



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI HYDRAENA (HYDRAENIDAE;
COLEOPTERA) TÜRLERİNİN MİTOKONDRIYAL COX
ALT ÜNİTE I GENİ KULANILARAK BELİRLENMESİ**

Dilara SÖNMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

OCAK-2015



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI HYDRAENA(HYDRAENIDAE; COLEOPTERA) TÜRLERİNİN MİTOKONDİYAL COX ALT ÜNİTE
I GENİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Dilara SÖNMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

Ocak-2015

T.C.

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI HYDRAENA (HYDRAENIDAE; COLEOPTERA) TÜRLERİNİN
MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE İ GENİ KULLANILARAK
BELİRLENMESİ**

**DİLARA SÖNMEZ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Doç.Dr.Ahmet KASAPOĞLU danışmanlığında hazırlanan bu tez 07/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ahmet KASAPOĞLU
Başkan

Doç. Dr. Gülşen ÇOPUR AKPINAR
Üye

Yrd. Doç .Dr. Erol ATAY
Üye

Kod No:

**Prof. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü**

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.

07.01.2015

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde 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.

Dilara SÖNMEZ

ÖZET

Bazı *Hydraena* (Coleptera; Hydraenidae) Türlerinin Mitokondriyal Cox Alt Ünite I Geni Kullanılarak Belirlenmesi

Türkiye’de yaşayan 11 *Hydraena* türünün (Hydraenidae; Coleoptera) Cytokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX) geninin DNA dizilimleri, PCR yöntemiyle elde edilmiştir.

İncelenen örnekler, Türkiye’nin farklı ekolojik özelliklere ve yüksekliklere sahip habitatlarda bulunan su birikintileri, göl, gölet, bataklık , vb yerlerinden 2013 - 2014 yılları arasında toplanmıştır. Tür teşhisi yapılan örnekler, -20 °C soğutucuda petri kapları içerisinde saklanmıştır. Adından COX 1 bölgesi everensel primer olarak kullanılıp PCR yoluyla çoğaltılmıştır ve bu çoğaltılan DNA bölgelerinin baz dizin analizleri yapılmıştır. Yapılan dizi analizleri filogenetik analizde kullanılmış ve sonuçlar 3 farklı algoritma ; maximum parsimony , maximum likelihood , Neighbor-joining programıyla değerlendirilmiş ve parsimonik ağacı oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar Uluslararası veri bankasına (National Center for Biotechnology Information=NCBI). kaydedilmiştir

Çalışmamızda DNA barkodlama tekniği ile morfolojik ve anatomik çalışmalara dayanan geleneksel yöntemler kıyaslanmış ve tür teşhisi için hangisinin daha kolay ve doğru sonuçlar verdiği tartışılmıştır.

2014, 63 sayfa

Anahtar kelimeler : *Hydraena* , Hydraenidae , Filogenetik Analiz , Türkiye

ABSTRACT

Determination of Some *Hydraena* Species (Coleoptera; Hydraenidae) Using Mitochondrial Cox Sub Unit I Gene

In this study, it has been obtained DNA sequences of Cytochrome C Oxidase subunit I (COX) genes of 11 Hydraenidae species living in Turkey by Using PCR method.

These species were collected from the different altitude and environmental properties freshwater habitat like lakes, stream, ponds in Turkey between 2013 and 2014. Collected samples were identified by using anatomical and morphological properties. After that samples were protected on plates in the freezer at the -20 °C. The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene used as universal primer and duplicated by PCR method and analysed of this duplicated DNA sequences.

DNA base sequences were used in phylogenetic analysis and were reviewed 3 different algorithm programmes which are ; maximum parsimony , maximum likelihood , Neighbor-joining, and composed parsimonious tree. Results added to the National Center for Biotechnology Information (NCBI)

At the end of the study, we compared two taxonomical identification method, morphological and DNA sequence analysis that which is easier and more reliable. All the results discussed briefly.

2014, 63 Pages.

Key Words: *Hydraena*, Hydraenidae, Phylogenetic analyses, Turkey.

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 sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın moleküler kısmının yürütülmesinde yardımlarından dolayı sayın Mustafa KOLUKIRIK'a, desteklerini esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Hayrettin OCAKVERDİ, Yrd.Doç.Dr. Erol ATAY'a teşekkür ederim

Yüksek lisans öğrenimim ve tüm hayatım boyunca destek olan Adnan SÖNMEZ, Buşra SÖNMEZ, Tamara SÖNMEZ, M. Musa SÖNMEZ ve Sinem ÖZTEMUR'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Coleopterler’in Genel Özellikleri.....	3
1.1.1 <i>Hydraena</i> Morfolojisi.	5
1.1.2. <i>Hydraena</i> Ekolojisi.....	6
1.2.DNA Barkodlama.....	8
1.2.1. Neden DNA Barkodlamaya İhtiyacımız var?.....	9
1.2.2. DNA Barkod Halk Kütüphanesi.....	10
1.2.3. Mitokondriyal DNA, Havva Teoremi.....	14
1.2.4. Neden Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite ! (COI) Geni?.....	16
1.2.5. DNA Barkodlama Uygulaması.....	21
1.2.6.mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar.....	22
1.2.7. DNA barkodlamanın sistematik ile ilişkisi veya DNA barkodlamanın Taksonomi Filogeni ve Populasyon Genetiği ile ilişkisi.....	24
1.2.7.1.. DNA barkodlama-taksonomi ilişkisi.....	24
1.2.7.2. DNA barkodlama - filogeni ilişkisi.....	25
1.2.7.3. DNA barkodlama - populasyon genetiği ilişkisi.....	26
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	27
3.MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. DNA İzolasyonu.....	30
3.2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR).....	30
3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz.....	32
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	34
4.1. <i>Hydraena</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	34
5. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI.....	40
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

H1:	<i>Hydraenariparia</i>
H2:	<i>Hydraena helena</i>
H3:	<i>Hydraena dentipalpis</i>
H4:	<i>Hydraena paganettii</i>
H5:	<i>Hydraena.integra</i>
H6:	<i>Hydraena. grata</i>
H7:	<i>Hydraena falcata</i>
H8:	<i>Hydraena grandis</i>
H9:	<i>Hydraena abbasigili</i>
H10:	<i>Hydraena anatolica</i>
H11:	<i>Hydraena antiochena</i>

1. GİRİŞ

Canlı nedir sorusu ile başlayan sınıflandırma çalışmaları mikroskobun icadından sonra hız kazandı. Sınıflandırma; yapay sınıflandırma ve türlerin doğal benzerlikleri ile bu benzerliklerin sürekliliklerine göre gruplandırılan doğal sınıflandırma olarak ikiye ayrılır.

“Önemli ilk yapay sınıflandırma Andrea Cesalpino (1524-1603) tarafından geliştirildi. Ona göre bitkilerin en önemli özelliği beslenmelerinden ve üremelerinden sorumlu olan bitkisel ruha sahip olmalarıdır. Malpighi ise her bir canlının solunum organının büyüklüğünün canlıların doğal sınıflandırmasında bir basamak oluşturduğunu, bu anlamda bitkilerin merdivenin en alt basamağında bulunduğunu savundu. Cesalpino’nun sınıflandırmasını en geniş şekliyle uygulayan ise Carl Linnaeus (1707-1778) oldu. Bitkileri yirmi dört ana sınıfa ayıran Linnaeus hayvanları da dört ayaklılar, kuşlar, amfibiler, balıklar, böcekler ve solucanlar olmak üzere sınıfladı ve minerallerin de yer altında gelişen canlı maddeler olduğunu düşündü” (Topdemir, 2014).

“Linnaeus’un geliştirdiği sınıflandırma 200 yılı aşkın süredir olduğu gibi kullanıldı ve hâlâ kullanılıyor. Linnaeus’un sınıflandırmasında bitkilerin, hayvanların ve minerallerin fiziksel görünüşleri ve yapıları çok önemliydi. Ancak Linnaeus’un sisteminin yetersiz olduğu durumlar da var. Çünkü bilim insanları henüz tanımlanmamış sekiz milyon civarında tür olduğunu tahmin ediyor. Bu kadar türün klasik yolla tanımlanması uzun bir süre alacak. Öte yandan maalesef her geçen gün bazı türler tamamen yok oluyor. Ayrıca taksonomi uzmanlarının sayısı da sınırlayıcı bir faktördür“ (Karaçay, 2013).

” Yapay sınıflandırmaya karşı çıkanların başında Georges Buffon (1707-1788) geliyordu. Hayvanlar arasındaki benzerlikleri, anatomik yapılarını karşılaştırarak inceleyen Buffon, tüm yapay sınıflandırmaların metafizik bir hata olduğunu savunuyordu. Farklı hayvan türleri arasındaki benzerlikleri ve yakınlıkları inceleyen Buffon, şimdi farklı görülen türlerin geçmişteki ortak atalardan türemiş olabileceğini ileri sürdü. O dönemde konuya ilgi gösteren önemli bilim insanlarından biri olan Lamarck (1744-1829), böcekleri örümceklerden ve kabuklulardan ayırarak yeniden düzenledi ve omurgalılar ve omurgasızlar ayrımını getirdi. Türlerin değişmezliği

fikrinin temelsiz olduğunu savunan Lamarck, türlerin değişime uğradığını belgelemek için seçerek yetiştirme örneklerini göz önüne aldı. Ona göre, canlılar çevrede meydana gelen değişimlerden etkilenir ve ona uyum göstermek üzere değişirler. Çünkü çevre şartlarının değişmesiyle bazı organlara ek görevler yüklenir, bu durum da o organın daha çok çalışmasına ve daha fazla gelişmesine neden olur” (Topdemir, 2014).

Teknolojik gelişmeler, DNA dizi analizleri yapılmasını ve daha net verilerin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Bu sonuç bize morfolojik teşhislerde yapılan hataları göstererek, bu hataların düzeltilmesini ve yeni türlerin teşhis edilmesini kolaylaştırdı. Her türün kendine özgü dizilimi ise eşsiz bir fırsat olarak ortaya çıkmıştır. Tıpkı bir barkot gibi çalışan bu yapı, türlerin birbirinden en küçük özelliklerine kadar ayrılmasını ve morfolojik taksonominin doğurduğu hataların azaltılmasını sağlamıştır. Moleküler sistematığın temelini oluşturan DNA barkodlama tekniği, morfolojik özelliklere dayanılarak yapılan teşhislerdeki olası hataların düzeltilmesinde ve filogenetik ilişkilerin çözümünde önemli bir çıkış açmıştır. Çalışmamızda Hydraenidae (Coleoptera; Insecta) familyası *Hydraena* cinsine ait 11 türün morfolojik özelliklerine bakılarak teşhisi yapıldı. Çalışılan 11 türün mtDNA COX I geni DNA analizine tabi tutuldu.

Organizmaların DNA’sı evrimsel süreçte çok sayıda değişime uğramıştır ve bu değişim filogenetik analizlerde daha oransal olarak yavaş değişime uğrayan ribozomal RNA baz alınarak analiz yapılır, tür içi ayrımlarda genel hayvanlarda mitokondriyal DNA’da bulunansitokrom c oksidazdan (cytochrome c oxidase 1 = *COI* veya *cox1*) yararlanılmaktadır. “Mitokondriyal sitokrom c oksidaz (cytochrome c oxidase 1 = *COI* veya *cox1*) gen dizisi hayvansal organizmalar için güncel olarak DNA barkodu olarak kullanılmaktadır. Fakat mitokondriyal *COI* geni, düşük nükleotid değişim oranından dolayı bitkilerde DNA barkot uygulamaları için çok uygun değildir. Bitki barkot çalışmalarında, özellikle kloroplast DNA bölgeleri (kodlama yapan veya yapmayan) çok uygun gözükmekte olup bunun yanında çekirdek ribozomal *ITS* bölgeleri de barkot çalışmalarında aday olarak kullanılmaktadır”(Ertuğrul and Koç, 2012).

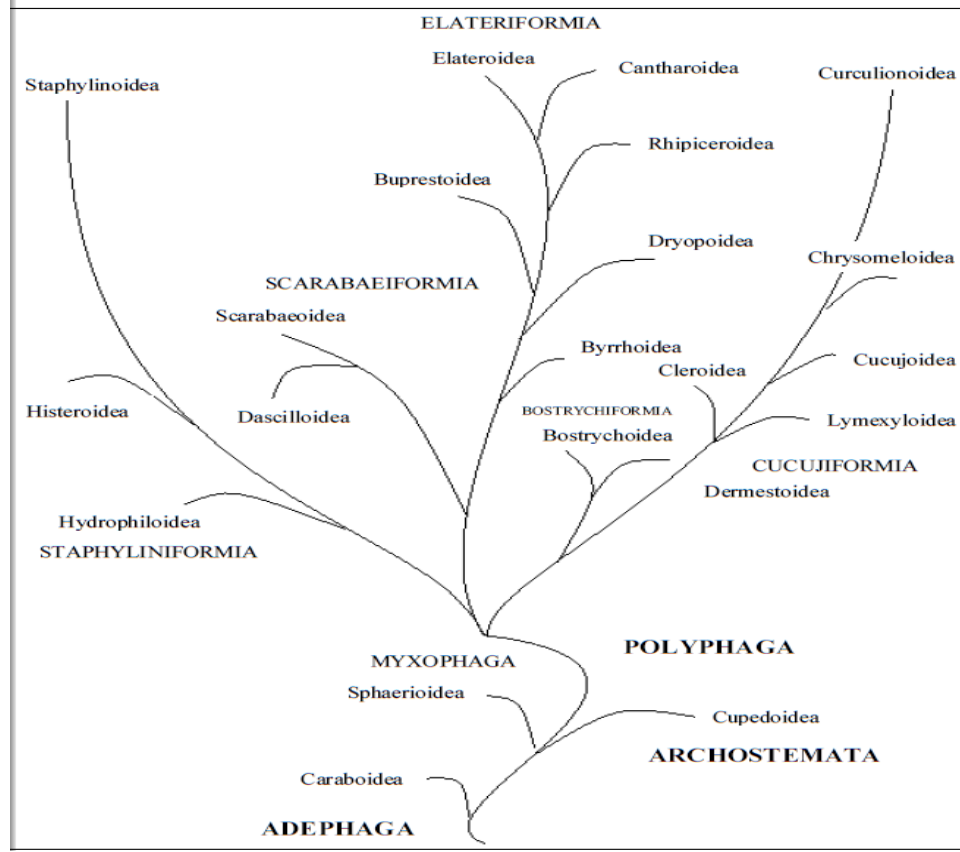
Bu çalışmada Türkiye’den toplanan *Hydraena* cinsine ait 11 türün erkek organlarına bakılarak önce morfolojik yöntemlerle tür teşhisi yapıldıktan sonra mitokondriyal *COX 1* geni ile tür tanımlanması yapılmıştır. Hedef DNA molekülleri

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

Amacımız ise *Hydraena* çeşitliliğini moleküler düzeyde araştırmaktır. Sonuçlar, Uluslararası DNA veri bankasına aktararak, dünyada oluşturulmaya çalışılan Biyolojik ve ekolojik çeşitliliğe veri oluşturmaktadır. Bununla birlikte yapılan moleküler analizlerle morfolojik analizler arasındaki hata ve doğruluk oranlarını bularak hangi yöntemin daha doğru ve verimli sonuçlara götürdüğünü bulmaktır. Alınan bulgular sonucu moleküler analiz yönteminde çıkabilecek hata ve riskleri kavramamıza, analiz esnasında dikkat etmemiz gereken hassas kısımları tanıtmak ve sonraki çalışmalara kılavuzluk etmektir.

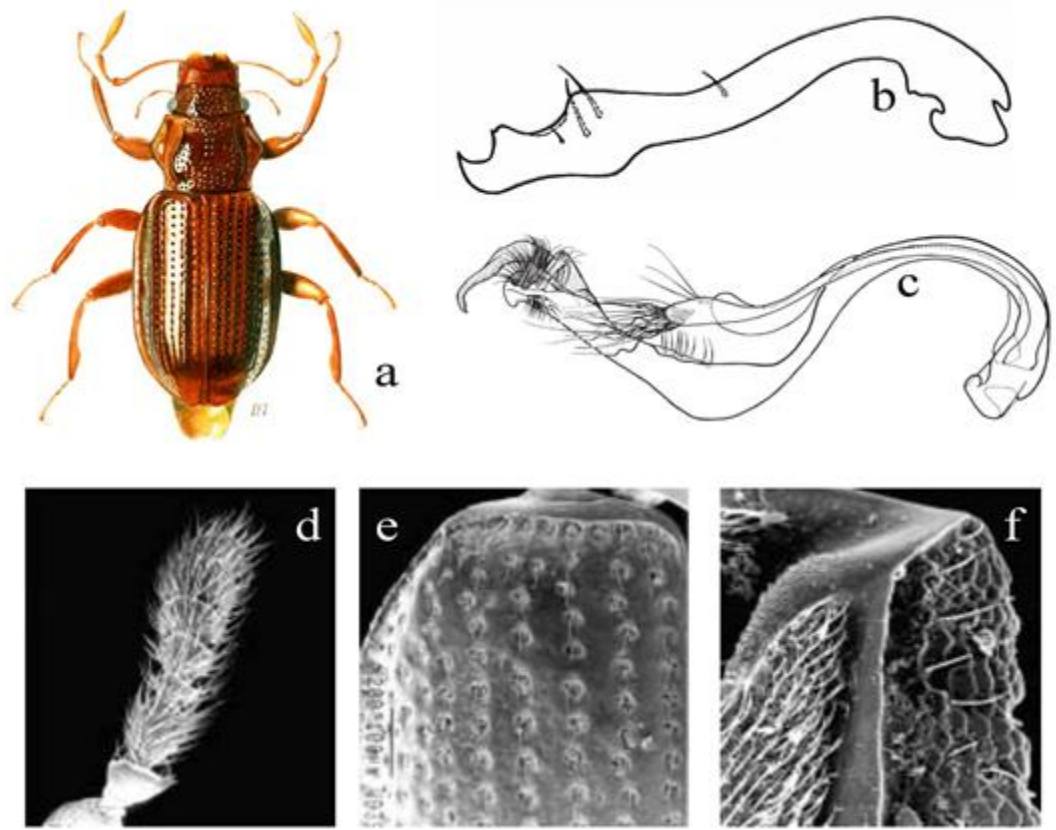
1.1 Coleopterlerin Genel Özellikleri

“Dünyada en fazla türe sahip oldukları için böceklerin evrimsel ilişkileri ve yaşamın evrimi anlamak için anahtar oldukları düşünülmektedir. Böceklerle ait ilk fosillere yaklaşık 400 milyon yıl önce Amerika’da Karbonifer’in ikinci katı olan Pennsylvanien katmanında, Avrupa’da ise İskoçya’nın Orta Devon katmanlarında rastlanmıştır. Coleoptera takımı dünyada eşsiz tür zenginliğine sahip bir takımdır. 350.000’in üzerinde tanıtımı yapılmış tür ile dünyadaki organizmalar içinde en çok türü içeren takım olarak gösterilmektedir. Coleoptera takımına bağlı Archostemata, Myxophaga, Adephaga ve Polyphaga alttakımları bulunmaktadır. Polyphaga ve Adephaga alttakımı Coleoptera takımına bağlı bütün böceklerin % 99’unu oluşturmaktadır” (Gülperçin, 2013).



Şekil 1. Coleoptera takımına ait filogeni diyagramı (GÜLPERÇİN, 2013).

”Coleoptera takımına bağlı böceklerle ilişkin en eski fosiller alt Permien döneme aittir. Bu dönemden sonra Coleoptera takımı birçok farklı forma ayrılarak çeşitlenme ve dallanma göstermiştir. Coleoptera takımına bağlı böcekleri diğer böceklerden ayıran en önemli özellik önkanatlarının sertleşerek elitra’ya dönüşmesidir. Elitra hem abdomenin üst yüzeyini hem de ince olan zarımsı alt kanadı korumakta ve uçuş sırasında alt kanatlardan ayrılıp açılarak uçuş faaliyetine yardımcı olmaktadır. Bunun dışında basit bir göğüs iskeleti ve az sayıda göğüs kaslarına sahip olmaları da ayırıcı bir özelliktir. Coleoptera takımına ait dört alttakım Permien ve Erken Trias Dönemde birbirlerinden ayrılmakta ve farklılaşmaktadır“ (Gülperçin, 2013).



Şekil 2 a) *H. bensaesirttan* (erkek birey)(b,c); Aedeagus (d). Anten (e), sol elitra(f) sol hypomeron (g) of *H. vedrasi* (“*Haenydra*” lineage; from Jäch *et al.* 2000). Hypomeral anten cepçik

1.1.1 *Hydraena* Morfolojisi

“*Hydraena* soyu nispeten gövde boyutları küçük (1,5-3.0 mm) ile karakterize olmuş vücut şekilleri dar ve basıktır. Birkaç türü kırmızımsı portakal veya soluk kahve rengi olsada genellikle koyu kahverengidirler. Maksillar dokunaçları , bacak ve antenleri genellikle soluk kırmızımsı kahverengi , yada nadiren , koyu kahverengidir. Pronotum genellikle konveks pronotal disk ile birlikte kordiform veya altıgen şeklindedir. Her Hydraenidae olduğu gibi, ovopositor yoktur. Erkek ikincil cinsel karakterler genellikle güçlü bacak morfolojisi ve her zaman daha uzun olan antenleri ve maksiller palp ile uzunluğu ifade edilmiştir . Dişi elitra tepe ve erkek genital şekli türleri tanınması için yararlıdır” (Trizzino *et al.* , 2013). “ Elitra , az düzensiz 11 çizgili , dış yan kenardak, noktalar uca doğru genişlemiş , matesternum daima birçift parlak plaklı , erkek genitaliası paramersizdir” (Kasapoğlu, 2002).

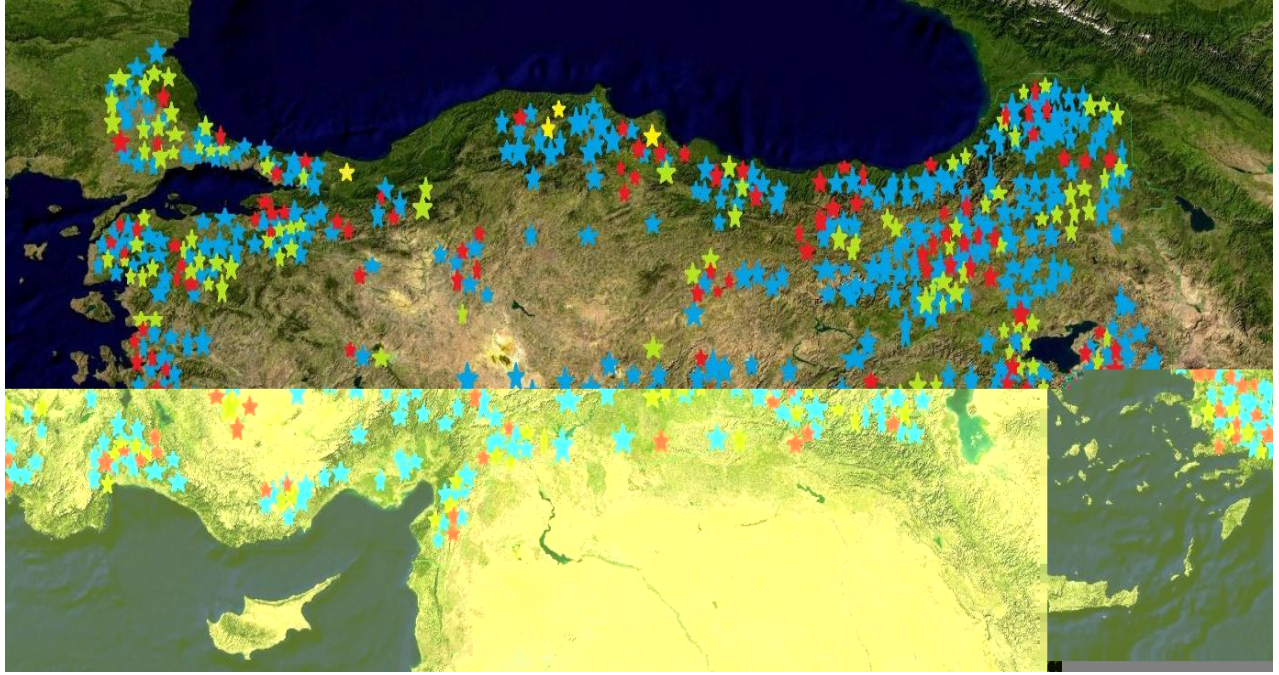
1.1.2 *Hydraena* Ekolojisi

“Hydraenid böcekler sucul veya yarıl suculdur. Erginlerin büyük kısmı suculdur ve genellikle akarsu , göl , gölet, kaynak suları , birikinti, bataklık şelale, su kenarlarındaki nemli kumlar vb. yerlerde yaşarlar. Türlerin ekolojik özellikleri ve habitatları cinslere göre farklılık göstermektedir. *Hydraena* türleri genellikle akarsu içlerindeki taşların altında, bazı *Ochthebius* türleri durgun veya yavaş akan sulardaki yosunlar arasında, *Limnebius* türleri ise akarsu kenarındaki kum veya yosunların arasında yaşarlar. Öte yandan farklı habitatlarda yaşayan türler de bilinmektedir. Tatlı sularda yaşayan bir familya olmasına karşın, bazı *Ochthebius* türleri deniz kenarlarındaki gölcüklerde, bazılarının çok tuzlu sularda, birkaç *Ochthebius* ile *Ochtheosus* cinsine ait türlerin tamamının ise karada yaşadığı bilinmektedir” (KASAPOĞLU , 2002).

Bu böceklerin toplanması, böcekler suda yaşadıkları ve vücut yapılarının küçük olmasından dolayı elek, damlalık veya çay süzgeci yardımıyla suyun karıştırılıp bulandırılması yöntemi ile yapılabilir.

“Hydraenidler, ılıman bölgelerde Nisan sonlarında veya Mayıs-Haziran aylarında yumurta bırakır. Tek tek bırakılan yumurtalar, genellikle vücudun arka kısmındaki memecikler tarafından salgılanan ipek benzeri iplikçikler tarafından sarılır. Yumurtayı saran bu ağ *Ochthebius*’ta olduğu gibi seyrek yada *Hydraena*’da olduğu gibi sıkı dokunmuş olabilir. Larvalar kampodeiform tiptedir. Su içindeki dal ve taşların altında bırakılan yumurtalar 8-10 gün sonra açılır. Larvalar kıyıya doğru çıkarlar. Genellikle ilkbahar sonlarında ve yazın başlarında yumurtadan çıkan larvalar, 2-3 aylık gelişme evresinden sonra erginleşirler. Hydraenidler genellikle karnivor veya herbivor olarak beslenirler. Hydraenidler aynı zamanda aktif uçucudur. Genellikle Mayıs-Haziran aylarında akşam saatlerine doğru uçarlar” (Kasapoğlu, 2002).

2002’de Kasapoğlu tarafından yapılan çalışmalar sonucu tüm Türkiye’de *Limnebius*’tan 19, *Ochthebius*’tan 60 ve *Hydraena*’dan ise 100 olmak üzere toplam 179 tür bulunurken 2011’de yaptığı çalışmada toplam tür sayısı artık 210 tür ve alt tür; 113 *Hydraena*, 21 *Limnebius*, 74 *Ochthebius* ve iki *Aulacochthebius* olduğunu belirlemiştir. Türlerin Türkiye haritasında bulundukları yerler şekil 1 de verilmiştir.



Şekil 3: ★: *Hydraena*, ★: *Limnebius*, ★: *Ochthebius*, ★: *Aulacochthebius*

Coleopterler sadece taksonomik açıdan önemli değildir. Yapılacak birçok limnoloji çalışmaları içinde bu veriler kaynak niteliğindedir. “Limnoloji, tüm iç su kaynaklarını inceleyen bir bilim dalıdır. Bu durumda, limnolojik çalışmaların kapsamında biyoloji, fizik, kimya, matematik, jeoloji, hidrojeoloji, meteoroloji veya diğer birçok konu yer almaktadır. Limnoloji, iç su kaynakları ile ilgili bilim dallarının şemsiyesi olarak kabul edilebilir. Ancak biyologların, tüm bu bilim dalları kapsamındaki çalışmalar ile elde edilen bulguları birleştirerek elde ettikleri bilgiler, sucül ekosistemlerin korunabilmesi için mutlaka gereklidir. Çünkü sucül ekosistemler, canlılık içerdikleri sürece devamlılık sağlayabilirler”(Kazancı, 2008). Bu sebepten Dolaylı Coleopterler başlıca taban büyük omurgasızlarından olup biyolojik indikatör görevi görerek bulundukları çevrenin ekolojisini ve kalitesini göstermekte. Eğer daha

önceden aynı bölge yine Coleopterler’ce çalışılmışsa geçmişten günümüze değişen çevreninde en önemli kanıt olup, gerek tür içi ve türler arası sayılarındaki artış azalışa bakılarak limonoglara bölgenin geçmiş hakkında da bilgi verebilir.

1.2. DNA Barkodlama

“ Birkaç yıl önce bir süpermarket koridorunda dolaşırken bizden biri olan (Hebert) mağaza ürünlerinin üzerindeki barkodlardaki kalın ve ince değişen çizgileri hayretle inceledi. Neden diye düşündü, neden dünya üzerindeki türleri tanımlamak için dört nükleotidlieşsiz DNA kısa sarmalını benzer şekilde kullanılamasın?”(Stoeckle MY, Hebert PDN ,2008).

“DNA dört harfli bir alfabeden oluştuğuna göre belli sayıdaki nükleotid dizilimi bir şekilde barkoda dönüştürülebilmeliydi. Bunun için türleri birbirinden ayırt edebilecek DNA dizilimine ihtiyaç vardı. Dizilimi türden türe fark eden bir gen olmalıydı. Eğer böyle bir dizilim bulunabilir ve barkoda dönüştürülebilirse bütün canlıları DNA dizilimlerine dayanarak birbirlerinden ayırmak mümkün 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 gen bölgesinin DNA barkodu kadar kullanışlı olabilmesi için üç özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler:

1. Tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması,
2. Geniş bir taksonomik ölçekten canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması,
3. DNA ekstraksiyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanabilir”(Keskin, 2013).

Her türden alınacak ve uygun sekansla oluşturulacak bu DNA barkodları, Dünya’nın her yerinden ulaşılabilecek bir sisteme yüklenecekti. “ Bu bilgiler örneğin adı, fotoğrafı ve tanımı ile ilgili bilgi verecek referans veritabanından, DNA barkod halk kütüphanesinden, anında ulaşılabilir olacaktır. Herkes, her yerde, tür tespiti verebilir ve

bazı canlılarının daha önce kimin tanımladığını öğrenebilecektir “(Stoeckle MY, Hebert PDN,2008).

“DNA barkod kullanımı ilk yayını ile (2003’te görülen ilk yayınla birlikte) kısa sürede birçok araştırmacı raporlarında bu tekniğin sağlamlığını bildirdi. Mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt ünite I (COI) geninin kısa bir dizini (~600 bp) kullanımı ile, tür seviyesine kadar kimlik başarı oranı kuşlar dahil olmak üzere bir çok organizmada %98-100 arasında bildirilmektedir. Bu barkodun kullanımıyla birkaç tür daha önce olarak geleneksel taksonomik yollarla analiz edildiğinden tek bir tür olarak düşünülmekteydi. 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.). “ DNA barkodlamanın potansiyel kullanıcıları sadece taksonomistler değildir. Bu yöntem adli bilimler, biyoteknoloji, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik ve tür ayrımı gibi birçok alanda kullanılabilecek bir araç olarak literatürdeki yerini almıştır” (Keskin, 2013).

1.2.1 Neden Barkodlamaya İhtiyacımız Var?

“ Morfoloji, bitki ve hayvanların şekil ve yapısı, etkin bilim adamlarınca göze çarpan becerilerine ve morfolojik kalıntılarına dayanarak Linnaean-tipi taksonomik tanımlama ile tanımlanmış 1,7 milyon tür vardır. Hayatın çeşitliliğini açıklamak için tek başına morfolojinin bir sınırı vardır. Yakın akraba türlerinin ayrımındaki nüanslar tanımlamak için o grup organizmada uzmanlaşmak çok karmaşıktır. Sonuç olarak, kalabalık taksonomi uzmanları ile tek bir biyoçeşitliliği tanımlamak için tanımlatıcı örneklerle ihtiyaç duyarlar. Uygun uzmanları bulma ve örnekleri dağıtma hem pahalı hem de zaman alıcı olabilir. Örneğin, biyologlar henüz tanımlanmamış 8 milyon türün değerlendirilmesi ve morfolojik karakterizasyon ansiklopedisinin genişlemesi, bilinen türlerle eşleşme yapılmasını daha zor hale getirmektedir. Ayrıca yumurta ve yetişkinlere göre daha bol bulunan çocuk formları hiçte ayırt edici özelliklere sahip değildir ve tespit edilmesi için, tabi mümkünse, olgunlaşmaya kadar büyütülmelidir. Bazı türler sadece

erkek bireylerle tanımlanmaktadır” (Stoeckle and Hebert, 2008). Örneğin, sadece erkek genital organıyla teşhisi yapılan bazı *Hydraena* türlerinin bu yolla dişi bireyleri de tanımlanabilir. “Kolay ve hızlı bir standart genetik metod, tüm bu sorunlara köprü olabilecek bir yöntem olarak kullanılabilir” (Stoeckle and Hebert, 2008).

“Açıkçası, bu DNA barkodlama 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 barkodlama tekniğinin 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, 2007).

1.2.2.DNA Barkod Halk Kütüphanesi

Tüm bu çalışmalar esnasından bu bilginin depolanacağı ve herkesin her yerden istediği zaman ulaşabileceği bir kütüphane de oluşturulmalıydı. “DNA barkodlama 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 MY, Hebert PDN, 2008). 2008’de Mark Stoeckle ve Paul Hebert’in Bilimsel Amerikalı (Scientific American) dergisinde çıkan makalelerindeki bu çağrıkamuoyunun, bazı devlet kurumlarının ve bilimsel toplulukların dikkatini çekti.” Yayına destek DNA barkodlama araştırmalarına büyük bir destek sağladı ve 50 ülkede 200 üyesi ile Yaşam Barkod Konsorsiyumu kurmak için (Consortium for the Barcode of Life, CBOL; <http://www.barcoding.si.edu>) kullanılan hibe 100 milyon doları bulmuştur. Kanada ulusal araştırma ağı, DNA barkod edinim için barkod kayıtlarını toplama, basitleştirme ve barkod kayıtlarının kütüphanesi 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 sağılığı yasaları ve yaban hayatının korunması uygulanması için, bu tekniğın birçok uygulamayı öngörmektedir.CBOL bu teknikte gıda yasalarını uygulama da biyoçeşitlilik temel araştırmalarından, karantina ve bitki yasaları sağılığı 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” (Vernoooy 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 ağılardan 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 sağılar” (Sujeevan et. al. ,2007). Bold Mayıs 2004 ten başlayarak günümüze kadar gelen çalışmaları sonucunda 337.538 tane hayvanlar için bakod 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 diğeri canlılardır.

Numune Kayıt: 4.164.080	Barkodlarıyla 3.102.635	Örnekler:	Barkodlarıyla Türler: 214,554
Hayvanlar: • <u>Acanthocephala</u> [430] • <u>Annelida</u> [36576] • <u>Arthropoda</u> [3136750] • <u>Brachiopoda</u> [136] • <u>Bryozoa</u> [1546] • <u>Chaetognatha</u> [384] • <u>Chordata</u> [409192] • <u>Cnidaria</u> [12036] • <u>Cycliophora</u> [329] • <u>Echinodermata</u> [30410] • <u>Echiura</u> [39] • <u>Gnathostomulida</u> [15] • <u>Hemichordata</u> [42] • <u>Mollusca</u> [92631] • <u>Nematoda</u> [8403] • <u>Nemertea</u> [1061] • <u>Onychophora</u> [596] • <u>Platyhelminthes</u> [10828] • <u>Porifera</u> [2451] • <u>Priapulida</u> [23] • <u>Rotifera</u> [8171] • <u>Sipuncula</u> [394] • <u>Tardigrada</u> [1693] • <u>Xenoturbellida</u> [4]		Bitkiler: • <u>Bryophyta</u> [2507] • <u>Chlorophyta</u> [9564] • <u>Lycopodiophyta</u> [571] • <u>Magnoliophyta</u> [200228] • <u>Pinophyta</u> [5064] • <u>Pteridophyta</u> [8340] • <u>Rhodophyta</u> [39359] Mantarlar: • <u>Ascomycota</u> [66901] • <u>Basidiomycota</u> [37273] • <u>Chytridiomycota</u> [231] • <u>Glomeromycota</u> [3043] • <u>Myxomycota</u> [208] • <u>Zygomycota</u> [2586] Protistalar: • <u>Chlorarachniophyta</u> [68] • <u>Ciliophora</u> [560] • <u>Heterokontophyta</u> [16477] • <u>Pyrrophycomphyta</u> [2176]	

Tablo1: BOLD (The Barcode of Life Data System) DNA dizi analizi yapılmış canlı grupları ve şubelerinde DNA barkodu bulunan canlı sayısı (http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home)

Türkiye’de ve bizim çalışmalarımızda da yararlandığımız DNA halk kütüphanelerinden biri olan Ulusal Biyoteknoloji bilgi merkezi(NCBI; the National Center for Biotechnology Information) ise “Senatör Claude Pepper’ın biyomedikal araştırma yürütülmesi için bilgisayarlı bilgi işleme yöntemlerinin önemini kabul etmesiyle, Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH)’le Ulusal Tıp Kütüphanesi (NLM)’nin bir bölümü olarak, 4 Kasım 1988 tarihinde Ulusal biyoteknoloji bilimi Merkezi (NCBI) 'ni kurulmasında sponsor oldu.NLM biyomedikal veritabanı oluşturmadaki tecrübelerinden dolayı seçildi çünkü NIH parçası olarak, üniversitenin dahil olduğu sayısal moleküler biyoloji araştırmaları kurabilirdi. NHI kolektif araştırma bileşenleri dünyanın en büyük biyomedikal araştırma tesisini kurdu” (NCBI, 2014). “ Kurulan bu şirketin amacı en çok görülen varyasyonlardan biri olan tek nükleotit polimorfizminden de yararlanarak oluşturulan katalogla büyük ölçekli genetik çalışmaları fonksiyonel ve farmako-genetik, nüfus genetiği ve evrimsel biyoloji, fiziksel haritalama ve konumsal klonlama çalışmaları kolaylaştırması bekleniyor”(Sherry et all.).“Şuan şirket tek nükleotid pomorfizi de olmak üzere protein ve mitekondiral DNA gibi birçok barkod yöntemiyle oluşturdukları kütüphaneleriyle hizmet vermektedir. Biz çalışmamızda NCBI’nin basit lokal hizalama arama aracını (BLAST; Basic Local Alignment Search Tool) kullandık. Bu araçta 5 tip hizalama yapılabilmekte ve bunlar, protein blast; protein veri tabanında girilen proteini aratarak , blastx; girilen proteini veri tabanında kullanılan transfer nükleotidlerde aratarak, tblastn; transfer nükleotidi veritabanında kullanılan proteinlerden aratarak, tblastx; transfer nükleotidiveri tabanındaki transfer nükleotidlere sorgulatarak ve bizim kullandığımız nucleotide blast (nükleotid blast); aranan bir nükleotidi veri tabanında kullanılan bir nükleotidle sorgulayarak çalışır“(NCBI, 2014).

DNA barkodlama ile biyoçeşitliliğin evrensel standartlarda kayıt altına alınması sadece taksonomik açıdan önemli olduğu kadarDNA barkodu alınıp kaydedilen canlıların habitatının yaşam kalitesine ve gıda ve ilaç sanayisine kadar bize geniş bir bilgi verebilir. “Canlı toplulukları, bir ekosistemin “hafızası” olarak da değerlendirilir. Çünkü fiziksel ve kimyasal değişkenler ölçüm yapılan andaki durumu belirtir, geçmiş

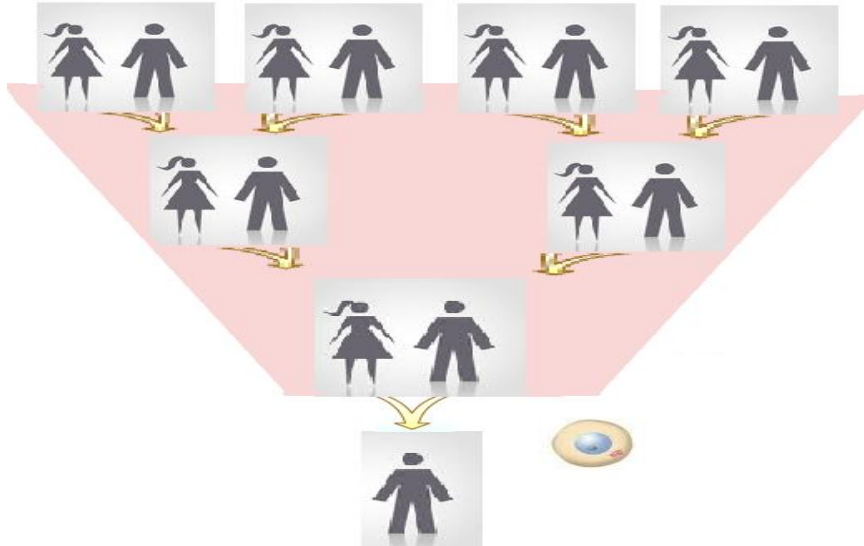
dönemlerdeki su kalitesi hakkında bilgi sağlamaz” (Kazancı N. 2012). Ancak DNA barkod çalışmalarına sayesinde, araştırılan bölgedeki türün barkoduna bakılarak hangi tarihte nerde bulunduğu ve durumunugöstererek araştırılan bölgede olup olmamasına bakılarak, bize bölgenin yaşam kalitesi yani ekosistem koşullarının değişip değişmediği hakkında gerekli bilgiyi gösterebilir. Buradanyola çıkan araştırmacılar canlı artık orda yaşamıyorsa değişen habitat koşullarının neye göre değiştiğini bularak varsa herhangi bir sorun çözüm arayışlarına girebilirler. DNA barkodlama çalışmasıyla belki de fark edilemeyecek bu değişim, hem kısa bir zamanda yapılırken hem de doğan sorunları daha çabuk keşfedip önlem alınabilmesini sağlamaktadır.

1.2.3. Mitokondriyal DNA, Havva Teoremi

DNA barkodlama çalışmalarında en uygun ve en mükemmelDNA’yı bulma çalışmaları birçok canlı için Mitokondriyal DNA’da son bulmaktadır. “Mitekondri semiotonom olarak, Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan ve kendi başına 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 10^3 - 10^4 mitokondri kopyası içerir” (Passarge, 2006). “Hayvan hücrelerinde sadece mitokondriyal DNA, bitki hücrelerinde ise hem mitokondriyal DNA ve hem dekloroplast DNA molekülleri ekstra kromozomal yapılar olarak bulunmaktadır. Sitoplazmik kalıtım materyalleri olarak da tanımlanan mtDNA ve cpDNA molekülleri anaya ait kalıtım modeline sahip olup yumurtanın sitoplazması vasıtasıyla generasyonlar boyunca aktarılmaktadır”(Özdil, 2007).Birçok canlı çekirdek DNA’sının yarısını anneden yarısını babadan alır. Mitokondriyal DNA ise dölleme sırasında sadece anne tarafından aktarıldığı için değişime daha kapalı bir DNA’dır. Buda evrim ve filogenetik araştırmalarda çekirdek DNA’sına göre daha yol göstericidir. Geçmişten günümüze tür göçlerini izleme ve dağılımlarının yapıldığı araştırmalarda daha doğru sonuçlar vermektedir. Anneden çocuğa geçen Mitokondriyal DNA ona annesinden, ona da annesinden kalarak böyle devam edip geriye gitmektedir. İnsanların var oluş tarihini araştırırken de kullanılan bu yöntem Havva teorisinin temelini oluşturmaktadır. “1987 yılı ocak ayında Kaliforniya Üniversitesi araştırmacılarından Allan Wilson ve çalışma arkadaşları Rebbecca Cann ve Mark Stoneking Nature dergisinde bir makale yayınladılar. Makale, şuanda dünya üzerinde yaşayan bütün

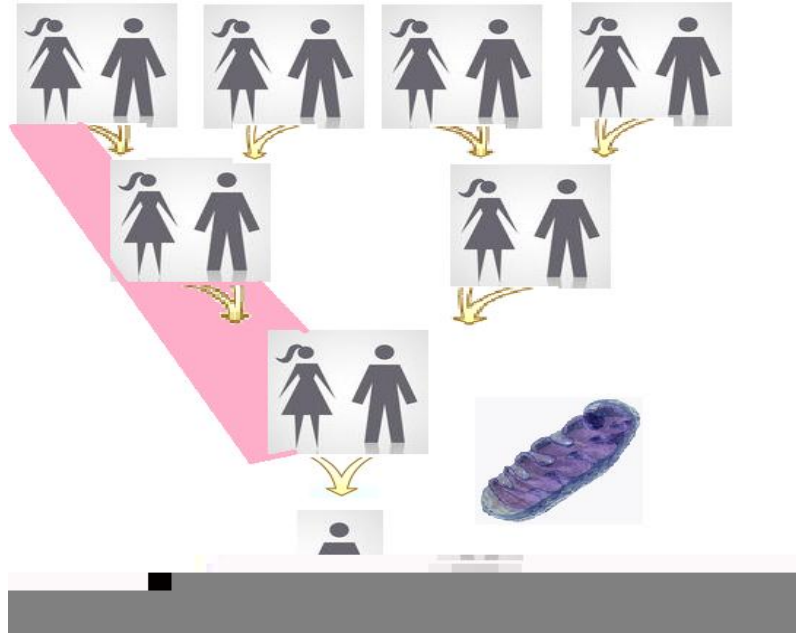
insanların genetik malzemesinin 200.000 yıl önce Afrika'da yaşamış olan tek bir

kadından geldiği sonucunu bildiriyordu. Haber anında günlük gazetelere de yansdı. Gazetelerden biri haberi, ilk kadın Havva'ya atıfta bulunarak “Hepimizin annesi-Bilim insanının Teorisi” başlığıyla vermişti. O günden sonra bu tez bilim çevresinde “Mitokondriyal Havva” olarak anılmaya başlandı” (Karaçay, 2010). “Mitokondriyal Havva; bundan 140.000 ve 290.000 yılları arasında yaşamış ve bugün var olan tüm mitokondri DNA’larını oluşturan atasal mitokondri DNA’sını taşıyan kadın” (Brown, 2009). “ Bu isimin nedeni, Wilson ve arkadaşlarının çalışmalarının mitokondri DNA’sı üzerinde yoğunlaşmış olmasıydı. Farklı ırklardan ve bölgelerden 147 kişinin mitokondri DNA’sının dizilimini belirlemiş ve birbirleriyle karşılaştırarak benzerliklerini ve farklılıklarını incelemişlerdi. Araştırmalarına temel oluşturan düşünce, dünyanın farklı bölgelerinde yaşayan, farklı ırklardan insanların DNA dizilimlerindeki benzerliklerin ve farklılıkların insan kökeni hakkında önemli ipuçları vereceğiydi. Eğer insanlar dünyanın farklı yörelerinde aynı anda ortaya çıktıysa, o zaman DNA dizilimlerinde gruplaşmalar olmalıydı. Örneğin, Afrika’da ortaya çıkmış olan grubun bu günkü çocuklarının DNA’ları birbirine daha yakın, ama örneğin Avusturalya insanların DNA’sından farklı olmalıydı. Sonuçta kaç farklı noktada insan türü ortaya çıkmışsa, DNA dizilimleri



arasındaki çeşitlilik de o kadar olmalıydı. Eğer tek bir köken söz konusu ise, DNA örnekleri dünyanın neresinden ve hangi ırktan gelirse gelsin büyük bir benzerlik göstermeliydi. Elde edilen sonuç ikinci senaryoyu doğruladı. Dünyada yaşayan hemen hemen her ırkı ve grubu temsil eden bu 147 kişilik grubun DNA’ları çok büyük bir benzerlik gösteriyordu. Bu sonuç bütün insanların ortak bir atadan geldiğinin kanıtıydı” (Karaçay, 2010).

Şekil 4 Nükleer DNA, tüm atalardan miras kalan



Şekil 5 Mitokondriyal DNA tek bir soydan miras gelen

Mitokondriyal DNA'nın kendini bu şekilde koruması nesillere rekombinasyona uğramadan düşük mutasyon riski ile taşınması sayesinde sadece antropologların değil taksonomistlerin de ilgisini çekerek DNA barkodlama sisteminin hedefi olmuştur. "Mutasyon olma sıklığı düşük olduğu için, mtDNA molekülünde meydana gelen genetik varyasyonun kaynağı şu şekilde özetlenebilir.

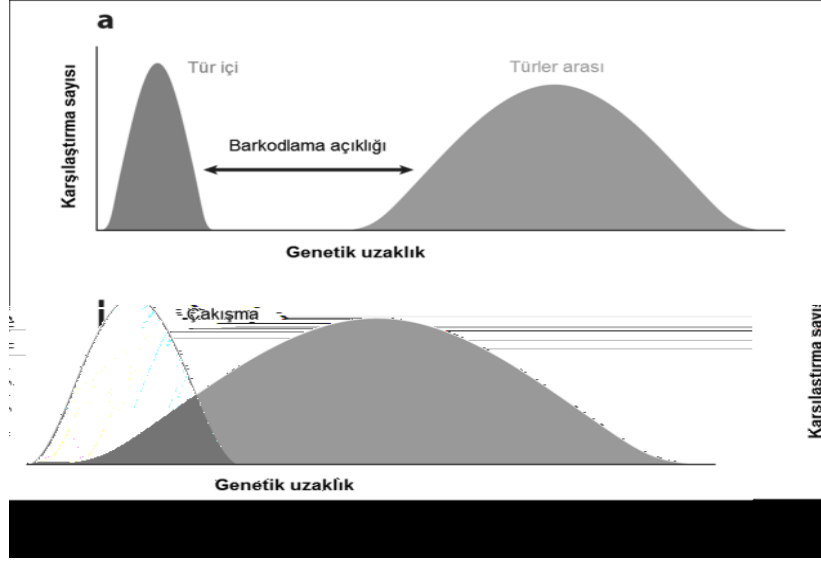
- a) nükleotid eksilmesi (deletion),
 - b) nükleotid ilave edilmesi (insertion),
 - c) nükleotid dönüşümleri (substitution),
 - d) belirli gen bölgelerinde DNA parçalarının farklı uzunluklarda olması ve
 - e) herhangi bir lokustaki nükleotid dizilimlerinde gözlenen çeşitli değişimler"
- (Özdil, 2007).

Tüm bu araştırmalar sonucu Mitokondriyal DNA'nın da daha spesifik bir parçası olan Mitokondriyal sitokrom C oksidaz alt ünite I (COI) geni birçok canlı için aranan barkod olmuştur.

1.2.4.Neden Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COI) Geni?

“Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt ünite I (COI) geninin yaklaşık 655 baz çiftlik küçük bir bölümü kullanılarak kuşlar, balıklar ve kelebekler gibi karmaşık gruplara ait birçok canlı türünde %98-100 seviyelerinde tanımlama başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kadar geniş ölçekte uygulama alanına sahip bu bölgenin ayırım gücünün temelinde nükleotid dizilerinde aynı anda meydana gelen değişikliklerdeki sıklık yer almaktadır” (Keskinve Atar, 2013).

“COI barkod bölgesinin, metazoan mitokondriyal genomu bakımından tür içerisinde %3’ten küçük, türler arasında ise ortalama %10 ila %25 arasında belirgin bir farklılık gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuş bir gerçektir. Günümüzde metazoan türler için kullanılan standart barkodun tanımı, COI geninin 5' ucundan 652-658 baz çiftlik bölgesi olarak ifade edilmektedir. Geçmişte yapılan birçok sistematik analiz çalışmasında kullanılan 12S rRNA ve 16S rRNA genleri, göstermiş oldukları yüksek insersiyon ve delesyon frekansı nedeniyle elde edilen dizilerin hizalanmasında ve karşılaştırılmasında büyük zorluklara neden olmuştur. Metazoan türlerin mitokondriyal genomlarında bulunan 13 protein kodlayan gen genellikle bu insersiyon ve delesyonları içermektedir. COI geninin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü, metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi ve birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilir bir filogenetik sinyale sahip olmasıdır. COI geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyonundaki nükleotidleri yüksek oranda substitüsyon göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek moleküler evrim hızına sahip olarak değerlendirilmektedirler. Bir başka önemli nokta da COI geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkân tanıyan ve coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda gerçekleşmesidir. COI geninin standart barkod geni olarak seçilmesindeki asıl neden, birden fazla tür için göstermiş olduğu belirgin ayırım gücü ve tür içi ile türler arasındaki uzaklığın çakışmadığı tipik varyasyon modelidir. Tür içi ve türler arası varyasyonda çakışma meydana gelmemesi “barkodlama açıklığı” olarak adlandırılmış ve barkod dizilerinin isabet ve güvenilirliğinde en önemli nokta olarak kabul edilmiştir (Şekil 1) “(Keskin ve Atar, 2013).



Şekil 6.”Tür içi ve türler arası genetik uzaklıkların varsayımsal dağılım frekansları. (a) tür içi varyasyon ve türler arası varyasyonun ayrı dağılımından doğan barkodlama açıklığı, (b) tür içi ve türler arası varyasyonun çakışan dağılımı sonucu barkodlama açıklığının bulunmaması”(Keskin ve Atar, 2013).

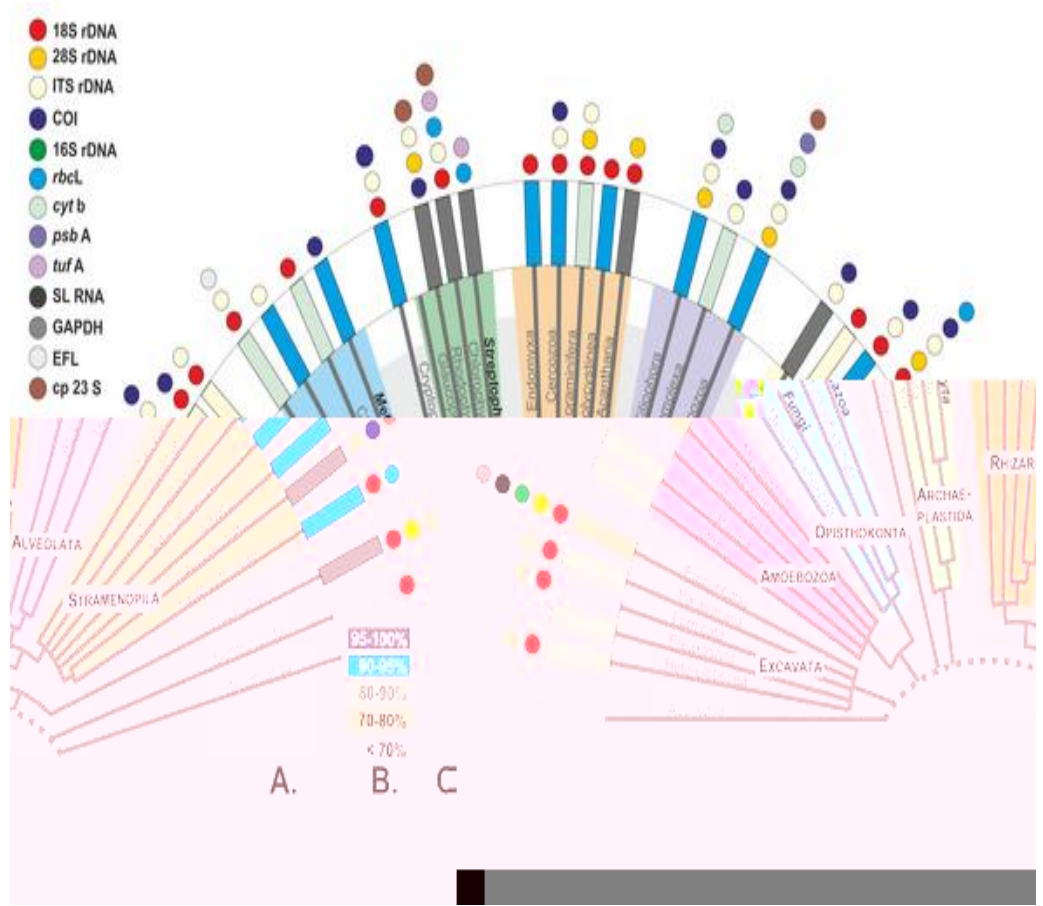
“Tüm bu özelliklerine rağmen *COI* geninin çözümleyemediği bazı canlı grupları da bulunmaktadır. Bunlara örnek, Porifera (süngerler), Ctenophora (taraklılar) ve Anthozoa (mercanlar) olup, bu gruplardaki mitokondriyalDNA evrimsel hızının diğer metazoan gruplara kıyasla 10-20 kat daha az olduğu ileri sürülmektedir. Dahası *COI* barkodlarından elde edilen verilerin bazı canlı gruplarında, yakın ilişkili türlerin güvenilir bir şekilde ayrımlarının gerçekleştirilmesinde yetersiz kaldığı da belirtilmektedir”(Keskin ve Atar, 2013).

“Belirtildiği gibi mtDNA molekülünde meydana gelen değişimler eklemeli olarak generasyonlar boyunca korunmakta ve dölden dölle aktarılmaktadır. Ancak heteroplazmik (heteroplasmy) yapının söz konusu olduğu beyaz mersin balığı (*Acipenser transmontanus*), midye (*mytilus*) ’nin kas dokusunda, meyve sinekleri (*Drosophila*) ve bazı hibrit fare hatları ile izogamik (isogamous) funguslarda teorik temeli henüz tam olarak ortaya konulmamakla birlikte, sitoplazmada bulunan farklı kaynaklardan gelen mtDNA molekülleri arasında parça değişimlerinin olduğunu bildiren araştırmalara da rastlanılmaktadır. Heteroplazmi (heteroplasmy), bir hücrede iki

ya da daha fazla kökene ait farklı mtDNA molekülünün aynı anda bulunması olarak ifade edilmektedir. Bu hücrelere sahip organizmalar da heteroplazmik organizmalar olarak tanımlanmaktadır” (Özdil, 2007).

“ Mitokondriyal sitokrom c oksidaz (cytochrome c oxidase 1 = *COI* veya *cox1*) gen dizisi hayvansal organizmalar için güncel olarak DNA barkodu olarak kullanılmaktadır. (Hebert *et al.* 2003). Fakat mitokondriyal *COI* geni, düşük nükleotid değişim oranından dolayı bitkilerde DNA barkot uygulamaları için çok uygun değildir. Doğal olarak bitki barkot kaynağı olarak plastid (cpDNA) ve çekirdek genomu (nrDNA) aday olarak ortaya çıkmaktadır“ (FİLİZ ve KOÇ, 2012).Yapılan çalışmalarsonucunda nükleer genomda bulunan ITS dizinin en uygun DNA barkodu olduğuna karar verilmiştir. “Amazon ağaçlarının tanımlanmasıyla ilgili barkot çalışmasında, plastid kodlama bölgelerinden *rbcLa*, *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *ycf5*; kodlama yapmayan bölgelerden *trnL*, *psbA-trnH* ve çekirdek bölgesi *ITS* dizileri kullanılmıştır. Yüksek kaliteli diziler (% 90 üzeri) *rpoC1*, *rbcLa*, *rpoB* ve *trnL* belirteçlerinden, en yüksek çeşitlilik oranları (polimorfizm) ise *ITS*, *psbA-trnH*, *trnL* ve *matK* bölgelerinden elde edilmiştir. Ayrıca, en kötü tür seviyesindeki ayırım gücü *rpoC1* plastid bölgesinden elde edilmiştir” (Filiz ve Koç, 2012).Çalışmalar kloroplast DNA’sının iyi sonuç vermemesi ve tür ayırım oranının %70’lerin altında olması nedeniyle kloroplast DNA bölgelerini evrensel DNA barkodu için uygun olmadığı kararını almıştır.

“Sonuç olarak bitki barkotlarının çok sayıda bölge içermeleri gerektiği öngörülmüştür Çekirdek *ITS* dizileri bitki barkotlarını desteklemekte kullanılan ve direkt dizilenmeye uygun seçeneklerin başında gelmektedir (Thomas, 2009). Tıbbi bitkilerle ilgili barkot çalışmasında, *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS2* ve *ITS1* bölgeleri kullanılarak 8557 tıbbi bitki DNA dizisi kullanılmıştır. *ITS2* verilerinin 6600’den fazla tür için uygun olduğu, özellikle çekirdek *ITS2* bölgesi çekirdek *ITS1* bölgesine oranla daha korunaklı ve çoğaltım ürünleri açısından daha tahmin edilebilir bilgiler sunduğu saptanmıştır. *ITS2* bölgesinin tıbbi bitkilerde evrensel ölçekte bir barkot olabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmüştür” (Filiz ve Koç, 2012).



Şekil 7.”Anaprotistansoyiçinsanatfilojenive barkodbelirteçlerineçerli durumu. (A) Ökaryotik yaşam için yeni bir filogeni (B) GenBank’tamevcut olan hersoy içindetümtürdeştürlerarasındaV418SrDNAgenetikbenzerliği(C) Bulunduğu grup spesifikbarkodkullanılır.Kesikli çizgiökaryothayatağacındakökkonumunuilişkinterreddütlerigösterir” (Pawlowsk et. al. , 2012).

1.2.5.DNA Barkodlama Uygulaması

“Barkodlama yolu ile tür tanımlanması genel olarak, incelenen örnekten elde edilen genomun standart bir kısmından elde edilmiş ve DNA barkodu adı verilen kısa DNA dizisinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Bilinmeyen tür örneklerinden elde edilen bu barkod dizileri, tanımlanması gerçekleştirilmiş ve veri tabanına kaydedilmiş barkodlar ile karşılaştırılır. Veri tabanında kayıtlı barkodlardan biri ile eşleşirse tür tanımlaması gerçekleşir. Eşleşme gerçekleşmediği takdirde, benzerlik oranlarına göre, kayıtlı türlere ilişkin yeni bir barkod kaydı olarak (haplotip veya coğrafik varyete) veya potansiyel yeni bir tür olarak değerlendirilir”(Keskin ve Atar, 2013).

“Tür seviyesinde biyosistematik tanımlamalarda birçok gen bölgesi kullanılmış fakat DNA barkodlama için evrensel bir standart oluşturulması fikri sonucunda daha öncede belirtildiği üzere, hayvanlar için *COI* geninin 5' ucundan 655 baz çiftlik bölgesi kabul görmüştür. Bu boyda bir dizi seçilerek konvansiyonel dizileme platformlarında tek seferde güvenle okunabilecek bir barkod oluşturulmuştur. DNA’da oluşan degradasyon sonucu 655 baz çiftlik bölgenin çoğaltılamayacağı durumlarda *COI* geninin daha kısa bölgeleri de (mini barkodlar) tür tanımlamada kullanılabilir. Bazı araştırmacılar, türlerin tanımlanmasında alternatif lokuslardan yararlanılabileceğini savunmaktadır. Örnek olarak, toprak nematodları ve benzer gruptaki canlıların tanımlanmasında *18S rDNA* dizilerinin kullanıldığı ve “DNA taksonomisi” adı verilen bir yöntem geliştirilmiştir. Fakat bu yaklaşımda, DNA barkodlamada olduğu gibi dizi analizi ile elde edilen genetik özelliğin Linnaeus taksonomisindeki türler ile eşleştirilmesi gibi bir amaç yoktur. Bu durumda da DNA taksonomisi yaklaşımı yalnızca detaylı taksonomik düzene sahip olmayan canlı gruplarında kullanılabilir olmaktadır. *COI* dizilerinin yeterli sayıda bulunmadığı durumlarda tür içerisinde ayırım yapabildiği tespit edilen veya ayırımı zor bir türün ortaya çıkarılmasında moleküler kanıt olarak kullanılabilen alternatif belirteçler de kullanılmıştır. Ayrıca bitkiler gibi bazı gruplarda *COI* tür seviyesinde ayırım yapabilecek hızda evrimleşmediğinden dolayı alternatif belirteçler kullanılmaktadır. DNA barkodlamanın farklı hayvan gruplarındaki etkinliğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [3, 7, 19, 21, 23]. Bu çalışmalar ile DNA barkodlaması gerçekleştirilen türlerin %95’inden fazlası için özgün bir *COI*

barkod dizisi elde edilmiş ve tür seviyesinde tanımlamalar düzenli bir şekilde yürütülmüştür. İlk gerçekleştirilen barkodlama çalışmaları örneklemelerin kısıtlı bir taksonomik ve coğrafik kapsamda gerçekleştirilmesi nedeniyle eleştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda tropikal ortamlarda bulunan türleşme bakımından zengin taksonlar ve belirli taksonomik gruplardaki türlerin tamamı hedef alınarak detaylı analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardaki asıl hızlanma, araştırma kuruluşları tarafından oluşturulan uluslararası bir birlik olan ve DNA barkodlamanın tür tanımlanmasında uluslararası bir standart olmasını destekleyen CBOL (Consortium for the Barcode of Life)'un kurulması ve DNA barkodları için küresel, çevrimiçi bir veri yönetim sistemi olan BOLD'un geliştirilmesi ile mümkün olmuştur”(Keskin ve Atar, 2013).

“Barkodlama çalışmaları genel olarak belirli taksonomik gruplardan örneklerin elde edilmesi (mümkünse morfolojik karakterler gibi klasik taksonomik yöntemler kullanılarak tanımlanması), DNA barkod dizilerinin (*COI* geninin 655 baz çiftlik kısmı) elde edilmesi ve diğer bilgiler ile bir araya getirilerek kataloglanması şeklinde yapılmaktadır. DNA barkod verilerinin analiz aşaması ise elde edilen nükleotid dizilerinin hizalanması ile başlar. Hizalanan diziler, kontrol amacı ile kodon analizinden geçirilir ve herhangi bir delesyon, insersiyon veya stop kodon oluşumu olup olmadığı tespit edilir. Ardından Kimura 2-parameter (K2P) modeline göre genetik uzaklık matrisi oluşturulur ve karşılaştırılan diğer türler ile ilişkisi neighbor-joining (NJ) yöntemine göre çizilen ağaçlar ile gösterilerek tür içi ve türler arası sonuçları değerlendirilebilmektedir”(Keskin ve Atar, 2013).

1.2.6 mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar

mtDNA analizlerinde karşılaşılan zorluklardan biri ve en önemlisi heteroplazmidir. Bilinen şekli ile mitokondriyal DNA'daki maternal kalıtım; homoplazmi (tüm hücre veya bireylerde tek tip mtDNA) ile sonuçlanır. Fakat nükleer psödogenlerin farklı çoğalmaları, paternal aktarımlar, somatik mutasyonlar ve tür çaprazlamaları heteroplazmiye (tüm hücre veya bireylerde birden fazla mitokondriyal DNA'nın karışımının bulunması) neden olabilmektedir” (Keskin ve Atar, 2013).Organizmada birden fazla mtDNA'nın bulunması mtDNA kullanılarak yapılan DNA barkodlama ve soyağacı çalışmalarını imkânsız kılmaktadır.Kalıtılan DNA

özelliklerinin maternal (anneye ait) mi, paternal (babaya ait) mı olduğu yoksa mutasyona uğramış hücrelerden biri olduğunu bulmak hem zahmetli hem de sonuca götürmede gereksiz bir risk ve zaman kaybı oluşturabilir.

“Türler arası hibridizasyon kuşkusuz barkodlama çalışmalarında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Hibridizasyon farklı kaynaklardan gelen nükleik asitlerin tamamlayıcı baz eşleşmesiyle birbirine tutunmasıdır”(Madigan and Martinko, 2010).“ Bilindiği gibi barkod geni olan *COI*, mitokondriyal bir gendir ve genellikle maternal olarak aktarılır. Bu sebepten ötürü hibrit bir canlı kaçınılmaz bir şekilde ve hatalı olarak maternal türle aynı tür olarak tanımlanacaktır. Eğer tanımlaması yapılacak türün hibritleşebilen türler arasında olduğu biliniyorsa ve doğru bir tanımlama yapmak isteniyorsa mutlaka DNA barkodlama ile birlikte bilinen türe özgü nükleer DNA allelleri de analiz edilmesi önerilmektedir. Eğer örnek gerçekten hibrit ise barkodlama sonucunda maternal tür belirlenecek, nükleer DNA dizisi yardımıyla da paternal tür ortaya çıkarılacaktır” (Keskin ve Atar, 2013).

Bir sonraki zorluk ise psödogenler (pseudogenes)“ adı verilen yalancı genlerdir.“Bu genler, genlerin duplike kopyalarının evrimsel artığıdır ve onları işlevsiz kılan mutasyonlara uğramışlardır. Bazı durumlarda, bu tür genlerin çok sayıda kopyalarına rastlanır” (Klug et. al. , 2009). “Bu psödogenler korunmuş evrensel primerler kullanıldığı zaman kolaylıkla mitokondriyal DNA ile birlikte amplifiye olabilmektedirler. Bu durum, nükleusta meydana gelen nükleotid substitüsyonlarının mitokondriyal genomdakiler kadar hızlı gerçekleşmemesi nedeniyle özellikle DNA barkodlama açısından sorun yaratmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda barkodlama sonuçlarının psödogenler nedeniyle yanlış değerlendirilmesinin önüne geçen analiz yöntemlerinin de geliştirilmiş olduğu ifade edilmektedir” (Keskin ve Atar, 2013).

Bir başka zorluk ise arşivlenmiş örneklerden DNA ekstraksiyonunu elde etmektir. Örnekler bir yerden başka bir uzak yere götürülürken veya daha sonra araştırılmak için saklanır ve saklanırken bozulmaması için formalin içine bırakılır.” pH dengesi ayarlanmamış formalinin hızlı asidifikasyonunun arşivlenmiş örneklerden zaten zor olan DNA ekstraksiyonunu bir kat daha zorlaştırdığı belirtilmektedir. Bilinenin aksine, dokuların pH dengesi ayarlanmış formalin içerisinde uzun zaman saklanması moleküler

analizde kullanılmalarına bir engel oluşturmamaktadır. Formalin içerisinde saklanmış dokulardan DNA ekstraksiyonuna yönelik birçok protokol bulunmakta, dahası formalin içerisinde saklanmış zooplankton ve balık örneklerinden elde edilmiş DNA barkodlarına da literatürde rastlanmaktadır. Mevcut sorunun aşılmasına yönelik yeni protokoller geliştirilmekle beraber, moleküler analizde kullanılacak dokuların saklanması yine de en uygun yöntem olarak etanol içerisinde veya dondurularak saklanması gösterilmektedir” (Keskin ve Atar, 2013).

” Canlıların *COI* dizilerine ilişkin kayıtların NCBI GenBank veri tabanında hızla artması sayesinde bu canlıların karşılaştırmalı tanımlanmasında kaynak oluşturacak kullanışlı ve detaylı bir kütüphane meydana gelmiş ve bu kütüphane gün geçtikçe de büyümektedir. Fakat dikkatli bir şekilde incelendiğinde GenBank veri tabanında taksonomik tanımlamanın yanlış yapıldığı, DNA dizisinin uygun bir şekilde kontrol edilmediği (dizinin yanlış hizalanması, stop kodonların oluşması, okuma çerçevesindeki insersiyon ve delesyonlar), bilinmeyen psödogenler içeren ve mikrobiyal kontaminasyonlara maruz kalmış birçok hatalı diziye de rastlandığı da ifade edilmektedir. Bu hatalı dizilerin ancak belirli taksonların karşılaştırmalı olarak incelenmesi ile tespit edilebildiği vurgulanmaktadır” (Keskin ve Atar, 2013).

1.2.7. DNA barkodlamanın sistematik ile ilişkisi veya DNA Barkodlamanın Taksonomi, Filogeni ve Populasyon Genetiği ile İlişkisi

1.2.7.1 DNA barkodlama-taksonomi ilişkisi

“Taksonomik çalışmalarla birlikte yürütülen DNA barkodlamanın, örneklerin tür seviyesinde tanımlanmalarında sağladığı faydalar ne kadar büyük olsa da, barkodlama hiçbir zaman kapsamlı taksonomik analizin yerini alacak bir uygulama olarak görülmemelidir. Bilinmeyen bir örnek barkod veri tabanından bir tür ile eşleşme sağlamaz ise, bu bilinmeyen örneğe ait barkod dizisi onun yeni bir tür olarak değerlendirilmesini sağlamaz. Aksine bu örnekler kapsamlı bir taksonomik analize tabi tutulurlar. Bu tanımlanamayan örneklerin klasik taksonomik yöntemler çerçevesinde değerlendirilmesi, barkodlama analizinden çok daha uzun sürse de yeni bir türün ortaya çıkarılmasında daha yüksek bir potansiyele sahiptir. Detaylı olarak çalışılmamış taksonomik gruplarda gerçekleştirilen çalışmalarda, klasik taksonomik çalışma öncesinde gerçekleştirilecek DNA barkodlama çalışması ile örneklerin hızla genetik

olarak farklı gruplara ayrılması sağlanabilir ve taksonomik çalışmanın iş yükü azaltılabilir. Yeni türlerin teşhisi ve tanımlanması en nihayetinde kapsamlı bir taksonomik çalışma ile gerçekleştirilse de, DNA barkodlama bu süreci belirgin bir biçimde hızlandırmakta ve kolaylaştırmaktadır. Genellikle morfolojik ve ekolojik verilerin toplanmasını da gerektiren klasik taksonomik çalışma yöntemleri, farklı taksonomik gruplara göre değişkenlik gösterirken (örneğin kuşlarla balıkların taksonomik tanımlanması farklı yöntem ve tecrübe gerektirir), barkodlama analizi çok geniş canlı grupları için (örneğin tüm hayvan taksonları) hemen hemen standart hale getirilmiştir“(Keskin ve Atar, 2013).

1.2.7.2.DNA barkodlama - filogeni ilişkisi

“DNA dizisi verilerinin işin içine girmesiyle filogenetik çalışmalarda son yirmi yılda çok önemli bir gelişme yaşanmış ve farklı canlı gruplarına yönelik geniş ölçekli projelerin sayısında artış görülmüştür. Moleküler filogeni temelli bir projede öncelikle analiz edilecek hedef grubun ölçeğinin (örneğin familya) belirlenmesi, hedef grubu temsil edecek taksonların belirlenmesi, DNA dizisi bilgilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturtulmasında en uygun yöntemin belirlenmesi (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian analizi vb.) gerekmektedir. Bu işlemler detaylı olarak farklı çalışmalarda anlatılmakla beraber güçlü bir şekilde desteklenebilen filogenetik ağaçların oluşturulmasında lokusların ve hedef grubu temsil edecek taksonların seçimi çok önemlidir. Kısa bir zaman öncesine kadar hedef gen seçiminde dizi analizinde sıkıntı yaratmayan özellikte dizilere sahip olan ve evrensel primerler ile çoğaltılabilen ribozomal genler tercih edilmekteydi. Fakat günümüzde, mevcut teknolojik gelişmeler ışığında daha stratejik gen seçimleri mümkün hale gelmiştir. Dolayısıyla, son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalardaki filogenetik analizlerde farklı genomik kısımlardan (örneğin nükleus, mitokondri veya kloroplast), birden fazla lokustan, toplamda birkaç kilobaz uzunluğunda DNA dizileri elde edilmektedir. Böylece farklı taksonomik seviyelerden elde edilen filogenetik çözünürlüğün artırılması sağlanmakta ve tek bir gene spesifik hataların önüne geçilebilmektedir“(Keskin ve Atar, 2013).

“Bir başka gözden kaçırılan nokta ise takson örneklemelerine, lokus seçimine gösterildiği kadar özen gösterilmemesidir. Fakat takson örneklemelerinin artırılması dal uzunluklarının kısılmasını ve homoplasi sayısının azalmasını sağlayarak doğru

filogenetik ağacın oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. Aksi takdirde dal uzunlukları ve homoplaside görülecek artış, yanlış bir filogeni oluşturulması ile sonuçlanabilir. Birçok araştırmacı filogeninin çözünürlüğünü artırmak için daha fazla gen eklemektense daha fazla takson eklemenin çok daha faydalı olduğunu savunmaktadır. Veri setine daha fazla takson eklemek analize yardımcı olmakla beraber analizler sırasında hesaplamaya ilişkin faktörler nedeniyle analiz edilebilecek takson sayısı sınırlı olduğundan eklenecek taksonların seçimi iyice önem kazanmaktadır. Bu sınırlayıcı nedenlerden ötürü araştırmacılar, yüksek sayıda takson içeren filogenetik veri setleriyle (örneğin yüzlerce tür) çalışırken daha bulgusal ve basit analitik yöntemlerden yararlanmaktadırlar. Her ne kadar barkod kütüphaneleri ile moleküler filogenetik veri setleri benzerlikler gösterebilir de (her ikisi de canlı gruplarına ilişkin DNA dizi bilgisi içermektedir), DNA barkodları genellikle evrimsel ilişkileri derinlemesine çözümleyebilecek yeterlilikte filogenetik sinyale sahip değildirler. DNA barkodlama çalışmaları, filogeni oluşturma çalışmalarına takson seçiminde yardımcı olarak katkıda bulunabilmektedir. DNA barkodları hem tür tanımlamada hem de ayrımı zor veya yeni türlerin ortaya çıkarılması noktasında etkili olduğundan, kapsamlı filogenetik analiz gerektiren taksonların belirlenmesinde kullanılabilecek bir moleküler araçtır” (Keskin ve Atar, 2013).

1.2.7.3. DNA barkodlama - populasyon genetiği ilişkisi

“Biyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılan araçlar ve uygulamalar biyolojinin iki önemli dalı tarafından geliştirilmiştir. Bunlar moleküler filogenetik ve populasyon genetiğidir. Bu bilim dalları canlılar arasındaki ilişkilerin farklı seviyelerine odaklanmıştır. Moleküler filogenetik çalışmalarda genellikle canlı grupları arasındaki daha derin evrimsel ilişkiler üzerine yoğunlaşırlarken, populasyon genetiği çalışmalarında tek bir türün kendi içindeki ve farklı populasyonları arasındaki varyasyon hedef alınmaktadır. Bu bağlamda, DNA barkodlama türler bakımından kapsamlı bir içeriğe sahipken, birbirleriyle ilişkilerinden çok tanımlanmalarına odaklanarak iki disiplinin ortasında bir yerde kendine yer bulmaktadır. Bilinenin aksine, DNA barkodlama tür içi genetik farklılıkların ortaya çıkarıldığı populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve tür içi genetik varyasyonu tespit etmekte çok başarılı bir genetik belirteç olarak kabul edilmektedir. Özellikle balık türleri üzerinde yoğunlaşan çalışmalarda DNA barkodlamanın populasyon genetiği çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabileceği elde edilen sonuçlar ile ortaya koyulmuştur. Avustralya’dan

toplamda 207 balık türünün COI geninin DNA dizisini analiz eden araştırmacılar ortalama tür içi K2P uzaklığını %0,39 olarak hesaplamışlardır. Araştırmacılar, bu çalışmadan elde edilen sonuçların COI geninin barkodlanmasının balıklarda türlerin ve tür içi farklı popülasyonların tanımlanmasında kullanılabileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir“(Keskin ve Atar, 2013).

2 ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çalışmamızda kullanılan 11 *Hydraena* türü önce erkek organlarına göre morfolojik olarak teşhis edilmiş daha sonra mitokondriyal Cox alt ünite 1 geni kullanılarak moleküler olarak tanımlanmış ve iki tanımlama sonucu çıkan veriler karşılaştırılmıştır. Daha sonra DNA barkodlama için kullanılan moleküler analiz sonuçları DNA veri tabanındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Birçok organizma üzerinde ve çeşitli dallarda DNA barkodlama yöntemi kullanılan, moleküler filogenetik ve moleküler taksonomi tez çalışmalarından bazıları bu bölümde verilmiştir.

KESKiN (2007), yüksek lisans tez çalışmasında Mullidae familyası üzerinde çalışmıştır. “Bu çalışmada Akdeniz, Ege Denizi, Marmara Denizi ve Karadeniz’den elde edilen *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus pori*, *Upeneus moluccensis* türleri ile *Mullus barbatus ponticus* alt türü, morfolojik olarak sınıflandırılmış; 16S rRNA, CytB, 12S rRNA ve CO II bölgeleri PCR tekniği ile çoğaltılarak, dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizleri sonucunda 16S rRNA bölgesinden filogenetik olarak anlam taşıyan veri elde edilemediğinden, bu bölge filogenetik analiz aşamasında çalışmadan çıkarılmıştır. CytB, 12S rRNA ve CO II bölgelerinin dizi analizleri sonucu elde edilen veri, MEGA4 programı kullanılarak, farklı metotlarla analiz edilmiş ve bu dört tür ile bir alt tür arasındaki genetik yakınlık ortaya koyulmuştur. Araştırma sonunda elde edilen veriler, daha önce Mullidae ailesine ait türlerde dizi analizi yapılmamış CO II bölgesinin nükleotit kompozisyonu hakkında detaylı bilgiler vermektedir. Ayrıca alt tür olarak kabul edilen *Mullus barbatus ponticus*’un, farklı denizlerden elde edilen *Mullus barbatus* türleri ile olan genetik yakınlığı, dizi analizi kullanılarak ilk defa bu çalışma ile ortaya koyulmuştur” (KESKiN, 2007).

Kahraman (2014), tez çalışmasında Hatay bölgesindeki 71 gündüz kelebeği (Rhopalocera) türünü Cytokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX 1) geninin DNA dizilimlerini moleküler analizler sonucu elde etmiş ve daha sonra bunları filogenetik

analizler sonucunda da elde ettiği verilerle bir araya getirerek filogenetik bir soy ağaç çıkarmak için 3 farklı algoritma; maximum parsimony, maximum likelihood, Neighbor-joining programlarını kullanmıştır. 71 türün akrabalıklarını gösteren soy ağaçları düzenlemiş ve ayrıca 71 kelebek türünün Mitokondriyal COX 1 gen dizilerini tür tayini amacıyla Gen bankasında karşılaştırılmasını yapmıştır. Gen Bankasında %100 benzeşmeyen 49 tür Bankanın veri tabanına yeni türler olarak kaydedilmiştir. Çalışmasında COX I geni türlerin akrabalık ilişkisini göstermenin yanı sıra tür ayrımında kullanılmıştır. Çalışma Hatay ilindeki kelebeklerin moleküler düzeyde ayrımı konusunda yapılan ilk çalışma olmuştur.

MONIZ ve KACZMARSKA (2009) yayınladıkları makalelerinde diatomların barkodlanması çalışmaları için uygun bir marker olup olmadığı hakkında bir çalışma yaptılar. Bu çalışma için seçilen 3 marker, COI geni (430 bp) , küçük ribozomal atlbirimi (1600 bp) ve 5.8S+ITS-2 (300-400 bp) gen bölgeleri test edildi. Test edilen 3 belirtecten COX I hayvan fillumlarını ayırırken hizalamadaki kolaylık ve %95 ten daha fazla ayrım sağlamaktadır. Ancak ITS-2 ikincil transkript yapısı üzerinde yapılan araştırmalar ve gelişmeler, 5.8S+ITS-2 fragmanı diatomlar için güçlü bir DNA barkod olarak ortaya çıkmıştır. Kolayca çoğaltılabilir ve sadece küçük bir kısmı bile çok yakın türleri ayırabilmektedir.

Filiz ve Koç (2012), araştırma makalelerinde DNA barkodlanmasındaen genel kullanılan Mitokondriyal genomda bulunan COX 1 geninin bitkilerde nükleotid değişim oranının düşük olmasından dolayı uygun olmadığının belirtmiş. Yaptığı araştırmalar sonucu bitkilerde DNA barkodlamada bitkiler için genel bir gen arama çalışmalarını derleyip en sonunda çekirdek bölgesi ITS dizilerinin bitki barkodlama çalışmaları için dahaideal bir diziye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Cebeci (2006), Gıda İzlenebilirliğinde Bilgi Teknolojileri bildirisinde genetik izlenebilirlikten bahsetmiş ve bu yöntemin yararlarına şöyle değinmiştir.”Genetik izlenebilirlik ürünün genetik türü, çeşidi, kaynağında genetik olarak modifiye edilmiş organizma (GMO) veya madde veya girdi/bileşen (tohum, fide, sperm, embryo vb) kullanılıp kullanılmadığını ortaya koyar. Girdi izlenebilirliği üretimde kullanılan tohum, gübre, kimyasal ilaçlar, sulama suyu, toprak yapısı, hayvan, hayvan yemi, katkı maddeleri gibi her türlü girdinin sağlandığı yer ve özellikleri gibi bilgilerin

izlenebilirliğini sağlamak amacındadır. Hastalık ve kalıntı izlenebilirliği gıdaya bulaşabilme ihtimali olan patojenik bakteri, virüs, mantar vb izlemeyi hedefler.” (Cebeci, 2006)

Keskin ve Atar (2013), derleme makalelerinde DNA barkodlama hakkında geniş çaplı bir araştırma yaparak, tekniğin tüm yönleriyle ele almışlardır. Çalışma sonucunda barkodlama esnasında yaşanan zorlukları göstermiş, DNA barkodlamada gelinen son durum hakkında bilgi vermişlerdir. DNA barkodlama tekniğinin avantajlarını göstererek biyoçeşitliliği korumak, ayrıca satışa sürülen ürünlerin kontrol edilmesi ve tabiki değişen ekosistem şartlarında türlerin güvenilir bir şekilde kayıt altına alınması gerektiğini vurgulayarak tekniğin kullanılmasını yaygınlaştırmak amacıyla bu çalışmalarını sunmuşlardır

Erturun ve arkadaşları (2011), araştırma makalelerinde Türkiye’nin 4 bölgesinde yaptıkları çalışma ve araştırmalarda Hydraenidae ailesinin kontrol listesinin yapmışlardır. Bu bölgeler Karadeniz, Ege, Marmara ve Akdeniz Bölgeleri içindedir. Kontrol listesi 210 tür olup, bunların 113’ü *Hydraena* Kugelann, 74 ü *Ochthebius* Leach, 21’i *Limnebius* Leach ve ikisi *Aulacochthebius* Leach’tır. Çalışmada her ailenin türleri Türkiye haritası üzerinde gösterilmiştir.

3 MATERYAL VE METOD

Bu çalışmadaki amaç Türkiye’de bulunan 11 *Hydraenat* türünü kullanarak DNA barkodlama tekniği uygulamasıyla moleküler tür teşhisi ve morfolojik tür teşhisi yaparak sonuçları karşılaştırmak ve çıkan sonuçları dayanarak filogenetik ağaç oluşturmak ve türlerin çeşitliğini belirlemektir.

3.1. DNA İzolasyonu

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

1. 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.
2. Numunenin homojenizatörde 2 dk, 6000 rpm’de homojenizasyonundan sonra 95°C’de 10 dk inkübe edilmiştir.
3. 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.
4. Karışım DNA Kolonu’na eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Elde edilen DNA -20°C’de saklanmıştır.

3.2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR)

PCR için kullanılan primerler *Hydraena* cinslerinin 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.

<i>Hydraena</i> COI Genleri	
Organizma	DataBank No
<i>Hydraena cordiformis</i>	HE970837.1
<i>Hydraena alia</i>	HE970868.1
<i>Hydraena truncata</i>	HQ425809.1
<i>Hydraena gracilis</i>	HM588398.1
<i>Hydraena iberica</i>	HM588406.1
<i>Hydraena catalonica</i>	HE970871.1
<i>Hydraena exasperata</i>	HE970849.1
<i>Hydraena intermedia</i>	HE970841.1
<i>Hydraena cordiformis</i>	HE970837.1
<i>Hydraena fontana</i>	HM588390.1

Tablo 2. Primer Tasarımında Kullanılan COI Gen Dizilimlerinin DNA Data Bankası Ulaşım Numaraları

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 3’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.

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 µl		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	35	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
<i>Ön İnkübasyon</i>				
95		00:10:00	4,8	–
<i>Çoğalma</i>				
95		00:00:20	4,8	–
55		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
<i>Erime Eğrisi</i>				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
<i>Soğuma</i>				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

Tablo 3 Q-PCR Sıcaklık Profilleri

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 ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Hydraena* Dizi Analizi Sonuçları

Elde edilen diziler EK-I’de verilmiştir. 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 4’te verilmiştir.

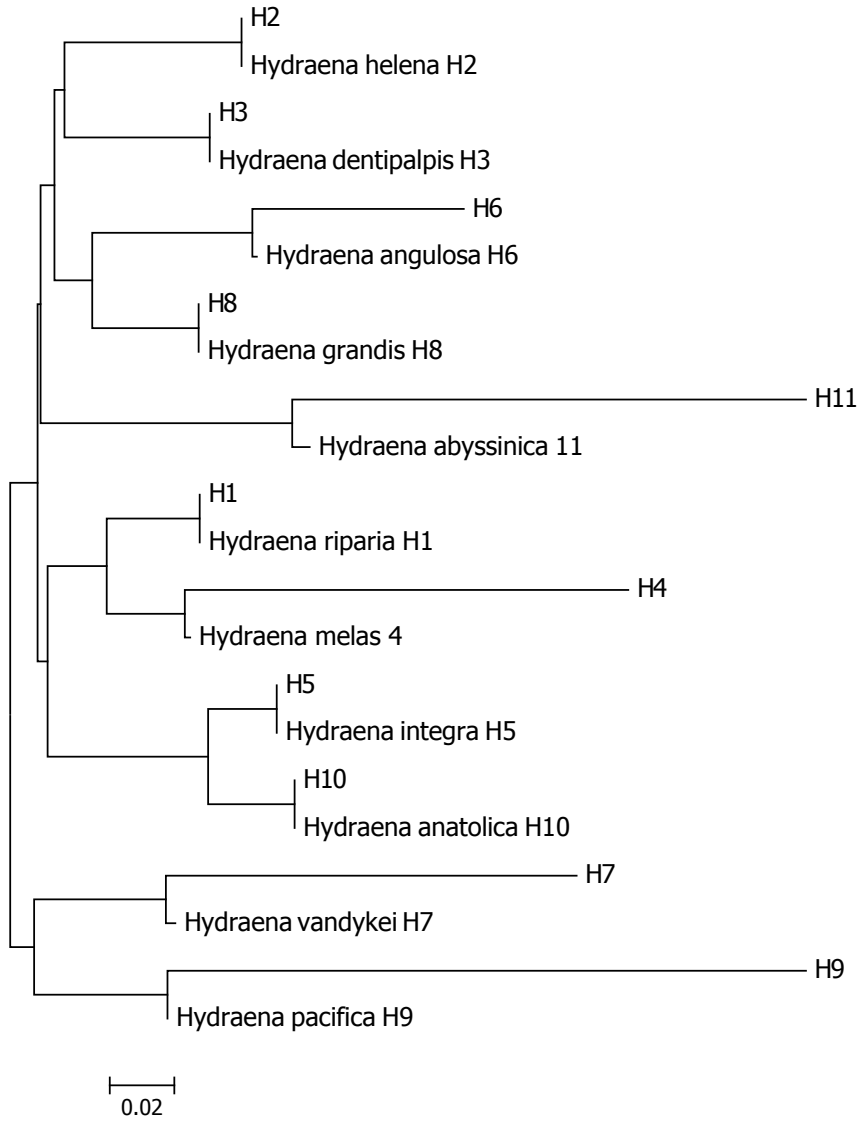
No	Morfolojik Tahmin	DNA Data Bankası En Benzer COI Gen Dizisi			Filogenetik Tahmin
		Databank No	Organizma-Gen	Benzerlik	
H1	<i>Hydraena riparia</i>	HQ165421.1	<i>Hydraena riparia</i>	644/644 (100%)	<i>Hydraena riparia</i>
H2	<i>Hydraena helena</i>	HE970861.1	<i>Hydraena helena</i>	419/419 (100%)	<i>Hydraena helena</i>
H3	<i>Hydraena dentipalpis</i>	HM588380.1	<i>Hydraena dentipalpis</i>	644/644 (100%)	<i>Hydraena dentipalpis</i>
H4	<i>Hydraena paganettii</i>	HE970834.1	<i>Hydraena melas</i>	593/656 (90%)	<i>Hydraena spp.</i>
H5	<i>Hydraena integra</i>	HM588392.1	<i>Hydraena integra</i>	644/644 (100%)	<i>Hydraena integra</i>
H6	<i>Hydraena grata</i>	HE970821.1	<i>Hydraena angulosa</i>	596/631 (94%)	<i>Hydraena spp.</i>
H7	<i>Hydraena falcata</i>	HE970820.1	<i>Hydraena vandykei</i>	594/656 (91%)	<i>Hydraena spp.</i>
H8	<i>Hydraena grandis</i>	HE970848.1	<i>Hydraena grandis</i>	644/644 (100%)	<i>Hydraena grandis</i>
H9	<i>Hydraena abbasigili</i>	HE970816.1	<i>Hydraena pacifica</i>	561/643 (87%)	<i>Hydraena spp.</i>
H10	<i>Hydraena anatolica</i>	HM588395.1	<i>Hydraena anatolica</i>	644/644 (100%)	<i>Hydraena anatolica</i>
H11	<i>Hydraena antiochena</i>	HE970817.1	<i>Hydraena abyssinica</i>	578/656 (88%)	<i>Hydraena spp.</i>

Tablo 4. Morfolojik ve Filogenetik Analiz Tür Tahminleri

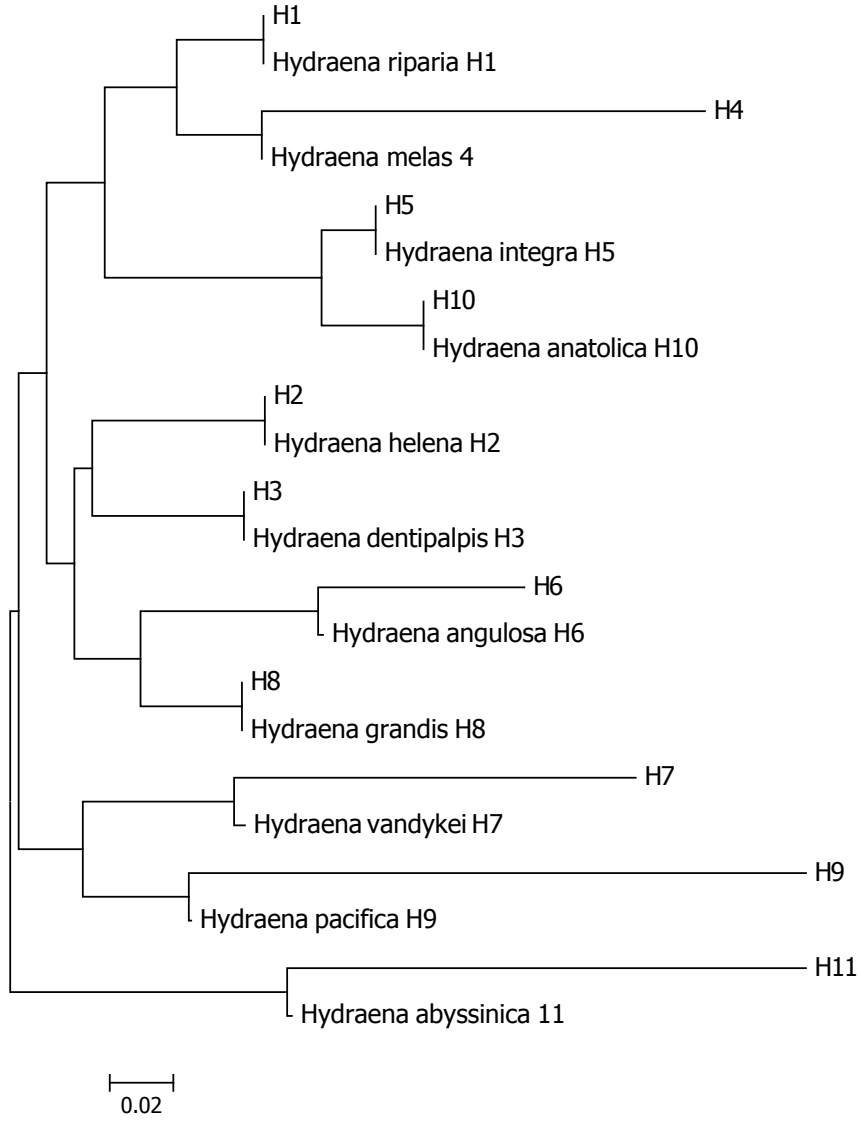
Bu çalışmada elde edilen ve aşağıda verilen diziler ile, bu dizilerin DNA data bankasında en çok benzediği dizilerin karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 8-11’de verilmiştir.

	Latince Adı	Familyası	Uzunluk	Eşlenen Baz	Toplam Baz	Benzerlik Yüzdesi %	Sekans ID (DNA databank kodu)	Benzediği Organizmanın Latince Adı.
H1	<i>Hydraena ripari</i>	Hydraenidae	820	644	644	%100	HQ165421.1	<i>Hydraena ripari</i>
H2	<i>H. helena</i>	Hydraenidae	826	416	416	%100	HE970861.1	<i>Hydraena helena</i>
H3	<i>H. dentipalpis</i>	Hydraenidae	826	644	644	%100	HM588380.1	<i>Hydraena dentipalpis</i>
H4	<i>H. paganetti</i>	Hydraenidae	826	589	652	%90	HE970795.1	<i>Hydraena pachyptera</i>
			795	587	652	%90	HE970834.1	<i>Hydraena melas</i>
H5	<i>H. integra</i>	Hydraenidae	826	645	645	%100	HM588392.1	<i>Hydraena integra</i>
H6	<i>H. grata</i>	Hydraenidae	826	596	631	%94	HE970821.1	<i>Hydraena angulosa</i>
H7	<i>H. falcata</i>	Hydraenidae	826	594	656	%91	HE970820.1	<i>Hydraena vandykei</i>
H8	<i>H. grandis</i>	Hydraenidae	826	644	644	%100	HE970848.1	<i>Hydraena grandis</i>
H9	<i>H. abbasigili</i>	Hydraenidae	826	559	641	%87	HE970816.1	<i>Hydraena pacifica</i>
H10	<i>H. anatolica</i>	Hydraenidae	826	644	644	%100	HM588395.1	<i>Hydraena anatolica</i>
H11	<i>H. antiochena</i>	Hydraenidae	826	578	656	%88	HE970817.1	<i>Hydraena anatolica</i>

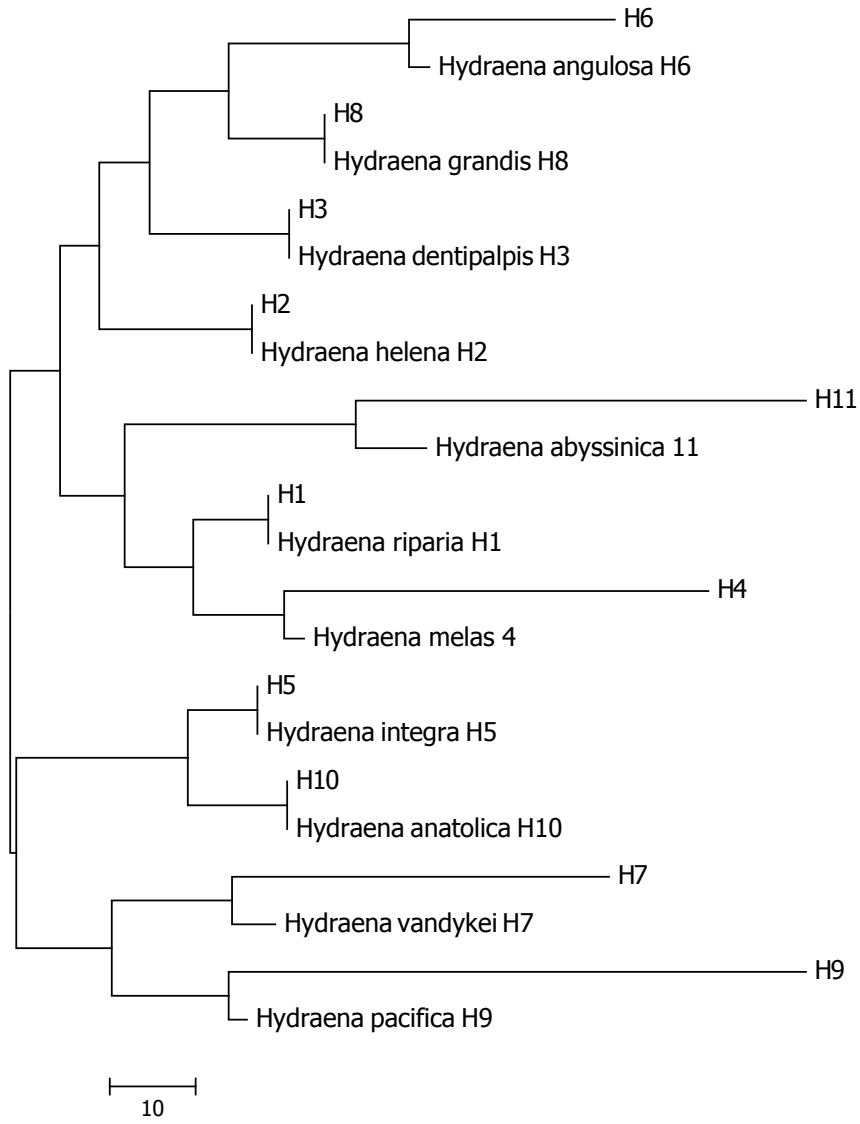
Tablo 5 Hydraenidae ailesine ait 11 türün DNA dizi analizi sonucunda NCBI’da çıkan sonuçlarının karşılaştırılması



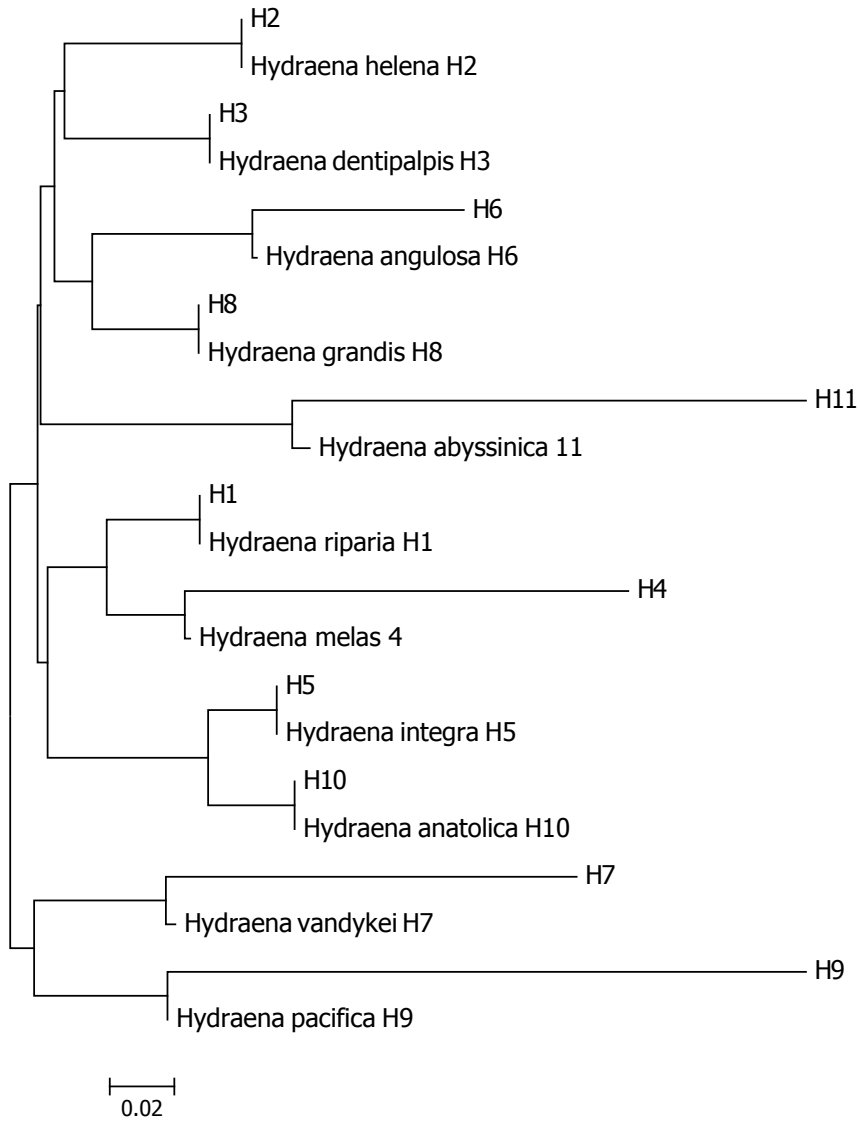
Şekil 8. Neighbor-joining ağacı



Şekil 9. Maximum likelihood ağacı



Şekil 10. Maximum parsimony ağacı



Şekil 11. Minimum evolution ağacı

5. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

Aşağıda yapılan deneyler sonucunda canlıların COX 1 gen dizilimi ve NCI kayıtlarında bulunan örneklerle uyuşmasına göre yapılan dizi analizi verilmiştir.

>H1

```
GAGGAAAAAAGGAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCAATAATTG
CAATTGGGTTATTAGGATT

TG TAGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTATGGATGTAGACACTCGA
GCTTATTTTACTTCAGCT

ACAATAATTATTGCTGTTCTACAGGAATTA AAAATTTT TAGTTGGTTAGCTA
CACTTCATGGTACTCAAT

TAAATTACTCTCCAGCAATATTATGGGCCTTAGGATTTGTTTTTTTATTTACT
GTAGGTGGATTA ACTGG

GGTTATTTTAGCTAATTCTTCAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTACG
TAGTAGCTCATTTTCAT

TATGTTTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGATTTGTTTCATTG
ATTCCTTTATTTACAG

GACTTATGTTAAATAATTTTATTTAAAAATTCAATTTATCACAATATTTATT
GGAGTAAATTTAACATT

CTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGGGATACCCCGTCGTTATTCAGAT
TATCCAGATGCCTATACA

ACTTGAAATATTGTTTCATCAATTGGATCTTTAATTTCTTTAATTTCAATAAT
TATATTTTAAATAATTA

TTTGAGAAAGATTT
```

>H2

```
GAGGTAAAAAGGAACTTTTGGAACTCTAGGTATAATTTATGCCATAATTG
CAATTGGTTTACTAGGATT

TG TAGTATGGGCTCATCATATGTTTACTGTAGGAATAGATGTAGATACTCGA
GCTTATTTTACTTCAGCT

ACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTA AAAATTTT TAGTTGACTAGCTA
CTCTACATGGTACTCAAT

TAAATTATTCTCCTGCAATACTATGAGCTTTGGGTTTTGTATTTTATTTACT
GTGGGGGGGATTAACAGG
```

AGTTATTTTAGCTAATTCTTCCATTGACATTATTTTACATGATACTTATTATG
TGGTAGCTCATTTCCAT

TATGTTTTATCAATAGGGGCCGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTTTCATTG
ATTCCTTTGTTTACA

>H3

GAGGAAAAAAGAACTTTTGGAACTTTAGGTATAATTTATGCAATAATTG
CAATTGGTTTACTGGGATT

TGTAGTATGAGCTCATCATATATTCAGTGTAGGAATAGACGTTGATACTCGA
GCTTATTTTACTTCAGCT

ACAATAATTATTGCAGTTCCTACAGGAATTAATAATTTTATGTTGATTAGCAA
CTCTTCATGGCACTCAAT

TAAATTATTCTCCGGCAATATTATGAGCATTAGGGTTTGTTTTTTTATTTACT
GTGGGGGGGATTAACCGG

AGTTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTACTATG
TAGTAGCCCATTTTCAT

TATGTTTTATCAATAGGTGCTGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTACATTG
ATTCCCTTTATTTACTG

GACTTATATTAAATAATTTTATTTAAAAATTCAATTTATTACAATATTTATT
GGGGTAAATTTAACATT

TTTTCCACAACATTTTTTAGGGTTAAGAGGAATACCTCGCCGTTATTCAGAT
TATCCTGATGCTTATACA

ACTTGAAATATCATTTTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTTTAATCTCAATAAT
TATATTTTAAATAATTA

TTTGAGAAAGATTT

>H4

GAGGAAAAAAGGAACTTTTGGTACTTTAGGACCTAGACATGCTATAATTG
CAATTGGATTATTAGGATT

TGTAGTATGAGCTCATCATATACCTAGACATGGAATGGATGTAGACACTCG
GGCTTATTTTACTTCAGCT

ACAATAATTATTGCTGTTTCTACCTAGACATGAATTTTATGTTGATTAGCGA
CACTCCATGGGACTCAAT

TAAACTATTCTCCCTAGACATGATGAGCTTTAGGATTTGTTTTTTTATTTACT
GTAGGAGGACCTAGACA

TGTTATTTTAGCTAATTCTTCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTATC
CTAGACATGATTTTCAT

TATGTCTTATCAATAGGAGCTGTATTTGCCATTATAGCTGGATTTGTTTCATTC
CTAGACATGATTTACAG

GACTTATATTAACCTAGACATGCTTAAAAATCCAATTTATCACAATATTTAT
TGGGGTAAACTTAACATT

TTTTCCTCAACATTTTTTTAGGACCTAGACATGTACCGCGCCGTTATTCAGATT
ACCCTGATGCTTACACA

ACTTGAAATATTATTTTCATCAATTGGATCCCTAATTTCTTTAATTTTCATCAAT
TATATTTTAAATAATTA

TTTGAGAAAGATTT

>H5

AGAGGAAAAAAGGAAACATTTGGTACATTAGGAATAATTTATGCAATAATT
GCAATTGGTTTATTAGGATTTG

TAGTATGGGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGACACTCGAGC
TTATTTTACATCAGCAAC

AATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTCAGGTGATTAGCTACA
TTGCATGGTACTCAATTA

AATTACTCCCCTGCTATAATATGATCTTTAGGGTTTGTATTTTTATTTACTGT
TGGAGGTTTAAACAGGAG

TAATTCCTAGCTAATTCCTCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTATGTA
GTAGCTCATTTTCATTA

TGTATTGTCTATGGGAGCTGTTTTTGCTATTATAGCAGGTTTTGTTTCATTGAT
TTCCATTATTTACAGGA

TTAATGTAAATAATTTTTATTTAAAAATTCAATTTATTACTATATTCATTGG
TGTAATCTAACATTTT

TCCCACAACATTTTTTTAGGATTAAGAGGAATACCTCGACGTTATTCAGATTA
TCCTGATGCTTATAACAAC

CTGAAATATTATCTCATCAATTGGATCCTTAATTTCTTTAATTTCTATAATTA
TATTTTAAATAATTATT

TGAGAAAGATTT

>H6

GAAACTTCTGGAGCTTTAGGAATAATCTACGCAATAATTGCAATCGTATTAC
TTGGGTTAG

TAGTTTGAGCTCATCATATATATACTGTTCTGAATAGATGTAGATACCCGGGC
TTATTCTACTTCAGCTAC

AATAATTAGTGCTGTACCACCAGGAATTATTATTGTTAGTTGATTAGCTACT
CTACATGGAACACAATTA

AACTATTCACCCGCCATATCATGAGCTTTAGGGTTTGTATTATTATTTACTGT
AGTTGGATTAAGTGGAG

TTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATTATTCTACATGATACTTATTACGTA
GTAGCACATTCTCATT

TGTGCTATCTATGCGAGCTGTATATGCAATTATAGCTGGATCTGTCCATTGA
TTCCGCTTATTTACAGGA

CTTATAATGAATAACTCTTATTTAAGGATTCAATTTATAGCAATATTTATTG
GAGTAAATTTGACATTCT

TCCCTCAACATTCTATAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGTTATTCTGATTA
TCCTGATGCTTATACAAC

TTGACATATTATCTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTTTAATTTCAATAATTA
TGTTTCTAATAATTATT

TGAGATAGAT

>H7

GAGGAAAAAAGGAACTTTTGGATAACTGGATATAATTTACGCTATAATTG
CAATTGGTTTATTAGGATT

TGTTGTATGGGCATAACTGGATTTACAGTTGGTATAGATGTAGACACCCGA
GCTTATTTTACTTCAGCT

ACAATAATTATTATAACTGGATCAGGAATTAATAATTTTATAGGTGATTAGCTA
CATTGCATGGGACACAAT

TAAATTATTCTCATAACTGGATATGAGCTTTAGGGTTCGTATTTTATTTACT
GTAGGGGGAATAACTGG

ATTTATTCTAGCTAATTCATCAATTGATATTATTTTACATGACATAACTGGAT
GTAGTTGCCCATTTTCA

CTATGTTTTATCTATAGGGGCTGATAACTGGATTATAGCCGGATTTGTTTCAT
TGATTCCCTTTATTTACA
GGAATAACTGGATATAACTTTTTATTTAAAAATTCAATTTATTACTATATTTAT
ATAACTGGATTTAACCT
TCTTCCCCCAACATTTTTTTAGGATTAAGAGGGATGCCCCGTCGATAACTGGA
TTACCCTGATGCTTACAC
AACTTGAAATATTATTTCTCAATTGGATCATTATAACTGGATGTTTCAATA
ATTATATTTTTAATAATT
ATTTGAGAAAGATTT

>H8

GAGGTAAAAAGGAACTTTTGGAACCTTAGGAATAATTTATGCAATAATCG
CAATTGGACTTCTTGGGTT
TG TAGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGAATAGATGTTGATACTCGA
GCTTATTTTACTTCAGCT
ACAATAATTATTGCCGTTCCAACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCTA
CTCTTCATGGAACCTCAAT
TAAATTATTCCCCAGCTATATTATGAGCTTTAGGGTTTGTATTTTTATTTACT
GTGGGTGGATTAACTGG
GGTTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATG
TAGTAGCTCATTTTCAT
TATGTTTTATCTATAGGTGCTGTTTTTGCAATTATAGCAGGATTTGTTCACTG
ATTCCCTTTGTTTACAG
GAATTATAATGAATAATTTTTACTTAAAAATTCAATTTATCACAATATTTATT
GGAGTAAATCTAACATT
TTTCCCACAACATTTTTTTAGGATTAAGAGGTATACCTCGACGTTATTCTGATT
ACCCAGATGCTTACACA
ACTTGAAACATCATTTTCATCAATTGGATCACTAATTTCTTTAATTTCAATAAT
TATATTTTTAATAATTA
TTTGAGAAAGATTT

>H9

GAGGAAAAAAGGAACTTTTGGAACCTTAGGTCCCAAGTTCGCTATAATTG
CAATTGGATTATTAGGATT

TGCCCAAGTTCGTCATCATATATTTACAGTGGGAATAGATGTTGATACTCGG
GCTTATTTTACTTCAGCA

ACCCCAAGTTCGCAGGTATTAACCCAAGTTCGAATTTTATAGGCCCAAGTTCG
CATTACATGGTACTCAAT

TGAATTATTCTCCCGCTATATTATGAGCTTTAGGATTTGTATTTTATTTACC
CCAAGTTCGTTAACAGG

AGTTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTACC
CCAAGTTCGATTTTCAC

TATGTTTTATCAATAGGGGCTGCCCAAGTTCGTATAGCCGGCTTTGTTCAAT
GATTCCCTTTATTTACAG

GACCCAAGTTCGATAATTTTACTTAAAAATTCAATTTATTACTATATTTATT
GGGTAAATTTAACTTT

TTTCCCTCAACACCCAAGTTCGTTAAGAGGTATACCCCGACGTTATTCCGAT
TACCCGGATGCCCAAGTT

CGTTGAAACATTATTTCTTCAATTGGGTCTTTAATTTCTTTAATTTCAATAAT
TATATTTTAAATAATTA

TTCCCAAGTTCGTT

>H10

GAGGAAAAAAGAAACATTTGGCACATTGGGAATAATTTATGCAATAATTG
CAATTGGTTTATTAGGATT

TGTGGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGATACTCGA
GCTTATTTTACATCAGCA

ACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTATAGATGATTAGCCA
CATTACATGGTACTCAAT

TAAATTACTCACCTGCTATAATATGAGCCTTAGGATTTGTATTTTATTTACT
GTTGGAGGTTTAACAGG

AGTTATCCTAGCTAATTCCTCAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTATG
TAGTAGCTCACTTTCAT

TATGTATTATCTATGGGAGCTGTTTTTGCTATTATAGCAGGTTTTGTTCAATTG
ATTTCCATTATTTACGG

GATTAATGTAAATAATTTTATTTAAAAATTCAATTTATTACTATATTCATT
GGTGTAATTTAACATT

TTTCCCACAACATTTTATAGGATTAAGAGGAATACCCCGACGTTATTCAGAT
TACCCTGATGCTTACACA

ACCTGAAATATTATTTTCATCAATTGGGTCCTTAATTTCTTTAATTTCTATAAT
TATATTTTAAATAATTA

TTTGAGAAAGATTT

>H11

GAGGAAAAAAGGAACTTTTGGAACATTGGGTATAATTTATGGGCAATCAG
TTATTGGATTATTAGGGTT

TGTTGTTTGAGCTCATCATATTTACAGTAGGGCAATCAGTTGATACTCGA
GCTTATTTTACATCAGCC

ACTATAATTATTGGCAATCAGTCAGGAATTA AAAATTTT TAGATGATTAGCTA
CGCTTCATGGGGCAATCA

GTAATTATTCCCCAGCTATATTATGATCCTTAGGGTTTGTTTTTTTATTTACG
GCAATCAGTGGCAATCA

GTTGATTTTAGCAAATTCTTCTATTGATATTAGGCAATCAGTCACTTATTATG
TAGTAGCCCATTTTCAT

TATGTTTTATCAATAGGGGCAGTATTTGCTATGGCAATCAGTATTTGTTTCATT
GATTCCTTTATTTACA

GGATTAATTTTGAATAATTTTATGGCAATCAGTCAATTTATTACAATATTCA
TTGGGGTAAATTTAACAT

TTTTTCCTCAACAGGCAATCAGTTTAAGAGGAATGCCTCGACGATATTCGGA
TTATCCAGATGGGCAATC

AGTTTGAAATATTATTTCTTCTATTGGATCAATAATTTCTTTTATTGCAATAA
GGCAATCAGTAATAATT

ATTTGAGAAAGATTT

H1>*Hydraena riparia*Kugelann, 1794

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGGT	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGGT	128
Query	61	TATTAGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGTATGGATGTAGACACTC	120
Sbjct	129	TATTAGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGTATGGATGTAGACACTC	188
Query	121	GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTTCTACAGGAATTAATAATTTTA	180
Sbjct	189	GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTTCTACAGGAATTAATAATTTTA	248
Query	181	GTTGGTTAGCTACACTTCATGGTACTCAATTAATTAATCTCTCCAGCAATATTATGGGCCT	240
Sbjct	249	GTTGGTTAGCTACACTTCATGGTACTCAATTAATTAATCTCTCCAGCAATATTATGGGCCT	308
Query	241	TAGGATTTGTTTTTTTATTTACTGTAGGTGGATTAAGTGGGGTTATTTAGCTAATTCCT	300
Sbjct	309	TAGGATTTGTTTTTTTATTTACTGTAGGTGGATTAAGTGGGGTTATTTAGCTAATTCCT	368
Query	301	CAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTACGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTAT	360
Sbjct	369	CAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTACGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTAT	428
Query	361	CAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGATTTGTTTCATTGATTTCTTTATTACAG	420
Sbjct	429	CAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGATTTGTTTCATTGATTTCTTTATTACAG	488
Query	421	GACTTATGTTAAATAATTTTATTTTAAAAATTCAATTTATCACAATATTTATTGGAGTAA	480
Sbjct	489	GACTTATGTTAAATAATTTTATTTTAAAAATTCAATTTATCACAATATTTATTGGAGTAA	548
Query	481	ATTTAACATTCTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGGATACCCGTCGTTATTTCAG	540
Sbjct	549	ATTTAACATTCTTTCCTCAACATTTCTTAGGATTAAGAGGGATACCCGTCGTTATTTCAG	608
Query	541	ATTATCCAGATGCCTATACAACCTGAAATATTGTTTCATCAATTGGATCttttaatttctt	600
Sbjct	609	ATTATCCAGATGCCTATACAACCTGAAATATTGTTTCATCAATTGGATCTTTAATTTCTT	668
Query	601	taattttcaataattataatTTTTtaataattatttGAGAAAGATTT	644
Sbjct	669	TAATTTCAATAATTATATTTTTTAATAATTATTGAGAAAGATTT	712

H2>*Hydraenahelena*Orchimont, 1929

```

Query 1  GAGGTAAAAGGAACTTTTGGAACCTAGGTATAATTTATGCCATAATTGCAATTGGTT 60
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 69 GAGGTAAAAGGAACTTTTGGAACCTAGGTATAATTTATGCCATAATTGCAATTGGTT 128

Query 61 TACTAGGATTTGTAGTATGGGCTCATCATATGTTTACTGTAGGAATAGATGTAGATACTC 120
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 129TACTAGGATTTGTAGTATGGGCTCATCATATGTTTACTGTAGGAATAGATGTAGATACTC 188

Query 121GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAAAATTTTTA 180
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct189GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAAAATTTTTA 248

Query 181 GTTGACTAGCTACTCTACATGGTACTCAATTAAATTATTCTCCTGCAATACTATGAGCTT 240
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 249 GTTGACTAGCTACTCTACATGGTACTCAATTAAATTATTCTCCTGCAATACTATGAGCTT 308

Query 241 TGGGTTTTGTATTTTTATTTACTGTGGGGGGATTAACAGGAGTTATTTTAGCTAATTCTT 300
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 309 TGGGTTTTGTATTTTTATTTACTGTGGGGGGATTAACAGGAGTTATTTTAGCTAATTCTT 368

Query 301 CCATTGACATTATTTTACATGATACTTATTATGTGGTAGCTCATTTCCATTATGTTTTAT 360
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 369 CCATTGACATTATTTTACATGATACTTATTATGTGGTAGCTCATTTCCATTATGTTTTAT 428

Query 361 CAATAGGGGCCGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTTTCATTGATTTCTTTGTTTACA 419
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 429 CAATAGGGGCCGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTTTCATTGATTTCTTTGTTTACA 487

```

H3>*Hydraenadentipalpis*Reitter, 1888

Query	1	GAGGaaaaaaaGAAACTTTTGGAACTTTAGGTATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGTT	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGAAACTTTTGGAACTTTAGGTATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGTT	128
Query	61	TACTGGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTCAGTGTAGGAATAGACGTTGATACTC	120
Sbjct	129	TACTGGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTCAGTGTAGGAATAGACGTTGATACTC	188
Query	121	GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCAGTTCCTACAGGAATAAAAATTTTA	180
Sbjct	189	GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCAGTTCCTACAGGAATAAAAATTTTA	248
Query	181	GTTGATTAGCAACTCTTCATGGCACTCAATTAAATTATTCTCCGGCAATATTATGAGCAT	240
Sbjct	249	GTTGATTAGCAACTCTTCATGGCACTCAATTAAATTATTCTCCGGCAATATTATGAGCAT	308
Query	241	TAGGGTTTGtttttttATTTACTGTGGGGGATTAACCGGAGTTATTTTAGCTAATTCAT	300
Sbjct	309	TAGGGTTTGTTTTTTTATTTACTGTGGGGGATTAACCGGAGTTATTTTAGCTAATTCAT	368
Query	301	CAATTGATATTATTCTTCATGATACTTACTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTTTAT	360
Sbjct	369	CAATTGATATTATTCTTCATGATACTTACTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTTTAT	428
Query	361	CAATAGGTGCTGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTACATTGATTCCCttttatttactg	420
Sbjct	429	CAATAGGTGCTGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTACATTGATTCCCTTTATTACTG	488
Query	421	gacttatattaataaatTTTTtattttaaaaattcaatttattacaatatTTtattggggtaa	480
Sbjct	489	GACTTATATTAAATAATTTTTATTAAAAATTCAATTATTACAATATTATTGGGGTAA	548
Query	481	atttaacattttttCCACAACATTTTTTAGGGTTAAGAGGAATACCTCGCCGTTATTCAG	540
Sbjct	549	ATTTAACATTTTTTCCACAACATTTTTTAGGGTTAAGAGGAATACCTCGCCGTTATTCAG	608
Query	541	ATTATCCTGATGCTTATACAACCTGAAATATCATTTTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTT	600
Sbjct	609	ATTATCCTGATGCTTATACAACCTGAAATATCATTTTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTT	668
Query	601	TAATCTCAATAATTATATTTTTTAATAATTATTTGAGAAAAGATT	644
Sbjct	669	TAATCTCAATAATTATATTTTTTAATAATTATTTGAGAAAAGATT	712

H4> *Hydraena paqanettii* Ganglbauer, 1901 (*Hydraena melas* %90)

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACTTTGGTACTTTAGGACCTAGACATGCTATAATTGCAATTGGAT	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGGAAACTTTGGTACTTTAGGAATAATTATGCTATAATTGCAATTGGAT	128
Query	61	TATTAGGATTGTAGTATGAGCTCATCATATACCTAGAC-AT-GGAATGGATGTAGACAC	118
Sbjct	129	TATTAGGATTGTAGTATGAGCTCATCATATA--TTTACTGTAGGAATGGATGTAGACAC	186
Query	119	TCGGGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTTCCCTACCTAGACAT-GAATTT	177
Sbjct	187	TCGGGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTTCCCTAC-AGGAATTAATAATT	245
Query	178	TTAGTTGATTAGCGACACTCCATGGGACTCAATTAACTATTCTCCCTAGACATGATGAG	237
Sbjct	246	TTAGTTGATTAGCGACACTCCATGGGACTCAATTAACTATTCTCCAGCAATATTATGAG	305
Query	238	CTTTAGGATTGTtttttttATTTACTGTAGGAGGACCTAGACAT--GTTATTTTAGCTAA	295
Sbjct	306	CTTTAGGATTGTTTTTTTATTTACTGTAGGAGGA-TTA-ACTGGGGTTATTTTAGCTAA	363
Query	296	TTCTTCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTATCCTAG-ACATGATTTTCATTATG	354
Sbjct	364	TTCTTCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTAT-GTAGTAGCCCATTTCATTATG	422
Query	355	TCTTATCAATAGGAGCTGTATTTGCCATTATAGCTGGATTGTTTCATTCCCTAGACATGAT	414
Sbjct	423	TCTTATCAATAGGAGCTGTATTTGCCATTATAGCTGGATTGTTTCATTGATTCCCCCTTAT	482
Query	415	TTACAGGACTTATATTAACCTAGACATGCTTAAAAATCCAATTTATCACAATATTTATTG	474
Sbjct	483	TTACAGGACTTATATTAATAAATTTCTACTTAAAAATCCAATTTATCACAATATTTATTG	542
Query	475	GGGTAAACTTAACATTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGACCTAGACATG--TACCGCGCCG	532
Sbjct	543	GGGTAAACTTAACATTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGA-TTAG-CAGGAATACCGCGCCG	600
Query	533	TTATTTCAGATTACCCTGATGCTTACACAACCTGAAATATTATTTTCATCAATTGGATCCCT	592
Sbjct	601	TTATTTCAGATTACCCTGATGCTTACACAACCTGAAATATTATTTTCATCAATTGGATCCCT	660
Query	593	AATTTCTTTAATTTTCATCAATTATATTTTTTAATAATTATTTGAGAAAGATTT	644
Sbjct	661	AATTTCTTTAATTTCAATAATTATATTTTTTAATAATTATTTGAGAAAGATTT	712

H5>*Hydraena.integra*Pretner, 1931

Query	1	AGAGGAAAAAGGAAACATTTGGTACATTAGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGT	60
Sbjct	68	AGAGGAAAAAGGAAACATTTGGTACATTAGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGT	127
Query	61	TTATTAGGATTTGTAGTATGGGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGACACT	120
Sbjct	128	TTATTAGGATTTGTAGTATGGGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGACACT	187
Query	121	CGAGCTTATTTTACATCAGCAACAATAATTATGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTC	180
Sbjct	188	CGAGCTTATTTTACATCAGCAACAATAATTATGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTC	247
Query	181	AGGTGATTAGCTACATTGCATGGTACTCAATTAAATTACTCCCCTGCTATAATATGATCT	240
Sbjct	248	AGGTGATTAGCTACATTGCATGGTACTCAATTAAATTACTCCCCTGCTATAATATGATCT	307
Query	241	TTAGGGTTTGTATTTTATTTACTGTTGGAGGTTTAACAGGAGTAATTCTAGCTAATTCC	300
Sbjct	308	TTAGGGTTTGTATTTTATTTACTGTTGGAGGTTTAACAGGAGTAATTCTAGCTAATTCC	367
Query	301	TCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTATTG	360
Sbjct	368	TCAATTGATATTATTCTTCATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTATTG	427
Query	361	TCTATGGGAGCTGTTTTTGCTATTATAGCAGGTTTTGTTCattgatttccattatttaca	420
Sbjct	428	TCTATGGGAGCTGTTTTTGCTATTATAGCAGGTTTTGTTCATTGATTCCATTATTTACA	487
Query	421	ggattaatgttaaataatTTTTtatttaaaaattcaatttattactatatattcattGGTGTA	480
Sbjct	488	GGATTAATGTTAAATAATTTTATTTAAAAATTCAATTATTACTATATTCAATTGGTGTA	547
Query	481	AATCTAACATTTTCCCACAACATTTTATAGGATTAAGAGGAATACCTCGACGTTATTCA	540
Sbjct	548	AATCTAACATTTTCCCACAACATTTTATAGGATTAAGAGGAATACCTCGACGTTATTCA	607
Query	541	GATTATCCTGATGCTTATACAACTGAAATATTATCTCATCAATTGGATCCTTAATTCT	600
Sbjct	608	GATTATCCTGATGCTTATACAACTGAAATATTATCTCATCAATTGGATCCTTAATTCT	667
Query	601	TTAATTTCTATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	645
Sbjct	668	TTAATTTCTATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	712

H6>Hydraena. grataOrchimont, 1944(*Hydraenaangulosa* %94)

Query	1	GAAACTTCTGGAGCTTTAGGAATAATCTACGCAATAATTGCAATCGTATTACTTGGGTTA	60
Sbjct	80	GAAACTTTTGGAACTTTAGGAATAATTACGCAATAATTGCAATCGGATTACTTGGGTTT	139
Query	61	GTAGTTTGAGCTCATCATATATATACTGTTTCGAATAGATGTAGATACCCGGGCTTATTCT	120
Sbjct	140	GTAGTTTGAGCTCATCATATATTTACTGTTTGAATAGATGTAGATACCCGGGCTTATTTT	199
Query	121	ACTTCAGCTACAATAATTAGTGCTGTACCACCAGGAATTATTATTGTTAGTTGATTAGCT	180
Sbjct	200	ACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAATTTTATGTTGATTAGCT	259
Query	181	ACTCTACATGGAACACAATTAACTATTACCCGCCATATCATGAGCTTTAGGGTTTGTA	240
Sbjct	260	ACTTTACATGGAACCCAATTAACTATTACCCGCCATATTATGAGCTTTAGGGTTTGTA	319
Query	241	TTATTATTTACTGTAGTTGGATTAACTGGAGTTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATT	300
Sbjct	320	TTTTTATTTACTGTAGGGGATTAACTGGAGTTATTTTAGCTAATTCATCAATTGATATT	379
Query	301	ATTCTACATGATACTTATTACGTAGTAGCACATTCTCATTATGTGCTATCTATGCGAGCT	360
Sbjct	380	ATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCACATTTTTCATTATGTGCTATCTATGGGAGCT	439
Query	361	GTATATGCAATTATAGCTGGATCTGTCCATTGATTCCGCTTATTTACAGGACTTATAATG	420
Sbjct	440	GTATTTGCAATTATAGCTGGATTTGTCCATTGATTCCCTTATTTACAGGACTTATAATG	499
Query	421	AATAACTCTTATTTAAGGATTCAATTTATAGCAATATTTATTGGAGTAAATTTGACATTC	480
Sbjct	500	AATAACTTTTATTTAAAAATTCAATTTATAGCAATATTTATTGGAGTAAATTTGACATTT	559
Query	481	TTCCCTCAACATTCTATAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGTTATTCTGATTATCCTGAT	540
Sbjct	560	TTCCCTCAACATTTTATAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGTTATTCTGATTATCCTGAT	619
Query	541	GCTTATACAACCTTGACATATTATCTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTTTAATTTCAATA	600
Sbjct	620	GCTTATACAACCTTGAAATATTATCTCATCAATTGGATCATTAAATTTCTTTAATTTCAATA	679
Query	601	ATTATGTTTCTAATAATTATTTGAGATAGAT	631
Sbjct	680	ATTATGTTTTTAATAATTATTTGAGAAAGAT	710

H7>Hydraena falcataJach, 1992(*Hydraena vandykei* %91)

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGATAAC-TGGATATAATTTACGCTATAATTGCAATTGGT	59
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGGA-ACCTTAGGTATAATTTACGCTATAATTGCAATTGGT	127
Query	60	TTATTAGGATTTGTTGTATGGGC--ATAACTGGAT-TTCACAGTTGGTATAGATGTAGAC	116
Sbjct	128	TTATTAGGATTTGTTGTATGGGCTCATCA-T--ATGTTACAGTTGGTATAGATGTAGAC	184
Query	117	ACCCGAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTATAACTGGATCAGGAATTAAAATT	176
Sbjct	185	ACCCGAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCAGTTCCTACAGGAATTAAAATT	244
Query	177	TTTAGGTGATTAGCTACATTGCATGGGACACAATTAAATTATTCTCATAACTGGA-TATG	235
Sbjct	245	TTTAGGTGATTAGCTACATTGCATGGGACACAATTAAATTATTCTCC-AGCTATATTATG	303
Query	236	AGCTTTAGGGTTCGTATTTTTATTACTGTAGGGGGAATAACTGGATTATTCTAGCTAA	295
Sbjct	304	AGCTTTAGGGTTCGTATTTTTATTACTGTAGGGGGATTAAACAGGGGTATTCTAGCTAA	363
Query	296	TTCATCAATTGATATTATTTTACATGACA-TAACTGGATGTAGTTGCCCATTTTCACTAT	354
Sbjct	364	TTCATCAATTGATATTATTTTACATGACACTTATT--ATGTAGTTGCCCATTTTCACTAT	421
Query	355	GTTTTATCTATAGGGGCTGATAACTGG-ATTATAGCCGGATTGTTCATTGATTCCCTTT	413
Sbjct	422	GTTTTATCTATAGGGGCTG-TATTTGCAATTATAGCCGGATTGTTCATTGATTCCCTTT	480
Query	414	ATTTACAGGAATAA--CTGGATATAACTTTTATTTAAAAATTCAATTATTACTATATTT	471
Sbjct	481	ATTTACAGGATTAATACTA-A-ATAACTTTTATTTAAAAATTCAATTATTACTATATTT	538
Query	472	ATATAACTGGATTTAACTTTCTTCCCCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGGATGCCCCGT	531
Sbjct	539	ATTGGAGTAAATTTAACTTTCTTCCCCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGGATGCCCCGT	598
Query	532	CGATAA-CTGGATTACCCTGATGCTTACACAACCTTGAAATATTATTTCTCAATTGGATC	590
Sbjct	599	CGTTATTCT-GATTACCCTGATGCTTACACAACCTTGAAATATTATTTCTCAATTGGATC	657
Query	591	ATTA-TAACTGGATGTTTCAATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	645
Sbjct	658	ATTAATTTCTTTA-GTTTCAATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	712

H8>*Hydraena grandis*Reitter 1885

```

Query 1      GAGGTAAAAAGGAAACTTTTGGAACTTTAGGAATAATTATGCAATAATCGCAATTGGAC 60
          |||
Sbjct 69     GAGGTAAAAAGGAAACTTTTGGAACTTTAGGAATAATTATGCAATAATCGCAATTGGAC 128

Query 61     TTCTTGGGTTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGAATAGATGTTGATACTC 120
          |||
Sbjct 129    TTCTTGGGTTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGAATAGATGTTGATACTC 188

Query 121    GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCCGTTCCAACAGGAATAAAATTTTTA 180
          |||
Sbjct 189    GAGCTTATTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCCGTTCCAACAGGAATAAAATTTTTA 248

Query 181    GTTGATTAGCTACTCTTCATGGAACCAATTAAATTATTCGCCAGCTATATTATGAGCTT 240
          |||
Sbjct 249    GTTGATTAGCTACTCTTCATGGAACCAATTAAATTATTCGCCAGCTATATTATGAGCTT 308

Query 241    TAGGGTTTGTATTTTATTTACTGTGGGTGGATTAAGTGGGGTTATTTAGCTAATTCAT 300
          |||
Sbjct 309    TAGGGTTTGTATTTTATTTACTGTGGGTGGATTAAGTGGGGTTATTTAGCTAATTCAT 368

Query 301    CAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTAT 360
          |||
Sbjct 369    CAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTAT 428

Query 361    CTATAGGTGCTGTTTTTGCAATTATAGCAGGATTTGTTCACTGATTCCTTTGTTTACAG 420
          |||
Sbjct 429    CTATAGGTGCTGTTTTTGCAATTATAGCAGGATTTGTTCACTGATTCCTTTGTTTACAG 488

Query 421    GAATTATAATGAATAATTTTACTTAAAAATTCAATTATCACAATATTTATTGGAGTAA 480
          |||
Sbjct 489    GAATTATAATGAATAATTTTACTTAAAAATTCAATTATCACAATATTTATTGGAGTAA 548

Query 481    ATCTAACATTTTCCCACAACATTTTGTAGGATTAAGAGGTATACCTCGACGTTATTCTG 540
          |||
Sbjct 549    ATCTAACATTTTCCCACAACATTTTGTAGGATTAAGAGGTATACCTCGACGTTATTCTG 608

Query 541    ATTACCCAGATGCTTACACAACCTGAAACATCATTTTCATCAATTGGATCACTAATTTCTT 600
          |||
Sbjct 609    ATTACCCAGATGCTTACACAACCTGAAACATCATTTTCATCAATTGGATCACTAATTTCTT 668

Query 601    TAATTTCAATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT 644
          |||
Sbjct 669    TAATTTCAATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT 712

```

H9>Hydraenaabbasigili Jach, 1988(Hydraenapasifica %87)

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGAACTTTAGGTCCCAAGTT-CGCTATAATTGCAATTGGA	59
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGAACTTTAGGT-ATAATTTATGCTATAATTGCAATTGGA	127
Query	60	TTATTAGGATTTG-CCCAAGTTCGTCATCATATATTTACAGTGGGAATAGATGTTGATAC	118
Sbjct	128	TTATTAGGATTTGTTGTATGAGC-TCATCATATATTTACAGTGGGAATAGATGTTGATAC	186
Query	119	TCGGGCTTATTTTACTTCAGCAACCCCAAGT-TCGCAGGTATTAACCAAGTTCGAATTT	177
Sbjct	187	TCGGGCTTATTTTACTTCAGCAACGATAATTATTGCA-GTTCCAACAGGTATTAAAATTT	245
Query	178	TTAGGCCCA-AGTTCGCATTACATGGTACTCAATTGAATTATTCTCCCGCTATATTATGA	236
Sbjct	246	TTAGGTGATTAGCT-ACATTACATGGTACTCAATTGAATTATTCTCCCGCTATATTATGA	304
Query	237	GCTTTAGGATTTGTATTTTATTACCCCAAGTTCGTTAACAGGAGTTATTTTAGCTAAT	296
Sbjct	305	GCTTTAGGATTTGTATTTTATTACTGTAGGTGGGTTAACAGGAGTTATTTTAGCTAAT	364
Query	297	TCATCAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTACCCCAAGTT-CG-ATTTTCACTATG	354
Sbjct	365	TCATCAATTGATATTATTTTACATGATACTTATTACGT-A-GTTGCCCATTTTCACTATG	422
Query	355	TTTTATCAATAGGGGCTGCCCAAGTTCGTATAGCCGGCTTTGTTCATTGATTCCCTTTAT	414
Sbjct	423	TTTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGCTTTGTTCATTGATTCCCTTTAT	482
Query	415	TTACAGGACCCAAGTTCGATAATTTTACTTAAAAATTCATTTATTACTATATTTATTG	474
Sbjct	483	TTACAGGATTAATGCTAAATAATTTTACTTAAAAATTCATTTATTACTATATTTATTG	542
Query	475	GGGTAAATTTAACTTTTTTCCCTCAACACC-CA-AGTTCGTTAAGAGGTATACCCCGACG	532
Sbjct	543	GGGTAAATTTAACTTTTTTCCCTCAACATTTCTTAGGT--TTAAGAGGTATACCCCGACG	600
Query	533	TTATTCCGATTACCCGGATGCCCA-AGTTCGTTGAAACattatttcttcaattgggtctt	591
Sbjct	601	TTATTCCGATTACCCGGATGCTTACACAAC-TTGAAACATTATTCTTCAATTGGGTCTT	659
Query	592	taatttctttaaatttcaataatttatatttttaataattatt	632
Sbjct	660	TAATTTCTTTAATTTCAATAATTATATTTTAAATAATTATT	700

H10>*Hydraena anatolica* Janssens, 1963

Query	1	GAGGaaaaaaaGAAACATTGGGCACATTGGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGTT	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGAAACATTGGGCACATTGGGAATAATTTATGCAATAATTGCAATTGGTT	128
Query	61	TATTAGGATTTGTGGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGATACTC	120
Sbjct	129	TATTAGGATTTGTGGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGATACTC	188
Query	121	GAGCTTATTTTACATCAGCAACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTA	180
Sbjct	189	GAGCTTATTTTACATCAGCAACAATAATTATTGCTGTACCAACAGGAATTAATAATTTTA	248
Query	181	GATGATTAGCCACATTACATGGTACTCAATTAAATTACTCACCTGCTATAATATGAGCCT	240
Sbjct	249	GATGATTAGCCACATTACATGGTACTCAATTAAATTACTCACCTGCTATAATATGAGCCT	308
Query	241	TAGGATTTGTATTTTATTTACTGTTGGAGGTTTAAACAGGAGTTATCCTAGCTAATTCCT	300
Sbjct	309	TAGGATTTGTATTTTATTTACTGTTGGAGGTTTAAACAGGAGTTATCCTAGCTAATTCCT	368
Query	301	CAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTATGTAGTAGCTCACTTTCATTATGTATTAT	360
Sbjct	369	CAATTGATATTATTCTTCATGATACATATTATGTAGTAGCTCACTTTCATTATGTATTAT	428
Query	361	CTATGGGAGCTGTTTTTGTCTATTATAGCAGGTTTTGTTCattgatttccattatttacgg	420
Sbjct	429	CTATGGGAGCTGTTTTTGTCTATTATAGCAGGTTTTGTTCATTGATTTCATTATTACGG	488
Query	421	gattaatgttaaataatttttattttaaaaattcaatttattactatatattcattGGTGTAA	480
Sbjct	489	GATTAATGTTAAATAATTTTATTTTAAAAATTCAATTATTACTATATTCATTGGTGTAA	548
Query	481	ATTTAACATTTTCCCACAACATTTTTTAGGATTAAGAGGAATACCCCGACGTTATTCAG	540
Sbjct	549	ATTTAACATTTTCCCACAACATTTTTTAGGATTAAGAGGAATACCCCGACGTTATTCAG	608
Query	541	ATTACCCTGATGCTTACACAACCTGAAATattatttcatcaattgggtccttaatttctt	600
Sbjct	609	ATTACCCTGATGCTTACACAACCTGAAATATTATTTTCATCAATTGGGTCCTTAATTTCTT	668
Query	601	taatttctataattatatttttaataattatttGAGAAAGATTT	644
Sbjct	669	TAATTTCTATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	712

H11>Hydraenaantiochena Jach, 1988(Hydraenaabyssinica %88)

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGAACATTGGGTATAATTATGGGCAAT--CAGTTATTGG	58
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGGAAACTTTTGGAACATTGGGTATAATTATG--CAATAATAGCTATTGG	126
Query	59	ATTATTAGGGTTTGTGTTTGGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGGCAAT-CA-GTTGAT	116
Sbjct	127	ATTATTAGGGTTTGTGTTTGGAGCTCATCATATATTTACAGTAGG--AATAGATGTTGAT	184
Query	117	ACTCGAGCTTATTTTACATCAGCCACTATAATTATTGGCAATCAGT-CAGGAATTTAAAT	175
Sbjct	185	ACTCGAGCTTATTTTACATCAGCCACTATAATTATTG-CCGTACCTACAGGAATTTAAAT	243
Query	176	TTTTAGATGATTAGCTACGCTTCATGGGGCAATCAG-T-AATTATTCCTCCAGCTATATTA	233
Sbjct	244	TTTTAGATGATTAGCTACGCTTCATGG--AACTCAGTTAAATTATTCCTCCAGCTATATTA	301
Query	234	TGATCCTTAGGGTTTGtttttttATTTACGGCAATCAGTGGCAATCAGT-TGATTTTAGC	292
Sbjct	302	TGATCCTTAGGGTTTGTTTTTTTATTACAG-TAGGAGGATTAACCGGTGTGATTTTAGC	360
Query	293	AAATTCTTCTATTGATATTAGGCAATCA-GTCACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATT	351
Sbjct	361	AAATTCTTCTATTGATATTATTTTA-CACGACACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATT	419
Query	352	ATGTTTTATCAATAGGGGCAGTATTTGCTATGGCAAT-CAGTATTTGTTCATTGATTTC	410
Sbjct	420	ATGTTTTATCAATAGGGGCAGTATTTGCTAT--CATGGCAGGATTTGTTCATTGATTTC	477
Query	411	TTTATTTACAGGATTAATTTTGAATAATTTTATGGCAATCAGTCAATTTATTACAATATT	470
Sbjct	478	TTTATTTACAGGATTAATTTTGAATAATTTTATATTTAAAAATCAATTTATTACAATATT	537
Query	471	CATTGGGGTAAATTTAACATTTTTTCCTCAACAGGCAATCAGTTTAAGAGGAATGCCTCG	530
Sbjct	538	CATTGGGGTAAATTTAACATTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGAATGCCTCG	597
Query	531	ACGATATTCGGATTATCCAGATGGGCA-ATCAGTTTGAAATATTATTTCTTCTATTGGAT	589
Sbjct	598	ACGATATTCGGATTATCCAGATGCTTATACTAC-TTGAAATATTATTTCTTCTATTGGAT	656
Query	590	CAATAATTTCTTTTATTGCAATAAGGCAATCAGTAATAATTATTTGAGAAAGATTT	645
Sbjct	657	CAATAATTTCTTTTATTGCAATAATTATATTTTAAATAATTATTTGAGAAAGATTT	712

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye’den toplanan 11 *Hydraena* (Coleoptera, Hydraenidae) türü moleküler düzeyde araştırılmıştır. DNA’ları izole edilen bu türlerin mitokondriyal COI geninin nükleotid dizisi oluşturulmuş ve PCR ile COX 1 gen dizisinin yaklaşık olarak 655 baz çiftlik kısmı oluşturularak COI gen dizileri birer moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. 11 *Hydraene* türüne ait mitokondriyal COX 1 gen dizileri tür tayini amacıyla Gen bankasındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizde, 11 *Hydraena* ‘ya ait DNA dizileri ile 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.

Analiz sonuçlarına göre *H. riparia*, *H. helena*, *H. dentipalpis*, *H. integra*, *H. grandis* ve *H. anatolica* türlerinin nükleotid dizileri sistemde kayıtlı nükleotid dizileriyle %100 örtüşürken, *H. paganettii* türü *H. melas* türüne %90, *H. grata* *H. angulosa* türüne %94; *H. falcata* *H. vandykei* türüne %91; *H. abbasigili* *H. pasifica* türüne %87 ve *H. antiochena* ise *H. abyssinica* türüne %88 oranında benzerlik göstermektedir. Bu yüzden *H. paganettii*, *H. grata*, *H. falcata*, *H. abbasigili* ve *H. antiochena* olmak üzere toplam beş tür, uluslararası data bankasına yeni tür olarak kaydedilmiştir. Böylece, bu alanda yapılacak olan herhangi bir çalışmada yeni kayıtlarımız esas alınarak teşhis edilmiş olacaktır.

H. antiochena türü Etiyopyada yaşayan *H. abyssinica* %88 oranında benzerken Anadoludan teşhis edilen *H. septemlacuum* türüyle %81 oranında örtüşmektedir. Bu farklılık, alt tür seviyesindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. *H. antiochena* türü *Hydraena* (s. str.) alt cinsinde yer alırken *H. septemlacuum* türü ise *Haenydra* alt cinsinde yer almaktadır.

H. abbasigili türü Kuzey Amerikada yaşayan *H. pasifica* türüyle %87, *H. circulata* türüyle ise %82 oranında benzerlik göstermektedir.

H. falcata türü, Kuzey Amerikada yaşayan *H. vandykei* türüne %91 oranında benzemektedir.

H. grata türü ise Avrupada yaşayan *H. angulosa* türüyle %94 oranında benzerlik göstermektedir.

H. paganettii türü %90 oranında *H. melas* türüne benzemektedir. *H. paganettii* türü *Phothydraena* alt cinsine ait olduğundan aradaki bariz farkın alt cinsten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Analizi yapılan ve karşılaştırılan türler arasındaki farklılık, sisteme kayıtlı tür sayısının azlığından kaynaklanabilir. Yapılacak olan başka çalışmalarla veri bankasına yeni ilaveler yapıldıkça daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabilecektir. Yeni çalışmalarla mevcut türlerin tamamı veri bankasına kaydedildiğinde morfolojik tür teşhisinde karşılaşılan bazı karışıklıkların kolaylıkla giderilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Aravind K, Ravikanth G, Shaanker RU, Chandrashekara K, Kumar ARV, Ganeshaiah KN. 2007. DNA barcoding: An exercise in futility or utility? **Current Science**. 92(9):1213-1216.
- Brown T. A. **Gen Klonlama ve DNA Analizi** 5. Baskı 2009 Blackweel yayınları Nobel Yayın Dağıtım. Syf. 372
- 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.
- Hansen M. 1998. **World catalogue of insects, Vol. 1: Hydraenidae (Coleoptera)**. Apollo Books, Vester-Skerninge, Denmark. 168 pp.
- 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 GelişmelerE.Ü. **Su Ürünleri Dergisi 2008** Cilt/Volume 25, Sayı/Issue 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
- Karaçay, B. 2010 **Yaşamın Sırrı DNA** syf 63-69 Tübitak Yayınları
- Keskin E. ve Atar H, H. 2013 DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanımı olarak 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.

Klug William S. , Cummings Michael R. and Spencer Charlotte A. , 2009 , **Genetik Kavramlar** , Palme yayıncılık , s 301 , Ankara

Madigan Michael T., and Martinko John, 2010, **Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi**, Palme Yayıncılık: 532, 11. baskı, s;167, Ankara

Mower, J.P., Touzet, P., Gummow, J.S., Delph, L.F. and Palmer, J.D., 2007. **Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial gene of seed plants.**BMC Evol Biol, 7, 135. doi:10.1186/1471-2148-7-135.

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 LTD. ŞTİ.** Sayfa; 130

Pawlowski Jan, Audic Ste'phane, Adl Sina, Bass David, Belbahri Lassaa'd, Berney Ce'dric, Bowser Samuel S., Cepicka Ivan, Decelle Johan, Dunthorn Micah, Fiore-Donno Anna Maria, Gile Gillian H., Holzmanna Maria, Jahn Regine, Jirku Miloslav, Keeling Patrick J., Kostka Martin, Kudryavtsev Alexander, Lara Enrique, Lukes Julius, Mann David G., Mitchell Edward A. D., Nitsche Frank, Romeralo Maria, Saunders Gary W., Simpson Alastair G. B., Smirnov Alexey V., Spouge John L., Stern Rowena F., Stoeck Thorsten, Zimmermann Jonas, Schindel, de Vargas David Colomban , 2012, **CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms**, PLOS Biology, www.plosbiology.org , November 2012 , Volume 10 , Issue 11 , e1001419, s;1-5

Ratnasingham S. and Hebert P. D. N. , 2007 Barcoding B.: **The Barcode of Life Data System** (www.barcodinglife.org) Molecular Ecology Notes (2007) 7, 355–364

Sherry S. T., WARD M.-H., KHOLODOV M., BAKER J., PHAN L., SMIGIELSKI E. M., SIROTKIN K. , 2001, **DbSNP; the NCBI database of genetic variation**, *Nucleic Acid Research*, , Vol. 29, No. 1 syf 308-311

Stoeckle MY, Hebert PDN (2008) **Bar Code of Life**. Scientific American 299: 82–88.

Topdemir, H. Gazi 2014. **Bilim ve Teknik Dergisi Mart Sayısı**: 90-91

Trizzino M. , CARNEVALI L., DE FELICI S. , AUDISIO P. , 2013 **A revision of *Hydraena* species of the “*Haenydra*” lineage (Coleoptera, Hydraenidae)** *Zootaxa*3607 (1): 001–173

Vernooy Ronnie, Haribabu Ejnavarzala, Muller Manuel Ruiz, Vogel Joseph Henry, Hebert Paul D. N., Schindel David E., Shimura Junko, Singer Gregory A. C. 2010 **PLoS Biology** (www.plosbiology.org) July 2010 , Volume 8 , Issue 7 : 1-5

ÖZGEÇMİŞ

1988 Yılında Kayseri’de doğdu. İlköğretimini Kayseri Aziz Özkan İlköğretim Okulu ve 3. Sınıf yarı dönemden sonrasını ise İstanbul Osmangazi İlköğretim ve Ortaöğretim Okulunda tamamladı.

Lisans eğitimini Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesinde Yüksek Lisansa başladı, 2015 yılında tamamladı.

