



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI LIMNEBIUS (COLEOPTERA: HYDRAENIDAE) TÜR ÇEŞİTLİLİĞİNİN
MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1 GENİ HEDEFLERENEREK ORTAYA
ÇIKARILMASI**

Sibel CİLLİ ÇEKMECE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

EYLÜL-2019



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LIMNEBIUS (COLEOPTERA: HYDRAENIDAE) TÜR
ÇEŞİTLİLİĞİNİN MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1 GENİ
HEDEFLEREN ORTAYA ÇIKARILMASI**

Sibel CİLLİ ÇEKMECE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
EYLÜL-2019**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI LIMNEBIUS (COLEOPTERA: HYDRAENIDAE) TÜR
ÇEŞİTLİLİĞİNİN MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1 GENİ
HEDEFLEREN ORTAYA ÇIKARILMASI**

SİBEL ÇEKMECE CİLLİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet KASAPOĞLU danışmanlığında hazırlanan bu tez 10/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KASAPOĞLU
Başkan

Prof. Dr. Abdullah MART
Üye

Doç. Dr. Erol ATAY
Üye

Kod No:

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 330

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

10.09.2019

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yüksek Öğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Sibel CİLLİ ÇEKMECE

ÖZET

BAZI LIMNEBIUS (COLEOPTERA: HYDRAENIDAE) TÜR ÇEŞİTLİLİĞİNİN MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1 GENİ HEDEFLEREN ORTAYA ÇIKARILMASI

Bu çalışmada morfolojik özelliklerine bakılarak tanımlanan 9 su böceği türünün (*Limnebius*) Cytokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX) genini DNA dizilimleri moleküler çalışmalar sonucu elde edilmiştir.

İncelenen örnekler, farklı bitki örtüsüne sahip ve farklı yüksekliklerde bulunan göl, bataklık, su birikintileri, gölet, vb. sucul habitatlardan 2000- 2013 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları ile toplanmıştır. Örnekler tür teşhisi yapıldıktan sonra -20 °C’de soğutucuda petri kapları içerisinde saklanmıştır. Daha sonra COX 1 bölgesi evrensel primer kullanılarak PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA bölgelerinin baz dizin analizleri yapılmıştır. Bu filogenetik analizler 3 farklı algoritma; maximum parsimony, maximum likelihood, Neighbor-joining programıyla değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu Hydraenidlere ait alt türlerin parsimonik ağacı oluşturulmuştur.

Bu çalışmada morfolojik yöntemlerle yapılan tür teşhisleri ile moleküler tür teşhisi karşılaştırılmış ve sağlıklı bir teşhis yapılırken her iki yöntemin kullanıldığında daha sağlıklı bir sonuca götüreceği kanaatine varılmıştır.

2019, 36 sayfa

Anahtar kelimeler: Coleoptera, Hydraenidae, *Limnebius* Filogenetik Analiz, Hatay

ABSTRACT

BASED ON MITOCHONDRIAL COX SUBUNIT 1 GENE OF SOME LIMNEBIUS (COLEOPTERA: HYDRAENIDAE) IN HATAY PROVINCE

With this study, DNA sequences of Cytochrome C Oxydase Subunit I (COX I) gene were worked out by molecular proceedings for morphologically identified nine *Limnebius* species (Coleoptera: Hydraenidae).

These species were collected during field work carried out in 2000 and 2013 at aquatic localities with various altitudes and vegetation. Samples collected were first identified species to their morphological features prious to be placed on plates in the freezer at the -20 °C. Afterwords, in order to determine their COX I section, DNA isolation was rendered with appropriate methods.

PCR method was employed to increase the COX I section of the samples with the help of universal primers. Then basic sequence analysies were made for the increased with 3 different algorithms, namely maximum parsimony, maximum likelihood and Neighbor-joining programmes. Based on this assesment the parsimonic tree was to reveal the resemblance logic between species pertaining in *Limnebius* species.

In the light of the findings from this study, it was established that phylogenetic analysies for these nine *Limnebius* species, which was not studied with molecular data in our country, provided universally valid and more reliable information when compared with morphological data in identifying species.

2019, 36 Pages.

Key Words: Coleoptera, Hydraenidae, *Limnebius* Phylogenetic Analyses, Hatay

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Ahmet KASAPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana destek olan eşim Nebil ÇEKMECE, oğlum Bedir EMİR ve kızım Melike Zeynep'e teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	2
1.1. Coleopterler'in Genel Özellikleri	3
1.2. <i>Limnebius</i> Morfolojisi	4
1.3. DNA Barkotlama	5
1.3.1. Hayvanlarda DNA Barkotlama Çalışmaları	8
1.3.2. Neden COI Geni?	9
1.4. DNA Barkodlama iş Akışı	11
1.5. mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar	12
1.6. DNA Barkotlama ile Taksonomi Arasındaki ilişkisi	13
1.7. DNA Barkotlama ile Filogeni arasındaki ilişki	13
1.8. DNA Barkotlamanın Popülasyon Genetiği ile İlişkisi	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3. 1. DNA İzolasyonu	18
3. 2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR)	18
3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Celoptera filogeni diagramı.....	3
Şekil 1.2. Tür içi ve türler arası genetik uzaklıkların dağılım frekansları	9
Şekil 4.1. Maximum parsimony ağacı.....	21
Şekil 4.2. Neighbor-joining ağacı.....	21
Şekil 4.3. Maximum likelihood ağacı.....	21
Şekil 4.4. <i>Limnebius</i> türlerinin COX1 sekansları (500 baz çifti) ile erkek cinsiyet organlarının şekillerine göre soyağacı.....	22



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Morfolojik ve Filogenetik Analiz Tür Tahminleri.....	20
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- L1* : *Limnebius perparvulus*
L2 : *Limnebius corybus*
L3 : *Limnebius myrmidon*
L4 : *Limnebius stagnalis*
L5 : *Limnebius claviger*
L6 : *Limnebius atomus*
L7 : *Limnebius paraniristanus*
L8 : *Limnebius corfidius*
L9 : *Limnebius ferroi*

1. GİRİŞ

Sınıflandırma çalışmaları Aristo ile başlamış, 18. yüzyılda da büyük bir ivme kazanmıştır. Türler arasında çok az özellikten yararlanılarak birbirinden farklı ve belirgin gruplara ayıran yapay sınıflandırma ve türlerin doğal benzerlikleri ile bu benzerliklerin sürekliliklerine göre gruplandırılan doğal sınıflandırma olarak ikiye ayrılır.

Linnaeus'un geliştirdiği sınıflandırma sistemi 200 yıldır kullanılmaktadır. (Karaçay, 2013).

G. Buffon (1707-1788) yapay sınıflandırmaya karşı çıkmıştır. Buffon, yapay sınıflandırmaların metafizik bir hata olduğunu savunuyordu. Buffon, bugün farklı görülen türlerin, geçmişte ortak atalardan türemiş olabileceğini savundu. Lamarck (1744-1829) ise omurgalılar ve omurgasızlar ayrımını getirdi. Türlerin değiştiğini göstermek için seçerek yetiştirilen örnekleri esas aldı. Lamarck'a göre, canlılar çevrede meydana gelen değişimlerden etkilenir ve çevreye adapte olarak değişirler. (Topdemir, 2014).

Moleküler tekniklerin gelişmesi sonucu DNA dizi analizlerinin yapılabilmesiyle daha net veriler ortaya çıkarmış ve morfolojik teşhislerde yapılan hatalar azalmıştır. DNA tıpkı bir barkod gibi marketlerde nasıl her barkot belli bir ürünü temsil ediyorsa canlılar için de DNA aynı şeyi yapıyordu. Onun ne olduğunu nasıl özelliklere sahip olduğunu ifade ediyor. Moleküler sistematığın temelini oluşturan bu yapı karşılaştırmalı anatomi ve diğer morfolojik özelliklere göre yapılan teşhislerle çözülemeyen filogenetik ilişkilerin çözümünde büyük yardımı olmuştur. Limnebius yaptığımız çalışmada tür ayrımında erkek cinsiyet organı (aedeagus) kullanılmıştır. Çalışılan 9 türde toplanan örneklerden erkekler ayrılmış daha sonra şekline bakılarak türlerin teşhisi yapılmıştır. Ancak bu küçük farklılıklar tür teşhisi için yeterli olmayabilir.

Canlı DNA'sı evrimsel süreçte birçok değişime uğramıştır ve bu yüzden filogenetik analizlerde daha oransal olarak daha yavaş değişim gösteren ribozomal RNA baz alınarak analiz yapılırken, tür içi ayrımlarda hayvanlarda mitokondriyal DNA'dan yararlanılmaktadır.

"Mt. Cit. C oksidaz (COI veya COX1) gen dizisi hayvansal organizmalar için DNA barkodu olarak kullanılmaktadır (Ertuğrul ve Koç 2012).

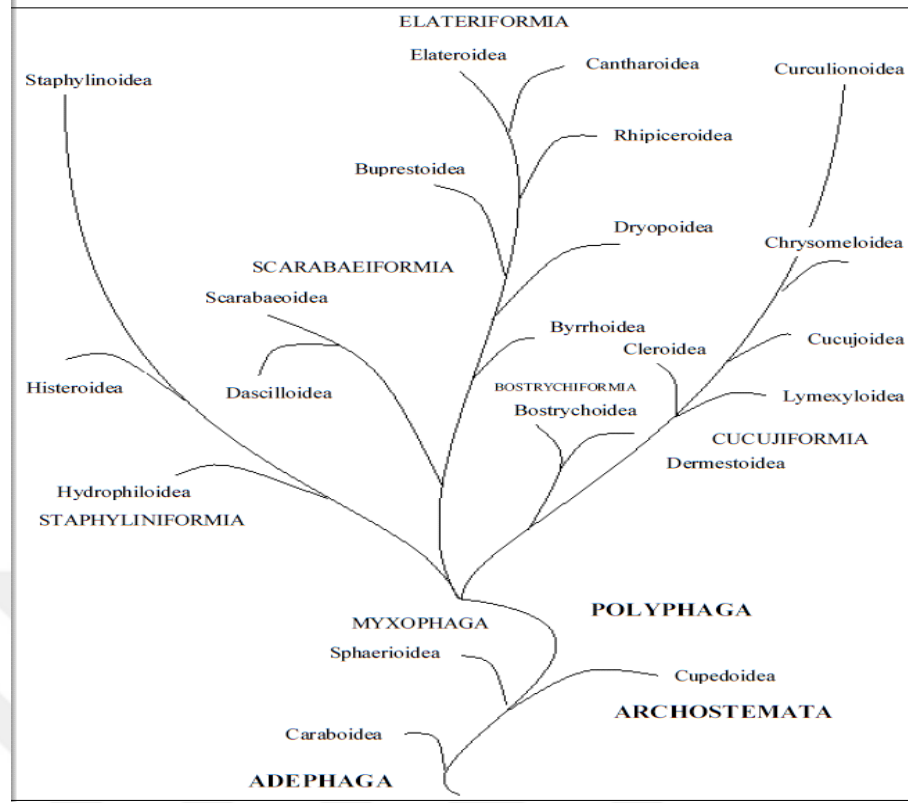
Bu çalışmada Hatay ve Doğu Anadolu bölgesinden toplanan *Limnebius* cinsine ait 9 türün mitokondriyal COX 1 geni ile tür tanımlanması yapılmıştır. Hedef DNA

molekülleri PCR yardımıyla çoğaltıldıktan sonra Sanger yöntemi ile dizilenmiştir. Diziler Neighbor-joining, maximum likelihood, maximum parsimony olarak adlandırılan 3 farklı algoritma ile filogenetik analizi yapılmıştır.

Bu çalışmadaki amacımız *Limnebius* çeşitliğini moleküler düzeyde araştırıp bulunan türleri DNA sekansları ve bu sekanslardan oluşturulan soy ağacının Türkiye'nin ekolojik çeşitliliğinin yanı sıra Dünya genelinde yapılan birçok ekolojik çalışmaya da kaynak oluşturmaktır. Bunun yanı sıra esas amacımız yapılan morfolojik analizlerle moleküler analizler arasındaki hata ve doğruluk oranlarını bularak hangi yöntemin daha verimli ve doğru sonuçlara götürdüğünü bulmaktır. Elde edilen veriler, moleküler analiz yöntemini daha iyi anlamamızı ve çıkabilecek hata ve riskleri kavramamıza yardımcı olacaktır.

1.1. Coleopterler'in Genel Özellikleri

Böcekler, en fazla türe sahip olduklarından onların yaşamın ve evrimin anlaşılmasında çok önemlidirler. En eski fosilleri 400 milyon yıllıktır ve Amerika'da Karbonifer katmanında ve İskoçya'nın Orta Devon katmanlarında rastlanmıştır. Coleoptera, eşsiz tür zenginliğine sahiptir. 350.000'in üzerinde tanımı yapılmış türe sahiptir. Coleoptera, Myxophaga Archostemata, Polyphaga ve Adephaga olmak üzere 4 alt takımdan oluşmaktadır. Polyphaga ve Adephaga alttakımları bu böceklerin %99'unu kapsamaktadır (Gülperçin, 2013).



Şekil 1.1. Coleoptera filogeni diyagramı (Gülperçin, 2013).

Coleopterler, ön kanatlarının sertleşerek elitra'ya dönüşmesiyle diğer böceklerden ayrılırlar. Elitra, abdomenin üst yüzeyini örter, zarsı alt kanatları korur. Coleoptera takımları Permien ve Erken Trias Dönemde birbirlerinden ayrılmaktadır (Gülperçin, 2013).

1.2. *Limnebius* Morfolojisi

Boyları 1 ila 2,5 mm arasındadır. Vücut şekilleri uzunca ovaldır. Genellikle koyu kahverengi ve siyahtır. Tatlı suların durgun yerlerinde çamur, kum ve taşlar arasında yaşarlar. Genellikle küçük omurgasızlarla ve döküntüyle beslenirler. Tür ayrımında genellikle erkek cinsiyet organı (aedeagus) kullanılır. Yaklaşık 210-760 mikron boyundaki aedeagus, stereomikroskop altında iğne yardımıyla çıkarılır, ışık mikroskopunda şekli çizilerek tür teşhisinde kullanılır (Kasapoğlu, 2002).

1.3. DNA Barkotlama

DNA barkotlama terimi, son yıllarda adından sıkça bahsettirmeye başlayan bir ifadedir. Bu yöntem temelde canlının tür teşhisi için uygun donanım ve kısıtlıya sahip nükleer materyalinin dizi analizi sonucu doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaya dayalı bir yöntemdir. “Hebert ve ark. (2003) tarafından kullanılan bu kavram daha sonra akademik camianın ilgisini çekmiştir (Ertuğrul ve Koç, 2012).

Proje, Paul Hebert’in alışveriş yaparken aklına gelir. Market çalışanlarının, ambalajlar üzerindeki barkotları okutarak ürünün ne olduğunu ve sayısını görmesine benzetir. Hebert, bu yöntemin biyolojik sistemlerde de kullanılabileceğini düşünür. Bunun uygulanabilmesi için türleri birbirinden ayırabilecek DNA dizilimine ihtiyaç vardı. Nükleotid dizilimi türden türe fark eden bir gen olmalıydı. Eğer DNA’nın nükleotid dizilimi barkod gibi kullanılabılırsa bütün türleri birbirinden ayırma imkânı olurdu (Karaçay, 2013).

Ancak bu yöntem tek bir gen bölgesi kullanılarak yapılmalı ve tüm hayvanların tür teşhisinde işe yaramalıydı. Gen haritası çıkarılarak tür teşhis edilebilir ancak bu maliyeti yüksek bir yöntem olurdu. Bu yüzden canlının tüm genomu yerine bir parçasında aynı tür teşhisi yapıp yapılamayacağına bakıldı. “Bir genin DNA barkodu olarak kullanılabilmesi için şu özelliklerinin olması gerekir:

1. Tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyona,
2. PCR işlemleri sırasında sorun oluşturmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması,
3. Canlılar için uygun ortak primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması (Keskin ve Atar, 2013).

“DNA barkod kullanımı ilk yayını ile (2003’te görülen ilk yayınlı birlikte) kısa sürede birçok araştırmacı raporlarında bu tekniğin sağlamlığını bildirdi. Mt.sit C oksidaz alt ünite I geninin kısa bir dizini (~600 bp) kullanımı ile, tür seviyesine kadar kimlik başarı oranı kuşlar dahil olmak üzere birçok organizmada %98-100 arasında bildirilmektedir. Bu barkodun kullanımıyla birkaç tür daha önce geleneksel taksonomik yollarla analiz edildiğinden tek bir tür olarak düşünölmekteydi. Bu heyecan verici gelişmelerden sonra türlerin tespiti konveksiyonel taksonomi uzmanları olmadan bile tespiti edilebileceği söylentilerini körükledi. Türlerle hızlı ve doğru kimlik sağlamanın haricinde, bu teknoloji farklı taksonlar arasındaki filogeneik bağlantıları

ortaya çıkarmayı vaat ediyor (Aravind et al, 2007). “DNA barkodlama taksonomi, adli bilimler, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik, biyoteknoloji ve tür teşhisi gibi birçok alanda kullanılabilen bir uygulamadır (Keskin ve Atar, 2013).

Açıkçası, bu DNA barkotlama ile mevcut taksonomik araçları tamamlayacak ve özel gruplar için sağlam bir kimlik planı geliştirilmesi amacı taksonomi için avantaj olacaktır. Böyle bir süreç, zaten tanımlanmış taksonomik grubun inceliklerine yararlı açılımlar sağlayabilir. Dahası, DNA barkod bilgileri de türlerin taksonomik konumuna ilişkin ve taksonomik çıkmazları gidermek yeni hipotezlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Sonuç olarak, DNA barkotlama tekniğin faydaları ve göreceli maliyetleri tartışılmaya devam ederken bu araç, etkili bir geleneksel taksonomik çalışmaları tamamlayıcı olarak ve önemli takson için fikri mülkiyet hakları (FMH) güvencesi için kullanılabilirliği olduğu açıktır. Bu hem ülke beceri ve altyapısının gelişmesi için hem de milli mirasın üstlendiği barkodlarımızın korunması ve ticareti için önemli olacaktır (Aravind et al, 2007).

Tüm bu çalışmalar yapılırken Paul Hebert’in hayalindeki barkod okumayı gerçekleştirmek için; tüm bu bilgilerine depolanması, gerektiğinde ulaşılabilmesi ve yeni verilerin yüklenebilmesi için bir internet tabanlı veri ağına ihtiyaç vardı. “DNA barkotlama teknolojisi kullanılarak, araştırmacılar Dünya’nın biyolojik çeşitliliğini hızlı ve doğru değerlendirmek için Dünya’daki tüm türlerin DNA’larından standart kısa bir parçayla bilimsel bir topluluk sağlayacak bir kütüphane kurmak istiyoruz.” (Stoeckle and Hebert, 2008) 2008’de Mark Stoeckle ve Paul Hebert’in Bilimsel Amerikalı (Scientific American) dergisinde çıkan makalelerindeki bu çağrı bilimsel toplulukların, devlet kurumlarının ve kamuoyunun dikkatini çekti.” Yayına destek DNA barkodlama araştırmalarına büyük bir destek sağladı ve 50 ülkede 200 üyesi ile Yaşam Barkod Konsorsiyumu kurmak için kullanılan hibe 100 milyon doları bulmuştur. Kanada ulusal araştırma ağı, DNA barkod edinim için barkod kayıtlarını toplama, basitleştirme ve barkod kayıtlarının kütatörlüğü ile analiz için gerekli bileşim platformu geliştirmeye yöneldiler” (Vernooy et al., 2010).

“Konsorsiyum henüz gelişmekte olanlar da dahil olmak üzere, gezegendeki tüm türler için DNA barkod geliştirmekte iddialı bir programı vardı. CBOL biyoçeşitlilik konusunda temel araştırma gıda yasaları, karantina ve bitki sağlığı yasaları ve yaban hayatının korunması uygulanması için, bu tekniğin birçok uygulamayı öngörmektedir.

CBOL bu teknikte gıda yasalarını uygulama da biyoçeşitlilik temel araştırmalarından, karantina ve bitki yasaları sağlığı ve yaban hayatın korunması gibi birçok uygulamayı öngörmekteydi” (Aravind, 2007).

“İkinci çaba BOLD’un tasarlanmasına yol açmıştır, Yaşam Veri Sistemleri Barkod (<http://www.boldsystems.org>) şimdi 5.000’den fazla kayıtlı kullanıcısı, yaklaşık 100.000 tür ve 850.000’den fazla tür numuneleri var “(Vernooy et al., 2010).

CBOL’un kurumundan bu yana birbirini destekleyen birçok veri ağı kurulmuş (örneğin ; iBOL, CCDB, GenBank ,EOL ve GBIF gibi.) ve tüm bu web tabanlı ağlardan en sık kullanılanı ve tüm bu veri tabanlarını şirketlerinin ortaklığıyla oluşturulmuş kurum ise Hayat Bilgi Sistem barkodu The Barcode of Life Data System (BOLD) kurulmuştur.

“Hayat Bilgi Sistemi Barkod (BOLD)- www.barcodinglife.org- örnek toplamadan barkodu kütüphanede onaylamaya kadar olan analitik yolunun tüm aşamalarını destekleyen birleşik bir biyoinformatik platform sağlar” (Ratnasingham and Habert, 2007). Bold, Mayıs 2004 ten başlayarak günümüze kadar gelen çalışmaları sonucunda 337.538 tane hayvanlar için barkod kümesi (BINs), 3.528.325 tane sekans, 3.102.635 barkod sekansı toplamış bunların 145,758’i hayvan, 53.435’i bitki ve 15.435’i fungus ve diğer canlılardır.

Vernooy ve arkadaşları Ekim 2010’da yayınladıkları bir makalede bahsettikleri bu projeyi uluslararası boyuta taşımak istiyorlardı. “Ekim 2010 Uluslararası Biyoçeşitlilik Yılı olarak; bu küresel çabaları koordine etmek, araştırmacılar ve biyoçeşitlilik korumak için örgütlerin bir ittifak oluşturarak Uluslararası Yaşam Projesi Barkod ‘unu (<http://www.ibolproject.org>; iBOL) başlatmayı planlıyoruz. Proje potansiyeli, sosyal, kültürel ve ekonomik, etkileri doğrudan ve dolaylı gelişmekte olan ülkeler üzerinde özel bir odaklanma ile DNA barkodlama araştırmalarını genişletmek ve güçlendirmek için 26 ülkeyi bir araya getirecektir. IBOL faaliyetlerinin ilk beş yıl içinde Dünya’nın türlerin 500 bin temsil eden 5 milyon örnek den DNA barkod almak için gelişmekte olan ülkelerdeki araştırmacılar ve yerel topluluklar ile iş birliği yaparak bu durumu düzenlemeyi amaçlamaktadır. Çalışma özellikler İBOL tarafından taksonomik gruplar üzerinde durulacaktı çünkü onlar ekosistemin anahtarı (örneğin; pollinators (tozlaştırıcılar), zararlılar (örneğin; pestist (böcek zararlıları), hasatları (ormanlar ve balıklar gibi) veya onlar koruma programlarının önemli hedefleridir (örneğin; memeliler, sürüngenler)” (Vernooy et al., 2010).

“iBOL Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (CBD) üç ana hedefi barındırır: Biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilir kullanımı ve genetik kaynakların kullanımdan kaynaklanan faydaların adil ve eşit paylaşımı” (Vernooy et al., 2010).

DNA barkotlama biyoçeşitliliğin evrensel standartlarda kayıt alınması sadece taksonomik açıdan önemli değildir. Aynı zamanda gıda ve ilaç sanayisinden, bulundukları çevrenin yaşam kalitesine kadar bize geniş bir bilgi ağı sağlayabilir. “Komüniteler, bir ekosistemin “hafızası” olarak da değerlendirilir. Çünkü çevresel faktörler, ölçüm yapılan andaki durumu belirtir, geçmiş dönemlerdeki su kalitesi hakkında bilgi sağlamaz” (Kazancı, 2008). Ancak geçmişten günümüze yapılan bu DNA barkod çalışmalarına bakılarak, araştırılan bölgedeki tür çeşitliliğinin durumu bize bölgenin kalitesi yani ekosistem koşulları hakkında gerekli bilgiyi, varsa sorunu gösterebilir. Çünkü canlının varlığı ve komünite yapıları habitatın kalitesini yansıtır. DNA barkod çalışmalarıyla belki bir ömür sürecek bir çalışma kısa bir sürede tamamlanıp alınması gereken önlemler korunması gereken türler tespit edilebilir.

1.3.1. Hayvanlarda DNA Barkotlama Çalışmaları

Ökaryotik canlıların sahip oldukları toplam genetik materyal, nükleus içindeki genomik DNA'ya ilave olarak mitokondri (mtDNA) ve kloroplastta bulunan (cpDNA) DNA moleküllerinden oluşmaktadır. Hayvan hücrelerinde sadece mitokondriyal DNA bulunurken, bitki hücrelerinde hem mitokondriyal DNA hem de kloroplast DNA'sı sitoplazmik genom olarak bilinmektedir. Kloroplast ve mitokondri DNA'sı, sitoplazmik kalıtım materyalleri olarak da bilinir. Mitokondri ve kloroplast anaya aittir ve yumurta vasıtasıyla nesiller boyunca aktarılır. Mitokondri, hücre bölünürken, çoğalır. Mitokondri çift zarlıdır, kendine özgü DNA'sı (mtDNA) ve ribozomları ile, çeşitli enzimleri sentezleyebilir ve adenosin trifosfat (ATP) sentezler. Hayvanlarda mtDNA, oksijenli solunumla ilgili genleri taşır (Özdil, 2007).

Mitokondri yarı otonom olarak, Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan ve kendi kendine çoğalabilen bir organeldir. Çapı 1-2 µm olup, insanlarda 16 569 baz çiftine sahip çembersel mitokondriyal DNA (mtDNA) kopyaları bulunmaktadır. Ortalama olarak, bir ökaryotik hücre 100- 10000 mitokondri kopyası içerir” (Passarge, 2006). Mitokondri eşeyli üreyen canlılarda genel olarak sadece anneden aktarılan bir DNA

olduğu için ve evrim sürecinde çok fazla değişmeyip sadece türden türe küçük farklılıklar içeren bir nükleik materyaldir. Bu özelliği de Hebert'in DNA barkodlama için evrensel bir kod olma niteliklerinde aradığı bir özelliktir. mtDNA'nın evrim süresinde çok fazla kombinasyonlarda bulunmamasının nedeni ise, çift zincirli, halkasal yapıda ve tek bir molekülden olmasıydı. Çünkü bu yapı hücre bölünmesi esnasında çekirdek DNA'sında olduğu gibi parça değişiminin gerçekleşmesini engellemekteydi. Mutasyon oranı düşük olduğu için, mtDNA'da genetik varyasyonun kaynağı şu şekilde özetlenebilir.

- a) nükleotid eklenmesi
- b) nükleotid kaybedilmesi
- c) belirli gen bölgelerinde DNA'nın farklı uzunluklarda olması
- d) nükleotidlerin yer değiştirmesi
- e) herhangi bir lokustaki nükleotid dizilimlerindeki çeşitli değişimler (Özdil, 2007).

İşte bu değişimler türler arası farklılıkları sağlamakta ve DNA barkodlama için bize türler arası gerekli ayrımı yapabilme yetisi vermektedir. "Pek çok çalışmada, *COI* geninin, 655 baz çiftlik bölümü kullanılarak birçok karmaşık gruplarda %98-100 oranlarında tanımlama yapılmıştır (Keskin ve Atar, 2013).

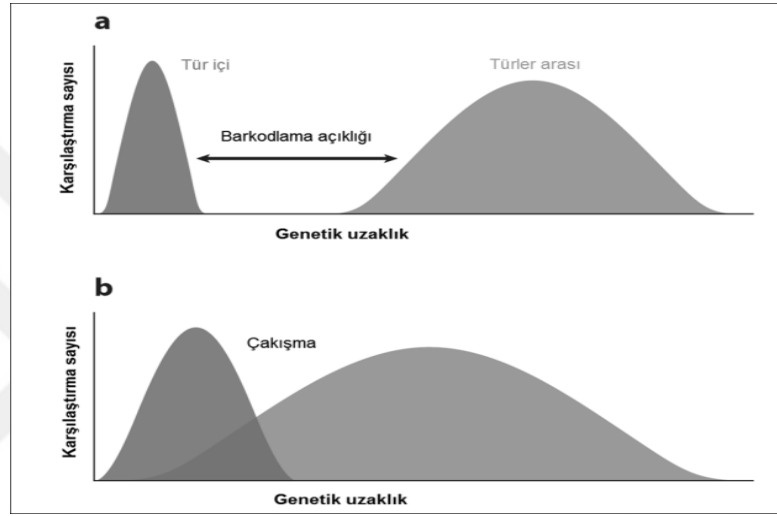
1.3.2. Neden COI Geni?

COI geninin kullanışlılığı, birçok omurgasız ve omurgalı grubu için kabul edilmiştir. Barkotlama, hayvansal hücre hatlarının belirlenmesinde de kullanılabilir ve veri bankasındaki materyallerin belirlenmesinde önerilen bir uygulamadır. Ayrıca, COI geni, kırmızı makro alglerin, protistlerin ve bazı fungusların teşhisinde de kullanılabilir. (Keskin ve Atar, 2013).

Günümüzde metazoalar için barkot, COI geninin 5' ucundan 652-658 baz çiftlik DNA bölgesidir. Geçmişte yapılan birçok taksonomik analizde, *16S rRNA* ve *12S rRNA* dizileri, yüksek insersiyon (araya nükleotid girmesi) ve delesyon (nükleotid kaybı) frekansı nedeniyle zorluklara sebep olmuştur. COI geninin diğer mitokondriyal genlerden üstünlüğü, farklı taksonomik seviyelerde kullanılabilir olması ve metazoa türleri için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesidir.

COI geninde bulunan kodonların III. pozisyonundaki nükleotidleri, yüksek oranda inversiyon göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla 3 kat evrim hızına sahiptirler. Diğer önemli nokta ise *COI* geninde gerçekleşen evrimin, tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek hızda gerçekleşmesidir.

COI'ın barkod olarak kullanılmasındaki neden, tür içi belirgin ayrım gücü ve tür içi ile türler arasındaki uzaklığın çakışmadığı tipik varyasyon modelidir. (Şekil. 1.2) (Keskin ve Atar, 2013).



Şekil 1.2. Tür içi ve türler arası genetik uzaklıkların dağılım frekansları. a): tür içi varyasyon ve türler arası varyasyonun ayrı dağılımından kaynaklanan barkotlama açıklığı, (b) tür içi ve türler arası varyasyonun çakışan dağılımı sonucu barkotlama açıklığının bulunmaması (Keskin ve Atar, 2013).

Bunlara rağmen *COI* barkod olarak kullanılmadığı canlılar da mevcuttur. Porifera, Ctenophora ve Anthozoa gibi gruplarda mitokondriyal DNA'nın evrimleşme hızı diğer metazodan 10-20 kat daha az olduğu ifade edilmektedir. (Keskin ve Atar, 2013).

Mitokondri DNA'sındaki değişimler eklemeli olarak korunmakta ve nesilden nesile aktarılmaktadır. Ancak heteroplazmik yapının söz konusu olduğu midye (*Mytilus*) ve beyaz mersin balığı (*Acipenser transmontanus*)'nın kas dokusunda, meyve sinekleri (*Drosophila*) ve bazı hibrit fare hatları ile izogamik funguslarda tam olarak ortaya konulamamakta ve sitoplazmada bulunan farklı kaynaklardan gelen mtDNA'lar arasında parça değişimlerinin olduğunu bildirilmektedir. Heteroplazmi, bir hücrede birden fazla kökene ait farklı mtDNA'nın birlikte bulunması olarak tanımlanır. Bu hücrelere sahip organizmalar da heteroplazmik organizmalar olarak adlandırılır (Özdil, 2007).

Mt. Sit. C oksidaz gen dizisi, hayvanlar için DNA barkodu olarak kullanılmaktadır (Hebert *et al.* 2003). Ancak bitkiler için çok uygun değildir. Bunun sebebi düşük nükleotid değişim oranına sahip olmasıdır. Bitki barkot kaynağı olarak kloroplast (cpDNA) ve çekirdek genomu (nrDNA) kullanılır. (Filiz ve Koç, 2012) CBOL ve BOLD, çekirdek genomunda bulunan ITS dizisinde en uygun DNA barkodu olduğuna karar verilmiştir (Filiz ve Koç, 2012).

1.4. DNA Barkodlama iş Akışı

Barkotlama, belli örneklerin DNA'larının dizilenmesi ve diğer bilgiler ile bir araya getirilerek kataloglanmasına dayanmaktadır. Nükleotid dizilerinin hizalanması ile verilerinin analiz edilir. Elde edilen nükleotid dizileri, teşhis edilmiş ve veri tabanına yüklenmiş barkotlar ile karşılaştırılır. Diziler, barkotlardan biri ile eşleşirse tür tanımlanmış olur. Eşleşme olmadığı durumda, benzerlik oranlarına göre, türlere ilişkin yeni bir barkot kaydı olarak veya muhtemel yeni tür olarak değerlendirilir. Diziler, kontrol için kodon analizinden geçirilir ve herhangi bir insersiyon, delesyon veya bitiş kodonu olup olmadığı tespit edilir. Daha sonra Kimura 2-parameter (K2P) modeline göre genetik uzaklık matrisi oluşturulur ve karşılaştırılan diğer türler ile ilişkisi neighbor-joining yöntemiyle soy ağaçları ile gösterilerek tür içi ve türler arası sonuçları değerlendirilir (Keskin ve Atar, 2013).

Barkotlama ile tür teşhisi, türün genomundan elde edilmiş DNA barkodunun kullanılmasıyla yapılır. Bu barkot dizileri, veri tabanındaki barkotlar ile karşılaştırılır. Bunlardan biri ile eşleşirse tür tanımlanmış olur. Eşleşme olmazsa, benzerlik oranlarına göre yeni bir barkod kaydı veya muhtemel yeni bir tür olarak nitelendirilir. Barkotlama çalışmaları genel olarak örneklerin elde edilmesi, DNA barkot dizilerinin elde edilmesi ve kataloglanması şeklinde yapılmaktadır. Bunların analizi ise nükleotid dizilerinin hizalanması ile başlar. Hizalanan diziler, kontrol amacı ile kodon analizinden geçirilir ve herhangi bir insersiyon, delesyon, veya bitiş kodonu olup olmadığı ile tespit edilir. Ardından Kimura 2-parameter (K2P) modeline göre genetik uzaklık matrisi oluşturulur ve karşılaştırılan diğer türler ile ilişkisi neighbor-joining yöntemine göre çizilen ağaçlar ile gösterilerek tür içi ve türler arası sonuçları değerlendirilir (Keskin ve Atar, 2013).

1.5. mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar

mtDNA analizlerinde karşılaşılan zorlukların başında heteroplazmi gelemektedir. Mitokondriyal DNA, anaya ait bir kalıttır. Fakat nükleer psödogenlerin farklı çoğalmaları, somatik mutasyonlar, atasal aktarımlar ve tür çaprazlamaları heteroplazmiye neden olmaktadır (Keskin ve Atar, 2013). Birden fazla mtDNA'nın bulunması mtDNA dizi analizi ile DNA barkotlama ile soyağacı oluşturmayı imkânsız hale getirmektedir. Çünkü diz analizi yapılan mitokondrinin paternal mı maternal mı olduğu yoksa mutasyon geçirmiş hücrelerden biri mi olduğunu bilemeyiz.

İkinci olarak da psödogenlerden (yalancı genler; pseudogenes) bahsedebiliriz. “Bu genler, genlerin duplike kopyalarının evrimsel artığıdır ve onları işlevsiz kılan mutasyonlara uğramışlardır. Bazı durumlarda, bu tür genlerin çok sayıda kopyalarına rastlanır” (Klug., 2009). “Psödogenler, evrensel primerler kullanıldığında mtDNA ile birlikte amplifiye olabilmektedir. Bu durum, nükleusta meydana gelen nükleotid yerdeğiştirmelerinin mitokondriyal genomdakiler kadar hızlı olmaması nedeniyle DNA barkotlama açısından sorun oluşturmaktadır. Fakat son çalışmalarda barkotlama sonuçlarının psödogenler nedeniyle yanlış değerlendirilmesini önlemiştir. (Keskin ve Atar, 2013).

Bilindiği gibi DNA ekstraksiyonunu elde etmek zordur özellikle arşivlenmiş örneklerden. Folmalin içine konan örnekler gerek daha sonra araştırılmak için gerekse bir yerden başka bir uzak yere götürülürken örneğin bozulmaması için formalin içine bırakılır. Ve DNA barkotlamadaki sorunların bir diğeri de pH'ı iyi ayarlanmamış formalin çözeltilerinden kaynaklanmaktadır.” pH dengesi ayarlanmamış formalinin hızlı asidifikasyonunun DNA ekstraksiyonunu zorlaştırdığı bildirilmektedir. pH dengesi ayarlanmış formalin içerisinde uzun süre saklamak moleküler analizde kullanılmalarına engel değildir. Formalin içinde muhafaza edilen dokulardan DNA ekstraksiyonuna ilişkin birçok protokol bulunmaktadır, formalin içinde saklanmış zooplankton ve balık DNA barkotları da mevcuttur. Moleküler analizde kullanılacak dokuların muhafazasında en uygun yöntem etanol içinde saklamak ya da dondurmaktır (Keskin ve Atar, 2013).

DNA barkotlamayı zorlaştıran bir başka etkende hatalı dizilerdir. Türlerin *nükleotid* kayıtlarının NCBI Gen Bankası veri tabanında hızla artmış ve bu sayede canlıların karşılaştırmalı tanımlanmasında dev bir kütüphane oluşmuştur. Bu kütüphane hızla

büyümektedir. Fakat Gen Bankası veri tabanında taksonomik tanımlamanın hatalı yapılabildiği, DNA dizisinin uygun dikkatli kontrol edilmediği, mikrobiyal bulaşmalara maruz kalmış birçok hatalı diziye de rastlandığı iddia edilmektedir. Bu hatalı diziler, belirli taksonların karşılaştırmalı incelenmesi ile tespit edilebilmektedir (Keskin ve Atar, 2013).

Türler arasındaki hibritleşmeler, barkotlama çalışmalarında ciddi sorunlar yaratmaktadır (Keskin ve Atar, 2013). Hibridizasyon farklı kaynaklardan gelen nükleik asitlerin tamamlayıcı baz eşleşmesiyle birbirine tutunmasıdır.” (Madigan and Martinko, 2010). *COI*, mitokondriyal bir gendir ve genellikle anneden aktarılır. Bu yüzden hibrit bir canlı hatalı olarak maternal türle aynı tür olarak teşhis edilecektir. Eğer tanımlaması yapılan tür, hibritleşebilen bir tür ise mutlaka DNA barkotlamanın yanı sıra bilinen türün nükleer DNA allellerinin de analiz edilmesi gerekir (Keskin ve Atar, 2013).

1.6. DNA Barkotlama ile Taksonomi Arasındaki ilişkisi

DNA barkotlama, taksonomik çalışmalara destek olsa da barkotlama hiçbir zaman kapsamlı bir taksonomik analizin yerini tutacak bir yöntem değildir. Bir canlıya ait barkod, veri tabanından bir türle eşleşmezse, bu onun yeni bir tür olduğunu göstermez. Örnekler, detaylı bir taksonomik analize tabi tutulmalıdır. Tür teşhisinde, klasik taksonomik yöntemler, barkotlama yönteminden daha yüksek bir doğruluğa sahiptir. Detaylı olarak çalışılmamış gruplarda klasik taksonomik çalışma öncesinde yapılacak DNA barkotlama ile örneklerin hızla farklı gruplara ayrılması sağlanabilir ve taksonomik çalışmanın iş yükü azaltılabilir. Yeni türlerin teşhisinde DNA barkotlama, süreci hızlandırmakta ve kolaylaştırmaktadır. Genellikle morfolojik ve ekolojik verilerin toplanmasını da gerektiren klasik taksonomik çalışma yöntemleri, farklı taksonomik gruplara göre değişkenlik gösterirken, barkotlama analizi büyük gruplar için hemen hemen standart hale getirilmiştir (Keskin ve Atar, 2013).

1.7. DNA Barkotlama ile Filogeni arasındaki ilişki

DNA barkotunun dahil edilmesiyle, filogenetik çalışmalarda önemli gelişmeler olmuş ve farklı gruplara yönelik çalışmalar artmıştır. Moleküler filogeni çalışmalarında,

öncelikle taksonun ölçeği (familya, cins vb) belirlenir. Grubu temsil eden taksonların belirlenmesi, soy ağaçların oluşturtulmasında en uygun yöntemin tespiti zorunludur. Bu yöntemler; Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian analizidir. Bu işlemler, farklı çalışmalarda anlatılmakla birlikte, filogenetik ağaçların oluşturtulmasında oldukça önemlidir. Daha önceden hedef gen seçiminde, ribozomal genler tercih edilirken, günümüzde daha stratejik gen seçimleri yapılmaktadır. Dolayısıyla, son filogenetik analizlerde, birkaç kilobaz uzunlukta DNA dizileri elde edilmektedir. Böylece farklı taksonomik seviyelerden elde edilen filogenetik çözünürlüğün artırılması sağlanmakta ve belirli hataların önüne geçilebilmektedir (Keskin ve Atar, 2013).

Başka bir sorun ise tür örneklemelerine, lokus seçimine olduğu kadar önem verilmemesidir. Fakat örneklemenin çoğaltılması dal uzunluklarının kısalmasını ve homoplasinin azalmasını sağlayarak doğru soy ağacının oluşturtulmasına katkı sunmaktadır. Aksi takdirde dal uzunlukları ve homoplaside görülecek artış, hatalı bir filogeni oluşturtulması yol açabilir. Birçok araştırmacı filogeninin çözünürlüğünü artırmak için daha fazla gen eklemektense daha fazla takson eklemenin çok daha olacağını ileri sürmektedir. Veri setine daha fazla takson eklemek analize yardımcı olmakla birlikte, eklenecek taksonların seçiminin önemini artırmaktadır. Bu sınırlayıcı nedenlerden dolayı araştırmacılar, yüksek sayıda takson içeren filogenetik veri setleriyle çalışırken daha bulgusal ve basit analitik yöntemlerden faydalanmaktadır. Barkod kütüphaneleri ile moleküler filogenetik veri setleri benzerlikler gösterse de DNA barkotları genellikle evrimsel ilişkileri derinlemesine çözümleyebilecek yeterlilikte değildir. DNA barkodlama çalışmaları, filogeni oluşturtmak için takson seçiminde yardımcı olmaktadır. DNA barkodları hem tür tanımlamada hem de ayrımı zor veya yeni türlerin ortaya çıkarılmada etkilidir, detaylı filogenetik analiz gerektiren taksonların belirlenmesinde moleküler bir araçtır (Keskin ve Atar, 2013).

1.8. DNA Barkotlamanın Popülasyon Genetiği ile İlişkisi

“Biyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılan uygulamalar biyolojinin iki önemli dalı tarafından geliştirilmiştir. Bunlar filogenetik ve popülasyon genetiğidir. Bu bilim dalları, canlılar arasındaki ilişkilerin farklı seviyelerine odaklanmıştır. Moleküler filogenetikte, canlı grupları arasındaki evrimsel ilişkiler ele alınırken, popülasyon

genetiğinde ise tek bir türün kendi içindeki ve farklı popülasyonları arasındaki varyasyon irdelenmektedir. Bu noktada DNA barkotlama, türler bakımından kapsamlı bir içeriğe sahipken, türlerin birbirleriyle ilişkilerinden çok tanımlanmalarına odaklanır ve iki disiplinin ortasında bir yerde konumlanır. DNA barkotlama, popülasyon genetiği çalışmalarında sıkça kullanılmakta ve tür içi genetik varyasyonu belirlemede başarılı bir genetik ayıraç olarak kabul görmektedir. Özellikle balık popülasyon genetiği çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Avustralya'dan toplam 207 balık türünün COI dizisini analiz eden araştırmacılar, ortalama tür içi K2P uzaklığını %0,39 olarak belirlemiştir. Araştırmacılar, bu sonuçların COI geninin barkotlanmasının, balıklarda türlerin ve tür içi farklı popülasyonların tanımlanmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir (Keskin ve Atar, 2013).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çeşitli canlılarla ilgili önceden DNA barkodlama yöntemi ile yapılmış, moleküler filogenetik ve moleküler taksonomi araştırmalarından bazıları verilmiştir.

Kahraman (2014), tez çalışmasında Hatay yöresindeki 71 gündüz kelebeği (*Rhopalocera*) türünü Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX 1) geninin DNA dizilimlerini moleküler yollarla elde etmiş ve bu filogenetik analizler sonucunda da filogenetik bir soy ağacı oluşturmak için üç farklı algoritma; maximum likelihood, maximum parsimony, Neighbor-joining programlarıyla değerlendirmiştir. 71 türün birbiriyle akrabalıklarını belirten soy ağaçları düzenlemiştir. Ayrıca 71 kelebek türüne ait Mitokondriyal COX 1 gen dizileri tür tayini amacıyla Gen bankasında karşılaştırma yapılmış. Filogenetik analizlerin gerçekleşmesinde tüm kelebeklere ait DNA dizileri ve Gen Bankasından elde edilen referans diziler kullanılmıştır. Ve Gen Bankasında %100 benzeşme gösteren türler dışında ve Gen Bankası'nın da kabul ettiği 49 türleri Bankanın veri tabanına yeni veri olarak kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geni türlerin birbiriyle akrabalık ilişkisini ölçmekten çok, tür ayrımında kullanıldığı bilinmektedir. Burada sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin yetersizliği ortaya çıkmıştır. Ve kelebek türlerinin moleküler verilerle değerlendirilmesinde ilk kez sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin kullanılması açısından hem de Hatay ilindeki kelebeklerin ülkemizde moleküler yönde ayrımı için ilk çalışma olmuştur.

Yeşiloğlu, M (2014), Hydraenidae familyası *Ochthebius* cinsine ait 17 türü çalışmıştır.

Özdil (2007) , DNA PCR-RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerları kullanarak 20 yöreye ait bal arılarının genetik yapısını tanımlamış ve farklı bölgelerde yetiştirilen popülasyonlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amacıyla anonim lokus, sitokrom b (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (18S rRNA), sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) ve sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) lokuslarında farklı enzim kombinasyonlarından yararlanılarak PCR, PCR-RFLP analizi ile COI-COII intergenik bölgede DNA dizi analizini yapmıştır.

Ertuğrul ve Koç (2012), araştırma makalelerinde DNA barkodlamasında genel olarak kullanılan sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin (CO1) bitkilerde nükleotid

değişim oranı düşük olduğundan uygun değildir. Bu yüzden bitkiler için genel bir gen arama çalışmalarını derleyip en sonunda çekirdek ribozomal ITS bölgelerinin bitki barkodlama çalışmaları için en ideal diziye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Keskin ve Atar (2013), derleme makalelerinde DNA barkodlama tekniğini tüm yönleriyle ele almış ve barkodlama esnasında yaşanan zorlukları belirtilerek, DNA barkodlamada son durumu göstermiştir. DNA barkodlama tekniğinin avantajları gözler önüne serilerek tekniğin kullanılmasını yaygınlaştırmak, biyoçeşitlilik ve ekosistemdeki değişiklikleri daha kolay gözlemlemek, soyu tükenmekte olan canlıların ise kontrollerini sağlayarak biyoçeşitlilik korumaya dikkat çekmişlerdir.

Ertorun ve arkadaşları (2011), araştırma makalelerinde Türkiye'nin yedi önemli bölgesinden Hydraenidae ailesinin kontrol listesinin yaptılar. Bu bölgeler Karadeniz bölgesi, Marmara Bölgesi ve Ege ve Akdeniz Bölgeleri içindedir. Kontrol listesi 210 tür içermekte olup, bunların ikisi Aulacochthebius Leach., 113'ü Hydraena Kugelann, 21'i Limnebius Leach ve 74 ü Ochthebius Leach.'tır. Çalışmada bu her ailenin türlerinin üzerinde gösteren haritalar yapılmıştır. Çalışma verilerine göre Hydreaena 161 tür ve alt türü ile Türkiye'de temsil edilmektedir. Adephagous su böcekleri 167 türler ve 17 endemik olan alt türleri ile Türkiye'de temsil edilmektedir.

Gülperçin (2013), araştırma makalelerinde Coleopter takımına bağlı böceklerin filogenisinin moleküler ve morfolojik bilgi eksikliğini tartışmıştır. Bu veri eksikliğini biyolojik ve evrimsel nedenlere bağlıdır. Çalışmalarında bu konuya yönelik bilgileri derlemişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucu bu eksikliğin Coleopter takımının inanılmaz tür zenginliği ve çeşitliliğinden kaynaklandığı sonucuna varılmış, günümüzde birçok araştırmacının "Polyphaga-Myxophaga" hipotezini savunmasına karşın, kanat karakteri ile ilgili yapılan çalışmalarda "Basal Polyphaga" hipotezi desteklenmiştir. Yapılacak DNA çalışmalarının bu canlıların dört alttakımının yakınlıklarını belirlemekte ve bu konuda cevaplanamamış soru kalmayacağı yönünde tavsiye vermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon kiti kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

- Bir mikrofüj tüpüne 600 µl Parçalama Tamponu (%2 CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide-, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) eklenmiş, daha sonra böcek numunesi tümüyle tamponun içine bırakılmıştır.
- Numunenin homojenizatörde 2 dk, 6000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- Tüp 14000 RPM'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar Bağlama Tamponu (6.75M Guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-Cl pH 8.0) eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır.
- Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
- Kolona 500 µl İnhibitör Eleme Tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır.
- Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır.
- Kolun 14000 RPM de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir.
- Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

3. 2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR)

PCR için kullanılan primerler Limnebius cinsinin DNA data bankasında mevcut mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt unite I (*COI*) gen bölgeleri kullanılarak

tasarlanmıştır. Primer tasarımı için Tablo-1’de verilen diziler kullanılmıştır. Diziler Clustal Omega Programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ile karşılaştırılmış ve karşılaştırma sonucunda elde edilen korunmuş bölgeleri hedefleyen, 663 bp uzunluğunda ürün vermek üzere dejenere ileri 5'-CATATTATYAGMCAAGAAAG-3' ve geri 5'-AAATCTTTCTCAAATRATDAAWA-3' primerleri tasarlanmıştır.

Q-PCR için Biospeedy Gerçek Zamanlı PCR Ana Karışımı (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Bütün reaksiyonlarda Biorad CFX96-Touch (Biorad Inc., A.B.D.) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x SybrGreen-I, 5 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış, Tablo 2’de verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C- 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları Biorad CFX Manager™ yazılımında analiz edilmiştir.

3.3.Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Elde edilen PCR ampliconların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer’da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir. Dizi analizi için Bioeksen firmasından hizmet alınmıştır. Her bir böcek örneği için elde edilen diziler CLC Sequence Viewer programı ile analiz edilmiştir. Elde edilen dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. DNA data bankasındaki mevcut dizilere %97 ve üzeri benzerlik gösteren diziler, benzer dizilime sahip organizma ile aynı tür olarak kabul edilmiştir. %70-97 arasında benzerlik gösteren türler ise hem morfolojik özellikleri hem de COI genlerinin en çok benzediği organizma göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bilinen böcek türlerine 70% ‘den az benzerlik gösteren türler sınıflandırılmamış olarak listelenmiştir. DNA data bankasında mevcut dizilere %100’den daha az benzerlik gösteren diziler DNA data bankasına eklenmiştir. Bu çalışmada elde edilen diziler ClustalW yazılımı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) kullanılarak birbirleriyle karşılaştırılmış, hizalanmış ve ardından manuel ayarlama yapılmıştır. Analizde sadece açıkça uyumlu baz pozisyonları kullanılmıştır. Yapılan dizi

karşılaştırmalarına dayanan filogenetik ağaçların çizimi için MEGA yazılımı (<http://www.megasoftware.net/>) kullanılmıştır. Filogenetik ağaçlar 4 farklı algoritma (neighbor-joining, maximum likelihood, maximum parsimony ve minimum evolution) ile elde edilmiş, böylelikle filogenetik ağaçlardaki gruplanmalar ve grup içi dallanmalardaki uzaklıklar belirlenmiştir.



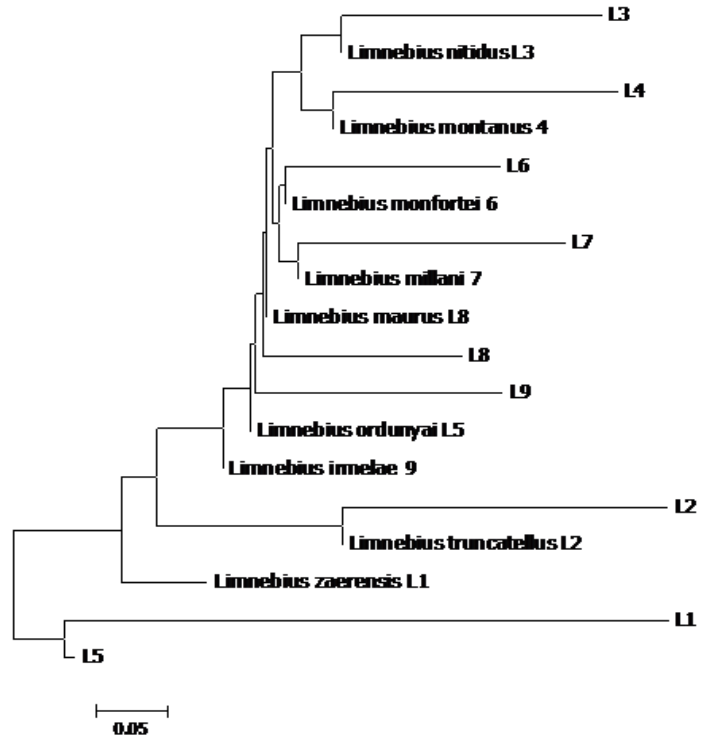
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Böceğin morfolojisine dayalı yapılan tür tahmini, moleküler analizler sonucu elde edilen dizilerin DNA data bankasında en çok benzediği gen ve bu gene sahip organizma ve bu bilgiler ışığında yapılan filogenetik tür tahmini Tablo 1’de verilmiştir.

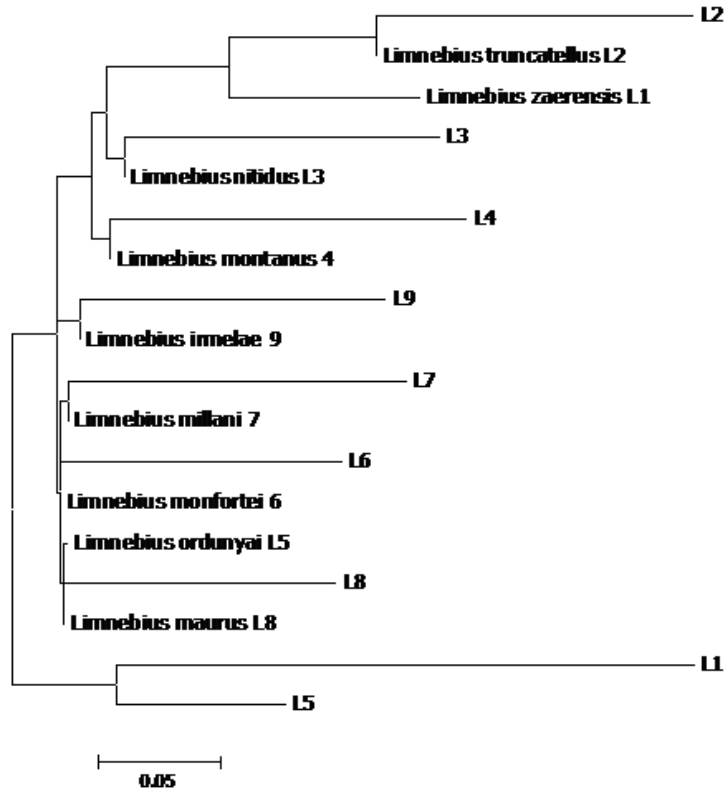
Çizelge 4.1. Morfolojik ve Filogenetik Analiz Tür Tahminleri

No	Morfolojik Tahmin	DNA Data Bankası En Benzer COI Gen Dizisi			Filogenetik Tahmin
		Databank No	Organizma-Gen	Benzerlik	
L1	Limnebius perparvulus	EU365868.1	Limnebius zaerensis	580/652 (89%)	Limnebius spp.
L2	Limnebius corybus	HQ165290.1	Limnebius truncatellus	574/636 (90%)	Limnebius spp.
L3	Limnebius myrmidon	HE610238.1	Limnebius nitidus	581/650 (89%)	Limnebius spp.
L4	Limnebius stagnalis	HE610237.1	Limnebius montanus	570/639 (89%)	Limnebius spp.
L5	Limnebius claviger	HE610239.1	Limnebius ordunyai	582/643 (91%)	Limnebius spp.
L6	Limnebius atomus	HE610236.1	Limnebius monfortei	591/654 (90%)	Limnebius spp.
L7	Limnebius paraniristanus	HE610235.1	Limnebius millani	581/650 (89%)	Limnebius spp.
L8	Limnebius corfidius	HE610234.1	Limnebius maurus	585/640 (91%)	Limnebius spp.
L9	Limnebius ferroi	HE610233.1	Limnebius irmelae	580/639 (91%)	Limnebius spp.

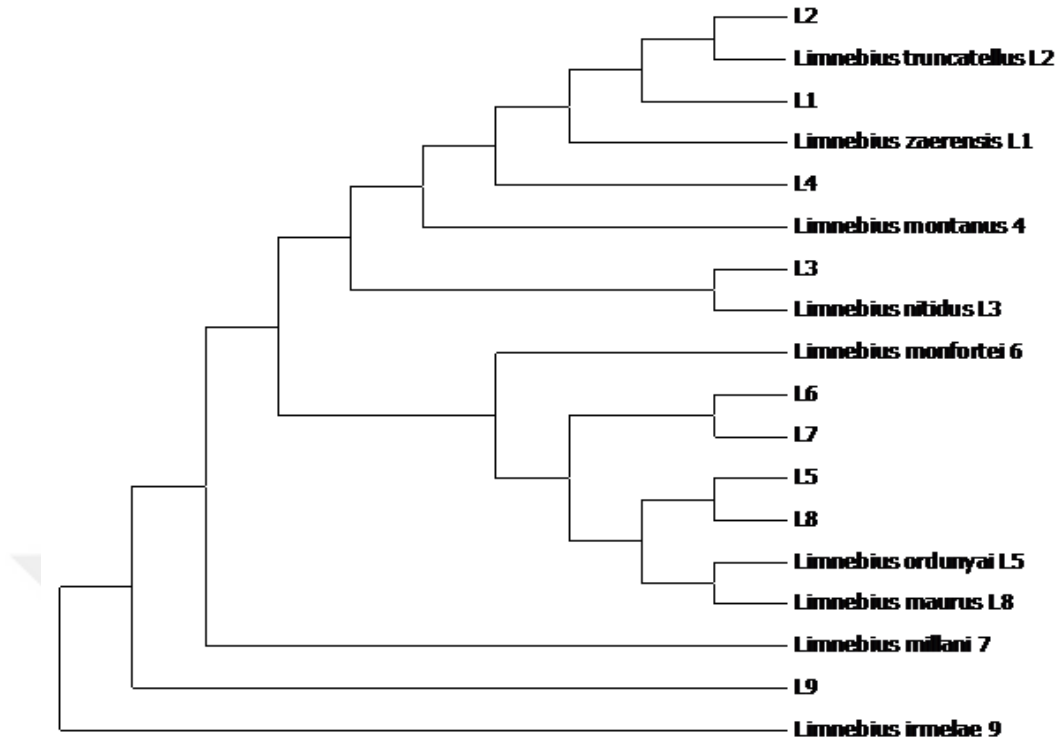
Bu çalışmada elde edilen ve EK-I’de verilen diziler ile, bu dizilerin DNA data bankasında en çok benzediği dizilerin karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.1- Şekil 4.3’de verilmiştir.



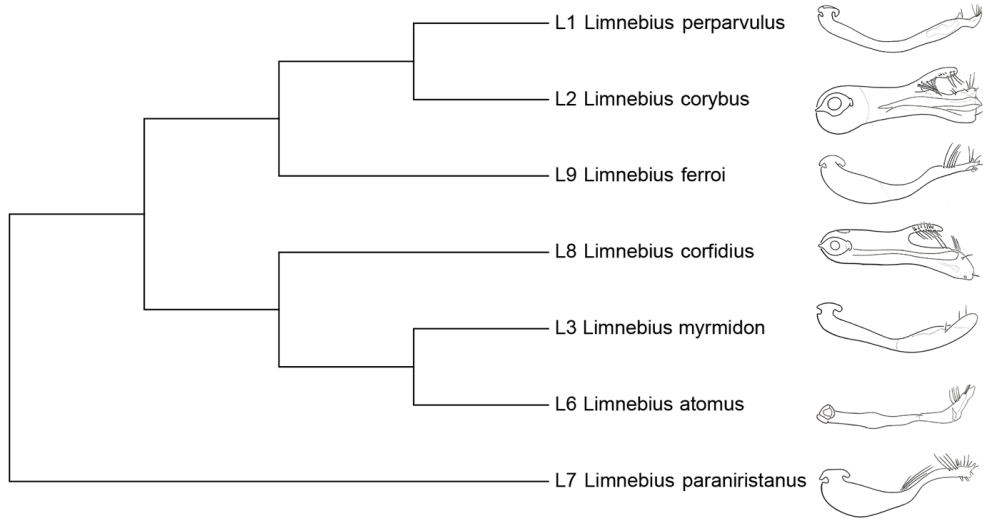
Şekil 4.1. Maximum parsimony ağacı



Şekil 4.2 Neighbor-joining ağacı



Şekil 4.3. Maximum likelihood ağacı



Şekil 4.4. *Limnebius* türlerinin COX1 sekansları (500 baz çifti) ile erkek cinsiyet organlarının şekillerine göre soyağacı (Şekiller Jach, 1993'ten)

Elde edilen *Limnebius* dizi analizi sonuçları aşağıda verilmiştir.

1. *Limnebius perparvulus*

Query 5
AAAAAAGGAACTTTTGAATTCGCTTAATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGATTACT 64
Sbjct 1
AAAAAAGGAACTTTTGAATTCGCTTAATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGATTACT 60
Query 65
TGGATTTGTTGTATGGGCAATTCGCTTATTCACAGTCGGCATAGATGTTGATACTCGAGC 124
Sbjct 61
TGGATTTGTTGTATGGGCAATTCGCTTATTCACAGTCGGCATAGATGTTGATACTCGAGC 120
Query 125
TTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTAATTCGCTTACAGGAATTAATAATTTTAGTTG 184
Sbjct 121
TTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTAATTCGCTTACAGGAATTAATAATTTTAGTTG 180
Query 185
GTTAGCTACTCTTCATGGAATTCGCTTATCTTACTCTCCTTCTTTATTATGAGCTTTAGG 244
Sbjct 181
GTTAGCTACTCTTCATGGAATTCGCTTATCTTACTCTCCTTCTTTATTATCAGCTTTAGG 240
Query 245
ATTTGTATTTTTATTCACTGTCGGAGGAAATTCGCTTATAATTTTGGCTAACTCTTCAAT 304
Sbjct 241
ATTTGTATTTTTATTCACTGTCGGAGGAAATTCGCTTATAATTTTGGCTAACTCTTCAAT 300
Query 305
TGATATTATTTTACATGAAATTCGCTTAGTCGTAGCCATTTTCATTATGTTTTATCAAT 364
Sbjct 301
TGATATTATTTTACATGAAATTCGCTTAGTCGTAGCCATTTTCATTATGTTTTATCAAT 360
Query 365
AGGTGCGGTATTTGCTATTATAGCGGGAAATTCGCTTAGATATCCTTTATTTACTGGACT 424
Sbjct 361
AGGTGCGGTATTTGCTATTATAGCGGGAAATTCGCTTACATATCCTTTATTTACTGGACT 420
Query 425 AACTCttaataataaatatttaaaattaattcgcttattatattttaggagtaaattt 484
Sbjct 421
AACTCTTAATAATAAATATTTAAAAATTAATTCGCTTATTATATTTTGGAGTAAATTT 480
Query 485 aacttttttCCTCAACATTTCTTAGGACTTAGTGGAATACCACGTCGTTACTCTGATTA 544
Sbjct 481
AACTTTTTTTCCTCAACATTTCTTAGGACTTAGTGGAATACCACGTCGTTACTCTGATTA 540
Query 545 CCCAGATGCATACACTACAATTCGCTTAatttcttctattggatcaataatttctctaatt 604
Sbjct 541
CCCAGATGCATACACTACAATTCGCTTAATTTCTTCTATTGGATCAATAATTTCTCTAAT 600
Query 605 tgcaatttttatcttttatttattattaattCGCTTATT 644
Sbjct 601 TGCAATTTTATCTTTTTATTATTATTAATTCGCTTATT 640

2. *Limnebius corybus*

Query 5

aaaaaaGAAACATTTGGAACTTTAGGACGCATAACGTCTATAATAGCAATTGGATTATT 64

Sbjct 1

AAAAAAGAAACATTTGGAACTTTAGGACGCATAACGTCTATAATAGCAATTGGATTATT
60

Query 65

AGGATTTGTTGTTTGAGCTCATCATATATTCACAGTTGCGCATAACGTAGATACTCGGCG 124

Sbjct 61

AGGATTTGTTGTTTCAGCTCATCATATATTCACAGTTGCGCATAACGTAGATACTCGGCG 120

Query 125

CATAACGTCTTCTGCAACAATAATTATTGCTGTTCCCACAGGAATTAATAATTTTATAGTTG 184

Sbjct 121

CATAACGTCTTCTGCAACAATAATTATTGCTGTTCCCACAGGAATTAATAATTTTATAGTTG 180

Query 185

GTTAGCTACGCATAACGTAGCACAAATTAACACTCTCCAGCGCTTCTTTGAGCCTTAGG
244

Sbjct 181

GTTAGCTACGCATAACGTAGCACAAATTAACACTCTCCAGCGCTTCTTTGAGCCTTAGG 240

Query 245

ATTTGTATTTTTATTTACCGCATAACGTTTAACTGGAGTAATTTTAGCTAATTCTTCAAT 304

Sbjct 241

ATTTGTATTTTTATTTACCGCATTACGTTTAACTGGAGTAATTTTAGCTAATTCTTCAAT 300

Query 305

TGATATTACGCATAACGTTACTTATTATGTAGTAGCTCACTTTCACTATGTTTTATCTAT 364

Sbjct 301

TGATATTACGCATAACGTTACTTATTATGTAGTAGCTCACTTTCACTATGTTTTATCTAT 360

Query 365

AGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGACGCATAACGTGATTTCCGTTATTTACAGGTTT 424

Sbjct 361

AGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGACGCATAACGTGATTTCCGTTATTTACAGGTTT 420

Query 425

ATACTTAACGCATAACGTTTTAAAGATTCAATTTATTATTATATTTATTGGAGTAAATTT 484

Sbjct 421

ATACTTAACGCATAACGTTTTAAAGATTCAATTTATTATTATATTTATTGGAGTAAATTT 480

Query 485

AACATTTTTCCCTCAACACGCATAACGTATTAAGCGGAATACCTCGACGCTATTCTGATT 544

Sbjct 481

AACATTTTTCCCTCAACACGCATTACGTATTAAGCGGAATACCTCGACGCTATTCTCATT 540

Query 545

ACCCAGATGCATACACATCCGCATAACGTATTTCTTCTATCGGATCAATAATTTCTTTAA 604

Sbjct 541

ACCCACATGCATACACATCCGCATAACGTATTTCTTCTATCGGATCAATAATTTCTTTAA 600

Query 605 TTGCTATCAttttttttAATTATTATTCGCATAACGTTT 645

Sbjct 601 TTGCTATCATTTTTTTTTTAATTATTATTCGCATAACGTTT 641

3. *Limnebius myrmidon*

Query 5

AAAAAAGGACACCTTACTGACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT 64

Sbjct 1

AAAAAAGGACACCTTACTGACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT 60

Query 65

AGGATTTGACACCTTACTTCATCATATATTTACAGTTGGTATAGATGTGCGATACTCGGGC 124

Sbjct 61

AGGATTTGACACCTTACTTCATCATATATTTACAGTTGGTATAGATGTGCGATACTCGGGC 120

Query 125

TTATTTTACTTCAGCTACACACCTTACTGCCGTTCCACAGGAATTAATAATTTTATAGATG 184

Sbjct 121

TTATTTTACTTCAGCTACACACCTTACTGCCGTTCCACAGGAATTAATAATTTTATACATC 180

Query 185

ATTAGCTACTCTTCATGGGACACAAATTACACCTTACTCCGCTCTTTTATGAGCATTAGG 244

Sbjct 181

ATTAGCTACTCTTCATGGGACACAAATTACACCTTACTCCGCTCTTTTATCAGCATTAGG 240

Query 245

ATTTGtttttATTTACAGTGGGGGGGATTAAGTGGCGACACCTTACTTAACTCTTCTGT 304

Sbjct 241

ATTTGTTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGGATTAAGTGGCGACACCTTACTTAACTCTTCTGT 300

Query 305

TGACATTATTTTACATGATACCTACTACGTAGTAGCTCACACCTTACTTGTTTTATCTAT 364

Sbjct 301

TGACATTATTTTACATGATACCTACTACGTAGTAGCTCACACCTTACTTGTTTTATCTAT 360

Query 365

GGGGGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGAACACCTTACTGATTCCCTTTATTCACAGGatt 424

Sbjct 361

GGGGGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGAACACCTTACTCATTCCCTTTATTCACAGGATT 420

Query 425 atatttaataacaaattacaccttactcaatttattattatatttattggtgtaattt 484

Sbjct 421

ATATTTAAATAACAAATTACACCTTACTCAATTTATTATTATATTTATTGGTGTTAATTT 480

Query 485

aACGTTTTACACCTTACttttttAGGTTTAAGAGGAATACCCCGACGATATTCTGATAC 544

Sbjct 481

AACGTTTTACACCTTACTTTTTTTAGGTTTAACAGGAATACCCCGACGATATTCTGATAC 540

Query 545

ACCTTACTCTTATACCTCTTGAAATATTATTTCTTCTATTGGATCAATACACCTTACTAT 604

Sbjct 541

ACCTTACTCTTATACCTCTTCAAATATTATTTCTTCTATTGGATCAATACACCTTACTAT 600

Query 605 TGCTATTATTATATTTTTATTTATCATTGAGAAAGATTT 644

Sbjct 601 TGCTATTATTATATTTTTATTTATCATTTCAGAAACATTT 640

4. *Limnebius stagnalis*

Query 5
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTAGGTATAATTTATGCCGTAGCCAGAATCGGATTACT 64
Sbjct 1
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTAGGTATAATTTATGCCGTAGCCACAATCGGATTACT 60
Query 65
AGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTTGCCGTAGCCAGTGATACTCGAGC 124
Sbjct 61
AGGATTTGTTGTATCAGCTCATCATATATTTACAGTTGCCGTAGCCAGTGATACTCGAGC 120
Query 125
TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCCCACCGTAGCCAGAATTTTATAGATG 184
Sbjct 121
TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCCCACCGTAGCCACAATTTTATACATC 180
Query 185
ATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCTCCCGTAGCCAGATGAGCATTAGG 244
Sbjct 181
ATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCTCCCGTAGCCACATCAGCATTAGG 240
Query 245
ATTTGTTTTATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGCCGTAGCCAGTAACTCTTCTGT 304
Sbjct 241
ATTTGTTTTATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGCCGTAGCCAGTAACTCTTCTGT 300
Query 305
TGACATTATTTTACATGATACCTACTACCCGTAGCCAGATTTTCACTATGTTTTATCTAT 364
Sbjct 301
TGACATTATTTTACATGATACCTACTACCCGTTGCCAGATTTTCACTATGTTTTATCTAT 360
Query 365
GGGGGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGACCGTAGCCAGGATTTCTTTATTACAGGATT 424
Sbjct 361
GGGGGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGACCGTTGCCAGGATTTCTTTATTACAGGATT 420
Query 425
ATATTTAAATAACAAATTTTTAAAAATTCCGTAGCCAGTTATATTTATTGGCGTTAATTT 484
Sbjct 421
ATATTTAAATAACAAATTTTTAAAAATTCCGTTGCCAGTTATATTTATTGGCGTTAATTT 480
Query 485
AACGTTTTTCCCCAACATTTTTTAGGTCCGTAGCCAGTACCCCGACGATATTCTGATTA 544
Sbjct 481
AACGTTTTTCCCCAACATTTTTTAGGTCCGTAGCCAGTACCCCGACGATATTCTGATTA 540
Query 545
TCCAGATGCTTATACTTCTTGAAATATTCCGTAGCCAGTTGGATCAATGATTTCTTTAAT 604
Sbjct 541
TCCAGATGCTTATACTTCTTCAAATATTCCGTTGCCAGTTGGATCAATGATTTCTTTAAT 600
Query 605 TGCTATTATTATATTTTTATTCATCATTCCGTAGCCAGTT 644
Sbjct 601 TGCTATTATTATATTTTTATTCATCATTCCGTAGCCAGTT 640

5. *Limnebius claviger*

Query 5
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT 64
Sbjct 1
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT 60
Query 65
AGGATTTGTTGTATGGGCAACTTTAGGATTTACAGTTGGTATAGATGTTGATACTCGAGC
124
Sbjct 61
AGGATTTGTTGTATGGGCAACTTTAGGATTTACAGTTGGTATAGATGTTGATACTCGAGC
120
Query 125
TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTAACTTTAGGACAGGAATTAATTTTATAGATG 184
Sbjct 121
TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTAACTTTACGACAGGAATTAATTTTATACATC 180
Query 185
ATTAGCTACTCTTCATGGAACTTTAGGAAATTATCCCCTGCTCTTTTATGAGCATTAGG 244
Sbjct 181
ATTAGCTACTCTTCATGGAACTTTAGGAAATTATCCCCTGCTCTTTTATCAGCATTAGG 240
Query 245
ATTTGTTTTTTATTTACAGTGGGGGGAACTTTAGGATAATTTAGCTAACTCTTCTAA 304
Sbjct 241
ATTTGTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGAACTTTACGATAATTTTAGCTAACTCTTCTAA 300
Query 305
CTTTAGGATTTTACATGATACCTACTACGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTATCTAT 364
Sbjct 301
CTTTACGATTTTACATGATACCTACTACGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTATCTAT 360
Query 365
GGGAGCAGAACTTTAGGATATAGCAGGATTTATCCAATGATTCCCTTTATTCACAGGATT
424
Sbjct 361
GGGAGCAGAACTTTTGGATATAGCAGGATTTATCCAATCATTCCCTTTATTCACAGGATT 420
Query 425 ATACTTAAATAACAAATTTTTAAAAattaacttaggattatatttggcgtaattt 484
Sbjct 421
ATACTTAAATAACAAATTTTTAAAAATTAACTTTACGATTATATTTATTGGCGTTAATTT 480
Query 485 aacgtttaacttaggatttttaggtttaaGAGGAATACCTCGACGATATTCTGATTA 544
Sbjct 481
AACGTTTTTACTTTTGGATTTTTTAGGTTTAAACAGGAATACCTCGACGATATTCTGATTA 540
Query 545
CCCAGATGCTTACACTTCAACTTTAGGAATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 604
Sbjct 541
CCCAGATGCTTACACTTCAACTTTAGGAATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 600
Query 605 TGCTATTATCATATTTTTATTCATCATCAACTTTAGGATT 644
Sbjct 601 TGCTATTATCATATTTTTATTCATCATCAACTTTACGATT 640

6. *Limnebius atomus*

Query 6
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATTACTATAATTTTACT 65
Sbjct 1
AAAAAAGGAAACATTTGGAACTTTACGAATAATTTATGCTATAATTACTATAATTTTACT 60
Query 66
AGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTTGGTATAGATACTATAATTTCGAGC 125
Sbjct 61
ACGATTTGTTGTATCAGCTCATCATATATTTACAGTTGGTATACATACTATAATTTCGAGC 120
Query 126
TTATTTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTACTATAATTTAGAT 185
Sbjct 121 TTATTTTACTTCAGCTACTAATATTATTGCCGTTCTACACGAATTACTAT-
ATTTAGAT 179
Query 186
GATTAGCTACTCTTCATGGGACACAAATTAATTATCCCCTGCTCTTTTATGAGCAT-AC 244
Sbjct 180
CATTTGCTACTCTTCATGGGACACAAATTAATTATCCCCTGCTCTTTTATCAGCATTAC 239
Query 245
TATAATTTACTATAATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCTAACTCTTCT 304
Sbjct 240 TATCATTTA-
TATCATTTACAGTGGGGGGATTTACTGGCGTTATTTTGTCTAACTCTTCT 298
Query 305
GTTGACATACTATAATTTGATACCTACTACGTAGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATCT 364
Sbjct 299
GTTGACATACTATCATTTGATACCTACTACGTTGTTGCTCATTTTCACTATGTTTTATCT 358
Query 365 ATGGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATCCTACTATAATt---tttattcaca
421
Sbjct 359 ATGGGAGCAGTATTTGCTATTATTGCAGGATTTATCC-A--
ATCATTCCTTTTATTCACA 415
Query 422 ggattataacttaataacaataactataaattattcaatttattattattattggcggt 481
Sbjct 416
GGATTATACTTTAATAACAATACTATTATTATTCAATTTATTATTATATTTATTGGCGTT 475
Query 482 aatttaacgttactataaattacatttttaggtttaaGAGGAATACCTCGACGATATTCT 541
Sbjct 476
AATTTTACGTTACTACCCCTACATTTTTTTGGTTTTAGAGGAATACCTCGACGATATTCT 535
Query 542 GATTACCCAGATGCTTACACTTCTTGAAATTACTATAA-
TTCTATTGGGTCAATGATTTTC 600
Sbjct 536 GATTACCCAGATGCTTACACTTCTTCAAAT-
ACTATAACTTCTATTGGGTCAATCATTTTC 594
Query 601 TTTAATTGCTATTATCATATTTACTATA-ATTATCTGAGAAAGATTT 646
Sbjct 595 TTTTATTGCTATTATCATATTTA-TATTCATTATCTCAGAAAGATTT 640

7. *Limnebius paranuristanus*

Query 5

AAAAAAGGGACACAAATTAACCTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCGACACAAATTCT
64

Sbjct 1

AAAAAAGGGACACAAATTAACCTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCGACACAAATTCT
60

Query 65

AGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTTGGTATAGATGTGACACAAATTGC 124

Sbjct 61

AGGATTTGTTGTATCAGCTCATCATATATTTACAGTTGGTATAGATGTGACACAAATTGC 120

Query 125

TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTATAGATG 184

Sbjct 121

TTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTATCATC 180

Query 185

ATTAGCTAGACACAAATTGACACAAATTAATTATTTCCCTGCTCTTTTATGAGCATTAGG 244

Sbjct 181

ATTAGCTACACACAAATTGACACAAATTAATTATTTCCCTGCTCTTTTATCAGCATTAGG 240

Query 245

ATTTGtttttATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGGACACAAATTAATTCTTCTGT 304

Sbjct 241

ATTTGTTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGGACACAAATTAATTCTTCTGT 300

Query 305

TGACATTAGACACAAATTTACCTACTATGTAGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATCTAT 364

Sbjct 301

TGACATTACACACAAATTTACCTACTATGTAGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATCTAT 360

Query 365

GGGAGCAGTATTTGCTATGACACAAATTTTATCCAATGATTCCCTTTATTCACAGGATT 424

Sbjct 361

GGGAGCAGTATTTGCTATGACACAAATTTTATCCAATCATTCCCTTTATTCACAGGATT 420

Query 425 ATACTTAAGACACaaatttttaaaattcaattattattattattggcgtaattt 484

Sbjct 421

ATACTTAACACACAAATTTTAAAAATTCAATTTATTATTATATTTATTGGCGTTAATTT 480

Query 485

aacgttttCCCCAACAGACACAAATTTTAAGAGGAATACCTCGACGATATTCTGATGA 544

Sbjct 481

AACGTTTTTCCCCAACAGACACAAATTTTAACAGGAATACCTCGACGATATTCTGATGA

540

Query 545

CACAAATTCTTACACTTCTTGAAATATTATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 604

Sbjct 541

CACAAATTCTTACACTTCTTCAAATATTATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 600

Query 605 TGCTATTATCATATTTTTATTTCATCATCGACACAAATTTT 644

Sbjct 601 TGCTATTATCATATTTTTATTTCATCATCGACACAAATTTT 640

8. *Limnebius corfidius*

Query 5

AAAAAAGGAAACATTTGGATTCACAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT
64

Sbjct 1

AAAAAAGGAAACATTTGGATTCACAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT
60

Query 65 AGGATTTGTTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTTGATTACACA-G-
GAATTCACAGGA 122

Sbjct 61 AGGATTTGTTGTATGGGCTCATCATATATTTACAGTTGATTACATGTGAATTCAC-
-GA 118

Query 123

GCTTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTGA 182

Sbjct 119

GCTTATTTTACTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTACA 178

Query 183

TGATTAGCTACTCTTCATGGGACACAAATTAATTATTTCCCATTCACAGGAATGAGCATT 242

Sbjct 179 TCATTAGCTACTCTTCATGGGACACAAATTAATTATTTCCCATTCACAGGAATCAGCATT 237

Query 243

AGGATTTGttttttATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCATTACAGG 302

Sbjct 238

ACGATTTGTTTTTTTATTTACAGTGGGGGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCATTACACAG 297

Query 303

AGTTGACATTATTTTACATGATACCTACTACGTAGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATC 362

Sbjct 298

AGTTCACATTATTTTACATCATACTACTACGTAGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATC 357

Query 363 TATTCACAGGATATTTGCTATTATAGCAGGATTTATCCAATGATTCCCttttacacagg
422

Sbjct 358

TATTCACCGGATATTTGCTATTATAGCACGATTTATCCAATCATTCCCTTTATTCACACG 417

Query 423 attatacttaaattcacaggatttaaaattcaatttattattatattatiGGCGTTAA 482

Sbjct 418

ATTATACTTAAATTCACAGGATTTAAAAATTCAATTTATTATTATATTTATTGGCGTTTA 477

Query 483

TTTAACGTTTTTCCCCCAACAATTCACAGGATTAAGAGGAATACCTCGACGATATTCTGA
542

Sbjct 478

TTTAACGTTTTTCCCCCAACAATTCACACGATTAACACGAATACCTCGACGATATTCTCA 537

Query 543 TTACCCAGATGCTTACACTTCTTGAAATATTATT-

CACAGGATTGGGTCAATGATTTCTT 601

Sbjct 538 TTACCCACATGCTTACACTTCTTCAAATATTATTTTACA-

GATTGGGTCAATGATTTCTT 596

Query 602 TAATTGCTATTATCATATTTTATTCATCATCATTCACAGGATT 645

Sbjct 597 TAATTGCTATTATCATATTTTATTCATCATCATTCACACGATT 640

9. *Limnebius ferroi*

Query 5

AAAAAAGGAAACATTTCGGTACCCAGATGATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT
64

Sbjct 1

AAAAAAGGAAACATTTCGGTACCCAGATGATAATTTATGCTATAATAGCAATCGGATTACT
60

Query 65

AGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATACCCAGATGGTATAGATGTTGATACTCGGTA
124

Sbjct 61

AGGATTTGTTGTATCAGCTCATCATATATACCCAGATGGTATAGATGTTGATACTCGGTA 120

Query 125

CCCAGATGCTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCCCTACAGGAATTAATAATTTTAGATG 184

Sbjct 121

CCCAGATGCTTCAGCTACTATAATTATTGCCGTTCCCTACAGGAATTAATAATTTTACATC 180

Query 185

ATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCCTACCCAGATGATGAGCATTAGG
244

Sbjct 181

ATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCCTACCCACATCATCAGCATTAGG 240

Query 245

ATTTGTTTTACCCAGATGAGTGGGAGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCTAACTCTTCTGT 304

Sbjct 241

ATTTGTTTTACCCACATCAGTGGGAGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCTAACTCTTCTGT 300

Query 305

TGACATTATTTTACACGATACCCAGATGGTAGTAGCTCATTTTCACTATAACCCAGATGAT 364

Sbjct 301

TGACATTATTTTACACGATACCCAGATGGTAGTAGCTCATTTTCACTATAACCCAGATGAT 360

Query 365

GGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATCCAATGATTCCCTTTATTCACAGGATT 424

Sbjct 361

GGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATCCAATCATTCCCTTTATTCACAGGATT 420

Query 425

ATACTTAAATAACAAATTTTTAAAAATTCAATTTATTATAACCCAGATGTGGCGTTAATTT 484

Sbjct 421

ATACTTAAATAACAAATTTTTAAAAATTCAATTTATTATAACCCACATGTGGCGTTAATTT 480

Query 485

AACGTTTTTACCCAGATGTTTTTTAGGTTTAAGAGGAATGCCTCGACGATATTCTGATTA 544

Sbjct 481

AACGTTTTTACCCACATGTTTTTTAGGTTTAACAGGAATGCCTCGACGATATTCTGATTA 540

Query 545

CCCAGATGCTTACACTTCTTGAAATATTATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 604

Sbjct 541

CCCAGATGCTTACACTTCTTCAAATATTATTTCTTCTATTGGGTCAATGATTTCTTTAAT 600

Query 605 TGCTATTATCATATTTTTATTTCATCATCTACCCAGATGTT 644

Sbjct 601 TGCTATTATCATATTTTTATTTCATCATCTACCCAGATGTT 640

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, 9 *Limnebius* (Coleoptera, Hydraenidae) türü moleküler düzeyde çalışılmıştır. Bu türlerin DNA'ları izole edilip mitokondriyal COI geninin nükleotid dizisi oluşturulmuştur. PCR ile COX 1 gen dizisinin yaklaşık olarak 655 baz çifti kısmı oluşturulmuş ve bu COI gen dizileri birer moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. 9 *Limnebius* türüne ait mitokondriyal COX 1 gen dizileri tür tayini amacıyla Gen bankasındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizde, örneklerimize ait DNA dizileri ve Gen Bankası'ndan elde edilen referans dizileri kullanılmıştır.

DNA dizi analiziyle, örneklerin BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) taraması sonucunda benzerlik oranları ile tür seviyesinde tanımlama yapılmıştır. Gen Bankası'nda %100 benzeşme gösteren türler dışında ve Gen Bankası'nın kabul ettiği 9 *Limnebius* türü bankanın veri tabanına eklenmiştir. Bu türler Gen Bankası için yeni kayıttır. Zira bunlar ilk kez kaydedilmektedir. Eklenen türler şunlardır: *Limnebius perparvulus*, *L. corybus*, *L. myrmidon*, *L. stagnalis*, *L. claviger*, *L. atomus*, *L. paranuristanus*, *L. corfidius*, *L. ferroi* dir. Bu türlerin Gen Bankasında moleküler veri kayıtları daha önce oluşturulmamıştır.

COX 1 geni sadece tür tayininde kullanılmış, türlerin akrabalık ilişkileri konusunda yeterli ve güvenilir bir bilgi vermemektedir.

Elde edilen sonuçlar *Limnebius* türlerinin moleküler verilerle teşhisi açısından önemlidir. Ayrıca bu çalışma ülkemizde yaşayan *Limnebius* türleri için bir ilk niteliği taşımaktadır.

Gerek *Limnebius* gerekse diğer böcek türlerinin tamamının mitokondriyal COX 1 gen dizilim verilerinin veri bankasına yüklenerek daha sağlıklı tür teşhisi yapılabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca türlerin filogenetik ilişkilerinin daha sağlıklı belirlenmesinin yine bu yöntemin etkin bir şekilde kullanılmasıyla mümkün olacağını düşünüyoruz.

Bu yöntem tek başına tür teşhisinde yeterli ve güvenilir sonuçlar vermeyebilir. Ancak klasik taksonomi yöntemlerle yapılan teşhislerden emin olunmadığı durumlarda iyi bir yöntem olarak başvurulabileceği kanaatindeyiz.

Öte yandan, tür, cins ve familya düzeyinde evrimsel akrabalık ilişkilerin belirlenmesinde güvenilir bir yöntem olduğunu düşünüyoruz.

Bu çalışmanın sonuçları Morphological and molecular characterization of an endemic and six known Bilimneus (Hydraenidae: *Limnebius*) species from Turkey (Cilt: 27 Sayı: 2 Sayfa: 921-927 Yıl:2018) adlı makale olarak Fresenius Environmental Bulletin (SCI) dergisinde yayınlanmıştır. Çalışmada; 1'i Türkiye için endemik olan 7 *Limnebius* türünün hem klasik morfoloji, hem de DNA barkotlama yöntemiyle tür teşhisi yapıldığı, bu türlerin COI gen dizileriyle morfolojilerinin çok fazla örtüşmediği ifade edilmektedir (Şekil. 4.4). Bu farklılığın, veri bankasında *Limnebius* türleri için yeterli verinin bulunmadığından kaynaklandığı kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- Aravind, K., Ravikanth, G., Shaanker, R.U., Chandrashekara K, Kumar ARV, Ganeshaiah, K.N. 2007. DNA barcoding: An exercise in futility or utility? **Current Sciece**. 92(9):1213-1216.
- Ertorun, N., Jäch, M.A., Kasapoğlu, A. and Darılmaz, M.C., 2011, Checklist of the Hydraenidae (Coleoptera) of Turkey, with notes on distribution, **Zootaxa** 3055: 22–42 (2011)
- Ertuğrul, F. ve Koç, İ., 2012 Bitkilerde DNA Barkotları, **Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Derigisi**, 12 (2012) 011007 (53-57)
- Gülperçin N., 2013, Coleoptera (Insecta) Takımına Bağlı Böceklerin Filogenisi, BAÜ **Fen Bil. Enst. Dergisi**, Cilt 15(2) 29-39
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*, 270, 313–321.
- Jäch, M.A. 1993. Taxonomic revision of the Palearctic species of the genus *Limnebius* Leach, 1815 (Coleoptera: Hydraenidae). **Koleopterologische Rundschau** 63: 99–187.
- Kasapoğlu, A., 2002, Erzurum Artvin ve Rize illeri Hydraenidae (Polyhaga, Coleoptera) Türlerinin Sistematiik Yönden İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, sayfa 52 , Erzurum.
- Kazancı, N., 2008, Limnolojide Gelişmeler **E.Ü. Su Ürünleri Dergisi** 25 (4): 365–369
- Klug William, S., Cummings Michael, R. and Spencer Charlotte, A., 2009, Genetik Kavramlar, **Palme Yayıncılık**, s 301, Ankara
- Karaçay, B. 2013. Bilim ve Teknik Dergisi Ocak Sayısı: 52-55
- Keskin, E., ve Atar, H.H. 2013. DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama, **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 6 (2): 01-08
- Kahraman, Z., 2014. Hatay Yöresindeki Gündüz Kelebek (Rhopalocera) Çeşitliliğinin Mitokondriyal COX Alt Ünite 1 Geni Hedeflenerek Ortaya Çıkarılması, Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-172.
- Madigan, M.T., and Martinko, J., 2010, Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, **Palme Yayıncılık**: 532, 11. baskı, s;167, Ankara.
- Özdil, F., 2007. Mitokondriyel DNA PCR-rflp (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arılarının tanımlanması, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 1-141
- Passarge, E., 2006 Renkli Genetik Atlası 3. baskı **Nobel Tıp Kitapevleri**. Sayfa; 130
- Ratnasingham, S. and Hebert, P.D. N., 2007 Barcoding B. The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) **Molecular Ecology Notes**, 7, 355–364
- Stoeckle, MY., Hebert, PDN. 2008. Bar Code of Life. **Scientific American** 299: 82–88.
- Topdemir, H.G. 2014. Bilim ve Teknik Dergisi Mart Sayısı: 90-91
- Vernooy, R., Haribabu, E., Muller, M.R., Vogel, J.H. Hebert, PDN., Schindel, D.E., Shimura, J., Singer, G.A.C. 2010 PLoS Biology (www.plosbiology.org) July 2010, 8 (7): 1-5
- Kasapoglu, A., Ertorun, N., Mutlu, M.B., Atay, E., Cilli, S. 2018. Morphological and Molecular characterization of an endemic and six known *Bilimneus* (Hydraenidae: *Limnebius*) species from Turkey. **Fresenius Environmental Bulletin** 27 (2), 921-927.

Yeşiloğlu, M. 2014. Hatay Yöresindeki *Ochthebius* Türlerinin (Hydraenidae; Coleoptera) Çeşitliliğinin Mitokondriyal COX Alt Ünite 1 Geni Hedeflenerek Ortaya Çıkarılması. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-44, Hatay.



ÖZGEÇMİŞ

Sibel CİLLİ ÇEKMECE 1976 yılında Hatay Antakya'da doğdu.

İlköğrenimini Mehmet Akif Ersoy İlkokulu ve Samandağ Ortaokulu'nda lise öğrenimini Samandağ Lisesi'nde tamamladı.

Yüksek Öğrenimini Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat-Fakültesi Biyoloji Bölümü, açık öğretim Üniversitesi Halkla İlişkiler, Mustafa Kemal Üniversitesi Özel Eğitim Öğretmenliği olarak tamamladı.

Yüksek Lisansına Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Zooloji üzerine devam ediyor.

2004-2010 yılları arasında Başkent Üniversitesi Kültür Yayın Dergisi BÜTÜN DÜNYA 'da değişik konularda 15 yazısı yayınlanmıştır. "Hıdırbey Ağacı" ve "Dokuz Kişilik Kardeşler Ordusu" yazıları ilkokul Türkçe ders kitaplarında yayınlanmıştır.

2000- 2010 yılları arasında farklı okullarda Sınıf Öğretmenliği, sürücü kurslarında İlk Yardım Eğitmeni olarak çalıştı. 2014 yılında İslâhiye Cumhuriyet İlkokulu'nda Özel Eğitim Öğretmeni olarak kadro almıştır.

2015 yılında Esentepe Mehmet Akar İlkokulu'nda Özel Eğitim Öğretmeni olarak devam etti.

2016 yılında Besim Ömer Akalın MTAL İlk Yardım Eğitim Merkezi Mesul Müdürü olarak görevlendirilmiştir ve halen bu görevi yürütmektedir.

Evli, Bedir Emir ve Melike Zeynep adında 2 çocuk annesidir