

## ANADOLU *BOMBUS LAPIDARIUS* L. (APIDAE: HYMENOPTERA) POPÜLASYONLARININ GENETİK YAPILANMASI

Burcu TEMEL ALTUN <sup>1,\*</sup>, Ertan Mahir KORKMAZ <sup>2</sup>, Hasan H. BAŞIBÜYÜK <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye

<sup>3</sup> Gerontoloji Bölümü, Edebiyat Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye

### ÖZET

Anadolu, Avrupa'nın günümüz biyoçeşitliliğine önemli derecede katkı sağlayan bölgelerden birisidir. Bazı günümüz orta ve kuzey Avrupa popülasyonlarının buzul dönemlerinde Anadolu'da barınmış popülasyonlardan giden öncülerce oluşturulduğu savunulmaktadır. Soğuk tercih eden hayvanlar yayılış örüntülerinde buzul dönemlerinde genişleme buzullar arası dönemlerde ise daralma sergiledikleri için model organizmalar olarak kabul edilmektedir. Bu kapsamda Anadolu'nun, tarihsel biyocoğrafyası ve genetik çeşitliliği konusunda bilgi edinmek amacıyla Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *Bombus lapidarius*'un 14 kadar popülasyonundan *COI* ve *nCTB* gen bölgeleri çalışılmıştır. Her iki belirteç açısından da haplotip çeşitliliği ve özgün haplotip sayısı yüksek olup, popülasyonlar arasında anlamlı bir genetik farklılaşma saptanmıştır. Özellikle Doğu-Batı farklılaşması Karadeniz boyunca desteklenmektedir. Tüm analizlerde Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğer popülasyonlardan belirgin olarak farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılaşma popülasyonların coğrafik yayılış örüntüleri ile doğrudan ilişkilidir. Aynı zamanda bu popülasyonlar ayrı bir soy hattı oluşturmaktadır. Ayrıca Batı popülasyonları son türemiş popülasyonlar olarak görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** mtDNA, NUMT, Anadolu, Filocoğrafya, Genetik yapı, Coğrafik genetik yapılanma

## GENETIC STRUCTURING OF ANATOLIAN *BOMBUS LAPIDARIUS* L. (APIDAE: HYMENOPTERA) POPULATIONS

### ABSTRACT

Anatolia is one of the important regions which have contributed to current biodiversity of Europe. It is suggested that some of the current central and northern populations of Europe have been originated from populations took refuge during glacial ages. Cold preferring animals are accepted as model organisms because they exhibit range expansion and range contraction patterns during glacial and interglacial periods, respectively. In order to improve our knowledge on biogeography and genetic diversity of Anatolia, the distribution pattern of *Bombus lapidarius* were investigated in the Black Sea region using *COI* and *nCTB* genes from 14 populations. High numbers of unique and diverse haplotypes were observed in both markers, suggesting genetic differentiations among populations. East-West differentiation is particularly supported throughout the Black Sea region. All analyses indicate that the East4 and East5 populations exhibit significantly differentiation from other populations. This differentiation is directly related to the geographical distribution patterns of populations. These populations constitute a separate lineage at the same time. In addition, Western populations can be accepted as recently derived populations.

**Keywords:** mtDNA, NUMT, Anatolia, Phylogeography, Genetic structure, Landscape genetics

## 1. GİRİŞ

Popülasyonların genetik yapılanmasında gözlenen farklılaşmalar, yayılış alanındaki tarihsel ve güncel dinamiklerin yanı sıra hem popülasyonların evrimsel hikayesi, hem de alanın jeolojik tarihi ile ilişkilendirilebilir. Buzul çağlarının ve özellikle de Pliyosen–Pleistosen buzullaşmalarının günümüz Avrupa popülasyonlarının evrimsel tarihi üzerine ciddi ve belirleyici bir etki sergilemiş olduğu bilinmektedir [1, 2]. Batı Paleartik bölgesinin Buzul dönemi filocoğrafyasını araştıran çalışmalar İber, İtalya, Yunanistan/Balkanlar ve Anadolu olmak üzere Avrupa'nın günümüz biyoçeşitliliğine önemli

\* Sorumlu Yazar: [burcutml85@hotmail.com](mailto:burcutml85@hotmail.com)

Geliş Tarihi: 29 Kasım 2017 Yayın Tarihi: 17 Ağustos 2018

derecede katkı sağlayan dört ana sığınak alan ortaya koymuştur [3-11]. Son yıllarda Kuzey Afrika'nın da sığınak rolüne sahip olduğu rapor edilmiştir [12]. Paleartik bölgede türlerin yayılış alanının en güneyinde yer alan Anadolu, buzul dönemleri boyunca birçok popülasyona ev sahipliği yapan ve buzullar arası dönemlerde ise Balkanlar ve Kafkaslar yoluyla kuzeye yayılışlarını sağlayan oldukça önemli bir sığınak alanıdır [5]. Anadolu Yarımadası'nın kuzey sınırını, Karadeniz kıyısı boyunca uzanan Pontidler oluşturmaktadır. Bu dağ sırası batıda Bulgaristan sınırları içerisinde yer alan Rodop Dağları'ndan başlar ve doğuda Küçük Kafkaslar'a kadar uzanır [13]. Anadolu coğrafik lokasyonu, heterojen topografyası ve iklimsel koşullarındaki değişikliklere ek olarak karmaşık paleocoğrafik tarihi ile de Avrupa'nın günümüz biyolojik çeşitliliğine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [14]. Birkaç farklı soy hattına yönelik çalışmalar, Anadolu'da genetik çeşitliliğin yüksek düzeyde olduğuna işaret etmektedir [10,15-18]. Ancak genel olarak Anadolu, bölgesel filocoğrafik çalışmalarda yeterince temsil edilmemiştir. Sonuç olarak bu yarım adada yayılış sergileyen popülasyonların genetik yapılanmasında sürekli dalgalanmaların, uzun süreli tarihsel izolasyonların ya da yeniden yerleşme olaylarının yol açtığı genetik örüntünün izlerine rastlanması beklenmektedir. *Bombus* arıları da soğuğa uyarlanmış, alpin formların veya Holoartik grupların tarihsel biyocoğrafik örüntülerini anlamak için mükemmel bir sistemdir [19]. Soğuk seven bu arı türü Anadolu'nun batısındaki dağlardan, Karadeniz hattı boyunca kuzeydoğu Anadolu dağlarına kadar uzanan bir yayılış sergilemesi nedeniyle Pontid oluşumlarının olası etkisini sınamaya da olanaklı kılmaktadır.

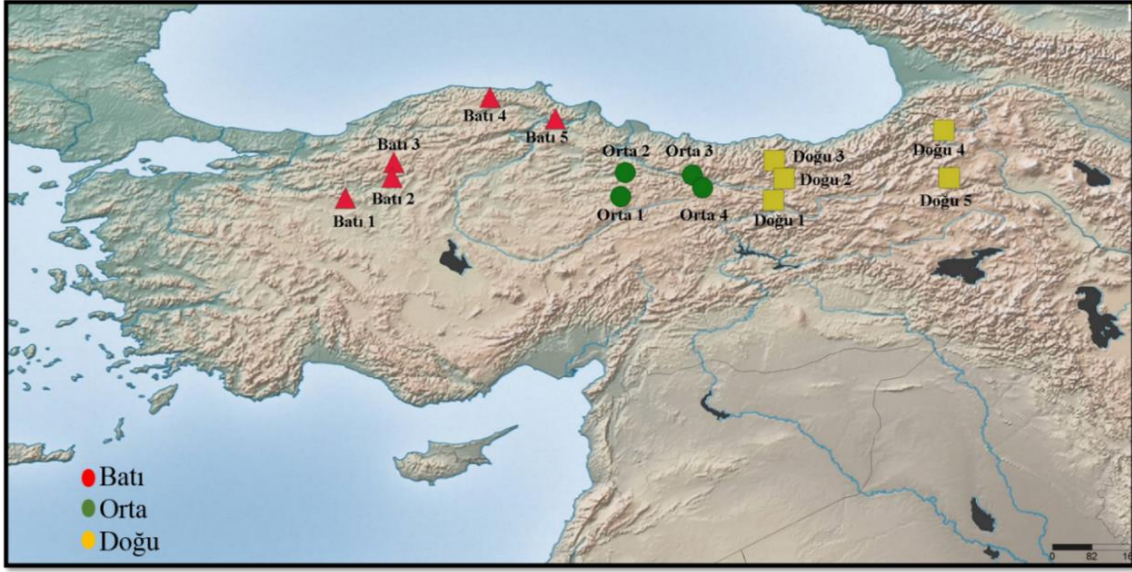
*Bombus lapidarius*, Bombinae alt familyasının bir üyesi olup kuzey ılıman bölgelerde hem ekolojik hem de ekonomik açıdan önemli tozlaştırıcılar olarak bilinmektedir [20-22]. Aynı zamanda soğuk seven, izole ve parçalı bir yayılış sergileyen bir tür olması nedeniyle filocoğrafya çalışmaları açısından da ideal bir organizmadır [23]. Taksonomik açıdan bu tür, günümüzde *B. lapidarius lapidarius*, *B. lapidarius caucasicus*, *B. lapidarius eriophorus*, *B. lapidarius decipiens* ve *B. lapidarius atlanticus* olmak üzere beş alt taksonomik gruba ayrılmıştır [24]. Batı Paleartik'te yayılış sergileyen bu türün nominal türü Avrupa'nın ovaları, Balkanlar ve Batı Anadolu'da; *B. lapidarius caucasicus* Kuzeydoğu Anadolu, Transkafkasya ve İran'ın kuzeyinde, *B. lapidarius eriophorus* Kafkasya'da, *B. lapidarius decipiens* İberve Güney İtalya'da ve *B. lapidarius atlanticus* ise Fas'ta yayılış sergilemektedir [25].

Burada, Anadolu'da yayılış sergileyen *Bombus lapidarius* popülasyonları genetik açıdan değerlendirilerek olası fiocoğrafik örüntüleri ve coğrafik genetik yapılanmaları mitokondri genomunu temsilen *COI* gen bölgesi ve çekirdek genomunu temsilen bir kodlama yapmayan gen bölgesine başvurularak açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Örneklem

Örneklem, 2008-2010 tarihleri arasında türün Anadolu'daki yayılış alanını ve topografik yapıyı temsil edecek şekilde 14 farklı lokaliteden 81 birey toplanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 1, Tablo 1). Etonol içerisinde saklanarak laboratuvar ortamına getirilen bireylerin teşhislerinde farklı tür teşhis anahtarları kullanılmıştır [26-27]. Tür örnekleri buldukları lokaliteye bağlı olarak Batı, Orta ve Doğu gruplandırılmaları yapılmıştır.



Şekil 1. Örneklerin toplandığı lokaliteler

## 2.2. DNA Analizi

Örneklerden total genomik DNA izolasyonu için yüksek saflıkta PZR kalıbı hazırlama kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılmıştır. DNA izolasyonu sonrasında *COI* gen bölgesini hedefleyen PZR işlemleri iki farklı primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk primer çifti BTF: 5'-GCCGTTTCCTACAGGAATTAAGTCTTC-3', BTR: 5'-AACTCGTCCAGGAATTGCATCAAC-3', ikinci primer çifti ise AP-H-3103: 5'-AATCTGGATAGTCTGAATAAC-3', AP-L-1954:5'-AGCAATGATCAAATTTATAATAC-3' [28] dizilerinden oluşmaktadır. Her bir PZR reaksiyonu 50 µl son hacimde hazırlanmıştır. 50 µl'lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hanover, MD), 5 µl 10× reaksiyon tampon (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), primerlerin her birinden 10 pmol, 0,2 mM her bir dNTP (MBI Fermentas), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 50-100 ng kalıp DNA eklenmiştir. PZR döngüsü koşulları: 94°C'de 5 dakika; 35 döngü 94°C'de 1 dakika, 46°C'de 1 dakika ve 72°C'de 30 saniye; ve sonunda 72°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda her iki gen bölgesine ait sırasıyla 1344 ve 1050 baz çiftlik fragmanlar elde edilmiştir. Dizileme sonrasında ilgili gen bölgelerinin ileri ve geri yönlü nükleotid dizileri CodonCode Aligner v3.5.6 [29] programı kullanılarak gözle hizalanmıştır. Her bir birey için konsensüs dizisi Mega v6.0 programı [30] kullanılarak elde edilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışma kapsamında analiz edilen *Bombus lapidarius* popülasyonlarının örneklem ve lokalite bilgileri

Lokalite Adı	Pop. Adı	Toplama Tarihi	Yükseklik (m)	Enlem	Boylam	Toplam birey	<i>COI</i> birey	nCBT birey
<i>B. lapidarius</i>								
Eskişehir-Mihaliççık	Batı1	10.07.2010	1241	39° 55'08.61"N	31° 23'06.98"E	13	13	-
Ankara-Güdül	Batı2	05.07.2008	1518	40° 18'38.99"N	32° 15'07.99"E	7	-	7
Bolu-Cankurtaran	Batı3	10.07.2010	1466	40° 35'03.77"N	32° 17'02.10"E	9	5	4
Kastamonu-Isırganlı	Batı4	09.07.2010	1358	41° 48'08.91"N	34° 05'02.10"E	7	7	-
Sinop-Alaçam	Batı5	08.07.2010	1158	41° 24'03.47"N	35° 18'05.82"E	3	-	3
Tokat-Çamlıbel	Orta1	08.07.2010	1613	39° 57'01.28"N	36° 31'08.09"E	13	-	13
Tokat-Topçam	Orta2	08.07.2010	1610	40° 24'01.53"N	36° 36'13.31"E	6	6	-
Ordu-Mesudiye	Orta3	19.07.2010	1626	40° 21'23.04"N	37° 51'16.99"E	2	1	1
Sivas-Suşehri	Orta4	19.07.2010	1773	40° 07'04.76"N	38° 02'54.24"E	3	1	2
Erzincan-Ahmediye	Doğu1	19.07.2010	2105	39° 53'06.54"N	39° 22'03.91"E	3	2	1
Gümüşhane-Kösedağ	Doğu2	19.10.2010	1887	40° 17'06.53"N	39° 34'03.55"E	4	4	-
Gümüşhane-Zigana	Doğu3	19.07.2010	1726	40° 37'08.03"N	39° 23'07.45"E	5	-	5
Ardahan-Çamgeçidi	Doğu4	21.07.2010	2061	40° 18'00.69"N	42° 39'02.65"E	1	1	-
Kars-Sarıkamış	Doğu5	20.07.2010	2149	38° 46'08.60"N	42° 33'05.83"E	5	5	-

## 2.3. Veri Analizi

### 2.3.1. Genetik Çeşitlilik ve Gen Karakterizasyonu

Her iki gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu nükleotid düzeyinde, kodlama yapan gen bölgesinin ise ayrıca amino asit düzeyinde de gerçekleştirilmiştir. Nükleotid kompozisyonu, nükleotid yer değişim tipleri ve amino asit kompozisyonları DnaSP v5.0 [31] ve MEGA v6.0 programları aracılığıyla analiz edilmiştir. Popülasyon içi ve popülasyonlar arası nükleotid çeşitliliği [ $P_i$ ] [32], ikili nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı  $k$  [33] haplotip çeşitliliği ( $H_d$ ), haplotip sayısı ( $H$ ) ve popülasyonlara özgün haplotip sayısı ( $H_U$ ) [32- 33] DnaSP v5.0 ve Arlequin v3.11 [34] programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kodlama yapan gen bölgesinin nükleotid çeşitliliğinin seçim baskısına maruz kalıp kalmadığının ve tarihsel ani genişleme örüntülerinin sınanması amacıyla Tajima'nın  $D$  [35] ve  $F_s$  [36] analizlerine başvurulmuştur.

### 2.3.2. Coğrafik Genetik Yapılanma

Anadolu *B. lapidarius* türünde genetik yapılanmayı belirlemek için,  $\Phi$  istatistiklerine dayalı moleküler varyansın mekânsal analizi (SAMOVA) araştırılmıştır. Bu amaçla SAMOVA v1.0 programından yararlanılmıştır [37]. Popülasyonlar arası ortalama genetik uzaklık değerleri p-distance [38]. algoritması üzerinden MEGA v6.0 programı ile gerçekleştirilmiştir. Genetik farklılaşma değerlerinin anlamlılık dereceleri 1000 rastgele permütasyon üzerinden hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası genetik yapılanma, aynı zamanda, ikili genetik uzaklık (p-distance) değerleri üzerinden temel koordinatlar analizi (PCoA) kullanılarak GenAlEx v6.3 paket programında [39] gerçekleştirilmiştir. Genetik yapılanmanın oluşumunda coğrafik uzaklıkla genetik uzaklık arasında bir ilişkinin [isolation by distance (IBD); 40] var olup olmadığı popülasyonların GenAlEx v6.3 paket programında yer alan Mantel seçeneği kullanılarak 10 000 rastgele permütasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir.

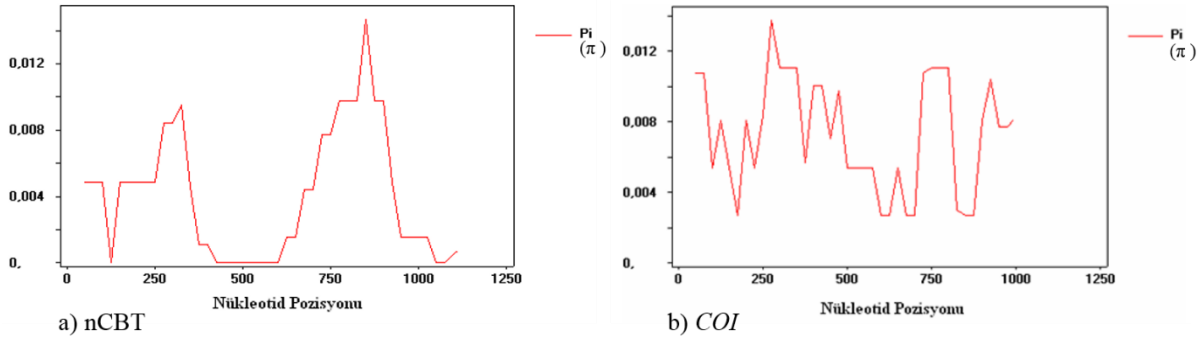
### 2.3.3. Filogeni ve Filocoğrafya

*B. lapidarius* popülasyonlarının filogenisi ve popülasyonlar arası farklılaşma zamanları Bayesiyen çıkarsamalı ve MCMC yaklaşımlı bir filogenetik analiz olan BEAST version 1.8.3 [41] programı kullanılarak tahmin edilmiştir. Dışgrup olarak *Bombus* cinsi içerisinde yer alan *Thoracobombus* altcinsini temsilen *T. muscorum* atanmıştır [42]. Analiz yalnızca COI veri seti üzerinden yürütülmüş olup nükleotid yer değiştirme açısından en uygun evrimsel modelin belirlenmesinde JModel test programından yararlanılmıştır [43]. Hem AIC (Akaike Information Criterion) hem de BIC (Bayesiyen Information Criterion) parametreleri için en uygun model olarak altı parametrelili GTR + G + I modeli saptanmıştır. Veri seti saat benzeri evrimleşme sergilemediği için, ayılma zamanları “uncorrelated relaxed lognormal clock” parametresi altında tahmin edilmiştir. Yule türleşme ağaç öncülleri tür içindeki model oran varyasyonu için uygulanmıştır [44]. Ayrılma zamanlarının belirlenmesinde mutasyon oranı olarak, böcek mitokondri genleri için daha önce önerilmiş ve yaygın bir şekilde kullanılan her milyon yılda pozisyon başına  $1.31E-2$  yer değiştirme değeri seçilmiştir [45]. Analiz 50 milyon döngü (her 5000 döngüde bir örneklem) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonucundaki tüm parametrelerin güvenilirliği ve doyumluk değerleri (ESS > 200) Tracer v1.6 programı ile kontrol edilmiştir. Ağaçların maksimum klad güvenilirlikleri TreeAnnotator v1.8.3 [41] programı yardımı ile örneklerin %25'lik kısmı yakılarak (burn-in) hesaplanmıştır. Figtree v1.4.2 [46] konsensüs ağacının görüntülenmesinde tercih edilmiştir. Gen ağaçlarının inşa edilmesine ek olarak, popülasyonları oluşturan bireylerin her iki DNA belirteci için sekans dizilerine dayandırılarak bireyler arasındaki soy hattı ilişkisi ortanca-bağlama (median-joining, MJ) parametresi altında Network v5.0.0.1 [47] programına başvurularak gerçekleştirilmiştir.

### 3. SONUÇ

#### 3.1. Genetik Çeşitlilik

Bu çalışmanın önemli bulgularından biri PZR, dizileme ve hizalama aşamaları sonucunda kodlama yapmayan (nCBT) bir numt (mitokondri kökenli bir yalancı gen) bölgesinin varlığının saptanmasıdır. *COI* gen bölgesine benzerlik sergileyen ve 1151 bç uzunluğunda olan bu dizi, içerisinde rastgele stop kodonları barındırması ve %75,6 G+C içeriğine sahip olması özellikleri ile tanımlanmıştır. Bu gen bölgesine ait dizi verisi toplamda sekiz popülasyona ait 36 bireyden elde edilebilmiş ve çekirdek DNA'ya ait kodlama yapmayan bölgeler gibi bilgi verici olma durumu göz önünde bulundurularak sonraki analizlerde kullanılmıştır. Analiz edilen 36 bireye ait nükleotid konsensüs dizisi içerisinde 13 adet mutasyon, 13 polimorfik (değişken) pozisyon sayısı ( $S$ ) ve 1138 adet değişken olmayan pozisyon bulunmuştur. Bu polimorfik pozisyonlardan parsimoni bilgi verici pozisyon sayısı 12'dir. Baz başına nükleotid çeşitliliği  $\pi = 0,00395$  ve ikili nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı  $k = 4,541$  olarak belirlenmiştir. Baz başına nükleotid çeşitliliği incelendiği zaman nükleotid değişiminin en fazla 801-900. pozisyonlar arasında olduğu ve dizinin en korunmuş bölgesi ise 425-600. baz pozisyonları arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 2a). Diğer taraftan nükleotid kompozisyonunun G+C yönünde eğilim sergilediği (% 75,6) gözlenmiş olup, ortalama nükleotid yüzdesi toplamda sırasıyla %8,0 (A), %16,3 (T), %37,6 (C) ve %38,0 (G) şeklinde hesaplanmıştır. Anadolu *B. lapidarius* popülasyonlarında yedi haplotip ile temsil edilen bu gen bölgesi yüksek haplotip çeşitliliğine sahiptir ( $H_d = 0,768 \pm 0,052$ ). Bu haplotiplerin dağılımları incelendiği zaman özgün haplotip sayısının dört ( $H_U$ ), en az iki popülasyon tarafından paylaşılan haplotip sayısının ise üç olduğu gözlenmiştir (Tablo 2).



Şekil 2. nCBT (a) ve *COI* (b) gen bölgesi boyunca baz başına nükleotid çeşitliliği ( $Pi$ )

Tablo 2. Çalışma kapsamında *Bombus lapidarius* *COI* ve *nCBT* gen bölgelerine ait haplotipler

<i>COI</i>		<i>nCBT</i>	
Haplotipler	Popülasyonlar ve bireyler	Haplotipler	Popülasyonlar ve bireyler
HL1	Batı4b, Batı4r	BT1	Orta1a, Orta1b, Orta1c, Orta1d, Orta1e, Orta1i, Orta1j, Orta1k, Orta1l, Orta1m, Orta3d, Orta4d, Doğu1d, Doğu3a, Doğu3d
HL2	Batı4e, Batı4p, Batı4u, Batı4t	BT2	Orta1f, Orta1g, Orta1h
HL3	Batı3c, Batı3g, Batı3i, Batı3k, Batı3m, Batı1d, Batı1h, Batı1j, Orta2b, Orta2d, Batı1k, Batı1l, Batı1m, Batı1n	BT3	Batı2a, Batı2c, Batı2d, Batı2e, Batı2f, Batı5a, Batı5b, Batı5c
HL4	Batı1a, Batı1b, Batı1c, Batı1e, Batı1f, Batı1g	BT4	Batı2b, Batı2g, Batı3a, Batı3e
HL5	Doğu1b, Doğu1e, Doğu2h, Doğu2f, Doğu2g, Doğu2j, Orta2c, Orta2e, Orta2f, Orta2h, Orta4e	BT5	Batı3j, Batı3b
HL6	Doğu4a, Doğu5a, Doğu5b, Doğu5c, Doğu5d, Doğu5f, Doğu5g	BT6	Doğu3b, Doğu3e, Doğu3f
HL7	Orta3b	BT7	Orta4f

COI gen bölgesi açısından değerlendirildiğinde, toplamda 10 popülasyona ait 45 bireyde 1037 bç uzunluğunda dizi elde edilmiştir. Bu veri setinin 29 adet mutasyon, 29 polimorfik (değişken) pozisyon sayısı (S) ve 1008 adet değişken olmayan pozisyon barındırdığı belirlenmiştir. Bu polimorfik pozisyonlardan parsimoni bilgi verici pozisyon sayısı altıdır. Nükleotid çeşitlilik indeksleri  $\pi = 0,00767$  ve  $k = 7,956$  olup nükleotid değişiminin en fazla olduğu pozisyonlar fragman boyunca değişkenlik sergilemiştir (Şekil 2b). A+T yönünde eğilim sergileyen bu gen bölgesinde ortalama nükleotid yüzdesi toplamda sırasıyla %33,3 (A), %41,4 (T), %13,6 (C) ve %11,7 (G) şeklindedir. Haplotip çeşitliliği yüksek olup ( $H_d = 0,809 \pm 0,029$ ) toplamda yedi haplotip elde edilmiştir. Özgün haplotip sayısı ise dördür (Tablo 2). Nötralite analizleri sonucunda her iki test açısından da önemli bir sapma gözlenmiştir [ $D = -1,11359$  ( $p = 0,001$ );  $F_S = -1,650$  ( $p = 0,001$ )].

### 3.2. Coğrafik Genetik Yapılanma

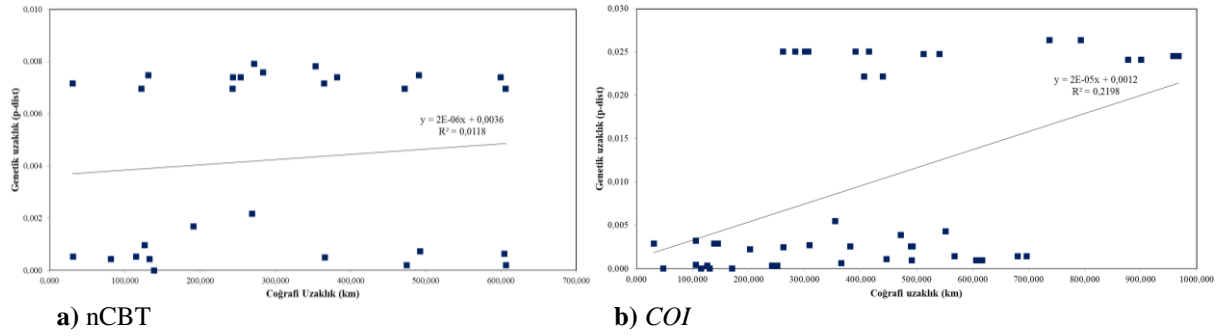
Popülasyonlar arasında genetik farklılaşma düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla ikili p-distance indekslerinden yararlanılmıştır. Genetik uzaklık değerleri COI için %0,00 ile %2,64 ve nCBT için %0,00 ile %0,76 arasında değişkenlik sergilediği hesaplanmıştır (Tablo 3a-b). Bu farklılaşma COI veri seti açısından değerlendirildiği zaman özellikle Doğu4 ve Doğu5 popülasyonları ile diğer kalan popülasyonlar arasında görülmektedir. Kodlama yapmayan gen bölgesi açısından ise bu farklılaşma özellikle Batı3 popülasyonu ile Doğu3 (%0,79) ve Orta4 (%0,78) popülasyonları arasında görülmektedir. Batı grupları içerisinde genetik uzaklık oranları her iki veri seti açısından da %0,00-%0,30 değerleri arasında değişkenlik gösterirken, Orta (%0,00-0,01) ve Doğu4-5 (%0,00) grupları kendi içerisinde düşük farklılaşma sergilemektedir (Tablo3a-b).

**Tablo 3.** Popülasyonlar arası ortalama genetik uzaklık değerleri a) nCBT (kodlama yapmayan), b) COI gen bölgesine ait p-distance değerleri

a) nCBT										
	Batı2	Batı3	Batı5	Orta1	Orta3	Orta4	Doğu1	Doğu3		
Batı2	0,0000									
Batı3	0,0017	0,0000								
Batı5	0,0005	0,0022	0,0000							
Orta1	0,0072	0,0076	0,0072	0,0000						
Orta3	0,0070	0,0074	0,0070	0,0002	0,0000					
Orta4	0,0074	0,0078	0,0074	0,0006	0,0004	0,0000				
Doğu1	0,0070	0,0074	0,0070	0,0002	0,0000	0,0004	0,0000			
Doğu3	0,0075	0,0079	0,0075	0,0007	0,0005	0,0010	0,0005	0,000		
b) COI										
	Batı1	Batı3	Batı4	Orta2	Orta3	Orta4	Doğu1	Doğu2	Doğu4	Doğu5
Batı1	0,0000									
Batı3	0,0040	0,0000								
Batı4	0,0027	0,0000	0,0000							
Orta2	0,0011	0,0006	0,0025	0,0000						
Orta3	0,0043	0,0039	0,0055	0,0032	0,0000					
Orta4	0,0014	0,0009	0,0026	0,0003	0,0029	0,0000				
Doğu1	0,0014	0,0009	0,0026	0,0003	0,0029	0,0000	0,0000			
Doğu2	0,0014	0,0009	0,0026	0,0003	0,0029	0,0000	0,0000	0,0000		
Doğu4	0,0246	0,0241	0,0264	0,0248	0,0251	0,0251	0,0251	0,0251	0,0000	
Doğu5	0,0246	0,0241	0,0264	0,0248	0,0251	0,0251	0,0251	0,0251	0,0000	0,0000



Popülasyonlar arasında saptanan ikili genetik uzaklık değerleri ile coğrafik uzaklık arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir (nCBT için  $R^2 = 0,0118$ ,  $p = 0,020$ ; *COI* için  $R^2 = 0,219$ ,  $p = 0,020$ ) (Şekil 3a-b). Bu korelasyon özellikle *COI* veri seti için daha barizdir. Bu korelasyona ek olarak, popülasyonların coğrafik yayılış örüntüleri ile popülasyonlar arası varyasyon oranı arasında da doğrudan bir ilişki saptanmıştır (Tablo 4). Bu ilişki nCBT açısından Batı popülasyonları ile Orta ve Doğu popülasyonları arasında, *COI* açısından ise Doğu4 ve Doğu5 popülasyonları ile diğer kalan popülasyonlar (Batı, Orta, Doğu1 ve Doğu2) arasında gözlenmiştir.

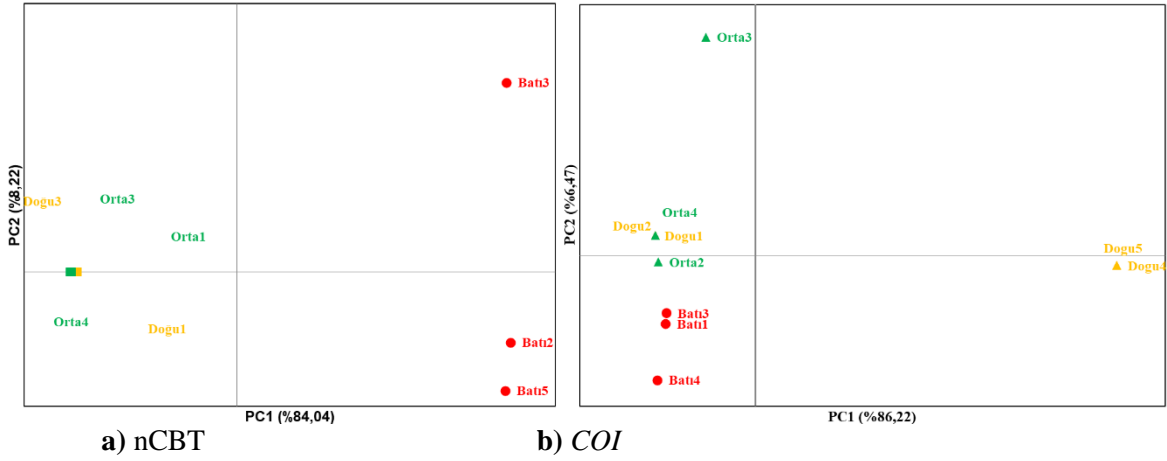


**Şekil 3.** a) nCBT b) *COI* gen veri setleri üzerinden Mantel testi (genetik uzaklık p-dist algoritması, coğrafik uzaklık ise km üzerinden hesaplanmıştır.)

**Tablo 4.** İki belirteç açısından SAMOVA sonuçları ( $\Phi$  istatistiklerinin anlamlılık düzeyleri 1000 rastgele permütasyon temelinde tahmin edilmiştir.  $p < 0,05$ )

<b>nCBT (Kodlama yapmayan gen bölgesi) Gruplandırma sayısı (K): 2</b>				
Varyasyonun Kaynağı	df	SS	% Varyasyon	p- değeri
Gruplar arasında ( $\Phi_{CT}$ )	1	64,764	87,61	0,0156 ± 0,0036
Grup içi popülasyonlar arasında ( $\Phi_{SC}$ )	6	6,843	5,69	0,0000 ± 0,0000
Popülasyonlar içinde ( $\Phi_{ST}$ )	28	7,865	6,70	0,0000 ± 0,0000
Toplam	35	79.472		
<b><i>COI</i> (Kodlama yapan gen bölgesi) Gruplandırma sayısı (K): 2</b>				
Varyasyonun Kaynağı	df	SS	% Varyasyon	p- değeri
Gruplar arasında ( $\Phi_{CT}$ )	1	148.101	93,99	0,0195 ± 0,0036
Grup içi popülasyonlar arasında ( $\Phi_{SC}$ )	8	21,024	4,71	0.0000 ± 0.0000
Popülasyonlar içinde ( $\Phi_{ST}$ )	35	5,897	1,30	0.0000 ± 0.0000
Toplam	44	175,022		

Temel koordinatlar analizleri (PCoA) sonucunda her iki gen bölgesi açısından da bir farklılaşma saptanmıştır. nCBT sonuçlarında üç ayrı kümelenme açığa çıkmıştır: Batı2 ve Batı5 popülasyonları, Batı3 popülasyonu ve Orta1, Orta3, Orta4, Doğu1 ve Doğu3 popülasyonları (Şekil 4a). *COI* gen bölgesi açısından analiz sonuçları değerlendirildiği zaman özellikle Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğerlerinden farklı bir kümelenme oluşturduğu gözlenmektedir (Şekil 4b). Orta3 popülasyonu ise diğer kalan Orta Doğu ve Batı popülasyonları ile birlikte kümelenmiştir (Şekil4b).

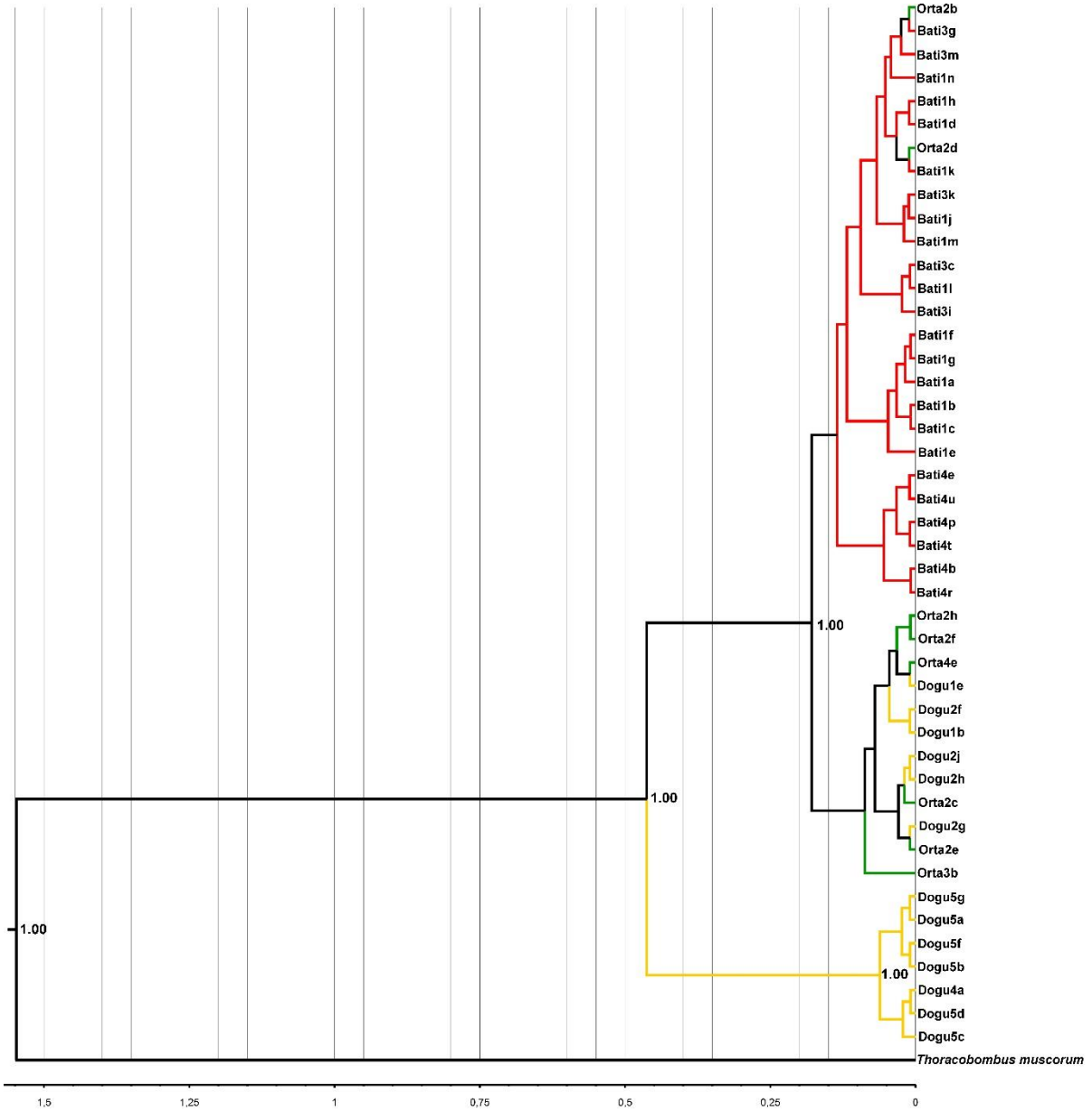


**Şekil 4.** İki belirteç için ikili genetik uzaklık (p) değerleri kullanılarak yapılan temel koordinatlar analizi (PCoA) renkleri popülasyonları temsil etmektedir [Batı popülasyonları (kırmızı), Orta popülasyonları (yeşil), Doğu popülasyonları (sarı)].

### 3.3. Filogeni ve Filocoğrafya

*COI* veri seti üzerinden gerçekleştirilen BEAST zaman ağacı bu DNA fragmanının saat benzeri bir evrim gösterdiğine işaret etmektedir (Şekil 5). Aynı zamanda tüm ana ayrımlarda yüksek destek değerleri saptanmıştır. Monofiletik bir ilişki sergileyen *B. lapidarius* türü içerisinde Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının temsil ettiği klad tüm diğerlerinden güçlü bir destek değeri (PP= 1.0) ile ayrılmış olup aynı zamanda kendi içerisinde de yüksek destek değerine sahip (PP= 1.0) iki ayrı soy hattı olarak farklılaşmış oldukları gözlenmektedir. Diğer kalan popülasyonlar arasında ise net bir farklılaşma gözlenmemiş olup popülasyonlar arası farklı haplotiplerin paylaşım durumlarına paralel olarak birlikte kümelendikleri gözlenmiştir. *B. lapidarius* popülasyonları arasındaki farklılaşmanın ise doğu-batı eksenli olduğu dikkat çekmektedir. Popülasyonlar arasında gözlenen ayrılma zamanları ise şu şekilde tahmin edilmiştir. Dış grup olarak seçilen *T. muscorum* türünün yaklaşık 1,55 myö (%95 güvenilirlik aralığı= 0,99 - 2,34 myö) ayrılmaktadır. *B. lapidarius* türü içerisinde ise Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarından oluşan soy-hattı yaklaşık olarak 0,46 myö (%95 güvenilirlik aralığı= 0,25 - 0,77 myö) tüm diğerlerinden ayrılarak farklılaşmıştır. Bu iki popülasyonun kendi aralarındaki ayrılma zamanları ise 60 bin yıl öncesine denk gelmektedir. Diğer taraftan kalan *B. lapidarius* popülasyonlarında gözlenen ana ayrılma dönemi ise yaklaşık olarak 0,18 myö (%95 güvenilirlik aralığı= 0,09 - 0,30 myö)'sine denk gelmektedir. Tüm popülasyon içi çeşitlenmeler ise son 30 bin yıl ile 10 bin yıl aralığında gerçekleştiği saptanmıştır.

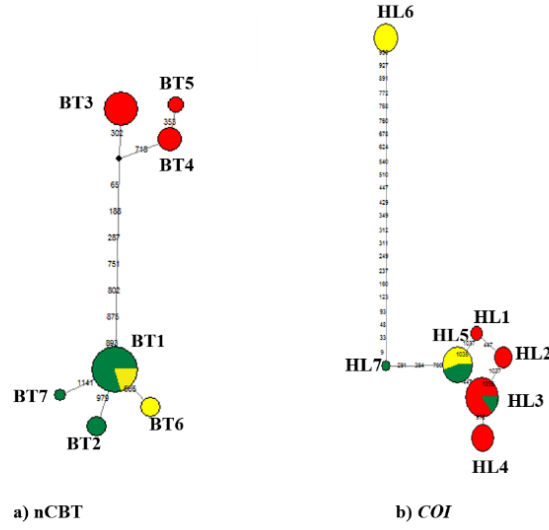




**Şekil 5.** COI veri setine dayalı BEAST zaman ağacı. Soy-hatlarının ayrılma zamanları GTR + G + I mutasyon modeli altında ilişkisiz üssel gevşek moleküler saat kullanılarak tahmin edilmiştir. Mutasyon oranı olarak her milyon yılda baz başına  $1.31E-2$  oranı baz alınmış [45] ve altbar milyon yıl üzerinden zamansal boyutunu göstermektedir. Destek değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir. Batı popülasyonları (kırmızı), Orta popülasyonları (yeşil), Doğu popülasyonları (sarı) renklendirilmiştir.

### 3.4. Şebeke Analizleri

Her iki gen bölgesine ait dizi verileri temel alınarak gerçekleştirilen soy hattı ilişkisi Şekil 6'da gösterilmiştir. Şebeke analizleri sonuçları diğer analizlere benzer bir yapılanma sergilemektedir. nCBT sonucunda Batı popülasyonları diğerlerinden ayrı bir yapılanma göstermekte iken (Şekil 6a), *COI* sonuçlarında ise Doğu4 ve Doğu5 popülasyonları tüm diğer popülasyonlardan ayrı bir soy hattı oluşturmaktadır (Şekil 6b).



Şekil 6. Her iki gen bölgesi için şebeke analizi [Batı popülasyonları (kırmızı), Orta popülasyonları (yeşil), Doğu popülasyonları (sarı)].

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. nCBT: Yalancı Gen Özellikleri

Doğrudan DNA, transpozon ya da viral elementleri içeren aktarım mekanizmaları aracılığıyla mitokondriden çekirdeğe göç yoluyla ortaya çıkmakta olan bu yalancı genler Nükleer mtDNA olarak isimlendirilmiştir (NUMT) [48- 50]. Numtlar, PZR tabanlı mitokondriyal araştırmalarda sıklıkla istenmeyen paraloglar olarak algılanır [51- 52]. Du Buy ve Riley [53] tarafından ilk keşfedildikten sonra, bitkiler, maya, nematodlar, böcekler ve memeliler ve kuşlar gibi omurgalılar da dahil olmak üzere birçok organizma grubunda bulunmuştur [54-56]. Özellikle yüksek organizasyonlu organizmaların genomlarında organellere ait DNA bölgelerinin transkripsiyona ya da translasyona uğramayan kopyalarına sıklıkla rastlanmaktadır [57]. Numtlar *Colletes* cinsi [58], Meliponini tribusu [59], bal arıları [60], yaban arısı [61] ve karıncalar [56] gibi birçok Hymenoptera türünde de belirlenmiştir. Bununla birlikte, numtları tanımlamak ve karşılaştırmak için çok fazla araştırma yapılmamıştır. MtDNA üzerinde odaklanan filogenetik çalışmalarda numtların kazara çoğaltılması, numtların ve ilgili mtDNA dizilerinin doğru bir şekilde belirlenmesi önemli bir olgu olmuştur [62]. Bu genlerinin oluşma mekanizmaları ve tarihsel süreçleri üzerine yapılan araştırmalar ökaryotik genomların evrimini anlamamıza büyük ölçüde katkı sağlamaktadır [57]. Bu durum taksonların evrimsel geçmişi ve filogenetik ilişkileri hakkında bilgi verir [52, 63- 64]. Bu çalışmada PZR, dizileme ve hizalama aşamaları sonucunda bir numt (ncBT) bölgesinin varlığı ilk kez *Bombus* cinsinde saptanmıştır.

### 4.2. *B. lapidarius* Anadolu Popülasyonlarının Genetik Yapılanması

Çalışma kapsamında her iki belirteç için dört tanesi özgün olmak üzere yedi haplotipinin saptanması, Anadolu popülasyonlarının yüksek düzeyde bir genetik çeşitliliğe sahip olduğuna işaret etmektedir. Aynı zamanda haplotip çeşitlilik indeksleri de bunu doğrular niteliktedir (Tablo 2). Gözlenen yüksek genetik çeşitlilik, türün yakın dönem evrimsel geçmişinde Anadolu'daki yayılışı açısından büyük bir efektif popülasyon büyüklüğüne erişmiş olduğuna işaret etmektedir. Bu tür dışında bazı diğer organizmalar üzerine yapılan çalışmalar da Anadolu popülasyonlarında uzun süreli bir biyocoğrafik izolasyonu önermektedir [11, 65- 67]. Popülasyonlarda genetik yapılanma ya çevrelere karşı sergiledikleri adaptif yanıtta ya da coğrafik izolasyon gibi popülasyonlarda gen akışını doğrudan etkileyen bir olgudan kaynaklanabilir. Bununla birlikte popülasyonlarda yapılanma hem süre giden hem de tarihsel süreçlerin etkileriyle de mümkün olabilir [1]. Genetik farklılaşma düzeyleri göz önüne alındığında özellikle Batı popülasyonları Orta ve Doğu popülasyonlarıyla yüksek oranlarda farklılık

sergilemesinin (Tablo 3a) yanı sıra, Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğer popülasyon gruplarından belirgin derecede ayrıldığını göstermektedir (Tablo 3b). Ek olarak Orta ile Doğu popülasyonları arasında (Tablo 3a) ve Batı ile Orta popülasyonları arasında (Tablo 3b) gözlenen düşük genetik farklılaşma bu popülasyonların görece benzer koşullara uyum sağlamak için pozitif seçim baskısı altında olabileceklerini önermektedir. Diğer taraftan popülasyonlar arasında genetik farklılaşma bir dereceye kadar coğrafik uzaklıktan kaynaklanmış olabilir. *B. lapidarius* popülasyonlarının yayılış örüntüleri açısından gen akışı ve genetik sürüklenme arasında bir denge olduğunu öneren sıfır hipotezini reddetmektedir. Popülasyonlar arasında genetik farklılaşma türün yayılış alanı boyunca coğrafik uzaklığın artmasıyla birlikte artış sergileme eğiliminde olduğu göz ardı edilemez (Şekil 3a-b). Ayrıca, popülasyonların coğrafik yayılış örüntüleri ile popülasyonlar arası varyasyon oranı arasında da doğrudan bir ilişki saptanmıştır (Tablo 4). Batı ile Orta ve Orta ile Doğu grupları arasında paylaşılan haplotiplerin belirlenmesi gen akışının olduğunu göstermektedir (Tablo 2). Orta2 (Tokat\_top) ve Orta1 (Tokat\_çam) popülasyonlarına ait bireylerin bu haplotiplerde paylaşıyor olması bir geçiş popülasyonu olduğunu söylemektedir. Bu popülasyonlar bölgesel düzeyde görece daha izole ve küçük popülasyonlar olup, bu yüzden sürüklenme ve/veya seçimden dolayı haplotip çeşitlikleri hemen hemen aynı orandadır (Tablo 2). Özellikle Doğu4 ve Doğu5 böyle izole popülasyonlarda rastgele genetik sürüklenmenin etkisi bir taraftan düşük genetik çeşitliliğe, diğer taraftan ise tüm diğer popülasyonlardan güçlü bir genetik farklılaşmaya yol açmaktadır [68]. Sonuçta türün yayılış örüntüsüne (küçük, izole ve alpin ya da subalpin bölgeler) paralel olarak, coğrafik uzaklık gen akış oranında bir kesintiye neden olur ve böylelikle popülasyonların farklı evrimsel süreçlere maruz kalmalarının desteklenmesi yönünde iş görür [10]. Genetik yapılanmanın yalnızca coğrafik uzaklıktan kaynaklı izolasyonla ilişkili olmadığını; aynı zamanda farklı yapılanma örüntülerine işaret ederek (Şekil 4-5-6), bu farklılaşmalarda çeşitli tarihsel olguların da önemli bir rol oynamış olabileceğini önermektedir. Bu farklılık oranında analiz yapılan örneklem sayısının azlığından kaynaklı bir sapma söz konusu olabileceği dikkate alınmalıdır. Batı grubunu oluşturan popülasyonlar Orta/ Doğu popülasyonlarından ayrılırken Orta ve Doğu grubu arasında Orta1 (Tokat\_çam) popülasyonları bir geçiş oluşturmaktadır (Şekil 4a, 5, 6a). Doğu grubu olarak Doğu4 (Ardahan\_çam) ve Doğu5 (Kars\_sar) farklılık gösterirken, Orta2 (Tokat\_top) popülasyonları diğer Doğu popülasyonları ile Orta grubu ve Batı grubu ile Orta grubu arasında bir geçiş sergilediği görülmektedir (Şekil 4b, 5, 6b). Doğu4 ve Doğu5 (HL6) popülasyonlarının diğer tüm popülasyonlardan yüksek genetik farklılaşması sonucu oluşmuştur (Şekil 5- 6b). Batı yönüne doğru yayılış sergilemektedir. Bu durum Anadolu'nun genetik çeşitliliği muhtemelen farklı etkilere sahip birkaç buzul dönemi sonucunda varyasyonun birikmesinden ve kararlı bir sığınak pozisyonundan kaynaklanmaktadır [8, 69- 71]. Bu çalışma sonucunda Pleistosen döneminde gerçekleştiği bilinen dört önemli buzul çağına diğer birçok türde olduğu gibi (6, 8, 10) bu türün çeşitlenmesinde önemli bir etki sergilediği gözlenmektedir. Özellikle Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğer kalan *B. lapidarius* popülasyonlarından ayrılma zamanları (~ 0,46 myö) Günz – Mindel buzulları arası döneme denk gelmektedir (Şekil 5). İkinci bir ana ayrılma zamanı ise kalan popülasyonlar arasında gözlenmiş olup Mindell - Riss buzul dönemleri arasındadır. Anadolu *B. lapidarius* popülasyonlarının popülasyon içi çeşitlenmeleri ise Würm buzul dönemi sonu ve Holosen süreci arasında olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 5). Bu dönemin birçok takson açısından oldukça sert iklimsel koşullarının artan sıcaklıklarla birlikte değişmeye başladığı ve günümüz koşullarını da oluşturan (4000 yö) kararlı bir iklimsel yapının açığa çıktığı döneme denk gelmesiyle örtüşmektedir. Kararlı bir sığınak pozisyonu ise Anadolu'nun uzun süreli ve karmaşık paleocoğrafik tarihinin yanı sıra yüksek habitat heterojenitesi, topografik ve iklimsel varyasyonlar sergilemesinden kaynaklanmakta ve tüm bu özellikler içerdiği mevcut biyoçeşitliliği açıklamada temel öneme sahip görünmektedir [7]. Ayrıca *B. lapidarius*'a ait bir alttürün Kafkasya'da yayılış gösteriyor olması Anadolu'daki alttürleri ile arasındaki ilişkiyi ve Anadolu'nun önemli bir sığınak olmasını görmemize yardımcı olmaktadır.

Sonuç olarak *B. lapidarius* popülasyonlarında karmaşık bir yapılanma örüntüsünün varlığı ve bu nedenle de türün Anadolu boyunca yayılışında genetik çeşitliliğin ve farklılaşmanın popülasyonların coğrafik pozisyonlarıyla da uyumlu olarak ortaya koyulmuştur. Bu durum türün evrimsel tarihini de göz önünde bulduğunda Anadolu'nun önemli bir sığınak alanı olması yönündedir. Bir taraftan popülasyonlarda

son bir ani genişleme örüntüsü ve popülasyon içi genetik çeşitlilik düzeylerinin ve özgün haplotip sayılarının yüksek olması, diğer taraftan komşu popülasyonlar olmasına rağmen aralarında gözlenen sınırlı gen akışı belirlenmiştir. Popülasyonlar arasında genetik farklılaşma düzeyleri göz önünde bulundurulduğunda Batı, Orta ve Doğu grupları arasında farklılaşma belirlenmiştir. Orta2 ve Doğu1 popülasyonları arasındaki düşük farklılık gen akışının sürdüğünü gösterirken Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğer popülasyonlarla yüksek oranlarda farklılaşma izole popülasyonlar olduğunun göstergesidir. Popülasyonlar arasında saptanan genetik farklılaşmanın coğrafik uzaklık ile anlamlı bir korelasyon sergilemesinin yanı sıra popülasyonlar arası varyasyon oranları coğrafik yayılış örüntüleri ile doğrudan ilişkisi belirlenmiştir. Özellikle Doğu4 ve Doğu5 popülasyonlarının diğerlerinden farklı bir kümelenme oluşturduğu, Orta grubu oluşturan popülasyonların ise bir kısmı Batı bir kısmı ise Doğu grubu ile birlikte yapılanma sergilemiştir. Bunun yanı sıra Doğu-Batı yönlü bir akrabalık ilişkisinin varlığı gözlenirken Doğu4 ve Doğu5 popülasyonları ayrı bir soy hattı oluşturmaktadır. Son türemiş grup ise genel olarak Batı popülasyonlarından oluşmaktadır. Günümüzde izole ve yüksek orman kenarı alanları tercih eden ve soğuk seven bir form olan *B. lapidarius* popülasyonları için uygun habitatların yok olmasına yol açan buzul süreçler ana farklılaşmaları da tetiklemiştir. Ancak bu sonuçlar daha fazla örneklem ve gen bölgesi kullanımıyla yeniden araştırılmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma CÜBAP tarafından yüksek lisans tez projesi (F-301) olarak desteklenmiştir. Örneklem için arazi çalışmasında yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Uygulamalı Biyoloji Bölümü'ne ve Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Sistemik Araştırma grubuna teşekkür ederiz. Aynı zamanda makalenin okunmasında ve iyileştirilmesinde önemli katkılar sunan anonim hakeme de teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Hewitt GM. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999; 68, 87–112.
- [2] Schmitt T. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 2007; 4, 1.
- [3] Ansell S, Stenøien HK, Grundmann M, et al. The importance of Anatolian mountains as the cradle of global diversity in *Arabis alpina*, a key arctic-alpine species. *Annals of Botany*, 2011; 108, 241–252.
- [4] Atkinson RJ, Rokas A, Stone GN. Longitudinal patterns in species richness and genetic diversity in European oaks and oak gallwasps. pp. 127–151, Eds. Weiss S. and Ferrand N., *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2007.
- [5] Çıplak B. Biogeography of Anatolia: the marker group Orthoptera. *Memorie della Società Entomologica Italiana*, 82, 2004; 357–372.
- [6] Çıplak B. The analogy between interglacial and global warming for the glacial relicts in a refugium, pp. 135–163. Ed. Fattorini S., *Insect Ecology and Conservation, Research Signpost*. 2008.
- [7] Çıplak B, Kaya S, Gündüz İ. Phylogeography of *Anterastes serbicus* species group (Orthoptera, Tettigoniidae): phylogroups correlate with mountain belts, but not with the morphospecies. *Journal of Orthoptera Research*, 2010; 19, 29–40.
- [8] Hewitt GM. Some genetic consequence of ice ages, and their role in diverging and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1996; 58, 247–276.

- [9] Kaya S, Çıplak B, Gündüz I. Estimating effects of global warming from past range changes for cold demanding refugial taxa: a case study on South-west Anatolian species *Poecilimon birandi*. *Biologia*, 67, 2012; 1152–1164.
- [10] Korkmaz EM, Lunt DH, Çıplak B, et al. The contribution of Anatolia to European phylogeography: the centre of origin of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Journal of Biogeography*, 2014; 41, 1793–1805.
- [11] Rokas A, Atkinson RJ, Webster LM. Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support an eastern origin for a circum-Mediterranean oak gallwasp *Andricus quercustozae*. *Molecular Ecology*, 2003; 12, 2153–2174.
- [12] Husemann M, Schmitt T, Zachos FE, et al. Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography*, 2014; 41, 81–94.
- [13] Yılmaz Y, Tüysüz O, Yiğitbaş E, et al. Geology and tectonic evolution of the Pontides, pp. 183–226, Ed. Robinson A.G., *Regional and Petroleum Geology of the Black Sea and Surrounding Region*. AAPG Memoir, Tulsa, 1997.
- [14] Şekercioğlu Ç.H, Anderson S, Akcay E, et al. Turkey's globally important biodiversity in crisis. *Biological Conservation*, 2011; 144, 2752–2769.
- [15] Ahmadzadeh F, Flecks M, Rödder D, et al. Multiple dispersal out of Anatolia: biogeography and evolution of oriental green lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2013; 110, 398–408
- [16] Ambarlı D, Zeydanlı US, Balkız Ö, et al. An overview of biodiversity and conservation status of steppes of the Anatolian biogeographical region. *Biodiversity and Conservation*, 2016; s10531-016-1172-0
- [17] Kryštufek B, Vohralik V, Obuch J. Endemism, vulnerability and conservation issues for small terrestrial mammals from the Balkans and Anatolia. *Folia Zoologica*, 2009; 58, 291–302.
- [18] Mutun S. Review of oak gall wasps phylogeographic patterns in Turkey suggests a main role of the Anatolian diagonal. *Turkish Journal of Forestry*, 2016; 17, 1–6.
- [19] Williams PH. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 1998; 67, 79–152.
- [20] Kim MJ, Yoon HJ, Im HH, et al. Mitochondrial DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2009; 12, 133–139.
- [21] Lecocq T, Gérard M, Michez D, et al. Conservation genetics of European bees: new insights from the continental scale. *Conservation Genetics*, 2017; 18, 585–596.
- [22] Lopez-Uribe MM, Soro A, Jha S. Conservation genetics of bees: advances in the application of molecular tools to guide bee pollinator conservation. *Conservation Genetics*, 2017; 18, 501–506.
- [23] Hines HM. Historical biogeography, divergence times and diversification patterns of Bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic Biology*, 2008; 57, 58–75.

- [24] Lecocq T, Dellicour S, Michez D, et al. Scent of a break-up: phylogeography and reproductive trait divergences in the red-tailed bumblebee (*Bombus lapidarius*). *BioMed Central Evolutionary Biology*, 2013; 13, 263.
- [25] Rasmont P, Flagothier D. Biogéographie et choix floraux des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Turquie, NATO 8, 1996.
- [26] Özbek H. Doğu Anadolu'nun bazı yörelerindeki Bombinae (Hymenoptera: Apoidea, Bombidae) türleri üzerindeki taksonomik ve bazı biyolojik çalışmalar, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 621, Atatürk Üniv. Basımevi, Erzurum, pp: 70., 1983.
- [27] Williams PH, Cameron SA, Hines HM, et al. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 2008; 39, 46–74.
- [28] Pedersen BV. European bumblebees (Hymenoptera: Bombini) – phylogenetic relationships inferred from DNA sequences. *Insect Systematics and Evolution*, 2002; 33, 1399-560.
- [29] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, et al. Department of Molecular Biotechnology, University of Washington, Seattle, Washington 98195-7730, USA., 1998.
- [30] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013; 30, 2725–2729.
- [31] Librado P, Rozas J. DnaSP v5.0, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009; 25, 1451–1452.
- [32] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- [33] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 1983; 105, 437–460.
- [34] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005; 1, 47–50.
- [35] Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 1989; 123, 597–601.
- [36] Fu Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1997; 147, 915–925.
- [37] Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 2002; 11, 2571–81.
- [38] Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 2000.
- [39] Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006; 6, 288–295.
- [40] Hutchison DW, Templeton AR. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 1999; 53, 1898–1914.

- [41] Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 2012; 29, 1969–1973.
- [42] Cameron SA, Williams PH. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003; 28, 552–563.
- [43] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 2008; 25, 1253–1256.
- [44] Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 2006; 4, 699–710.
- [45] Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 2010; 27, 1659–1672.
- [46] Rambaut A. FigTree v1.4.2. 2014. URL <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [accessed on 1 September 2016].
- [47] Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 1999; 16, 37–48.
- [48] D’Errico I, Gadaleta G, Saccone C. Pseudogenes in Metazoa: origin and features. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 2004; 3, 157–167.
- [49] Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, et al. Numt, a recent transfer and tandem amplifications of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, 1994; 39, 174–190.
- [50] Nugent JM, Palmer JD. RNA-mediated transfer of the gene COXII from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*, 1991; 66, 473–481.
- [51] Ermakov OA, Simonov E, Surin VL, et al. Implications of hybridization, NUMTs, and overlooked diversity for DNA barcoding of Eurasian ground squirrels. *PLoS One*, 2015; 10, e0117201.
- [52] Perez T, Rodríguez F, Fernández M, et al. Ancient mitochondrial pseudogenes reveal hybridization between distant lineages in the evolution of the *Rupicapra* genus. *Gene*, 2017; 628, 63–71.
- [53] Du Buy HG, Riley FL. Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA’s of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA’s of mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1967; 57, 790–797.
- [54] Bensasson D, Zhang D.X, Hartl D L, et al. Mitochondrial pseudogenes: evolution’s misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001; 16, 314–321.
- [55] Richly E, Leister D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 2004; 21, 1081–1084.
- [56] Martins JJr, Solomon SE, Mikheyev AS, et al. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*, 2007; 16, 777–784.



- [57] Gaziev AI, Shaikhaev GO. Nuclear mitochondrial pseudogenes. *Molecular Biology*, 2010; 44, 358–368.
- [58] Magnacca KN, Brown MJ. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian Hylaeus (Nesoprosopis) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology*, 2010; 10, 174.
- [59] Cristiano MP, Fernandes-Salomao TM, Yotoko KSC. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*, 2012; 43, 527.
- [60] Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution*, 2007; 24, 1340–1346.
- [61] Vijakainen L, Oliveira DC, Werren JH, et al. Transfers of mitochondrial DNA to the nuclear genome in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 2010; 19, 27–35.
- [62] Ruiz C, William De JM, J. Javier GQ, et al. Presence of nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in two related species of stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Meliponini). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2013; 51, 107–113.
- [63] Ko YJ, Yang EC, Lee JH, et al. Characterization of cetacean Numt and its application into cetacean phylogeny. *Genes & Genomics*, 2015; 37, 1061–1071.
- [64] Miraldo A, Hewitt GM, Dear PH, et al. Numts help to reconstruct the demographic history of the ocellated lizard (*Lacerta lepida*) in a secondary contact zone. *Molecular Ecology*, 2012; 21, 1005–1018.
- [65] Gündüz I, Jaarola M, Tez C. Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Sciuridae, Rodentia) in Turkey. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007; 43, 916–935.
- [66] Hampe A, Arroyo J, Jordano P. Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia. *Molecular Ecology*, 2003; 12, 3415–3426.
- [67] Naydenov K, Senneville S, Beaulieu J. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. *BMC Evolutionary Biology*, 2007; 7, 233–244.
- [68] Eckstein RL, O'neill RA, Danihelka J. Genetic structure among and within peripheral and central populations of three endangered floodplain violets. *Molecular Ecology*, 2006; 15, 2367–2379.
- [69] Dubey S, Cosson JF, Vohralík V. Molecular evidence of Pleistocene bidirectional faunal exchange between Europe and the Near East: the case of the bicoloured shrew (*Crocidura leucodon*, Soricidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 2007; 20, 1799–1808.
- [70] Hewitt GM. Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 2001; 10, 537–549.
- [71] Korkmaz EM, Sari M, Başibüyük H.H. Genetic Structure of *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae: Gomphocerinae) populations in Anatolia: a stable rear edge population. *Annals of the Entomological Society of America*, 2010; 103, 625–634.