandırmak ve tanımlamak için moleküler marker sürekli olarak kullanılmaktadır (Örnek; Banuls vd., 2000; Desquesnes vd., 2002; Hamilton vd., 2005; Kostygov vd., 2004; Maslov vd., 2007; Yurchenko vd., 2009). Ek olarak, popülasyon çalışmaları türler arası yoğunluğu ortaya çıkarır (Örnek; Brisse vd., 2000; Brisse vd., 2001; Cuervo vd., 2004; Da Silva vd., 2004; Tibayrenc, 2003). Maalesef cins *Crithidia* için sadece birkaç genetik bilgi mevcuttur. Buna rağmen, birçok filogenetik

çalışmalarda küçük altbirim ribosomal RNA (SSU rRNA veya glikosomal gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (gGAPDH) kullanılarak cins *Crithidia*'nın bir bütün olarak monofiletik olmadığını göstermiştir. (Hamilton vd., 2004; Hamilton vd., 2007; Hollar ve Maslov, 1997; Hughes ve Piontkivska, 2003; Maslov vd., 1996; Podlipaev vd., 2004). ITS1 bölgesi yüksek polimorfizimden dolayı soy çeşitliliği kapsamındaki çalışmalar için çok uygundur. ITS1 polimorfizimi kullanılarak *Trypanosoma rangeli*'nin en az aynı soydan gelen 4 ayrı organizma tanımlandı (Da Silva vd., 2004). Ayrıca, ITS1'in fragment uzunluk değişkenliğini bir agaroz jel üzerinde görselleştirebileceğini bulundu (Da Silva vd., 2004).

Çalışmamızdaki amaç, *C. bombi* ve *A. bombi*'nin *Cytb*, *GAPDH*, *ITS* genlerini çoğaltabilecek farklı ve yeni primerler dizayn etmektir. Bu primerler parazite spesifik ve yaban arıdan paraziti saflaştırmadan kullanılmaktaydı. Her iki *Cytb* ve *GAPDH* mitokondrial genlerin sırası PCR ürün saflaştırmasından sonra dizi analizi ile elde edilebilir. Primerlerin geçerliliğin onaylanması, onlara spesifik olacağını gösterdi, bu nedenle duyarlılık düşük oranda %75 olarak hesaplandı. Duyarlılığı daha doğru hesaplamak için deneylerin daha büyük sayılarla tekrarlanmasına gerek vardır. Şimdi ileriki adım farklı enfekte *C. bombi* yaban arıları sekanslamaktır ve her iki mitokondrial genlerin farklı *C. bombi* türleri arasında farklılıkları görmek için değişken olup olmayacağını görmektir. *C. bombi*'nin son derece değişkenlik gösteren ITS için çoklu haplotipleri önceden tanımlandı (Schmid-Hempel ve Tognazzoet, 2010), sekans başarısızdı. Bu nedenle PCR ürünlerinin moleküler klonlanmasına ihtiyaç vardı.

İlgili parazitlerin sekans bilgilerinin azlığından dolayı *A. bombi* için primer dizaynı daha zordu. *Cox1* için dizayn edilen farklı primerler başarısız oldu. Hatta farklı bağlanma sıcaklıkları, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları ve farklı DNA polimerazları deneyerek yapılan çoklu optimizasyon adımlarından sonra bile başarısız oldu. *ITS* bölgesi daha başarılıydı. Ancak, yine de sekansın doğru okunması için klonlamaya ihtiyaç vardı. 18SFa/28R1100a (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'/5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3') primer çiftinin geçerliliği kabul edildi ve duyarlılık %90 olarak belirlendi. ITS bölgesinin bilinen bu yüksek değişkenliği bu primer çiftini *A. bombi*'nin farklı haplotiplerini bulmak için uygun yapar. Bu nedenle, amacımızda belirttiğimiz gibi yaban arıların iki önemli protozoon parazitlerin farklı haplotiplerini bulmak için ihtiyaç duyulan moleküler araçlar geliştirdik. Bundan sonra yerel arılardan ticari arılara patojen dağılımı olup olmadığını ortaya çıkarmak için geniş çapta araştırmalar yapılmalıdır.

Çalışmamızda, ayrıca kullandığımız primerlerin yaban arıların parazitik türlerine sınırlı olmadığını gösterdi. Yani bu primerlerle de diğer arılarda parazit tanımlanabilir. Soliter arı *Osmia cornuta*'da tripanosomlara ait yeni bir parazit tanımlandı ve bunun yeni bir tür olarak önerilmesi için taksonomik ve mikroskobik olarak tanımlanması gerekmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda arılarda protozoon parazitlerin taranması için moleküler teknikler geliştirildi ve bu tekniklerin duyarlılığı hesaplandı. Ayrıca taksonomik ve mikroskopik olarak tanımlanması beklenen tripanosomlara ait yeni bir parazit tespit edildi. Çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. *Cytb*, *GAPDH*, *ITS*'i çoğaltabilen *Crithidia bombi* için farklı primerler dizayn edildi.
2. Her iki *Cytb* ve *GAPDH* mitokondrial genlerin sırası PCR ürün saflaştırmasından sonra dizi analizleri yapıldı.
3. Daha sonra *Cytb*-Leis (5'-GGTGTAGGTTTTAGTTTAGG-3'/5'-CTACAATAAACAAATCATAATATATATAACAATT-3') ve *GAPDH*-741 (5'-CCGAGTACTTCGCGTACCAG-3'/5'-CGAGGATGCCCTTCATGT-3') primerlerin geçerliliğın onaylanması için başka arı türlerinde test edildi ve bu her iki primer çiftinin % 75 duyarlılığa sahip olduğu hesaplandı.
4. *Apicystis bombi*'nin ilgili parazitlerin DNA dizi bilgilerinin azlığından dolayı primer dizayn etmek zordu. Çeşitli optimizasyon adımlardan sonra bile *Cox1* için dizayn edilen farklı primerler başarısızdı. Bunun yanında *ITS* bölgesi daha başarılıydı.
5. *Apicystis bombi* için 18SFa/28R1100a (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'/5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3') primer çiftinin geçerliliği kabul edildi ve bu primer çiftinin % 90 duyarlılığa sahip olduğu hesaplandı.
6. *Osmia cornuta*'da tripanosomlara ait taksonomik ve mikroskopik olarak tanımlanması beklenen yeni bir parazit tanımlandı.



## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada yaban arıların azalmasına neden olabileceği düşünülen iki önemli parazit olan *Crithidia bombi* ve *Apicystis bombi*'nin tanımlanması için yeni dizayn edilen primerler kullanıldı. Ayrıca bu primerler duyarlılığının ölçülmesi için çeşitli arı türleri üzerinde geçerliliği onaylandı. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlendi.

1. Yaban arı popülasyonlarının uzun süre gözetimi, yaban arıların şu anki statüsünü daha iyi anlamamız ve yapılacak olan çalışmaların temelini kurmak için gereklidir.
2. Yerel arılardan ticari arılara patojen dağılımı olup olmadığını kesin olarak ortaya çıkarmak için geniş çapta araştırmalar yapılmalıdır.
3. Dizayn edilen primerler başka arı türlerinde parazit taranmasında kullanılabilir.
4. Primerlerin duyarlılığını daha doğru hesaplamak için deneylerin daha büyük sayılarla tekrarlanması sağlanabilir.
5. *Osmia cornuta*'da yeni tür olma ihtimali olan tripanosomun tür tayinleri daha ileri moleküler metotlarla yapılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abak, K., 1994. Protected Cultivation in Turkey. ACTA Horticulturae, 366, 33-44.
- Altizer, S., Harvell, D. and Friedle, E., 2003. Rapid Evolutionary Dynamics and Disease Threats to Biodiversity. Trends In Ecology & Evolution, 18, 589-596.
- Aydin, L., Çakmak, İ., Güleğen, E. ve Korkut, M., 2003. Güney Marmara Bölgesi Arı Hastalıkları Ve Zararlıları Anket Sonuçları. Uludağ Arıcılık Dergisi, 3,1,37-40.
- Baer, B. and Schmid-Hempel, P., 1999. Experimental Variation in Polyandry Affects Parasite Loads and Fitness in A Bumble-Bee. Nature, 397, 151-154.
- Baer, B., and Schmid-Hempel, P., 2001. Unexpected Consequences of Polyandry for Parasitism and Fitness in the Bumblebee, *Bombus terrestris*. Evolution, 55, 1639-1643.
- Banuls, A. L., Dujardin, J. C., Guerrini, F., De Doncker, S., Jacquet, D., Arevalo, J., Noel, S., Le Ray, D. and Tibayrenc, M., 2000. Is *Leishmania* (Viannia) *Peruviana* A Distinct Species? A MLEE/RAPD Evolutionary Genetics Answer. J. Eukaryot. Microbiol., 47, 197–207.
- Beekman, M., Van Stratum, P. ve Veerman, A., 1999. Selection for Non- Diapause in the Bumblebee, *Bombus terrestris*, with Notes on The Effect of Inbreeding. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 93, 67-75.
- Beekman, M. ve Van Stratum, P., 2000. Does The Diapausa Experience of Bumblebee Queens, *Bombus terrestris*, Effect Colony Characteristics? Ecological Entomology, 25, 1-6.
- Benton, T., 2000. The Bumblebees of Essex. The Nature of Essex Series, No: 4, Loginga Books, Essex.
- Brisse, S., Dujardin, J.C. and Tibayrenc, M., 2000. Identification of Six *Trypanosoma cruzi* Lineages by Sequence-Characterised Amplified Region Markers. Mol. Biochem. Parasitol., 111, 95–105.
- Brisse, S., Verhoef, J. and Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of Large and Small Subunit rRNA and Mini-Exon Genes Further Supports The Distinction of Six *Trypanosoma cruzi* Lineages. Int. J. Parasitol., 31, 1218–1226.
- Brown, M. J. F., Schmid-Hempel, R. and Schmid-Hempel, P., 2003. Strong Context-Dependent Virulence in A Host-Parasite System: Reconciling Genetic Evidence With Theory. J. Anim. Ecol., 72, 994–1002.

- Carvell, C., Roy, D.B., Smart, S.M., Pywell, R.F., Preston, C.D. and Goulson, D., 2006. Declines in Forage Availability for Bumblebees at A National Scale. Biol. Conserv., 132, 481–89.
- Cnaani, J., Robinson, G.E. and Hefetz, A., 2000a. The Critical Period for Caste Determination in *Bombus terrestris* and Its Juvenile Hormone Correlates. Journal Of Comparative Physiology A., 186, 1089-1094.
- Colla, S.R., Otterstatter, M.C., Gegear, R.J. and Thomson, J.D., 2006. Plight of The Bumble Bee: Pathogen Spillover from Commercial to Wild Populations. Biological Conservation, 129, 461–467.
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Nehme, N., Hernandez, V., Saravia, N. and Fernandes, O., 2004. *Leishmania* (Viannia): Genetic Analysis of Cutaneous and Mucosal Strains Isolated From The Same Patient. Exp. Parasitol., 108, 59–66.
- Çetinkaya, Ş., Şener, R.H. ve Beşeroğlu, A., 1996. Tek Ürün Domates Yetiştiriciliğinde Meyve Tutumu Üzerine BGD ve Vibrasyon Etkilerinin Araştırılması ile Vibrasyon Uygulama Sıklığının Saptanması. Tagem, 485- 553.
- Da Silva, F. M., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A. C. V., Coura, J. R., Añez, N., Shaw, J. J., Stevens, J. R. and Teixeira, M. M. G., 2004. Phylogeny, Taxonomy and Grouping of *Trypanosoma rangeli* Isolates From Man, Triatomites and Sylvatic Mammals from Widespread Geographical Origin Based On SSU and ITS Ribosomal Sequences. Parasitology, 129, 549–561.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. and Hyatt, A.D., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife- Threats to Biodiversity and Human Health. Science, 287, 443–449.
- Davis, A.R. and Shuel, R.W., 1988. Distribution of Carbofuran and Dimethoate in Flowers and Their Secretion in Nectar as Related to Nectary Vascular Supply. Can. J. Bot., 66, 1248–55.
- Delaplane, K.S. and Mayer, D.F., 2000. Crop Pollination by Bees. Wallingford, UK: CABI.
- Desquesnes, M., Ravel, S. and Cuny, G., 2002. PCR Identification of *Trypanosoma lewisi*, A Common Parasite of Laboratory Rats. Kinetoplastid Biol. Dis., 1,2.
- Doğaroğlu, M., 1999. Modern Arıcılık Teknikleri Anadolu Matbaa ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Sti., İstanbul.
- Duchateau, M.J. and Velthuis, H.H.W., 1988. Development and Reproductive Strategies in *Bombus terrestris* Colonies. Behavior, 107, 186-207.
- Durrer, S. and Schmid-Hempel, P., 1994. Shared Use of Flowers Leads to Horizontal Pathogen Transmission. Proc. R. Soc. Lond. B., 258, 299–302.

- Eijende, J.V.D. and Vette, N., 1993. *Nosema* Infection in Honeybees (*Apis mellifera* L.) and Bumblebees (*Bombus terrestris* L.) Proceedings of The Section Experimental and Applied Entomology of The Netherlands Entomological Society, 4, 205-208.
- Eijende, J.V.D., 1994. The Pollination of Aubergines (*Solanum melongera*) in Glasshouse With Honey Bee (*Apis mellifera* L.) and Bumblebee (*Bombus terrestris* L.). Apidologie, 25,5, 450-452.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. Evolution, 39, 783-791.
- Fisher, R.M. and Pomeroy, N., 1989. Polination of Greenhouse Muskmelons By Bumblebee. Journal of Economic Entomology, 82,4, 1061-1066.
- Free, J.B. and Williams, I.H., 1976. Pollination as A Factor Limiting The Yield of Field Beans (*Vicia faba* L.). J. Agric. Sci., 87, 395–99.
- Free, J.B., 1982. Bees and Mandkind. Alden Press, Oxford, UK.
- Free, J.B., 1993. Insect Pollination of Crops. 2. Edition. Academic Pres. London. 684 pp.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European Honey Bees (*Apis Mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology, 103, 73-79.
- Gegear, R.J., Otterstatter, M.C. and Thomson, J.D., 2005. Does Parasitic Infection Impair The Ability of Bumblebees to Learn Flower-Handling Techniques? Anim. Behav., 70, 209–15.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I., De Miranda, J.R., 2006. Detection of Deformed Wing Virus, A Honey Bee Viral Pathogen, in Bumble Bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with Wing Deformities. J. Invertebr. Pathol., 91, 61–63.
- Goka, K., Okabe, K. and Yoneda M., 2006. Worldwide Migration of Parasitic Mites as A Result of Bumblebee Commercialization. Population Ecology, 48, 285-291.
- Goodwin, S. and Steiner, M., 1997. Introduction of *Bombus terrestris* for Biological Pollination of Horticultural Crops in Australia. Gosford IPM Services.
- Gorbunov, P.S., 1987. Endoparasitic Flagellates of The Genus *Crithidia* (Trypanosomatidae, Zoomastigophora) from The Alimentary Canal of Bumblebees. Zool. Zhurn., 66, 1775–1780.
- Goulson, D., 2003. Effects of Introduced Bees on Native Ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 34, 1–26.
- Goulson, D., 2003. Bumblebees: Behaviour and Ecology. Oxford, UK: Oxford Univ. Press

- Goulson, D., Lye, G.C. and Darvill, B., 2008. Decline and Conservation of Bumble Bees. Annual Reviews in Entomology, 53, 191-208.
- Gösterit, A. and Gürel, F., 2005. Comparison of Development Patterns of Imported and Native *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) Colonies in The Mediterraneancoastal Region. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 29, 393-398.
- Greetenkord, C. and Drecher, W., 1997. Succesful Colony Foundation and Development of Experimentally Hibernated *Bombus terrestris* Queens Depending on Different Starting Methods. Proc. Int'l Symp. On Pollination, Ed. K. W. Richards, ISHS ACTA Horticulturae, 437.
- Gürel, F., 1997. Bombus Arısı (*Bombus terrestris*) Yetiştiriciliği ve Sera Ürünlerinin Tozlanmasında Kullanımı. Tigem, 65, 22-29.
- Gürel, F., Gencer, V., Efendi, Y. ve Talay, R., 1998. Antalya Çevresindeki Seralarda Kullanılan Bombus (*Bombus terrestris*) Kolonilerinin Performanslarının Değerlendirilmesi. Derim, 15,4, 150-161.
- Gürel, F., Talay, R., Efendi, Y. ve Balcıoğlu, M.S., 1999a. Örtüaltı Domates Yetiştiriciliğinde Bombus Arısı (*Bombus terrestris*) Polinasyonunun Verim ve Kaliteye Etkileri. GAP I. Tarım Kongresi, Mayıs, Urfa. Bildiriler Kitabı: 1203-1210
- Gürel, F. ve Gösterit, A., 2001. Bombus (*Bombus terrestris*) Arısında Koloni Gelişimi ve Ana Arı, Erkek Arı Üretimi Süreci. Teknik Arıcılık Dergisi, 73, 22-29.
- Gürel, F., Gösterit, A., Talay, R ve Efendi, Y., 2001a. Bombus Arısı (*Bombus terrestris*) 'nın Örtüaltı Yetiştiricilikte ve Ekolojik Tarımda Kullanımı. 2. Ekolojik Tarım Kongresi, Kasım, Antalya. Bildiriler Kitabı: 245-255.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gidley, J., Holz, P. and Gibson, W. C., 2005. A New Lineage of Trypanosomes from Australian Vertebrates and Terrestrial Bloodsucking Leeches (Haemadipsidae). Int. J. Parasitol., 35, 431-443.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M.J., Mayo, R. and Bernal, J.L., 2009. Honeybee Colony Collapse Due To *Nosema ceranae* In Professional Apiaries. Environmental Microbiology Reports, 1, 110-113.
- Higes, M., Martín, R. and Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, A New Microsporidian Parasite in Honeybees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology, 92,2, 93-95.
- Hines, H.M. and Hendrix, S.D., 2005. Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Diversity and Abundance in Tallgrass Prairie Patches: Effects of Local and Landscape Floral Resources. Environ. Entomol., 34, 77-84.

- Howard, D.C., Watkins, J.W., Clarke, R.T., Barnett, C.L. and Stark, G.J., 2003. Estimating The Extent and Change in Broad Habitats in Great Britain. J. Environ. Manag., 67, 219–27.
- Husband, R.W. and Sinha, R.N., 1970. A Revision of The Genus *Locustacarus* with A Key to Genera of The Family Podapolipidae (Acarina). Annals of The Entomological Society of America, 63, 1152-1162.
- Imhoof, B. and Schmid-Hempel, P., 1999. Colony Success of The Bumble Bee, *Bombus terrestris*, In Relation To Infections by Two Protozoan Parasites, *Crithidia bombi* And *Nosema bombi*. Insectes Sociaux, 46, 233-238.
- Inari, N., Nagamitsu, T., Kenta, T., Goka, K., Hiura, T., 2005. Spatial and Temporal Pattern of Introduced *Bombus terrestris* Abundance in Hokkaido, Japan, and Its Potential Impact on Native Bumblebees. Popul. Ecol., 47, 77–82.
- Ings, T.C., Raine, N.E., Chittka, L., 2005. Mating Preference of Commercially Imported Bumblebees (*Bombus terrestris*) in Britain (Hymenoptera: Apidae). Entomol. Gen. 28, 233–38.
- Ings, T.C, Wards, N.L., Chittka, L., 2006. Can Commercially Imported Bumble Bees Outcompete Their Native Conspecifics? J. Appl. Ecol., 43, 940–48.
- Kostygov, A.Y., Salisarenko, E.P., Merkulov, P.A. and Podlipaev, S.A., 2004. Genetic Diversity of Insect Trypanosomatids from Subarctic and North-West Russia Revealed by Up-Pcr Typing. Protistology, 3, 257–264.
- Kremen, C., Williams, N.M. and Thorp, R.W., 2002. Crop Pollination from Native Bees at Risk From Agricultural Intensification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 16812–16.
- Lipa, J.J. and Triggiani, O., 1980. *Crithidia bombi* A Flagellated Parasite of A Bumblebee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). Acta Protozoologica, 27, 287–290.
- Lipa, J.J. and Triggiani, O., 1988. *Crithidia bombi* sp.N., A Flagellated Parasite of A Bumble-Bee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae). Acta Protozool., 27, 287–290.
- Lipa, J.J. and Triggiani, O., 1992. A Newly Recorded Neogregarine (Protozoa, Apicomplexa), Parasite in Honey Bees (*Apis mellifera*) and Bumble Bees (*Bombus* sp.). Apidologie, 23, 533-536.
- Lipa, J.J. and 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, 29-34.
- Macfarlane, R.P., Lipa, J.J. and Liu, H., 1995. Bumblebee Pathogens and Internal Enemies. Bee World, 76, 130-148.

- Maslov, D.A., Westenberger, S.J., Xu, X., Campbell, D.A. and Sturm, N.R., 2007. Discovery and Barcoding by Analysis of Spliced Leader rRNA Gene Sequences of New Isolates Oof Trypanosomatidae from Heteroptera In Costa Rica and Ecuador. J. Eukaryot. Microbiol., 54, 57–65.
- Mcfrederick, Q.S. and Lebuhn, G., 2006. Are Urban Parks Refuges For Bumble Bees? Biol. Conserv., 129, 372–82.
- Mcghee, R.B. and Cosgrove, W.B., 1980. Biology and Physiology of The Lower Trypanosomatidae. Microbiol. Rev., 44, 140–173.
- Mcivor, C.A., 1990. *Nosema* Diseases of The Bumble Bee *Bombus terrestris* L. M.Sc Thesis, Massey University, New Zealand, 84.
- Mcvicar, A.H., 1997. Disease and Parasite Implications of The Coexistence of Wild and Cultured Atlantic Salmon Populations. Journal of Marine Science, 54, 1093–1103.
- Mcvicar, A.H., 2004. Management Actions In Relation To The Controversy About Salmon Lice Infections In Fish Farms as A Hazard To Wild Salmonid Populations. Aquaculture Research, 35, 751–758.
- Meeus, I., De Graaf, D.C., Jans, K., Smaghe, G., 2010. Multiplex PCR Detection of Slowly-Evolving Trypanosomatids and Neogregarines in Bumblebees Using Broad-Range Primers. Journal of Applied Microbiology, 109, 107–115.
- Memmott, J., Waser, N.M. and Price, M.V., 2004. Tolerance of Pollination Networks To Species Extinctions. Proceedings of The Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 271, 2605.
- Michener, D.C., 1974. The Social Behavior of The Bees. The Belkrap Press of Harward University Press, Cambridge.
- Morton, A., Routledge, R., Peet, C. and Ladwig, A., 2004. Sea Lice (*Lepeophtheirus Salmonis*) Infection Rates on Juvenile Pink (*Oncorhynchus Gorbuscha*) and Chum (*Oncorhynchus Keta*) Salmon in The Nearshore Marine Environment of British Columbia, Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 61, 147–157.
- Eldeniz, N. ve Kaftanoğlu, O., 2006. An Investigation on Some Diseases and Parasites of Bumblebee Queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9,7, 1282-1286.
- Niwa, S., Iwano, H., Asada, S., Matsuura, M. and Goka, K., 2004. A Microsporidian Pathogen Isolated from A Colony of The European Bumblebee, *Bombus terrestris*, and Infectivity on Japanese Bumblebee. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 48, 60-64.

- Otterstatter, M.C. and Whidden, T.L., 2004. Patterns of Parasitism by Tracheal Mites (*Locustacarus buchneri*) in Natural Bumble Bee Populations. *Apidologie*, 35, 351–357.
- Otterstatter, M.C., Gegeer, R.J., Colla, S. and Thompson, J.D., 2005. Effects of Parasitic Mites and Protozoa on The Flower Constancy and Foraging Rate of Bumble Bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 58, 383–89.
- Otti, O. and Schmid-Hempel, P., 2007. *Nosema bombi*: A Pollinator Parasite with Detrimental Fitness Effects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 118-124.
- Özbek, H., 1983. Doğu Anadolu'nun Bazı Yörelerindeki Bombinae (Hymenoptera: Apidae, Bombidae) Türleri Üzerinde Taksonomik ve Bazı Biyolojik Çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, No: 621, Erzurum
- Özbek, H., 2002a. Arısız Tarım Sağlıklı ve Verimli Olurmu? *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2,2, 25-26.
- Özbek, H., 2002b. Arılar ve Doğa. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3,2, 22-25.
- Öztürk, A. İ., 2001. Balarısı Hastalıkları. *Muğla'da Tarım*. 1,5, 57-59.
- Plischuk, S. and Lange, C.E., 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) Parasitized by A Flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and A Neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *Jinvertebr Pathol.* 102, 263-265.
- Podlipaev, S.A., Sturm, N.R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S.J., Dollet, M., Campbell, D. A. and Lukes, J., 2004. Diversity of Insect Trypanosomatids Assessed From Spliced Leader RNA and 5S rRNA Genes and Intergenic Regions. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51, 283–290.
- Potts, S.G. ve Ark., 2010. Declines of Managed Honeybees and Beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49, 15–22.
- Power, A.G. and Mitchell, C.E., 2004. Pathogen Spillover in Disease Epidemics. *The American Naturalist*, 164, 79-89.
- Prys-Jones, O.E. and Corbet, S.A., 1991. Bumblebees., Richmond Publishing, Slough, England.
- Richards, A.J., 2001. Does Low Biodiversity Resulting from Modern Agricultural Practice Affect Crop Pollination and Yield? *Ann. Bot.*, 88, 165–72.
- Rutrecht, S.T., Klee, J. and Brown, M.J.F., 2007. Horizontal Transmission Success of *Nosema bombi* to Its Adult Bumble Bee Hosts: Effects of Dosage, Spore Source and Host Age. *Parasitology*, 134, 1719-1726.



- Rutrecht, S.T. and Brown, M.J.F., 2009. Differential Virulence in A Multiple-Host Parasite of Bumble Bees: Resolving The Paradox of Parasite Survival? Oikos ,118, 941-949.
- Schmid-Hempel, P., 1998. Parasites in Social Insects. Princeton University Press, Princeton N.J., USA.
- Schmid-Hempel, P., Pühr, K., Krüger, N., Reber, C. and Schmid-Hempel, R., 1999. Dynamic and Genetic Consequences of Variation in Horizontal Transmission for A Microparasitic Infection. Evolution, 53, 426–434.
- Schmid-Hempel, P., 2001. On The Evolutionary Ecology of Host-Parasite Interactions: Addressing The Question with Regard To Bumblebees and Their Parasites. Naturwissenschaften, 88, 147–158.
- Schmid-Hempel, P. and 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. and Tognazzo, M., 2010. Molecular Divergence Defines Two Distinct Lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), Parasites of Bumblebees. Journal of Eukaryotic Microbiology, 57, 337-345.
- Schwarz, H.H. and Huck, K., 1997. Phoretic Mites Use Flowers to Transfer Between Foaging Bumble Bees. Insects Sociaux, 44, 303-310.
- Shafer, A.B.A., Williams, G. R., Shutler D., Rogers, R.E.L. and Stewart D.T., 2009. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and Bees (Hymenoptera: Apidae) Suggests Both Cospeciation and A Host Switch. Journal of Parasitology, 95, 198-203.
- Shipp, J.L., Whitfieldgh, G.H., Papadopoulos, A.P., 1994. Effectiveness of The Bumble Bee *Bombus impatiens* Cr. (Hymenoptera: Apidae), As A Pollinator of Greenhouse Sweet Pepper. Sci. Hortic., 57, 29–39.
- Shykoff, J. A. and Schmid-Hempel, P., 1991a. Incidence and Effects of Four Parasites in Natural Populations of Bumble Bees in Switzerland. Apidologie, 22, 117-125.
- Shykoff, J. A. and Schmid-Hempel, P., 1991b. Genetic Relatedness and Eusociality: Parasite-Mediated Selection on The Genetic Composition of Groups. Behav.Ecol.Sociobiol., 28, 371-376.
- Skou, J.P., Holm, S.V.N. and Haas, H., 1963. Preliminary Investigations on Diseases in Bumble-Bees (*Bombus latr.*). Yearbook, Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen, 27-41.
- Spiewok S. and Neumann, P., 2006. Infestation of The Commercial Bumblebee (*Bombus impatiens*) Field Colonies by Small Hive Beetles (*Aethina Tumida*). Ecol. Entomol. 31,623–28.

- Steffan-Dewenter, I. vd., 2005. Pollinator Diversity and Crop Pollination Services Are at Risk. Trends in Ecology and Evolution,20. doi: 10.1016/j.tree. 2005.09.004.
- Thompson, H.M. and Hunt, L.V., 1999. Extrapolating From Honeybees to Bumblebees in Pesticide Risk Assessment. Ecotoxicology, 8, 147–66.
- Thompson, H.M., 2001. Assessing The Exposure and Toxicity of Pesticides to Bumblebees (*Bombus sp.*). Apidologie, 32, 305–21.
- Thomson, D.M., 2004. Detecting The Effects of Introduced Species: A Case Study of Competition Between *Apis* and *Bombus*. Oikos,114, 407–18.
- Thorp, R.W., 2005. Species Profile: *Bombus franklini*. In Red List of Pollinator Insects of North America, Ed.MDShepherd, DMVaughan, SH Black. Portland, OR: Xerces Society for Invertebrate Conservation.
- Tibayrene, M., 2003. Genetic Subdivisions Within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and Their Relevance for Molecular Epidemiology and Experimental Evolution. Kinetoplast Biol. Dis., 2, 12.
- Tutkun, E. ve Boşgelmez, A., 2003. Bal Arısı Zararlıları ve Hastalıkları Teşhis ve Tedavi Yöntemleri. Bizim Büro Basımevi. Ankara.
- URL-1 [Http://en.wikipedia.org/wiki/Bombus\\_terrestris](http://en.wikipedia.org/wiki/Bombus_terrestris). 10 Şubat 2011
- URL-2 [Http://www.aricilikvideolari.com/aricilik/arilar/bombus-arilari](http://www.aricilikvideolari.com/aricilik/arilar/bombus-arilari). 10 Şubat 2011
- Velthuis, H.H.W. ve Doorn, N.A.V., 2006. A Century of Advances In Bumblebee Domestication and The Economic and Environmental Aspects of Its Commercialization for Pollination. Apidologie, 37, 421-451.
- Walther-Hellwig, K., Fokul, G., Frankl, R., Buechler, R., Ekschmitt, K. and Wolters, V., 2006. Increased Density of Honeybee Colonies Affects Foraging Bumblebees. Apidologie,37, 517–32.
- Weiser, J., 1978. Morphological Differences of *Nosema apis* An *Nosema bombi*. Progress In Invertebrate Pathology 1958-1978. International Colloquium of Inv. Path., Eylül, Prague, 241-242.
- Westenberger, S. J., Sturm, N.R., Yanega, D., Podlipaev, S.A., Zeledo´N, R., Campbell, D. A. and Maslov, D.A., 2004. Trypanosomatid Biodiversity in Costa Rica: Genotyping of Parasites from Heteroptera Using The Spliced Leader RNA Gene. Parasitology, 129, 537–547.
- Westphal, C., Steffen-Dewenter, I., Tsharntke, T., 2003. Mass-Flowering Crops Enhance Pollinator Densities at A Landscape Scale. Ecol. Lett., 6, 961–65.

- Whittington, R., Winston, M.L. 2004. Comparison and Examination of *Bombus occidentalis* and *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) in Tomato Greenhouses. J. Econ. Entomol., 97, 1384–89.
- Whittington, R., Winston, M.L., Tucker, C. and Parachnowitsch, A.L., 2004. Plant-Species Identity of Pollen Collected by Bumblebees Placed in Greenhouse for Tomato Pollination. Can. J. Plant Sci., 84, 599–602.
- Williams, P.H. and Osborne J.L., 2009. Bumblebee Vulnerability and Conservation Worldwide. Apidologie, 40, 367-387.
- Williams, G.R., Shutler, D., Little, C.M., Burger-Maclellan, K.L. and Rogers, R.E.L., 2010. The Microsporidian *Nosema ceranae*, The Antibiotic Fumagilin-B® and Western Honey Bee (*Apis mellifera*) Colony Strength. Apidologie, in press. doi: 10.1051/apido/2010030.
- Yeninar, H., Duchateau, M.J., Kaftanoğlu, O. and Velthuis, H., 2000. Colony Developmental Patterns in Different Local Populations of The Turkish Bumblebee, *Bombus terrestris dalmatinus*. Journal of Apicultural Research, 39,3-4, 107-116.
- Yurchenko, V.Y., Lukes, J., Tesa\_Ova, M., Jirku, M. and Maslov, D.A., 2008. Morphological Discordance of The New Trypanosomatid Species Phylogenetically Associated with The Genus *Crithidia*. Protist., 159, 99–114.
- Yurchenko, V.Y., Lukes, J., Jirku, M. and Maslov, D.A., 2009. Selective Recovery of Cultivation-Prone Components from Mixed Trypanosomatid Infections: A Case of Several Novel Species Isolated From Neotropical Heteroptera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59, 893–909.

## ÖZGEÇMİŞ

Hande BAYRAKTAR, 1984 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Dumlupınar İlkokulu'nda, ortaokulu Cudibey İlköğretim Okulu'nda ve liseyi Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2004-2005 Eğitim-Öğretim yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında bu bölümden Biyolog unvanıyla mezun oldu. Aynı yıl, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yüksek Lisans eğitimi sırasında 2010-2011 Güz döneminde, Avrupa Birliği ERASMUS Öğrenci Değişim Programı kapsamında 4 ay süre ile Belçika'nın Gent Üniversitesi, Faculty of Bioscience Engineering, Department of Crop Protection, Laboratory of Agrozoology'de bulundu. İyi derecede İngilizce bilmektedir.