



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY YÖRESİNDEKİ OCHTHEBIUS TÜRLERİNİN
(HYDRAENIDAE; COLEOPTERA) ÇEŞİTLİLİĞİNİN
MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1 GENİ HEDEFLERENEREK
ORTAYA ÇIKARILMASI**

Mustafa YEŞİLOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
TEMMUZ-2014



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY YÖRESİNDEKİ OCHTHEBIUS TÜRLERİNİN (HYDRAENIDAE;
COLEOPTERA) ÇEŞİTLİLİĞİNİN MITOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1
GENİ HEDEFLERİNE ORTAYA ÇIKARILMASI**

Mustafa YEŞİLOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

Temmuz-2014

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY YÖRESİNDEKİ OCHTHEBIUS TÜRLERİNİN (HYDRAENIDAE;
COLEOPTERA) ÇEŞİTLİLİĞİNİN MİTOKONDRIYAL COX ALT ÜNİTE 1
GENİ HEDEFLERİNE ORTAYA ÇIKARILMASI**

MUSTAFA YEŞİLOĞLU
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç.Dr.Ahmet KASAPOĞLU danışmanlığında hazırlanan bu tez 15/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ahmet KASAPOĞLU
Başkan

Yrd. Doç .Dr. Erol ATAY
Üye

Yrd. Doç. Dr.Aziz GÜL
Üye

Kod No: 737

Prof. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 1204Y0126 (330)

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

15.07.2014

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.

Mustafa YEŞİLOĞLU

ÖZET
HATAY YÖRESİNDEKİ *OCHTHEBIUS* (HYDRAENIDAE, COLEOPTERA)
TÜRLERİNİN NÜKLEER ve MİTOKONDRIYAL rRNA'LAR
HEDEFLERİNE ORTAYA ÇIKARILMASI

Bu çalışmada morfolojik özelliklerine bakılarak tanımlanan Hatay yöresinde ve Doğu Anadolu'da yaşayan 17 su böceği türünün (*Ochthebius*) Cytokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX) genini DNA dizilimleri moleküler çalışmalar sonucu elde edilmiştir.

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

Bu çalışmada Hydraenidler üzerinde denenerek elde edilen verilerle, morfolojik ve anatomik çalışmalara dayanan tekniklerle daha doğru sonuçlara götüren moleküler sistematik yöntemlerle kıyaslanarak tür teşhisi için yeterli olup olmadığı gözlenmiştir.

2014, 44 sayfa

Anahtar kelimeler: Coleoptera, Hydraenidae, Filogenetik Analiz, Hatay

ABSTRACT

OCHTHEBIUS (COLEOPTERA, HYDRAENIDAE) on FERTILITY in HATAY TYPE are NUCLEAR and MITOCHONDRIAL rRNA in the SENSE of UNCOVERING the

With this study, DNA sequences of Cytochrome C Oxydase Subunit I (COX I) gene were worked out by molecular proceedings for morphologically identified seventeen Ochthebius species (Hydraenidae, Coleoptera) in Hatay province and eastern Anatolia region.

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

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

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

2014, 44 Pages.

Key Words: Ochthebius, Hydraenidae, Phylogenetic analysies, Hatay.

TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her zamankindenden daha fazla destek olan aileme 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.....	2
1.2.Ochthebius Morfolojisi.....	4
1.3.DNA Barkodlama.....	4
1.3.1. Hayvanlarda DNA Barkodlama.....	8
1.3.2. Neden Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COI) Geni?.....	9
1.4. DNA Barkodlama iş Akışı.....	12
1.5. mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar.....	13
1.6. DNA barkodlamanın sistematik ile ilişkisi veya DNA barkodlamanın Taksono-mi Filogeni ve Populasyon Genetiği ile ilişkisi.....	15
1.6.1. DNA barkodlama-taksonomi ilişkisi.....	15
1.6.2. DNA barkodlama - filogeni ilişkisi.....	16
1.6.3. DNA barkodlama - populasyon genetiği ilişkisi.....	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	19
3.MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. DNA İzolasyonu.....	21
3.2. Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR).....	21
3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	24
4.1.Ochthebius Dizi Analizi Sonuçları.....	24
5. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI.....	29
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- O1: *Ochthebius*(s. str.) *meridionalis*
O2: *Ochthebius*(s. str.) *fausti*
O3: *Ochthebius* (s. str.) *lividipennis*
O4: *Ochthebius* (*Asiobates*) *striatus*
O5: *Ochthebius* (*Hymenodes*) *difficilis*
O6: *Ochthebius* (s. str.) *ragusae*
O7: *Ochthebius* (*Asiobates*) *minimus*
O8: *Ochthebius* (s. str.) *pusillus*
O9: *Ochthebius* (s. str.) *uskubensis*
O10: *Ochthebius* (s. str.) *viridis*
O11: *Ochthebius* (*Asiobates*) *remotus*
O12: *Ochthebius* (s. str.) *virens*
O13: *Ochthebius* (s. str.) *hofratvukowitsi*
O14: *Ochthebius* (s. str.) *kirschenhoferi*
O15: *Ochthebius* (s. str.) *foveolatus*
O16: *Ochthebius* (*Asiobates*) *akbuluti*
O17: *Ochthebius*(*Asiobates*) *oeskani*

1.GİRİŞ

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

“Linnaeus’un geliştirdiği sınıflandırma 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).

Moleküler tekniklerin gelişmesi sonucu DNA dizi analizlerinin yapılabilmesiyle daha net veriler ortaya çıkarmış ve morfolojik teşhislerde yapılan hatalar azalmıştır. DNA tıpkı bir barkod gibi marketlerde nasıl her barkot belli bir ürünü temsil ediyorsa canlılar için de DNA aynı şeyi yapıyordu. Onun ne olduğunu nasıl özelliklere sahip

olduğunu ifade ediyor. Moleküler sistematığın temelini oluşturan bu yapı karşılaştırmalı anatomi ve diğer morfolojik özelliklere göre yapılan teşhislerle çözilemeyen filogenetik ilişkilerin çözümünde büyük yardımı olmuştur. Ochthebiuslarla yaptığımız çalışmamızda biz tür ayrımında erkek cinsiyet organı (aedeagus) kullanılmıştır. Çalışılan 17 türde toplanan örneklerden erkekler ayrılmış daha sonra aedeagus paramerine ve distaline bakılarak *Hydraena* ve türlerinin teşhisi yapılmıştır. Ancak bu küçük farklılıklar tür teşhisi için yeterli olmayabilir.

Canlı DNA'sı evrimsel süreçte bir çok değişime uğramıştır ve bu yüzden filogenetik analizlerde daha oransal olarak daha yavaş değişim gösteren ribozomal RNA baz alınarak analiz yapılırken, tür içi ayrımlarda hayvanlarda mitokondriyal DNA'dan yararlanılmaktadır. "Mitokondriyal sitokrom c oksidaz (cytochrome c oxidase 1 = *COI* veya *cox1*) gen dizisi hayvansal organizmalar için güncel olarak DNA barkodu olarak kullanılmaktadır (Filiz E, Koç, İ. 2012).

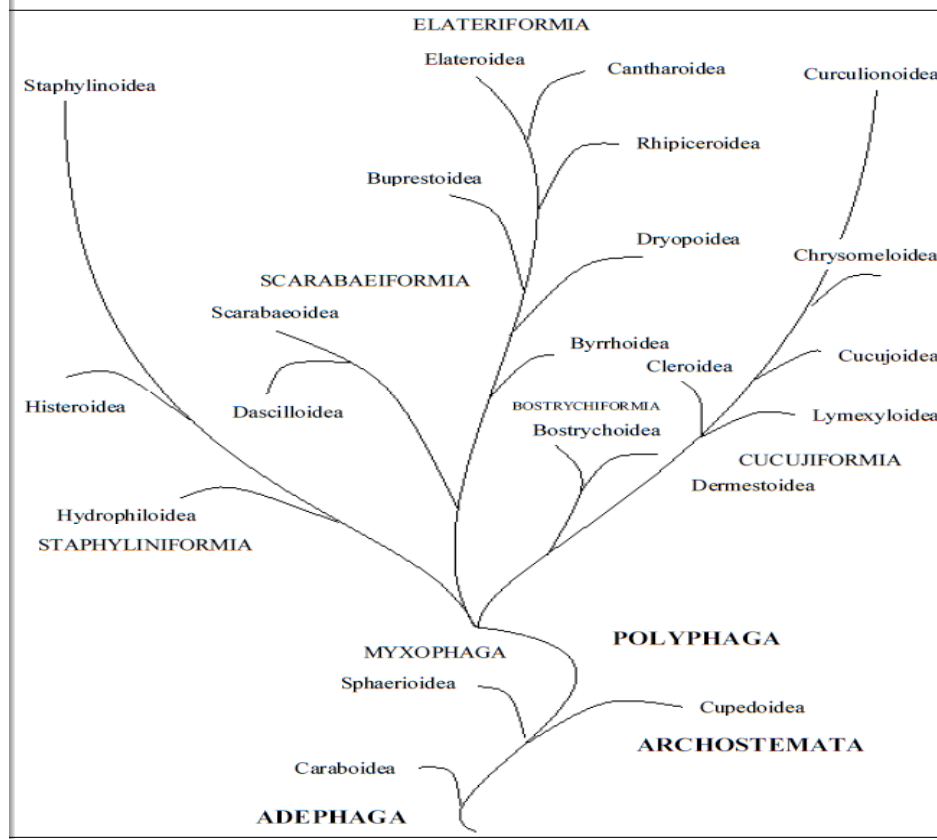
Bu çalışmada Hatay ve Doğu Anadolu bölgesinden toplanan *Ochthebius* cinsine ait 17 türün erkek organlarına bakılarak önce morfolojik yöntemlerle türlerine ayırdıktan sonra mitokondriyal COX 1 geni ile tür tanımlanması yapılmıştır. Hedef DNA molekülleri PCR yardımıyla çoğaltıldıktan sonra Sanger yöntemi ile dizilenmiştir. Diziler Neighbor-joining, maximum likelihood, maximum parsimony olarak adlandırılan 3 farklı algoritma ile filogenetik analizi yapılmıştır.

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

1.1. Coleopterler'in Genel Özellikleri

"Dünyada en fazla türe sahip oldukları için böceklerin evrimsel ilişkileri ve yaşamın evrimini 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 tanımı 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 1.1. Coleoptera takımına ait filogeni diyagramı (Gülperçin, 2013).

Coleoptera takımına bağlı böcekleri diğer böceklerden ayıran en önemli özellik ön kanatlarının 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 Permian ve Erken Trias Dönemde birbirlerinden ayrılmakta ve farklılaşmaktadır (Gülperçin, 2013).

1.2. *Ochthebius* Morfolojisi

“ Boyları 1,5 ila 2,5 mm arasındadır. Vücut şekilleri uzunca ovaldır. Genellikle koyu kahverengi ve siyahtır. Tatlı suların durgun yerlerinde çamur, kum ve taşlar arasında yaşarlar. Genellikle küçük omurgasızlarla ve döküntüyle beslenirler. Pronotum üzerinde bir veya üç çizgi, bazen de çöküntüler bulunur. Elytrada derin noktalardan oluşan çizgiler bulunur. Maksillar palpleri anten boyuna yakındır. Tür ayrımında genellikle erkek cinsiyet organı (aedeagus) kullanılır. Yaklaşık 300-500 mikron boyundaki aedeagus, stereomikroskop altında iğne yardımıyla çıkarılarak ışık mikroskopunda şekli çizilerek tür teşhisinde kullanılır ” (Kasapoğlu, 2002).

1.3. DNA Barkodlama

DNA barkodlama terimi, son yıllarda adından sıkça bahsettirmeye başlayan bir ifadedir. Bu yöntem temelde canlının tür teşhisi için uygun donanıma ve kısalığa sahip nükleer materyalinin dizi analizi sonucu doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaya dayalı bir yöntemdir. “DNA barkot” kavramı ilk olarak Hebert ve ark. (2003) tarafından kullanılan bir kavram olup daha sonraları bilim dünyasının ilgisini çekmeyi başarmıştır (Ertuğrul ve Koç, 2012).

“Projenin fikir babası, Guelph Üniversitesi’nden Paul Hebert bir gün süpermarkette alışveriş yaparken gözü paketlerin üzerindeki barkodlara takılıyor. Market çalışanlarından biri elindeki tabancayı andıran bir cihazla ambalajlar üzerindeki barkodları okuyarak ürünün ne olduğunu anında belirliyor, rafta kaç tane kaldığı bilgisini kablosuz ağ üzerinden depoya bildirerek satılan ürünün yerine yenisinin konmasını sağlıyor. Barkodlar, çıkıştaki gişelerde ödemelerin de çok hızlı yapılmasını sağlıyor. Hebert aynı şeyin biyolojik sistemler için de yapıp yapılamayacağını düşünüyor. 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 Atar, 2013).

“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, 2007). “ DNA barkodlamanın potansiyel kullanıcıları sadece taksonomistler değildir. Bu yöntem adli bilimler, biyoteknoloji, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik, ve tür ayırımı gibi birçok alanda kullanılabilecek bir araç olarak literatürdeki yerini almıştır” (Keskin ve Atar, 2013).

“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 tekniğın 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 üstlendiğı barkodlarımızın korunması ve ticareti için önemli olacaktır ” (Aravind, 2007).

Tüm bu çalışmalar yapılırken Paul Hebert’in hayalindeki barkod okumayı gerçekleştirmek için; tüm bu bilgilerine depolanması, gerektiğinde ulaşılabilmesi ve yeni verilerin yüklenebilmesi için bir internet tabanlı veri ağına ihtiyaç vardı. “DNA 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 çağrı bilimsel toplulukların , devlet kurumlarının ve kamuoyunun dikkatini çekti.” Yayına destek DNA barkodlama araştırmalarına büyük bir destek sağladı ve 50 ülkede 200 üyesi ile Yaşam Barkod Konsorsiyumu kurmak için (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 küratörlüğü ile analiz için gerekli bileşim platformu geliştirmeye yöneldiler”(Vernoooy et. al. , 2010).

“Konsorsiyum henüz gelişmekte olanlar da dahil olmak üzere, gezegendeki tüm türler için DNA barkod geliştirmekte iddialı bir programı vardı. CBOL biyoçeşitlilik konusunda temel araştırma gıda yasaları, karantina ve bitki sağlığı yasaları ve yaban hayatının korunması uygulanması için, bu tekniğın birçok uygulamayı öngörmektedir. CBOL bu teknikte gıda yasalarını uygulama da biyoçeşitlilik temel araştırmalarından, karantina ve bitki yasaları sağlığı ve yaban hayatın korunması gibi birçok uygulamayı öngörmekteydi” (Aravind, 2007).

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

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

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

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

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

DNA barkodlama biyoçeşitliliğin evrensel standartlarda kayıt alınması sadece taksonomik açıdan önemli değildir. Aynı zamanda gıda ve ilaç sanayisinden, bulundukları çevrenin yaşam kalitesine kadar bize geniş bir bilgi ağı sağlayabilir. “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, 2008). Ancak geçmişten günümüze yapılan bu DNA barkod çalışmalarına bakılarak, araştırılan bölgedeki tür çeşitliliğinin durumu bize bölgenin kalitesi yani ekosistem koşulları hakkında gerekli bilgiyi, varsa sorunu gösterebilir. Çünkü canlının varlığı ve komünite yapıları habitatın kalitesini yansıtır. DNA barkod çalışmalarıyla belki bir ömür sürecek bir çalıma kısa bir sürede tamamlanıp alınması gereken önlemler korunması gereken türler tespit edilebilir.

1.3.1. Hayvanlarda DNA Barkodlama

“Genel olarak ökaryotik canlıların sahip oldukları toplam genetik materyal, çekirdek içinde yer alan ve genomik DNA ya da çekirdek DNA (nDNA)’sı olarak ifade edilen kromozomlara ilave olarak mitokondri (mtDNA) ve kloroplast (cpDNA) organellerinde yer alan DNA moleküllerinin tamamından meydana gelmektedir. Hayvan hücrelerinde sadece mitokondriyel DNA, bitki hücrelerinde ise hem mitokondriyel DNA ve hem de kloroplast 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 nesiller boyunca aktarılmaktadır. Mitokondri, bulunduğu hücre bölündüğünde kendi kendine çoğalabilen bir organeldir. Mitokondri iki membrana sahip, kendine özgü DNA molekülü (mtDNA) ve ribozomları olan, çeşitli enzimleri sentezleyebilen ve adenosin trifosfat (ATP) formunda enerji sentezini gerçekleştiren bir

organeldir. Hayvanlarda mtDNA küçük, dairesel ikili sarmal bir DNA molekülüdür ve aerobik solunumla ilgili genleri içermektedir ”(Özdil, 2007).

“Mitokondri 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). Mitokondri eşeyli üreyen canlılarda genel olarak sadece anneden aktarılan bir DNA olduğu için ve evrim sürecinde çok fazla değişmeyip sadece türden türe küçük farklılıklar içeren bir nükleik materyaldir. Bu özelliği de Hebert’in DNA barkodlama için evrensel bir kod olma niteliklerinde aradığı bir özelliktir. mtDNA’nın evrim süresinde çok fazla kombinasyonlarda bulunmamasının nedeni ise, çift zincirli, halkasal yapıda ve tek bir molekülden olmasıydı. Çünkü bu yapı hücre bölünmesi esnasında çekirdek DNA’sında olduğu gibi parça değişiminin gerçekleşmesini engellemektedir. “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).

İşte bu değişimler türler arası farklılıkları sağlamakta ve DNA barkodlama için bize türler arası gerekli ayrımı yapabilme yetisi vermektedir. “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 ” (Keskin ve Atar, 2013).

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

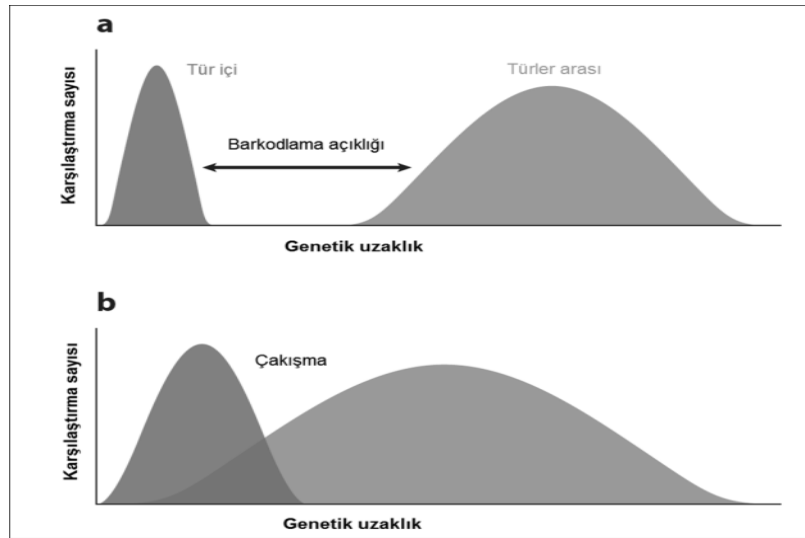
“*COI* gen bölgesinin tür seviyesinde tanımlamalarda etkin bir şekilde kullanılabilirliği günümüzde birçok omurgalı ve omurgasız hayvan grubu için kabul edilmiştir. Barkodlama ayrıca hayvan hücre hatlarının tanımlanmasında da kullanılabilmekte ve biyoçeşitlilik veri tabanlarındaki materyallerin karakterizasyonunda önerilen bir uygulama olarak da karşımıza çıkmaktadır. Bunlarla birlikte, *COI* geninin aynı bölgesi kırmızı makro alglerin tür tanımlanmasında, tek hücreli protistlerde ve bazı mantarlarda da kullanılmaktadır. Bu kadar geniş ölçekte uygulama alanına sahip bu bölgenin ayırım gücünün temelinde nükleotid dizilerinde aynı anda meydana gelen değişikliklerdeki sıklık yer almaktadır” (Keskin ve 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. Metazoan türler için evrensel bir barkod bölgesi arayışında, mitokondriyal genomun nükleer genoma kıyasla birçok avantajı söz konusudur. Bu avantajlar intronların bulunmaması, rekombinasyona sınırlı şekilde maruz kalması, tüm hücrelerde yüksek kopya sayısı, haploit özellikte olması ve maternal bir kalıtıma sahip olması şeklinde sıralanabilir. 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 imkan

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 1.2. 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 and 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 and Atar, 2013).

“Belirtildiği gibi mtDNA molekülünde meydana gelen değişimler eklemeli olarak generasyonlar boyunca korunmakta ve dölden döle 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. “ (Filiz ve Koç, 2012) CBOL ve BOLD hemen çalışmalara başlamış ve uzun uğraşlar sonucunda çekirdek genomunda bulunan ITS dizinde 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).

1.4.DNA Barkodlama iş Akışı

“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. 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. 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).

“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. 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).

1.5.mtDNA Analizinde Yaşanan Zorluklar

İlk olarak mtDNA analizlerinde karşılaşılan zorlukların başında heteroplazmi gelemektedir. “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). Canlıda birden fazla mtDNA’nın bulunması mtDNA dizi analize DNA barkodlama ile soyağacı oluşturmayı imkânsız kılmaktadır. Çünkü diz analizi yapılan **mitokondrinin paternal mı , maternal mı olduğu** yoksa mutasyon geçirmiş hücrelerden birimi olduğunu bilemeyiz.

İkinci olarak da psödogenlerden (yalancı genler; pseudogenes) bahsedebiliriz. “ Bu genler, genlerin duplike kopyalarının evrimsel artığıdır ve onları işlevsiz kılan mutasyonlara uğramışlardır. Bazı durumlarda, bu tür genlerin çok sayıda kopyalarına rastlanır.” (Klug. , 2009) “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).

Bilindiği gibi DNA ekstraksiyonunu elde etmek zordur özellikle arşivlenmiş örneklerden. Folmalin içine konan örnekler gerek daha sonra araştırılmak için gerekse bir yerden başka bir uzak yere götürülürken örneğin bozulmaması için formalin içine bırakılır. Ve DNA barkodlamadaki sorunların bir diğeri de pH’ı iyi ayarlanmamış formalin çözeltilerinden kaynaklanmaktadır.” 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).

DNA barkodlamayı zorlaştıran bir başka etkende hatalı dizilerdir.” Canlıların *COI* dizilerine ilişkin kayıtların NCBI Gen Bankası 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 Gen Bankası 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).

“Türler arası hibridizasyon kuşkusuz barkodlama çalışmalarında önemli bir sorun teşkil etmektedir ” (Keskin ve Atar, 2013). “ Hibridizasyon farklı kaynaklardan gelen nükleik asitlerin tamamlayıcı baz eşlemesiyle birbirine tutunmasıdır.”(Madigan and Martinko, 2010)“ Bilindiği gibi barkod geni olan *COI*, mitokondriyal bir genidir 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).

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

1.6.1. 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 tespiti 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).

1.6.2. 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 çalışmalarda 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 hesaplama ile ilişkili 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

alışmaları, 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).

1.6.3. DNA barkodlama - populasyon genetiğ i 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 yoğunlaşılırken, populasyon genetiğ i çalışmalarında tek bir türün kendi içindeki ve farklı populasyonları arasındaki varyasyon hedef alınmaktadır. Bu bağlamda, DNA barkodlama türler bakımından kapsamlı bir içeriğ e sahipken, birbirleriyle ilişkilerinden çok tanımlanmalarına odaklanarak iki disiplinin ortasında bir yerde kendine yer bulmaktadır. Bilinenin aksine, DNA barkodlama tür iç i genetik farklılıkların ortaya çıkarıldığı populasyon genetiğ i çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve tür iç i genetik varyasyonu tespit etmekte çok başarılı bir genetik belirteç olarak kabul edilmektedir. Özellikle balık türleri üzerinde yoğunlaş an çalışmalarda DNA barkodlamanın populasyon genetiğ i çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabileceğ i elde edilen sonuçlar ile ortaya koyulmuştur. Avustralya’dan toplamda 207 balık türünün COI geninin DNA dizisini analiz eden araştırcılar ortalama tür iç i K2P uzaklığ ını %0,39 olarak hesaplamışlardır. Araştırcılar, bu çalışmadan elde edilen sonuçların COI geninin barkodlanmasının balıklarda türlerin ve tür iç i farklı populasyonların tanımlanmasında kullanılabileceğ ini gösterdiğ ini belirtmişlerdir ” (Keskin ve Atar, 2013).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çeşitli canlılarla ilgili önceden DNA barkodlama yöntemi ile yapılmış, moleküler filogenetik ve moleküler taksonomi tez çalışmalarından bazıları bu bölümde verilmiştir.

Kahraman (2014), tez çalışmasında Hatay yöresindeki 71 gündüz kelebeği (*Rhopalocera*) türünü Cytokrom C Oksidaz Alt Ünite 1 (COX 1) geninin DNA dizilimlerini moleküler yollarla elde etmiş ve bu filogenetik analizler sonucunda da filogenetik bir soy ağaç çıkarmak için 3 farklı algoritma; maximum parsimony, maximum likelihood, Neighbor-joining programlarıyla değerlendirilmiştir. 71 türün bir biriyle akrabalıklarını belirten soy ağaçları düzenlemiştir. Ayrıca 71 kelebek türüne ait Mitokondriyal COX 1 gen dizileri tür tayini amacıyla Gen bankasında karşılaştırma yapılmış. Filogenetik analizlerin gerçekleşmesinde tüm kelebeklere ait DNA dizileri ve Gen Bankasından elde edilen referans diziler kullanılmıştır. Ve Gen Bankasında %100 benzeşme gösteren türler dışında ve Gen Bankası'nın da kabul ettiği 49 türleri Bankanın veri tabanına yeni veri olarak kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geni türlerin birbiriyle akrabalık ilişkisini ölçmekten çok, tür ayrımında kullanıldığı bilinmektedir. Burada sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin yetersizliği ortaya çıkmıştır. Ve kelebek türlerinin moleküler verilerle değerlendirilmesinde ilk kez sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin kullanılması açısından hem de Hatay ilindeki kelebeklerin ülkemizde moleküler yönde ayrımı için ilk çalışma olmuştur.

Özdil (2007) , tez çalışmasında DNA PCR-RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerları kullanarak Türkiye'nin 20 farklı yöresine ait bal arılarının Mitokondriyal DNA molekülüne bakılarak genetik yapısı tanımlanmış, olası yeni haplotiplerin belirlenmesi ve farklı bölgelerde yetiştirilen populasyonlar arasındaki farklıların tespit edilmesi amacıyla anonim lokus, sitokrom b (cyt b), sitokrom C oksidaz I (COI), ribozomun büyük alt birimi (18S rRNA), sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki bölge (COI-COII arası) ve sitokrom C oksidaz I ile II arasındaki intergenik bölge (COI-COII intergenik bölge) lokuslarında farklı enzim kombinasyonlarından yararlanılarak PCR, PCR-RFLP analizi ile COI-COII intergenik bölgede DNA dizi analizi yapılmıştır.

Filiz ve Koç (2012), araştırma makalelerinde DNA barkodlamasında genel olarak kullanılan sitokrom oksidaz c alt ünite 1 geninin (COI) bitkilerde nükleotid değişim oranı düşük olduğundan uygun değildir. Bu yüzden bitkiler için genel bir gen arama

alışmalarını derleyip en sonunda çekirdek ribozomal ITS bölgelerinin bitki barkodlama çalışmaları için en ideal diziye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

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

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

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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. DNA İzolasyonu

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

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 Ochthebius, Limnebius ve 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.

Çizelge 3.1. Primer Tasarımında Kullanılan COI Gen Dizilimlerinin DNA Data Bankası Ulaşım Numaraları

Ochthebius COI Genleri	
Organizma	DataBank No
<i>Ochthebius salinator</i>	FJ944255.1
<i>Ochthebius gibbosus</i>	GU143755.1
<i>Ochthebius glaber</i>	FJ944225.1
<i>Ochthebius gerecke</i>	FJ944176.1
<i>Ochthebius gibbosus</i>	GU143767.1
<i>Ochthebius aquilera</i>	GU143761.1
<i>Ochthebius granulatus</i>	GU143765.1
<i>Ochthebius melanescens</i>	GU143766.1
<i>Ochthebius halbherri</i>	GU143764.1
<i>Ochthebius legionensis</i>	GU143762.1

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

Çizelge 3. 2. Q-PCR Sıcaklık Profilleri

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)
Ön İnkübasyon				
95		00:10:00	4,8	–
Çoğalma				
95		00:00:20	4,8	–
55		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
Erime Eğrisi				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
Soğuma				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Elde edilen PCR amplikonların 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.

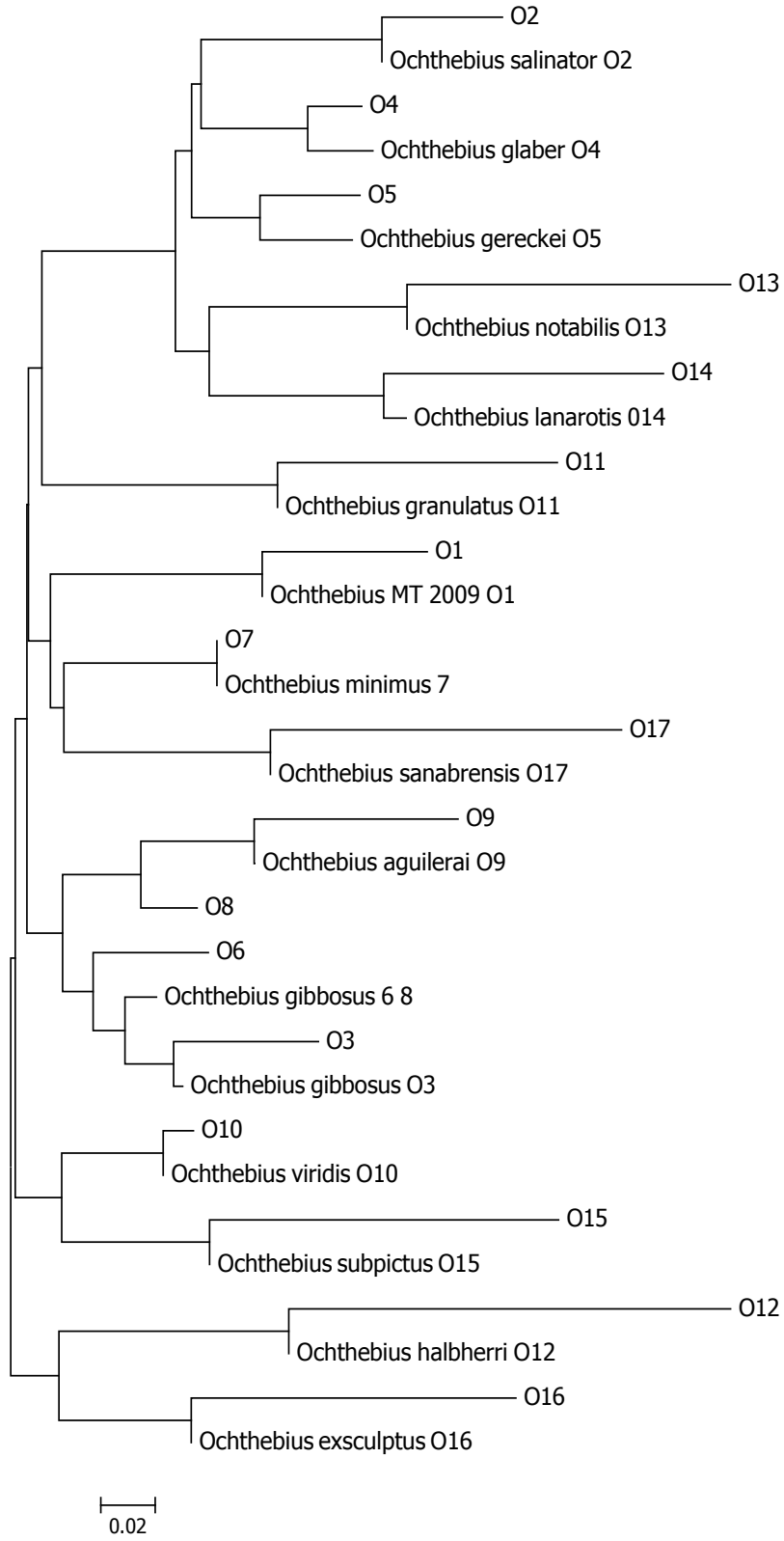
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Ochthebius Dizi Analizi Sonuçları

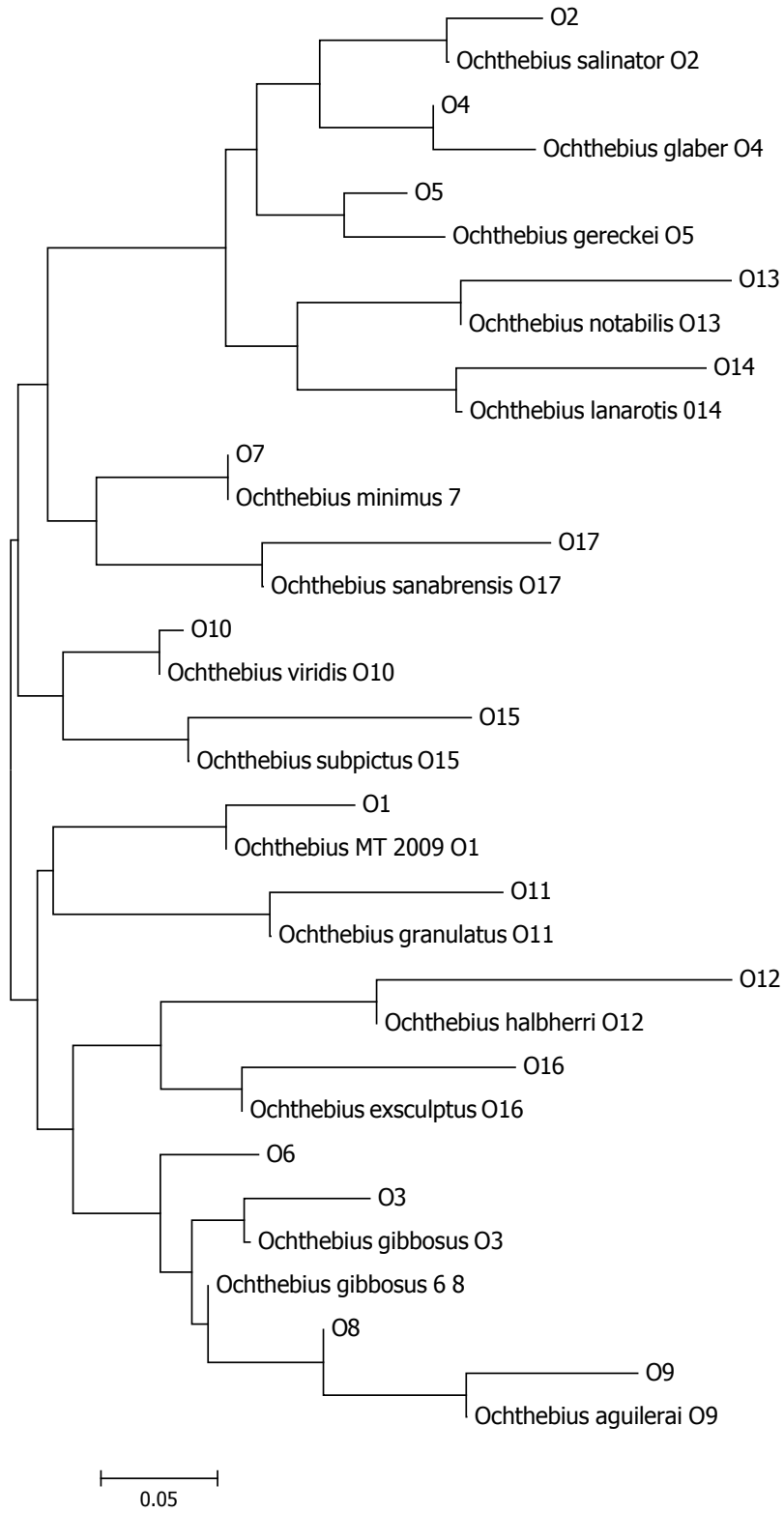
Elde edilen diziler EK-I’de verilmiştir. Böceğin morfolojisine dayalı yapılan tür tahmini, moleküler analizler sonucu elde edilen dizilerin DNA data bankasında en çok benzediği gen ve bu gene sahip organizma ve bu bilgiler ışığında yapılan filogenetik tür tahmini Tablo 3’te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Morfolojik ve Filogenetik Analiz Tür Tahminleri

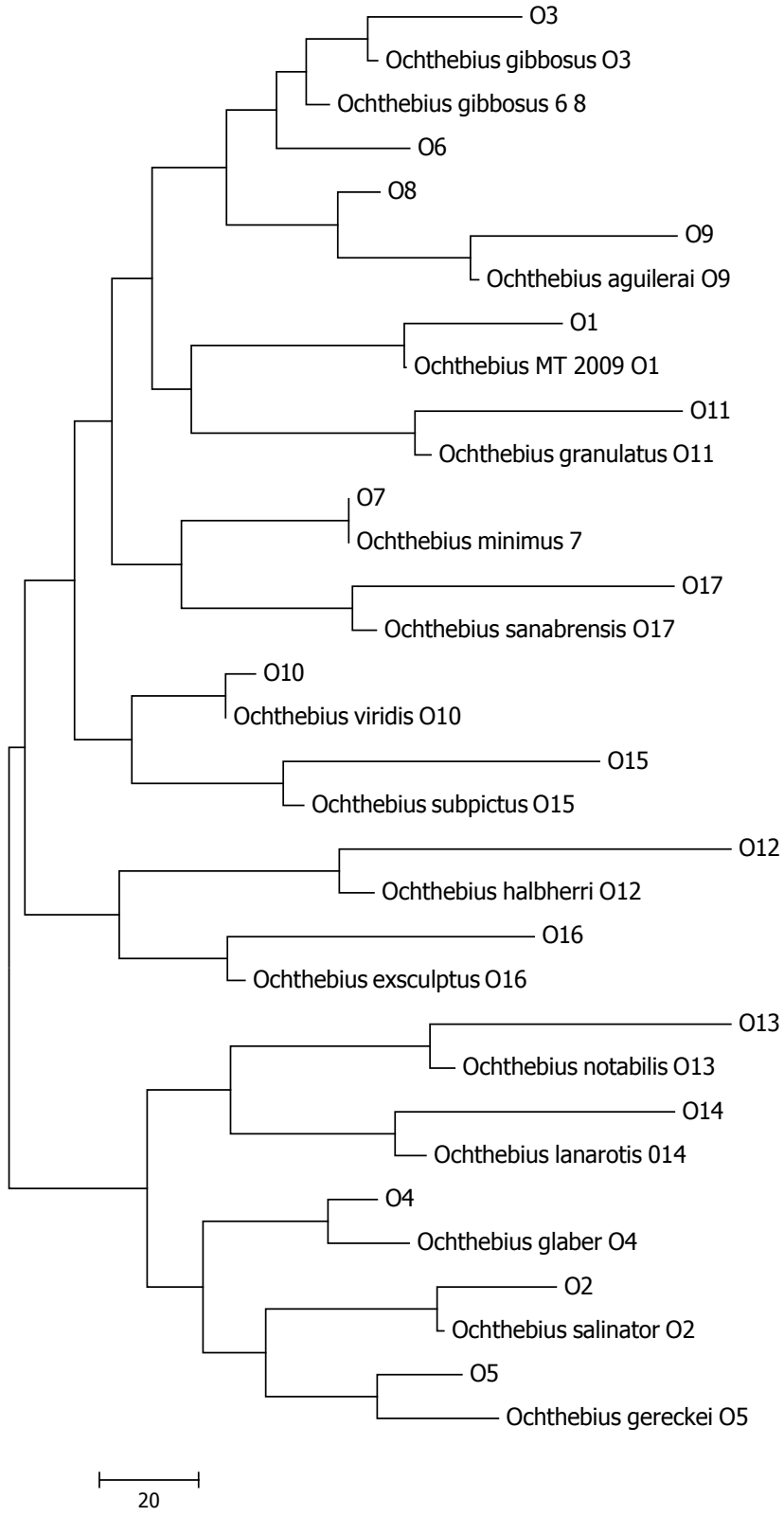
No	Morfolojik Tahmin	DNA Data Bankası	En Benzer COI Gen Dizisi	Filogenetik Tahmin	
		Databank No	Organizma-Gen	Benzerlik	
1	<i>O. meridionalis</i>	FJ623011.1	<i>Ochthebius sp.</i>	606/637 (95%)	<i>Ochthebius spp.</i>
2	<i>O. fausti</i>	FJ944271.1	<i>O. salinator</i>	619/642 (96%)	<i>Ochthebius spp.</i>
3	<i>O. lividipennis</i>	GU143755.1	<i>O. gibbosus</i>	617/647 (95%)	<i>Ochthebius spp.</i>
4	<i>O. striatus</i>	FJ944239.1	<i>O. glaber</i>	620/645 (96%)	<i>Ochthebius spp.</i>
5	<i>O. difficilis</i>	FJ944190.1	<i>O. gereckeai</i>	601/645 (93%)	<i>Ochthebius spp.</i>
6	<i>O.ragusae</i>	GU143767.1	<i>O. gibbosus</i>	608/644 (94%)	<i>Ochthebius spp.</i>
7	<i>O. minimus</i>	HE970842.1	<i>O. minimus</i>	644/644 (100%)	<i>Ochthebius minimus</i>
8	<i>O. pusillus</i>	GU143767.1	<i>O. gibbosus</i>	614/643 (95%)	<i>Ochthebius spp.</i>
9	<i>O. uskubensis</i>	GU143761.1	<i>O. aguilerai</i>	615/650 (95%)	<i>Ochthebius spp.</i>
10	<i>O. viridis</i>	HQ165437.1	<i>O. viridis</i>	696/705 (99%)	<i>Ochthebius viridis</i>
11	<i>O. remotus</i>	GU143765.1	<i>O. granulatus</i>	608/654 (93%)	<i>Ochthebius spp.</i>
12	<i>O. virens</i>	GU143764.1	<i>O. halbherri</i>	568/624 (91%)	<i>Ochthebius spp.</i>
13	<i>O. hofratvukovitsi</i>	FJ944120.1	<i>Oc. notabilis</i>	589/648 (91%)	<i>Ochthebius spp.</i>
14	<i>O. kirschenhoferi</i>	FJ944244.1	<i>O. lanarotis</i>	616/661 (93%)	<i>Ochthebius spp.</i>
15	<i>O. foveolatus</i>	HE970844.1	<i>O. subpictus</i>	593/640 (93%)	<i>Ochthebius spp.</i>
16	<i>O. akbuluti</i>	GU143754.1	<i>O. exsculptus</i>	577/654 (88%)	<i>Ochthebius spp.</i>
17	<i>O. oeskani</i>	EU660055.1	<i>O. sanabrensis</i>	585/644 (91%)	<i>Ochthebius spp.</i>



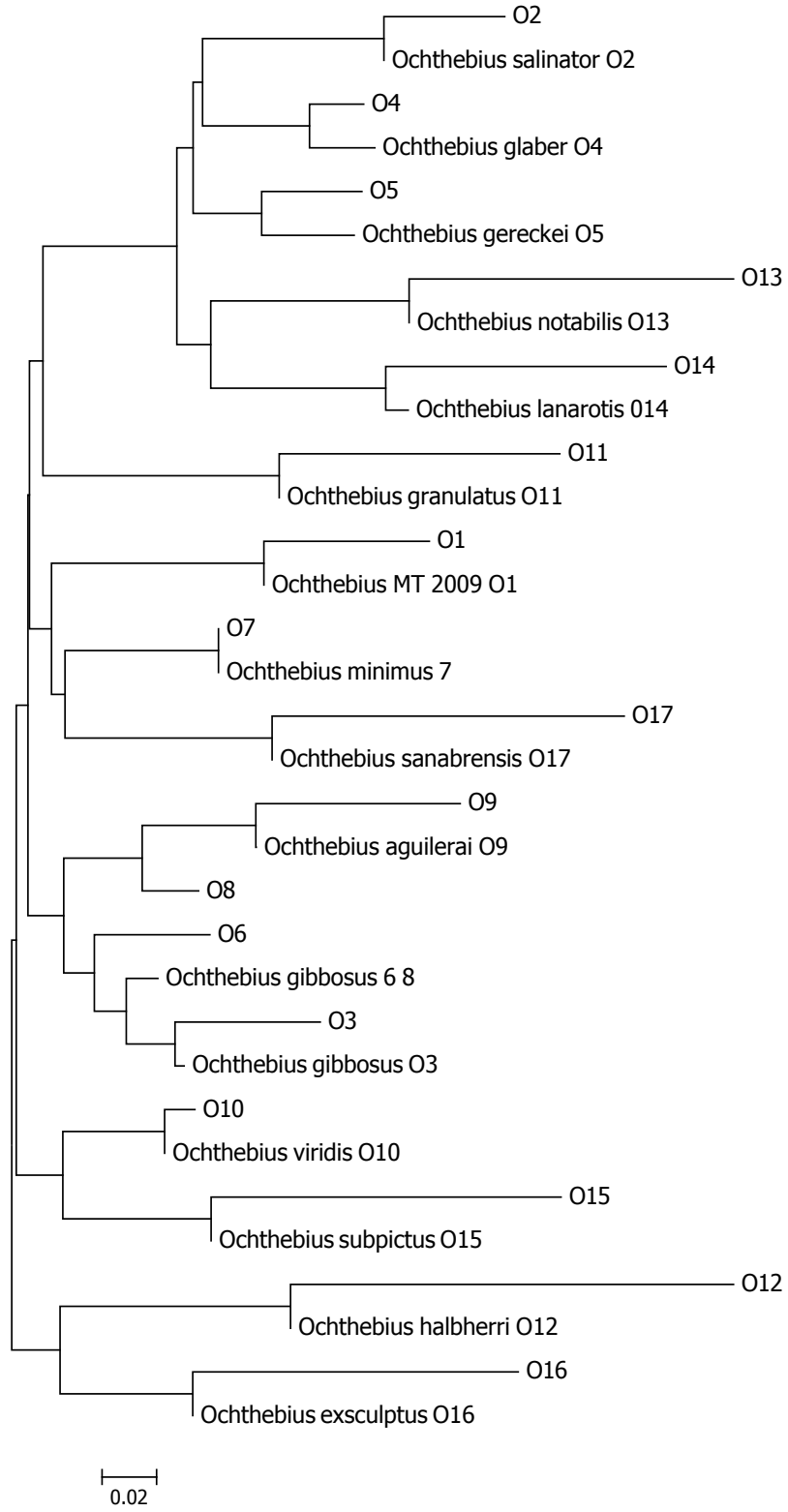
Şekil 4.1. Neighbor-joining ağacı



Şekil 4.2. Maximum likelihood ağacı



Şekil 4.3. Maximum parsimony ağacı



Şekil 4.4. Minimum evolution ağacı

5. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

1. *Ochthebius(s. str.) meridionalis* Germar, 1824

Query	1	GAGGAAATTAGGAACTTTTGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCCCTTGGTT	60
Sbjct	31	GAGGAAAAAGGAACTTTTGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTT	90
Query	61	TATTAGGCTTTGTTGTTTAGA-CTCATCATATATTTACTGCCCGTATAGATGTTGATACA	119
Sbjct	91	TATTAGGATTTGTTGTTT-GAGCTCATCATATATTTACTGTAGGTATAGATGTTGATACA	149
Query	120	CGAGGGGATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCAGTACCCACAGGTATTAAATAATC	179
Sbjct	150	CGAGCTTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCAGTACCCACAGGTATTAAATTTTC	209
Query	180	AGTTGGTTAGCAACTCTTCATGGAACACAAATCAATTATTCTCCAGCCATATTATGGGCT	239
Sbjct	210	AGTTGGTTAGCAACTCTTCATGGAACACAAATCAATTATTCTCCAGCCATATTATGGGCT	269
Query	240	TTAGGATTTGTATTTTATTACAGTTGGGGGATTAACCGGAGTAATCCTAGCAAACCTCA	299
Sbjct	270	TTAGGATTTGTATTTTATTACAGTTGGGGGATTAACCGGAGTAATCCTAGCAAACCTCA	329
Query	300	TCTATTGATATTATTCTTTTGATACATACTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTA	359
Sbjct	330	TCTATTGATATTATTCTTCATGATACATACTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTA	389
Query	360	TCAATAGGAGCTGTATTGCTATTATAGCAAGATTTATTCAATGATTCCTGCTATTCACG	419
Sbjct	390	TCAATAGGAGCTGTATTGCTATTATAGCAAGATTTATTCAATGATTCCTGCTATTCACG	449
Query	420	GGATTAACATTAAATAATAAATATTGAAATATCAATTTCTAACTATATTTATTGGAGTA	479
Sbjct	450	GGATTAACATTAAATAATAAATATTGAAATATCAATTTTAACTATATTTATTGGAGTA	509
Query	480	AACCTAACTTTTTTTCCTG-ACATTTTTTAGCGTTAAGAGGTATACCTCGACGTTACTCT	538
Sbjct	510	AACCTAACTTTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGGTTAAGAGGTATACCTCGACGTTACTCT	569
Query	539	TATTATCTAGATGCTTACACTTCATGATACATTGTATCTTCTATTGGATCATTAATTTCT	598
Sbjct	570	GATTATCCAGATGCTTACACTTCATGAAATATTGTATCTTCTATTGGATCAATAATTTCT	629
Query	599	CTAATTGCAATTATTATTTCTTTATTTATTGTATGAG	635
Sbjct	630	TTAATTGCAATTTTATTTTATTATTATTGTATGAG	666

2. *Ochthebius (s. str.) fausti* Sharp, 1887

Query	1	GAGGAAACGAGGAGACTTTCGGTACTTTGGGTATAATTTATGCAATAATAGCAATTGGCT	60
Sbjct	41	GAGGAAAAAGGAGACTTTCGGTACTTTGGGTATAATTTATGCAATAATAGCAATTGGCT	100
Query	61	TATTAGGATTTGTAGTGTGAGCTCATGGGATATTTACTGTGGGA-TGTCTGCTAGACACC	119
Sbjct	101	TATTAGGATTTGTAGTGTGAGCTCATCATATATTTACTGTGGGAATAGATG-TTGACACC	159
Query	120	CGAGCCCATCCTACTTCAGCAACTATAATTATTGCAGTTCACCCGGAATTAAATTTTT	179
Sbjct	160	CGAGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAATTATTGCAGTTCACCCGGAATTAAATTTTT	219
Query	180	AGATGATTAGCAACATTACATGGCACACAAATTAACCTACTCGCCAGCTATCTTATGAGCC	239
Sbjct	220	AGATGATTAGCAACATTACATGGCACACAAATTAACCTACTCGCCAGCTATGTTATGAGCC	279
Query	240	CTAGGATTTGTATTTTATTAGTGTAGGGGATTAACCTGGAGTAGTTCTAGCTAATTCT	299

Sbjct	280	 CTAGGATTTGTATTTTACTGTAGGGGGATTAAGTGGAGTAGTTCTAGCTAATTCT	339
Query	300	TCTATTGACGTAATTATACACGATACTTACTATGTTGTAGCCCATTTCCACTATGTATTA	359
Sbjct	340	 TCTATTGACGTAATTTACACGATACTTACTATGTTGTAGCCCATTTCCACTATGTATTA	399
Query	360	TCGATGGGAGCCGTATTCGCAATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTCCCCTTATTTACT	419
Sbjct	400	 TCGATGGGAGCCGTATTCGCAATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTCCCCTTATTTACT	459
Query	420	GGTTTAACAATAAATAATCTTTATTTAAAAATTCAGTCTATTATTATATCTATTGGGGTA	479
Sbjct	460	 GGTTTAACAATAAATAATCTTTATTTAAAAATTCAGTTTATTATTATATTTATTGGGGTA	519
Query	480	AATTTAACTTTTTTCCCCAACACTTTTTAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGATACTCA	539
Sbjct	520	 AATTTAACTTTTTTCCCCAACACTTTTTAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGATATTCA	579
Query	540	GATTATCCCGACGCTTATACAACCTGAAATATTATTTTCATCTATCGGATCAATAAATTTCC	599
Sbjct	580	 GATTATCCCGACGCTTATACAACCTGAAATATTATTTTCATCTATCGGATCAATAAATTTCC	639
Query	600	TTAATTGCTATCCTTATACTTTTATTATTATTGAGAAAGA 641	
Sbjct	640	 TTAATTGCTATTTTATACTTTTATTATTATTGAGAAAGA 681	

3.Ochthebius (s. str.) lividipennis Peyron, 1885

Query	1	GAGGGAAAAAGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTC	60
Sbjct	69	 GAGGGAAAAAGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTC	128
Query	61	TCTTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTCACGTGGCATAGATGTCCGCGTGT	120
Sbjct	129	 TCTTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTCACGTGGCATAGATGT-TGATACT	187
Query	121	C-AGCTTATTTTACTTCAGCAACCCTCGTCGATGGCAGTTCCTACAGGAATTAATAATTTT	179
Sbjct	188	 CGGGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAAT-TATTGCAGTTCCTACAGGAATTAATAATTTT	246
Query	180	TAGCTGATTAGCTACTCTTCATGGGACCCAAATTAACATTCTCCTTCAATACTTTGATC	239
Sbjct	247	 TAGCTGATTAGCTACTCTTCATGGGACCCAAATTAACATTCTCCTTCAATACTTTGATC	306
Query	240	TCTTGGATTTGTATTTTATTACTGTTGGTGGATTAAGTGGAGTAATTTTAGCTAATTC	299
Sbjct	307	 TCTTGGATTTGTATTTTATTACTGTTGGTGGATTAAGTGGAGTAATTTTAGCTAATTC	366
Query	300	TTCTATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTT	359
Sbjct	367	 TTCTATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTT	426
Query	360	GTCAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTCCCCTTATTTAC	419
Sbjct	427	 GTCAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTCCCCTTATTTAC	486
Query	420	GGGACTAACTATAAATCGTTGCAGTTTAAAAATTCAATTTTAAATTATTTATCGGAGT	479
Sbjct	487	 GGGACTAACTATAAATAACAAATTTTAAAAATTCAATTTTAAATTATTTATCGGAGT	546
Query	480	CAATATAACTTTTTTCTCAACATTTTTAGGTTTAAGAGGTATGCCACGTCGATACTC	539
Sbjct	547	 CAATATAACTTTTTTCTCAACATTTTTAGGTTTAAGAGGTATGCCACGTCGATACTC	606
Query	540	TGATTACCCAGACGCTTACACTTCCCTGCTAGC-TATTTCTTCAATTGGTTCTACAATTT	598
Sbjct	607	 TGATTACCCAGACGCTTACACTTCA-TGAAATATTATTTCTTCAATTGGTTCTACAATTT	665
Query	599	CTTTAATTGCAATCTTTTTTTTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT 645	
Sbjct	666	 CTTTAATTGCAATCTTTTTTTTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT 712	

4. *Ochthebius (Asiobates) striatus* *Castelnau, 1840 glaber* 96

Query	1	GAGGAAAAAAGGAAACATTCGGAACCTTGGGGATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGAT	60
Sbjct	41	GAGGAAAAAAGGAAACATTCGGAACCTTGGGGATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGAT	100
Query	61	TATTAGGATTTGTAGTTTGAGCTCATCATATATTTACTGTGGGAATAGATGTTGACACCC	120
Sbjct	101	TATTAGGATTTGTAGTTTGAGCGCATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATACTC	160
Query	121	GGGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAATCATTGCCGTACCAACTGGTATTAATAATTTT	180
Sbjct	161	GGGCTTATTTTCACTTCTGCAACTATAATCATTGCCGTACCAACTGGTATTAATAATTTT	220
Query	181	GTTGATTAGCTACTCTTCACGGAACCTCAAATTAATTATCCCTGCAATATTATGAGCAC	240
Sbjct	221	GTTGATTAGCTACTCTTCACGGAACCTCAAATTAATTATCCCTGCAATATTATGAGCAC	280
Query	241	TAGGATTTGTATTTTATTTACTGTGGGTGGTCTAACAGGAGTAGTTTGTAGCTAATTCCT	300
Sbjct	281	TAGGATTTGTATTTTATTTACTGTGGGTGGTCTAACAGGAGTAGTTTGTAGCTAATTCCT	340
Query	301	CAATTGATGTAATCTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTTTAT	360
Sbjct	341	CAATTGATGTAATCTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTTTAT	400
Query	361	CTATAGGCGCTGTATTTGCCATTATAGCCGGATTTATCAATGATTCCTTATTTACTG	420
Sbjct	401	CTATAGGCGCTGTATTTGCCATTATAGCCGGATTTATCAATGATTCCTTATTTACCG	460
Query	421	GTTTAACAATAAATAATCTTTATTTAAAAATTCAATTTATCGTGATATTTATTGGTGTA	480
Sbjct	461	GATTAACCATAAATAATATATATTTAAAAATTCAATTTATCGTGATATTTATTGGTGTA	520
Query	481	ATTTAACCTTTTTTCCCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGATACTCAG	540
Sbjct	521	ATTTAACCTTTTTTCCCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGATACTCAG	580
Query	541	ATTATCCTGACGCTTACTACTGAAATATTATTTTCATCTATCGGATCAATAATTTCTT	600
Sbjct	581	ATTATCCTGACGCTTACTACTGAAACATTATTTCTTCTATTTGGATCAATAATTTCTT	640
Query	601	TAATTGCTATTTTATACTT-CTATTTATTATTTGAGAAAGATT	644
Sbjct	641	TAATTGCCATCTTTAT-CTTACTATTTATTATTTGAGAAAGATT	684

5. *Ochthebius (Hymenodes) difficilis* *Mulsant, 1844 gerecke* 93

Query	1	GAGGGAAAAAGGAACTTTTGGAACCTTAGGGATAATTTATGCAATGATAGCAATTGGTT	60
Sbjct	41	GAGGGAAAAAGGAACTTTTGGAACCTTAGGGATAATTTATGCAATGATAGCAATTGGTT	100
Query	61	TATTAGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATGTCGATACAC	120
Sbjct	101	TATTAGGATTTGTAGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATGTTGATACAC	160
Query	121	GAGCTTACTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTCCGACCGGAATTAATAATTTTCA	180
Sbjct	161	GAGCTTACTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTCCGACCGGAATTAATAATTTTCA	220
Query	181	GATGACTAGCAACATTACATGGAACCCAAATTAATTATCTCCAGCAATACTTTGAGCCC	240
Sbjct	221	GATGACTAGCAACGTTACATGGAACCCAAATTAATTATCTCCAGCAATACTTTGAGCCC	280
Query	241	TAGGCTTTGTATTTTATTTACTGTGGGTGGTCTAACAGGAGTAGTTTGTAGCTAATTCCT	300
Sbjct	281	TAGGCTTTGTATTTTATTTACTAGTGGGGATTAACAGGAGTAGTATTAGCTAATTCCT	340
Query	301	CAATTGATGTAATCTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTTTAT	360
Sbjct	341	CTATTGATATCATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATGTTATTAT	400

Query	361	CTATAGGCGCTGTATTTGCCATTATAGCCGGATTTATCCAATGATTTCCCCTATTTACCG	420
Sbjct	401	CTATAGGCGCAGTATTTGCAATCATAGCAGGATTTATTCAATGATTTCCCCTATTTACTG	460
Query	421	GATTAACCATAAATAATATATATTTAAAAATTCATTTATCGTGATATTTATTGGTGTAA	480
Sbjct	461	GATTAACATAAATAACTTTTACTTAAAAATTCATTTATCATTATATTTATTGGAGTTA	520
Query	481	ATTTAACCTTTTTTCCCCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGGATACCTCGACGATACTCAG	540
Sbjct	521	ATTTAACCTTTTTTCCCCAACATTTTTTAGGATTAAGTGGGATACCACGACGATATTCTG	580
Query	541	ATTATCCTGACGCCTATACTACTTGAAATATCATCTCTTCTATTGGATCAATAATTTCT	600
Sbjct	581	ACTACCCAGATGCTTACACAACCTTGAAATATCATCTCTTCTATTGGATCAATAATTTCT	640
Query	601	TAATTGCCATTTTATACCTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	644
Sbjct	641	TAATTGCCATTTTATACCTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	684

6. *Ochthebius (s. str.) ragusae Kuwert, 1887 gibbosus 94 gereckeii 91*

Query	1	GAGGAAAAAAGAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTC	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTC	128
Query	61	TTTTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATGTCGATACAC	120
Sbjct	129	TTTTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATATTCCTGTTGGAATAGATGTTGATACTC	188
Query	121	GAGCTTACTTTACTTCAGCTACAATAATTATTGCTGTTCCGACCGGAATTAATAATTTTCA	180
Sbjct	189	GAGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAATTATTGCAGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTCA	248
Query	181	GATGACTAGCAACATTACATGGAACCCAAATTAATTATTCTCCAGCAATACTTTGAGCCC	240
Sbjct	249	GTTGATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCTCCTTCAATACTTTGATCTC	308
Query	241	TAGGCTTTGTATTTTATTTTACAGTAGGGGATTAACAGGAGTAGTATTAGCTAATTCTT	300
Sbjct	309	TTGGATTTGTATTTTATTTTACTGTTGGTGGATTAAGTGGCGTAATTTAGCTAATTCTT	368
Query	301	CTATTGATATTATTTTACATGATACTTATTATGTAGTAGCCCATTTCCATTATGTTTAT	360
Sbjct	369	CTATTGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTAT	428
Query	361	CAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTTCCCCTATTTACAG	420
Sbjct	429	CAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTTATTCAATGATTTCCCCTATTTACAG	488
Query	421	GACTAACTTTTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAATTATATTTATCGGAGTCA	480
Sbjct	489	GACTAACTTTTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAATTATATTTATCGGAGTCA	548
Query	481	ATATAACTTTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGTTTAAAGAGGTATGCCACGTCGATACTCTG	540
Sbjct	549	ATATAACTTTTTTTCCTCAACATTTTTTAGGTTTAAAGAGGTATGCCACGTCGATACTCTG	608
Query	541	ATTATCCAGATGCTTACACTTCATGAAATATTATTTTATCAATTGGCTCTACAATTTCTT	600
Sbjct	609	ATTATCCAGATGCTTACACTTCATGAAATATTATTTTATCAATTGGCTCTACAATTTCTT	668
Query	601	TAATTGCAATCTTTTTTTTTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	644
Sbjct	669	TAATTGCAATCTTTTTTTTTTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	712

7. *Ochthebius (Asiobates) minimus Fabricius, 1792* minimus 100

Query	1	GAGGAAAAAAGAACTTTTGGAACATTAGGAATAATTTATGCCATAATAGCAATTGGTC	60
Sbjct	69	GAGGAAAAAAGAACTTTTGGAACATTAGGAATAATTTATGCCATAATAGCAATTGGTC	128
Query	61	TTTGTAGGTTTGTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATGTTGATACTC	120
Sbjct	129	TTTGTAGGTTTGTGTATGAGCTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATGTTGATACTC	188
Query	121	GAGCCTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCTGTTCCTACAGGAATTAATTTT	180
Sbjct	189	GAGCCTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCTGTTCCTACAGGAATTAATTTT	248
Query	181	GTTGATTAGCAACTCTTCATGGAACCTCAAATTTCTTACTCCCCATCAATATTATGATCTT	240
Sbjct	249	GTTGATTAGCAACTCTTCATGGAACCTCAAATTTCTTACTCCCCATCAATATTATGATCTT	308
Query	241	TAGGATTGTATTTTTATTTACAGTGGGAGGATTAACAGGTGTAATTCTAGCAAATTCAT	300
Sbjct	309	TAGGATTGTATTTTTATTTACAGTGGGAGGATTAACAGGTGTAATTCTAGCAAATTCAT	368
Query	301	CAATTGATATTATTTTACATGATACATATTATGTAGTTGCACATTTTCATTATGTTTTAT	360
Sbjct	369	CAATTGATATTATTTTACATGATACATATTATGTAGTTGCACATTTTCATTATGTTTTAT	428
Query	361	CAATAGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATTCAATGATTCCTTTTATTCACAG	420
Sbjct	429	CAATAGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTATTCAATGATTCCTTTTATTCACAG	488
Query	421	GATTAACCTTTAAACAATAAATCTTAAAAATCAATTTTAAATTATATCTTAGGTGTTA	480
Sbjct	489	GATTAACCTTTAAACAATAAATCTTAAAAATCAATTTTAAATTATATCTTAGGTGTTA	548
Query	481	ATTTAACTTTTTTCCCTCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGAATACCTCGTCGATATTCAG	540
Sbjct	549	ATTTAACTTTTTTCCCTCAACATTTTTTAGGATTAAGAGGAATACCTCGTCGATATTCAG	608
Query	541	ATTATCCAGACGCATACACTACTTGAAATATTGTTTCTTCTATTGGCTCTACTATTTCTT	600
Sbjct	609	ATTATCCAGACGCATACACTACTTGAAATATTGTTTCTTCTATTGGCTCTACTATTTCTT	668
Query	601	TAATTGCAATTTTATTTTATTTATCATTGAGAAAGATTT	644
Sbjct	669	TAATTGCAATTTTATTTTATTTATCATTGAGAAAGATTT	712

8. *Ochthebius (s. str.) pusillus* Stephens, 1835

Query	3	GGAAAGAAAGAACTTTTGGCACTTTAGGAATAATTTACGCTATAATGGCTATCGGTTTA	62
Sbjct	71	GGAAAGAAAGAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGTCTT	130
Query	63	TTAGGATTTGTGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTAGACACCCGA	122
Sbjct	131	TTAGGATTTGTGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTTGGAATAGATGTGATACTCGA	190
Query	123	GCTTATTTTACTTCCGCAACTATAATCATTGCTGTCCCAACTGGAATTAATTTTATAGT	182
Sbjct	191	GCTTATTTTACTTCCGCAACTATAATCATTGCTGTCCCAACTGGAATTAATTTTATAGT	250
Query	183	TGATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCTCCTTCAATACTTTGATCTCTT	242
Sbjct	251	TGATTAGCTACTCTTCATGGAACACAAATTAATTATTCTCCTTCAATACTTTGATCTCTT	310
Query	243	GGATTTGTATTTTATTTACTGTTGGTGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCTAATTTCTTCT	302
Sbjct	311	GGATTTGTATTTTATTTACTGTTGGTGGATTAAGTGGCGTAATTTTAGCTAATTTCTTCT	370
Query	303	ATTGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTATCA	362

Sbjct	371		ATTGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTAGTAGCTCATTTTCATTATGTTTTATCA	430
Query	363		ATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTATTCAATGATTCCCCTTATTTACAGGA	422
Sbjct	431		ATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCCGGATTATTCAATGATTCCCCTTATTTACAGGA	490
Query	423		CTAACTTTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAATTATATTATCGGAGTCAAT	482
Sbjct	491		CTAACTTTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAATTATATTATCGGAGTCAAT	550
Query	483		ATAACTTTTTTCTCAACATTTTTAGGTTTAAGAGGTATGCCACGTCGATACTCTGAC	542
Sbjct	551		ATAACTTTTTTCTCAACATTTTTAGGTTTAAGAGGTATGCCACGTCGATACTCTGAT	610
Query	543		TATCCAGATGCTTACACTACATGAAATATTATTTCTTCTATTGGTTCTATAATTTTCA	602
Sbjct	611		TATCCAGATGCTTACACTTCATGAAATATTATTTTCATCAATTGGCTCTACAATTTCTT	670
Query	603		ATCGCAAT-TTTTTTTTCTTATTTATTATTTGAGACAGATT	644
Sbjct	671		ATTGCAATCTTTTTTTTT-TATTTATTATTTGAGAAAGATT	712

9.Ochthebius (s. str.) uskubensis Hebauer, 1986

Query	1		GTGGAAGAAAGAAACTTTTGGCACTTTAGGAATAATTTACGCTATAATGGCTATCGGTT	60
Sbjct	69		GTGGAAGAAAGAAACTTTTGGCACTTTAGGAATAATTTACGCTATAATGGCTATCGGTT	128
Query	61		TATTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATACGCTAGCTG--AGAATAGATGTAGACAC	118
Sbjct	129		TATTAGGATTTGTTGTATGAGCTCATCATATA-TTTA-CTGTTGGAATAGATGTAGACAC	186
Query	119		CCGAGCTTATTTTACTTCCGCAACTATAATCATTGCTGTCCCAACTGGAATTAATAATTT	178
Sbjct	187		CCGAGCTTATTTTACTTCCGCAACTATAATCATTGCTGTCCCAACTGGAATTAATAATTT	246
Query	179		TAGTCGCTAGCTGACTCTTCATGGAACCTCAAATTAATTATTTCCCTGCTA-GCTGATTGA	236
Sbjct	247		TAGTTGATTGGCCACTCTTCATGGAACCTCAAATTAATTATTTCCCTTCTATACT--TTGA	304
Query	237		TCTTTAGGATTTGTATTTTATTACCGTAGGTGGATTAACAGGTGTAATTTTAGCTAAT	296
Sbjct	305		TCTTTAGGATTTGTATTTTATTACCGTAGGTGGATTAACAGGTGTAATTTTAGCTAAT	364
Query	297		TCTTCTATTGATATTATTTCTTCATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTCCATTATGTT	356
Sbjct	365		TCTTCTATTGATATTATTTCTTCATGATACTTATTATGTAGTAGCTCATTTCCATTATGTT	424
Query	357		CTCTCTATGGGAGCCGTATTTGCCATTATAGCAGGATTTATCCAATGATTCCCCCTATTT	416
Sbjct	425		CTCTCTATGGGAGCCGTATTTGCCATTATAGCAGGATTTATCCAATGATTCCCCCTATTT	484
Query	417		ACTGGTTTAACTCTAA-CGCTAGCTGACTTGAAAATTCATTTTAAATTATATTATTGG	475
Sbjct	485		ACTGGTTTAACTCTAAATAATAAAT-TCTTGAAAATTCATTTTAAATTATATTATTGG	543
Query	476		TGTAAATCTTACATTTTCCCTCAACATTTTATAGGATTAAGGGGAATGCCCGACGATA	535
Sbjct	544		TGTAAATCTTACATTTTCCCTCAACATTTTATAGGATTAAGGGGAATGCCCGACGATA	603
Query	536		CTCTGACTATCCAGATGCTTACACTACC-GCTAGCTGAATTTCTTCTATTGGTTCTATAA	594
Sbjct	604		CTCTGACTATCCAGATGCTTACACTACATGAAATATT-ATTTCTTCTATTGGTTCTATAA	662
Query	595		TTTCATTAATCGCAATTTTTTTTTTCTTATTTATTATTTGAGACAGATT	644
Sbjct	663		TTTCATTAATCGCAATTTTTTTTTTCTTATTTATTATTTGAGACAGATT	712

10. *Ochthebius (s. str.) viridis* Peyron, 1858

Query	1	ATTATTTGTCAAGAAAGAGGAAAAAAGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCA	60
Sbjct	1	ATTATTTGTCAAGAAAGAGGAAAAAAGAAACTTTTGGTACTTTAGGAATAATTTATGCA	60
Query	61	ATAATAGCAATTGGATTATTAGGGTTTGTGTTTGAGCACATCACATATTCAGTGTAGGA	120
Sbjct	61	ATAATAGCAATTGGATTATTAGGGTTTGTGTTTGAGCACATCACATATTCAGTGTAGGA	120
Query	121	ATAGATGTAGATACACGAGCTTATTTTACATCTGCAACTATTTTATTGCTGTACCAACA	180
Sbjct	121	ATAGATGTAGATACACGAGCTTATTTTACATCTGCAACTATAATTATTGCTGTACCAACA	180
Query	181	GGAATTAAAATTTTATGATGACTAGCTACTCTTCATGGAACCTCAAATTAATTATTCACCT	240
Sbjct	181	GGAATTAAAATTTTATGATGACTAGCTACTCTTCATGGAACCTCAAATTAATTATTCACCT	240
Query	241	TCAATATTATGATCTTTAGGATTTGTATTTTATTTACTGTAGGAGGATTAACAGGAGTT	300
Sbjct	241	TCAATATTATGATCTTTAGGATTTGTATTTTATTTACTGTAGGAGGATTAACAGGAGTT	300
Query	301	ATTTTAGCAAATCTTCTATTGATGTTATTATACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCAT	360
Sbjct	301	ATTTTAGCAAATCTTCTATTGATGTTATTATACATGATACTTATTATGTAGTAGCTCAT	360
Query	361	TTTCATTATGTATTATCTATAGGAGGACTATTTGCAATTATAGCAGGATTTATTCAATGA	420
Sbjct	361	TTTCATTATGTATTATCTATAGGAGGACTATTTGCAATTATAGCAGGATTTATTCAATGA	420
Query	421	TTTCCTTTATTCACAGGATTAAACTTAAATAATAAAATTTTAAACCATTCAATTTTAAAT	480
Sbjct	421	TTTCCTTTATTCACAGGATTAAACTTAAATAATAAAATTTTAAACCATTCAATTTTAAAT	480
Query	481	ATATTTATTGGAGTAAATTTAACTTTTTTCCCTCAACATTTTATAGGGTTAAGAGGAATA	540
Sbjct	481	ATATTTATTGGAGTAAATTTAACTTTTTTCCCTCAACATTTTATAGGGTTAAGAGGAATA	540
Query	541	CCACGACGTTATTTCAGATTATCCAGATGCTTATACAACCTTGAaatattatttcctctatt	600
Sbjct	541	CCACGACGTTATTTCAGATTATCCAGATGCTTATACAACCTTGAATATATTATTCCTCTATT	600
Query	601	GGATCAATAATTTTCATTAATTGCAATTTTCTATTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	660
Sbjct	601	GGATCAATAATTTTCATTAATTGCAATTTTCTATTTTATTTATTATTGAGAAAGATTT	660
Query	661	ATTTTCATTACGAATTAGAATTTCTTCTTTACACATAAATACATCT	705
Sbjct	661	ATTTTCATTACGAAAAAGAATTTCTTCTTTACACATAAATACATCT	705

11. *Ochthebius (Asiobates) remotus* Teitter, 1885

Query	1	GTGGTAAAAAGGAACTTTTGGTACACTTGGGATAATTTATG-AATGATCTCCAATTGGT	59
Sbjct	69	GTGGTAAAAAGGAACTTTTGGTACACTTGGGATAATTTATGCTATAAT-AGCAATTGGT	127
Query	60	TTATTAGGATTTGTAGTATGAGCCCATCATATTTTACTGTTG-AAT-GATCTCCTGACA	117
Sbjct	128	TTATTAGGATTTGTAGTATGAGCCCATCATATTTTACTGTTGGAATGGATGT--TGACA	185
Query	118	CTCGAAATGATCTCCCATCAGCTACTATAATTATTGCTGTTCCCTACTGGAATTAAATTT	177
Sbjct	186	CTCGAGCTTATTTACATCAGCTACTATAATTATTGCTGTTCCCTACTGGAATTAAATTT	245
Query	178	TTAGTTGACTAGCAACTCTTCATGGGACCCAAATTAACCTATTTCCCCCTCCATACTATGAT	237
Sbjct	246	TTAGTTGACTAGCAACTCTTCATGGGACCCAAATTAACCTATTTCCCCCTCCATACTATGAT	305
Query	238	CATTGGGATTTGTATTTCTTTTACTGTAGGAGGTCTAACAGGAGTTATTTTAGCCAATT	297

Sbjct	306	 CATTGGGATTGTATTCTTTTACTGTAGGAGGTCTAACAGGAGTTATTTTAGCCAATT	365
Query	298	CTTCTATTGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTAGTTGCCCATTTTCACTACGTCC	357
Sbjct	366	 CTTCTATTGATATTATTTTACATGACACTTATTATGTAGTTGCCCATTTTCACTACGTCC	425
Query	358	TTTCTATAGGAGCCGTATTTGCTATCATAGCTGGTTTTATTCAATGATACCCTTTATTTA	417
Sbjct	426	 TTTCTATAGGAGCCGTATTTGCTATCATAGCTGGTTTTATTCAATGATACCCTTTATTTA	485
Query	418	CTGGTTTAACATTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAAA-ATGATCTCCTGGG	476
Sbjct	486	 CTGGTTTAACATTAAATAATAAATTTTAAAAATTCATTTTAAATTAT-ATTATTGGG	544
Query	477	GTTAAC-AATGATCTCCTTCCCCAACATTTTTTAGGGCTAAGAGGTATACCCCGTCGTTA	535
Sbjct	545	 GTTAACCTAACAT-TCTTCCCCAACATTTTTTAGGGCTAAGAGGTATACCCCGTCGTTA	603
Query	536	TTCTGATAATGATCTCCCTTACACTTCATGAAATGTAATGATCTCCAAT--GATCTCCA	593
Sbjct	604	 TTCTGATTACCTGATGCTTACACTTCATGAAATGTAATT--TCTTCTATTGGATCAATA	661
Query	594	ATTTTCATTAATTGCAATCTTAATTTTTTTTATTATTATTATTTGAGAAAGATTT	644
Sbjct	662	 ATTTTCATTAATTGCAATCTTAATTTTTTTTATTATTATTATTTGAGAAAGATTT	712

12.Ochthebius (s. str.) virens Jach, 1992

Query	1	GTGGAAAAAGGAAACTTTTGGCACAGTCGATGATAATTTACGCAATAATAGCTATCGGG	60
Sbjct	69	 GTGGAAAAAGGAAACTTTTGGAACTTTAGGT-ATAATTTACGCAATAATAGCTATCGGG	127
Query	61	CTTTTAGGATTGTAGTCTGAGCCACAGTC-GATGTTCACTGTTGGAATAGACGT-CACA	118
Sbjct	128	 CTTTTAGGATTGTAGTCTGAGCC-CA-TCATATATTCAGTGTGGAATAGACGTAGATA	185
Query	119	GTCGATGGCTTATTTTACTTCGGCCACCATAATTATTGCAGTTCCAACCGGAATTAACAC	178
Sbjct	186	 CCCGA--GCTTATTTTACTTCGGCCACCATAATTATTGCAGTTCCAACCGGAATTAATAA	243
Query	179	AGTCGATGTGATTAGCTACACTTCATGGCACTCAAATTCAC-AGTCGATGCTTCTATACT	237
Sbjct	244	 TTTC-AGATGATTAGCTACACTTCATGGCACTCAAATTAACACTC--CCCTTCTATACT	300
Query	238	TTGATCTCTAGGTTTTGTTTTCTATTCACTGTAGGCGGATTAACGGTGTTATTTTAGC	297
Sbjct	301	 TTGATCTCTAGGTTTTGTTTTCTATTCACTGTAGGCGGATTAACGGTGTTATTTTAGC	360
Query	298	TAACTCTCAATTGACATTATTTTACATGATACTTATTACGTAGTGGCACATTTTCATTA	357
Sbjct	361	 TAACTCTCAATTGACATTATTTTACATGATACTTATTACGTAGTGGCACATTTTCATTA	420
Query	358	TGTATTATCAATAGGTGCAGTATTTGCAATTATAGCAGGATTATCCAATGATTCCCATT	417
Sbjct	421	 TGTATTATCAATAGGTGCAGTATTTGCAATTATAGCAGGATTATCCAATGATTCCCATT	480
Query	418	ATTTACTGGCCTAACATTAAATAATAAATTCACAGTCGATGCAATTTTAAATTATATTTA	477
Sbjct	481	 ATTTACTGGCCTAACATTAAATAATAAATTTTAAAA-ATTCAATTTTAAATTATATTTA	539
Query	478	TCGGGGTAACTTAACATTTTTCACAGTCGATGTTTTTTAGGGCTTAGAGGAATACCTCGG	537
Sbjct	540	 TCGGGGTAACTTAACATTTTCCCC-CAACATTTTTTAGGGCTTAGAGGAATACCTCGG	598
Query	538	CGATATTCTGATTATCCTGACGCCTATACTTCC-ACAGTCGATGATTTCATCTATTGGAT	596
Sbjct	599	 CGATATTCTGATTATCCTGACGCCTATACTTCGTGAAAT--ATTATTTCATCTATTGGAT	656
Query	597	CTACTATCTCTCTAATTGCTATTT	620
Sbjct	657	 CTACTATCTCTCTAATTGCTATTT	680

13.Ochthebius (s. str.) hofratvukowitsi**Jach, 1994**

Query	1	AGGGAAAAAGGAAACTTTTGGGACTCTGGGAATAATTTATGCCATAATGGCAATTGGATT	60
Sbjct	42	AGGGAAAAAGGAAACTTTTGGGACTCTGGGAATAATTTATGCCATAATGGCAATTGGATT	101
Query	61	ACTGGGATTTTGTAG-CGCAGTTTAGCGCAGTATTTACAGTCGGAATAGATGTTGATACTC	119
Sbjct	102	ACTGGGATTTGTAGTATGAGCACATCATA-TATTTACAGTCGGAATAGATGTTGATACTC	160
Query	120	GAGCTTATTTTACCTCAGCAACTATAATATTGCTGTACCTACTGGAATTAATAATTTT	179
Sbjct	161	GAGCTTATTTTACCTCAGCAACTATAATATTGCTGTACCTACTGGAATTAATAATTTT	220
Query	180	GATGATTAGCTACATTACATGGAACCTCAAATTAACCTATTCTTTAGCGCAGTTATGAGCAT	239
Sbjct	221	GATGATTAGCTACATTACATGGAACCTCAAATTAACCTATTCACCAGCTATATTATGAGCAT	280
Query	240	TAGGGTTTGTATTTTATTTACAGTTGGAGGATTAACCGGAGTAGTACTTGCTAATTCAT	299
Sbjct	281	TAGGGTTTGTATTTTATTTACAGTTGGAGGATTAACCGGAGTAGTACTTGCTAATTCAT	340
Query	300	CTATTGATGTAATTTTACATGATACTTACTATGTAGTTGC-TTAGCGCAGTATGTTCTA	358
Sbjct	341	CTATTGATGTAATTTTACATGATACTTACTATGTAGTTGCCCATTTT-CACTATGTTCTA	399
Query	359	TCAATGGGTGCTGTATTTGCCATTATAGCTGGATTTATCCAATGATTCCCATTTATTTACA	418
Sbjct	400	TCAATGGGTGCTGTATTTGCCATTATAGCTGGATTTATCCAATGATTCCCATTTATTTACA	459
Query	419	GGATTAACCTATTT-TAGCGCAGTATTTAAAAATTTAGCGCAGCGTAATTTATTTGGAGT	477
Sbjct	460	GGATTAACCTATAAATAATATA-TATTTAAAAATTCATTTATCGTAATTTATTTGGAGT	518
Query	478	TAATTTAACTTTCTTCCCTCAACATTTCTTAG-TTTAGCGCAGGATGCCTCGGCGATATT	536
Sbjct	519	TAATTTAACTTTCTTCCCTCAACATTTCTTAGGTTTAAGGG-GGATGCCTCGGCGATATT	577
Query	537	CTGTTTAGCGCAGTGCCTATACTT-TTAGCGCAGTTATTTCTTCTATCGGATCAATAATT	595
Sbjct	578	CTGACTACCCCGATGCCTATACTACTTGAAATA-TTATTTCTTCTATCGGATCAATAATT	636
Query	596	TCTTTAATTGCAATTTTATTTATTTATTTATTTGTATGAGAAAGATT	643
Sbjct	637	TCTTTAATTGCAATTTTATTTATTTATTTATTTGTATGAGAAAGATT	684

14.Ochthebius (s. str.) kirschenhoferi**Jach, 1994**

Query	1	GAGGaaaaaaGAAACATTT-CCTCTCAGTCAGGTATAATTTATGCAATAATAGCAATTG	59
Sbjct	41	GAGGAAAAAAGAAACATTTGGAACCTC--T-TGGTATAATTTATGCAATAATAGCAATTG	97
Query	60	GGTTATTAGGATTCGTTGTTTACCTC-TCAGTCAGTATTTACAGTAGGAATAGATGTAG	118
Sbjct	98	GGTTATTAGGATTCGTTGTTTACCTC-T-A-TATTTACAGTAGGAATAGATGTAG	154
Query	119	ATACACGTGCTTACTTCACTTCAGCACCTCTCAGTCAGTTGCAGTTCCAACCTGGAATTAA	178
Sbjct	155	ATACACGTGCTTACTTCACTTCAGCAACTAT-AATTA-TTGCAGTTCCAACCTGGAATTAA	212
Query	179	AATTTTATAGATGATTAGCGACTCTTCAT-CCTCTCAGTCAGTTAATTATTCACCTGCTAT	237
Sbjct	213	AATTTTATAGATGATTAGCGACTCTTCATGGAACCTCAG--A-TTAATTATTCACCTGCTAT	269
Query	238	ATTATGGGCATTAGGATTTGTATTCTTATTTACAGTAGGGGGATTAACAGGAGTAGTATT	297
Sbjct	270	ATTATGGGCATTAGGATTTGTATTCTTATTTACAGTAGGGGGATTAACAGGAGTAGTATT	329
Query	298	AGCCAATTCATCTATTGATGTAATTTTACATGACACTTATTATGTAGTCGCTCATTTCCA	357

Sbjct	330	AGCCAATTCATCTATTGATGTAATTTTACATGACACTTATTATGTAGTCGCTCATTTCCA	389
Query	358	TTATGTTCTTTCTATGGGGGCTGTATTGCCCCCTCTCAGTCAGGATTTATCCAATGGTTC	417
Sbjct	390	TTATGTTCTTTCTATGGGGGCTGTATTGCCATTAT-AG-CAGGATTTATCCAATGGTTC	447
Query	418	CCTTTATTTACTGGATTGACTATAAATAACTCATATTTAAAAATTCAATTCATTGTTATA	477
Sbjct	448	CCTTTATTTACTGGATTGACTATAAATAACTCATATTTAAAAATTCAATTCATTGTTATA	507
Query	478	TTTCCTCTCAGTCAGATTTAACTTTTTTCCCCAACATTTTCTAGGATTAAGGGGCATAC	537
Sbjct	508	TTTATTGG-AGTTA-ATTTAACTTTTTTCCCCAACATTTTCTAGGATTAAGGGGCATAC	565
Query	538	CTCGACGATACTCTGATTACCCAGACGCATACACACCTCTCAGTCAGTTATTTCTTCTAT	597
Sbjct	566	CTCGACGATACTCTGATTACCCAGACGCATACACAAC-TGAAACA-TTATTCTTCTAT	623
Query	598	CGGATCTATAATTTCTTAATTGCAATTTTTATTTTACTATTTCATTGTATGAGAAAGTTT	657
Sbjct	624	CGGATCTATAATTTCTTAATTGCAATTTTTATTTTACTATTTCATTGTATGAGAAAGTTT	683
Query	658	T 658	
Sbjct	684	T 684	

15.Ochthebius (s. str.) foveolatus Germar, 1824

Query	13	AAACCTTTGGGACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCATACGTAACCTTTAGGATTTG	72
Sbjct	81	AAACCTTTGGGACTTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTGGATTATTAGGATTTG	140
Query	73	ATACGTA--ACTACATCATATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGATACACGAGCCTATTT	130
Sbjct	141	-TA-GTATGAGCACATCATATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGATACACGAGCCTATTT	198
Query	131	TACATCTGCAACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTAGGATACGTAA	190
Sbjct	199	TACATCTGCAACTATAATTATTGCCGTTCTACAGGAATTAATAATTTTAGG-TGGTTAG	257
Query	191	CT-CTCTTCATGGAACCAAAATTAATTACTCTCCTTCTATATTGTGATCACTTGGCTTTG	249
Sbjct	258	CTACTCTTCATGGAACCAAAATTAATTACTCTCCTTCTATATTGTGATCACTTGGCTTTG	317
Query	250	TGT-ATACGTAACCTTGTAGGGGGTTTGACTGGAGTAATTTTAGCTAATTCTTCTATTGAT	308
Sbjct	318	TGTTTTTATTAC-TGTAGGGGGTTTGACTGGAGTAATTTTAGCTAATTCTTCTATTGAT	376
Query	309	ATTATTTTACATGAATACGTA-ACTGTAGTAGCCATTTTCACTATGTATTATCTATAGG	367
Sbjct	377	ATTATTTTACATGA-TACTTATTATGTAGTAGCCATTTTCACTATGTATTATCTATAGG	435
Query	368	GGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGAATACGTAACGATTTCCATTATTCAGTGGATTAAC	427
Sbjct	436	GGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGATTTATTCAATGATTTCCATTATTCAGTGGATTAAC	495
Query	428	ATTAAACAATAAATTTTAAAAATTCAATTTTAAATTATATTATTGGTGTAATTTAAC	487
Sbjct	496	ATTAAACAATAAATTTTAAAAATTCAATTTTAAATTATATTATTGGTGTAATTTAAC	555
Query	488	CTTTTCCCTCAACATTTTGGGTTTAAAGAGGCATACCCGACGTTATTCAGATTATCC	547
Sbjct	556	CTTTTCCCTCAACATTTTGGGTTTAAAGAGGCATACCCGACGTTATTCAGATTATCC	615
Query	548	AGATGAT-ACGTAACCTTGAATATTTATTTTCATCTATTGGATCAATAATTTCTTTAATTG	606
Sbjct	616	AGATGCTTACACAAC-TTGAAATATTATTTTCATCTATTGGATCAATAATTTCTTTAATTG	674
Query	607	CTATTTTTTTATTTTTATACGTAACCTTGAGATAGATTT 644	
Sbjct	675	CTATTTTTTTATTTTTATTTTATTTTGGATAGATTT 712	

16. *Ochthebius (Asiobates) akbuluti* Jach, Kasapoglu&Erman, 2003

Query	1	GAGGGAAAAAGGAACTTTTGGTACTTTAGGTATAATTTATGCAATAATAGC-A-TCGTA	58
Sbjct	69	GAGGGAAAAAGGAACTTTTGGTACTTTAGGTATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGTT	128
Query	59	AGGCTTAGGATTGTAGTTTGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGCATAGATGTTGATAC	118
Sbjct	129	TA--TTAGGATTGTAGTTTGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGCATAGATGTTGATAC	186
Query	119	ACGGGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAATTATTGCAGTTCCAAATCGTAAGGC-AATTT	177
Sbjct	187	ACGGGCTTATTTTACTTCAGCAACTATAATTATTGCAGTTCCAAC-CGGAATTAAAATTT	245
Query	178	TTAGTTGATTAGCCACTCTTCATGGTACTCAGATTAATTATTCTCCTCAATACTTTGAT	237
Sbjct	246	TTAGTTGATTAGCCACTCTTCATGGTACTCAGATTAATTATTCTCCTCAATACTTTGAT	305
Query	238	CTCTAGGATTGTATTTTATTACATCGTA--AGGCTTAAGTGGAGTAATTCCTGCTAA	295
Sbjct	306	CTCTAGGATTGTATTTTATTACATCGTA-T-GTAGGAGGATTAAGTGGAGTAATTCCTGCTAA	363
Query	296	TTCTTCAATTGATATTATTTTACATGATACTTACTATGTAGTAGCCCATTTTCATTATAC	355
Sbjct	364	TTCTTCAATTGATATTATTTTACATGATACTTACTATGTAGTAGCCCATTTTCATTANNN	423
Query	356	TTTAGGTATCGTAAGGCTATTCGCAATTATAGCTGGAATCGTAAGGCGATTCCCTTTATT	415
Sbjct	424	NNNNNNNNNNNNNNNGTATTCGCAATTATAGCTGGATTAATCCAGTGATTCCCTTTATT	483
Query	416	TACTGGTTTAACATTAAATAATAAATTTTAAAAATCAATTTTAAATCGTAAGGC-TG	474
Sbjct	484	TACTGGTTTAACATTAAATAATAAATTTTAAAAATCAATTTTAAATTA-TATTTATTG	542
Query	475	GTGTAAACCTAACATTTTCCCCAGCATTTTATAGGGTTAAGAGGAA-A--TCGTAAGG	531
Sbjct	543	GTGTAAACCTAACATTTTCCCCAGCATTTTATAGGGTTAAGAGGAATACCTCG-ACG-	600
Query	532	CTTATTCTGATTATCCAGATGCATATACTTCCTGAAATATTATTTCCCTCAAATCG-TAAG	590
Sbjct	601	-TTATTCTGATTATCCAGATGCATATACTTCCTGAAATATTATTTCCCTCAATTGGATCTA	659
Query	591	GCTATTTTCATTGATTGCAATTTATCGTAAGGCATTTATTATTGAGATAGATTT	644
Sbjct	660	-CTATTTTCATTGATTGCAATTTTATTTTATTTATTATTGAGATAGATTT	712

17. *Ochthebius (Asiobates) oeskani* Jach, Kasapoglu&Erman, 2003

Query	1	GTGGAAAAAGGAACTTTTGG-AATTCGCTTAATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGA	59
Sbjct	69	GTGGAAAAAGGAACTTTTGGGACTTTAG-GGATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGA	127
Query	60	TTACTTGGATTGTTGTATGGGCAATTCGCTTATTCACAGTCGGCATAGATGTTGATACT	119
Sbjct	128	TTACTTGGATTGTTGTATGGGCTCATCACATATTCACAGTCGGCATAGATGTTGATACT	187
Query	120	CGAGCTTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATT--AATTCGCTTACAGGAATAAAATTT	177
Sbjct	188	CGAGCTTATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCTGTTC-C-TACAGGAATAAAATTT	245
Query	178	TTAGTTGGTTAGCTACTCTTCATGGAATTCGCTTATCTTACTCTCCTCTTTATTATGAG	237
Sbjct	246	TTAGTTGGTTAGCTACTCTTCATGGAACCCAAATTTCTTACTCTCCTCTTTATTATGAG	305
Query	238	CTTTAGGATTTGTATTTTATTCACTGTCGGAGGAAATTCGCT--TATAATTTTGGCTAA	295
Sbjct	306	CTTTAGGATTTGTATTTTATTCACTGTCGGAGGA--TTGACTGGTGTAATTTTGGCTAA	363

Query	296	CTCTTCAATTGATATTATTTTACATGAAATTC-GCTTA-GTCGTAGCCCATTTTCATTAT	353
Sbjct	364	CTCTTCAATTGATATTATTTTACATGA--TACATATTATGTCGTAGCCCATTTTCATTAT	421
Query	354	GTTTTATCAATAGGTGCGGTATTGCTATTATAGCGGGA--AATTCGCTTAGATATCCTT	411
Sbjct	422	GTTTTATCAATAGGTGCGGTATTGCTATTATAGCGGGATTATTC-AAT-GATATCCTT	479
Query	412	TATTTACTGGACTAACTCTTAATAATAAATATTTAAAAAATT-AATTCGCTTATTATATTT	470
Sbjct	480	TATTTACTGGACTAACTCTTAATAATAAATATTTAAAAAATTCAATT-TTAAATTATATTT	538
Query	471	TTAGGAGTAAATTTAACTTTTTTTCCTCAACATTTCTTAGGACTTAGTGGAATACCACGT	530
Sbjct	539	TTAGGAGTAAATTTAACTTTTTTTCCTCAACATTTCTTAGGACTTAGTGGAATACCACGT	598
Query	531	CGTTACTCTGATTACCCAGATGCATACACTAC---AATTCGCTTAATTTCTTCTATTGGA	587
Sbjct	599	CGTTACTCTGATTACCCAGATGCATACACTACTTGAAATA--TT-ATTTCTTCTATTGGA	655
Query	588	TCAATAATTTCTCTAATTGCAATTTTATCTTTTATTATTATT	632
Sbjct	656	TCAATAATTTCTCTAATTGCAATTTTATCTTTTATTATTATT	700

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Hatay ve Doğu Anadolu'dan toplanan 17 *Ochthebius* (Coleoptera, Hydraenidae) türü moleküler düzeyde çalışılmıştır. Bu türlerin DNA'ları izole edilip mitokondriyal COI geninin nükleotid dizisi oluşturulmuştur. PCR ile COX 1 gen dizisinin yaklaşık olarak 655 baz çifti kısmı oluşturulmuş ve bu COI gen dizileri birer moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. 17 *Ochthebius* türüne ait mitokondriyal COX 1 gen dizileri tür tayini amacıyla Gen bankasındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizde, örneklerimize ait DNA dizileri ve Gen Bankası'ndan elde edilen referans dizileri kullanılmıştır.

DNA dizi analiziyle, örneklerin BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) taraması sonucunda benzerlik oranları ile tür seviyesinde tanımlama yapılmıştır. Gen Bankası'nda %100 benzeşme gösteren türler dışında ve Gen Bankası'nın kabul ettiği 15 *Ochthebius* türü bankanın veri tabanına eklenmiştir. Bu türler Gen Bankası için yeni kayıttır. Zira bunlar ilk kez kaydedilmektedir. Eklenen türler şunlardır: *Ochthebius meridionalis*, *O. fausti*, *O. lividipennis*, *O. striatus*, *O. difficilis*, *O. ragusae*, *O. pusillus*, *O. uskubensis*, *O. viridis*, *O. remotus*, *O. virens*, *O. hofratvukovitsi*, *O. kirschenhoferi*, *O. foveolatus*, *O. oezkani* ve *O. akbuluti*'dir. Bu türlerin Gen Bankasında moleküler veri kayıtları daha önce oluşturulmamıştır.

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

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

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.
- 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 Dergisi** 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.
- Kasapoğlu A., 2002, Erzurum Artvin ve Rize illeri Hydraenidae (Polyhaga, Coleoptera) Türlerinin Sistematik Yönden İncelenmesi, **Doktora Tezi , Atatürk Üniversitesi** , sayfa 52 , ERZURUM
- Kazancı N., 2008, Limnolojide Gelişmeler E.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
- Keskin E., ve Atar H, H. 2013 DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanı larak Moleküler Tanımlama, **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 6 (2): 01-08
- Kahraman Z., 2014. Hatay Yöresindeki Gündüz Kelebek (Rhopalocera) Çeşitliliğinin Mitokondriyal COX Alt Ünite 1 Geni Hedeflenerek Ortaya Çıkarılması, **Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, 1-172.
- Madigan Michael T., and Martinko John, 2010, **Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi**, Palme Yayıncılık: 532, 11. baskı, s;167, Ankara

- Özdil F., 2007. Mitokondriyel DNA PCR-rflp (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arılarının tanımlanması, **Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara** , :1-141
- Passarge. E. , 2006 Renkli Genetik Atlası 3. baskı **Nobel Tıp Kitapevleri LTD. ŞTi.** Sayfa; 130
- 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
- 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
- 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

1985 Yılında Antakya’ da doğdu. İlk öğretimi Serinyol İlköğretim Okulunda, orta öğrenimimi Serinyol Lisesinde tamamladı.

Lisans eğitimimi Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesinde Yüksek Lisansa başladı, 2014 yılında tamamladı.