

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NDE BULUNAN TETRANYCHIDAE
TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANILANMASI, *Tetranychus
urticae* Koch, 1836 POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK
FARKLILIKLAR İLE ENDOSİMBİYONTLARIN BELİRLENMESİ**

Hilal Şule TOSUN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NDE BULUNAN TETRANYCHIDAE
TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANILANMASI, *Tetranychus
urticae* Koch, 1836 POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK
FARKLILIKLAR İLE ENDOSİMBİYONTLARIN BELİRLENMESİ**

Hilal Şule TOSUN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NDE BULUNAN TETRANYCHIDAE
TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANILANMASI, *Tetranychus*
***urticae* Koch, 1836 POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK**
FARKLILIKLARİLE ENDOSİMBİYONTLARIN BELİRLENMESİ

Hilal Şule TOSUN

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 12/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cengiz İKTEN (Danışman)

Prof. Dr. Fedai ERLER

Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL

Prof. Dr. Rüstem HAYAT

Prof. Dr. Erhan KOÇAK

ÖZET

BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NDE BULUNAN TETRANYCHIDAE TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANILANMASI, *Tetranychus urticae* Koch, 1836 POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ GENETİK FARKLILIKLARİLE ENDOSİMBİYONTLARIN BELİRLENMESİ

Hilal Şule TOSUN

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Temmuz 2021; 72 sayfa

Antalya, Burdur ve Isparta illerinden 2017-2019 yılları arasında toplanan Tetranychidae familyası türlerinin morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları yapılmıştır. Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan *Tetranychus urticae* Koch popülasyonlarında genetik polimorfizm ve endosimbiyontların varlığı araştırılmıştır. Morfolojik sistematikte, türlerin Hoyer yöntemiyle preparatları hazırlanmış ve teşhiste kullanılan morfolojik karakterleri fotoğraflandıktan sonra teşhisleri klasik yöntemlerle yapılmıştır. Moleküler sistematik çalışmalarında ise hem tek bireyden hem de popülasyon bazlı çoklu bireylerden elde edilen DNA'lar tüm genom amplifikasyonu aracılığı ile çoğaltılmıştır. Ayrıca, tüm mitokondriyi elde etmek için spesifik primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltma ve yeni nesil sekanslama kütüphaneleri hazırlanarak genom dizileri elde edilmiştir. Clustal analizde ve filogenetik ağaçta kullanılan ek GenBank dizileri, yine türlerin sekanslarından oluşan BLAST analiz sonuçlarına göre seçilmiştir. COI ve ITS gen bölgesi için MEGA 7 programında sekans temelli filogenetik ağaçlar UPGMA metodu ve ilgili parametreler kullanılarak oluşturulmuştur. Galaxy, MITOS Blastn, MFannot, GeSeq arayüz programlarından ham veri üzerindeki gen noktalarını belirlerken yararlanılmıştır.

Çalışma sonucunda, Tetranychidae familyasından, *Amphitetranychus viennensis* (Zacher, 1920), *Eutetranychus orientalis* (Klein, 1936), *Oligonychus* sp., *Petrobia harti* (Ewing, 1909), *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) ve teşhis edilemeyen diğer Tetranychidae sp. türleri farklı konukçu bitkilerde ve farklı lokasyonlarda tespit edilmiştir. Ek olarak, hem filogenetik ilişkileri çözmek hem de teşhis için etkili bir yöntem olan tüm mitokondriyal genomların sekanslanması (yeni nesil dizileme yöntemi, spesifik primerlerle PCR ve tüm genom amplifikasyonu) ile bulunan bu türlerin tüm mitokondriyal gen bölgesini içeren bilgiler başarılı bir şekilde elde edilmiştir. *E. orientalis* ve *P. harti* türlerinde ilk kez tüm mitokondriyal genom dizilim bilgisi elde edilmiştir. Ayrıca, cins düzeyinde teşhisi yapılan *Oligonychus* cinsine ait bir türün ve Tetranychidae familyasına ait bir diğer türün tüm mitokondriyal genom bilgileri derlenmiştir. Tespit edilen bu türlerde üç ayrı program kullanılarak genom anotasyon yapılmıştır. Genom anotasyon sonucunda, *E. orientalis* türünde ilk defa diğer Tetranychidae familyası türlerinden farklı olan bir gen düzeni bulunmuştur. Toplanan popülasyonlarda endosimbiyontlardan ise *Wolbachia*, *Cardinium* ve *Spiroplasma*'nın varlığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: NGS, Sanger, Tetranychidae, WGA, *Wolbachia*

JÜRİ: Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Prof. Dr. Rüstem HAYAT

Prof. Dr. Fedai ERLER

Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL



ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF
TETRANYCHIDAE SPECIES FOUND IN THE WEST MEDITERRANEAN
REGION AND DETERMINATION OF GENETIC DIFFERENCES BETWEEN THE
POPULATIONS OF *Tetranychus urticae* Koch 1836 AND ENDOSYMBIONTS

Hilal Şule TOSUN

PhD Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

July 2021; 72 pages

The morphological and molecular diagnostic studies were carried out on the family Tetranychidae species collected from Antalya, Isparta, and Burdur provinces between 2017-2019 years. The presence of genetic polymorphism and endosymbionts in *Tetranychus urticae* Koch populations collected from different provinces of Turkey were investigated. In the morphological systematic studies, the preparations of the species were prepared using the Hoyer method and important taxonomic characters using in diagnosis were then used after photographed. In molecular systematic studies, DNAs obtained from both a single individual and pool individuals due to attain whole mitochondria as whole genome amplification was replicated using specific primers with PCR method, and by using next-generation sequencing method their genome sequences were obtained with helping of service contract. Additional GenBank sequences used in the Cluster analysis and phylogenetic tree were selected based on the results of BLAST analysis, which also consists of sequences of species from MEGA 7 program, sequence-based phylogenetic trees were created using NJ and UPGMA method and related parameters. Galaxy, MITOS Blastn, MFannot and GeSeq interface programs were used to determine the gene points on the raw data.

As a result of this study, *Amphitettranychus viennensis* (Zacher, 1920), *Eutetranychus orientalis* (Klein, 1936), *Oligonychus* sp., *Petrobia harti* (Ewing, 1909), *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) and Tetranychidae sp. species were detected in different host plants and locations. Additionally, to figure out on both diagnoses and phylogenetic relationships with effective method of whole mitochondrial genome sequencing (next-generation sequencing method using specific primers with PCR and whole genome amplification) information containing the entire mitochondrial gene region was successfully obtained. For the first time whole mitochondrial sequence information of *E. orientalis* and *P. harti* was obtained. Genome annotation on these three identified species was preformed using three separate programs. In the collected populations, the presence of *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* from endosymbionts was detected.

KEYWORDS: NGS, Sanger, Tetranychidae, WGA, *Wolbachia*

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

Prof. Dr. Rüstem HAYAT

Prof. Dr. Fedai ERLER

Prof. Dr. Erhan KOÇAK

Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL



ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışman hocam Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan ve önerileri ile tezime değer katan sayın Prof. Dr. Fedai ERLER ve Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL hocalarıma şükranlarımı sunarım. Tez savunma sınavımda yer alarak beni şereflendiren, Prof. Dr. Rüstem HAYAT ve Prof. Dr. Erhan KOÇAK hocalarıma en içten dileklerimle teşekkür ederim. Ayrıca, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Birimi'ne ve MASGEN firmasına teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmasının moleküler analizleri aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. İnci ŞAHİN, Zir. Yük. Müh. Yeliz YILMAZ ve Zir. Yük. Müh. Payman EHSAS'a, arazi surveylerinde destek veren eşim Zir. Müh. Osman TOSUN, Zir. Yük. Müh. Esra BÖLÜCEK, Zir. Müh. Birsan ERÇABUK, Zir. Yük. Müh. Göknur ŞENEL, Zir. Müh. Hasan Ali KÜÇÜK, Zir. Müh. Mehmet TOMBAK, Zir. Müh. Halil GÜVEN ve Zir. Yük. Müh. Barış İMREK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Duygu SARI YOL, Arş. Gör. Dr. Hatice SARI, Dr. Derya BAKI, Zir. Yük. Müh. Gonca KÖNÜL, Zir. Müh. Ayşe Sinem DOĞRU, Zir. Müh. Ayşe VELİ ve Zir. Müh. Dilşan BOYLU'ya içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca ilgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Hanife SABANCI, babam Dursun SABANCI ve canım kardeşim Alperen Emre SABANCI'ya, destek ve sevgisini her zaman hissettiğim, her zaman olduğu gibi bu süreçte de beni yalnız bırakmayan eşim Osman TOSUN ve oğlum Kerem TOSUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	6
2.1. Tetranychidae Familyasının Moleküler Taksonomisi İlgili Bilgiler.....	6
2.2. Akarlarda Genetik Polimorfizm İle İlgili Çalışmalar.....	8
2.3. Tetranychidae Familyasında Endosimbiontlar	10
2.4. Akarlarda Yeni Nesil Dizileme Çalışmaları.....	11
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Metot	14
3.2.1. Tetranychidae familyası türlerinin örneklerinin toplanması.....	14
3.2.2. Örneklerin preparasyonu	15
3.2.3. Akar örneklerinden DNA izolasyonu	15
3.2.4. Tüm genom amplifikasyonu (whole genome amplification).....	17
3.2.5. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu	18
3.2.6. Yeni nesil dizileme kütüphanelerin oluşturulması	21
3.2.7. Filogenetik analizler	21
3.2.8. Biyoinformatik analizler.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1. Morfolojik Bulgular	24
4.1.1. Elde edilen Tetranychidae türleri hakkında bilgiler	24
4.2. Moleküler Bulgular	29
4.2.1. DNA izolasyonu	29
4.2.2. Bütün genom amplifikasyonu (whole genome amplification)	31
4.2.3. Tüm mitokondriyal genomun PCR ile amplifikasyonu.....	31

4.3. Filogenetik Analizler	32
4.3.1. <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonlarında filogenetik analiz.....	32
4.3.2. Tetranychidae familyasına ait farklı türlerde filogenetik analiz.....	34
4.4. Tez Kapsamında Elde Edilen Türlerin Genom Anotasyonu	39
4.4.1. <i>Petrobia harti</i> mitokondriyal genom anotasyonu.....	39
4.4.2. <i>Amphitetranychus viennensis</i> mitokondriyal genom anotasyonu.....	40
4.4.3. <i>Eutetranychus orientalis</i> mitokondriyal genom anotasyonu	42
4.4.4. <i>Tetranychus urticae</i> mitokondriyal genom anotasyonu	46
4.4.5. <i>Oligonychus</i> sp. mitokondriyal genom anotasyonu.....	47
4.4.6. Tetranychidae sp. mitokondriyal genom anotasyonu	49
4.5. Tez Kapsamında Elde Edilen Türlerin Tüm Ribozomal DNA Gen Bölgesi	50
4.6. Endosimbiyonların Tespiti	51
4.7. <i>Tetranychus urticae</i> Türünde Genetik Polimorfizm	55
5. SONUÇLAR	59
6. KAYNAKLAR	60
7 EKLER.....	73
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Batı Akdeniz Bölgesi’nde Bulunan Tetranychidae Türlerinin Morfolojik ve Moleküler Tanılanması, *Tetranychus urticae* Koch, 1836 Popülasyonları Arasındaki Genetik Farklılıklar ile Endosimbiontların Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/07/2021

Hilal Şule TOSUN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde

& : ve

°C : Santigrat derece

µl : Mikrolitre

3' : Üç üssü

+4 : Artı dört

5' : Beş üssü

H : A/C/T nükleotitlerinden herhangi birisi

D : A/G/T nükleotitlerinden herhangi birisi

R : A/G nükleotitlerinden herhangi birisi

W : A/T nükleotitlerinden herhangi birisi

Y : C/T nükleotitlerinden herhangi birisi

Kisaltmalar

bç : Baz çifti

COI : Sitokrom oksidaz I

CTAB : Cetyltrimethyl-ammonium bromide

deg : Dejenere primer

DNA : Deoksiribo nükleik asit

dNTP : Deoxynucleotide

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

EtBr : Ethidium bromide

F : Forward

g : Gram

L : Litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Preparatlar hazırlanırken kullanılan malzemeler	13
Şekil 3.2. Moleküler çalışmalarda kullanılan PCR cihazı ve ultrasonik banyo	14
Şekil 3.3. Tüm mitokondri bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler	20
Şekil 4.1. <i>Amphitetranychus viennensis</i> a) dişi birey b) erkek bireyde aedagus yapısı .	24
Şekil 4.2. <i>Eutetranychus orientalis</i> a) dişi birey b) erkek birey c) seta yapısı	25
Şekil 4.3. <i>Oligonychus</i> sp. dişi birey	26
Şekil 4.4. <i>Petrobia harti</i> a) dişi birey genel görünüm b) seta c) aedagus	27
Şekil 4.5. <i>Tetranychus urticae</i> a) dişi birey genel görünüm b) aedagus yapısı	28
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan ITS (a) ve COI (b) primer setleri ile PCR analizlerinde test edilen 24 örneğin oluşturduğu PCR ürünleri.	30
Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan Tetranychidae familyasından elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü	30
Şekil 4.8. WGA ürünü çoğaltılmış DNA	31
Şekil 4.9. Farklı Tetranychidae bireylerinden elde edilen DNA'lar ile a) 6491F-3062R; b) 913F-3062R; c) 10962F-94R; d) 8342F-11011R; e) 3043F-6515R primerlerini kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.10. <i>Tetranychus urticae</i> türüne ait bireylerin COI gen bölgesinin Kimura 2 parametre Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı	33
Şekil 4.11. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin COI gen bölgesinin Kimura 2-parametre Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı	35
Şekil 4.12. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin 18S gen bölgesinin Kimura 2-parametre Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı	36
Şekil 4.12. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin 28S gen bölgesinin Kimura 2-parametre Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı	37
Şekil 4.14. <i>Petrobia harti</i> tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu; a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen; d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri	39
Şekil 4.15. <i>Amphitetranychus viennensis</i> tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu; a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	

d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	41
Şekil 4.16. <i>Eutetranychus orientalis</i> tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu;	
a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin;	
b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	
d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	42
Şekil 4.17. <i>Eutetranychus orientalis</i> tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu;	
a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin;	
b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	
d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	44
Şekil 4.19. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen; d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	45
Şekil 4.19. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen; d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	45
Şekil 4.20 <i>Tetranychus urticae</i> tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu;	
a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin;	
b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	
d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	46
Şekil 4.21. <i>Oligonychus</i> sp. tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu;	
a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin;	
b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	
d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	48
Şekil 4.22. Tetranychidae sp. tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu	
a) Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin;	
b) MITOS programı ile tahmin edilen; c) MFannot programı ile tahmin edilen;	
d) GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri.....	49
Şekil 4.23. Genbankasında kayıtlı <i>Tetranychus urticae</i> genomu ve mevcut çalışmada Melek Borazanı bitkisinden toplanan <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonundan elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılması sonucunda 10 bç ve üzeri büyüklükte insersiyon ve delesyon içerdiği belirlenen lokus sayılarının büyüklük dağılımı	57
Şekil 4.24. 10 bç ve üstü INDEL markır büyüklüklerinin frekans dağılımı.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Acari taksonomik sınıflandırması.....	1
Çizelge 1.2. Tetranychidae familyasının taksonomisi	2
Çizelge 1.3. Türkiye’de tespit edilen Tetranychidae türleri	3
Çizelge 3.1. Internal Transcribed Spacer (ITS) ve Cytochrome oxidase (COI) bölgesine ait DNA dizileri kullanılarak, tasarlanan primerler	17
Çizelge 3.2. ITS primerleri ile kurulan PCR programı	17
Çizelge 3.3. COI primerleri ile kurulan PCR programı	17
Çizelge 3.4. WGA bileşenleri	18
Çizelge 3.5. Tüm mitokondriyal bölgeyi çoğaltmak için tasarlanan primerler ve dizilimleri	19
Çizelge 3.6. Tüm mitokondriyi çoğaltmak için kullanılan primerler	19
Çizelge 3.7. Mitokondriyal genomun Gradient PCR ile çoğaltılması için gerekli bileşenler ve miktarları.....	20
Çizelge 3.8. Tüm mitokondriyal bölgeyi çoğaltmada kullanılan gradient PCR programı	20
Çizelge 4.1. DNA izolasyonunda LPA kullanımının başarı oranları	30
Çizelge 4.2. <i>Tetranychus urticae</i> örneklerinin toplandığı iller ve konukçu bitkileri.....	33
Çizelge 4.3. Çalışmada elde edilen akar türlerinin Ribozomal DNA gen bölgesine ait sekans bilgileri	51
Çizelge 4.4. Çalışmada farklı konukçu bitkilerden toplanarak yeni nesil dizileme yöntemi ve tüm genom amplifikasyon metodu kullanılarak tanılanan endosimbiontlar.....	54
Çizelge 4.5. Genbankasında kayıtlı <i>Tetranychus urticae</i> genomu ve mevcut çalışmada Melek Borazanı bitkisinden toplanan <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonundan elde edilen DNA dizilerinin 10X coverage değeri ile karşılaştırılması sonucunda ortaya konulan polimorfizm oranlarının dağılımı örneklerinin toplandığı iller ve konukçu bitkileri.....	56
Çizelge 4.6. Genbankasında kayıtlı <i>Tetranychus urticae</i> genomu ve mevcut çalışmada Melek Borazanı bitkisinden toplanan <i>Tetranychus urticae</i> popülasyonundan elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılması sonucunda 10 bç ve üzeri büyüklükte insersiyon ve delesyon içerdiği belirlenen lokus sayılarının büyüklük dağılımı	56

1. GİRİŞ

Keliseratlar (Chelicerata), böceklerden sonra içerisinde at nalı yengeçleri, akrepler, örümcekler, akarlar ve kenelerin de yer aldığı en büyük ikinci karasal hayvan grubunu temsil etmektedir (Brusca ve Brusca, 2003).

Akarlar (Acarina), hem bitki paraziti olması ile hem de insan ve hayvanlar için patojen mikroorganizmaları taşıyan kenelerle beraber düşünüldüğünde, çok büyük ekonomik öneme sahiptir (Van Leeuwen vd. 2015). Tetranychidae, Eriophyidae Tenuipalpidae, Tarsonomidae, Acaridae gibi bitkilerde ciddi zarar oluşturan önemli akar familyalarının yanı sıra, insan hastalıklarını barındıran Ixodidae familyası gibi keneler de Acari içerisinde yer almaktadır (Knapp vd. 2018).

Acari alt sınıfı, Astigmata (depo akarları), Prostigmata (fitofag akarlar), Metastigmata (keneler), Cryptostigmata (toprak akarları) ve Mesostigmata (predatör akarlar) gibi değişik gruplara ayrılmaktadır (Çizelge 1.1) (Hoy 2011).

Çizelge 1.1 Acari taksonomik sınıflandırması

Şube Arthropoda
Altşube Chelicerata
Sınıf Arachnida
Alt sınıf Acari veya Acarina
Takım Parasitiformes (veya Anactinochaeta)
Alttakım Opilioacaridida (veya Notostigmata)
Alttakım Holothyrida (veya Tetrastigmata)
Alttakım Gamasida (veya Mesostigmata)
Alttakım Ixodida (veya Metastigmata)
Takım Acariformes (veya Actinochaeta)
Alttakım Actinedida (veya Prostigmata)
Alttakım Acaridida (veya Astigmata)
Alttakım Oribatida (veya Cryptostigmata)

Kırmızıörümcekler (Tetranychidae familyası), Çizelge 1.2’de gösterildiği gibi, iki altfamilya (Bryobinae ve Tetranychinae), altı tribüs (Bryobiini, Eurytetranychini, Hystrichonychini, Petrobiini, Tenuipalpoidini ve Tetranychini), 84 cins ve 1.300’den fazla türü içerir (Migeon ve Dorkeld 2021).

Tetranychidae, bitkilerde ekonomik kayba neden olan akar türlerinin en yoğun bulunduğu familyadır. Bu familya bireyleri, genelde polifag türler olup sebze ve süs bitkilerinin de içinde bulunduğu çok geniş konukçu dizisine sahiptirler (Zhang 2003).

Tetranychidae familyasına ait olan bireylerin vücut yapıları armut veya oval şeklinde olup vücudunda plaka bulunmamaktadır. Bu familyaya ait olan bireylerin vücut renkleri türlere göre farklılık göstermektedir. Bu renkler ise genelde kırmızı,

kızılımsı kahverengi, sarıdır. Bu familya bireyleri, bitkilerin yaprak ya da meyveleriyle beslenmektedir. Dişi bireyler yumurtalarını bitkilere bırakmaktadır. Yaşam döngüsü yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin dönemlerinden meydana gelmektedir. Yumurtalarının 4-5 günde açılmasının ardından, bireyler 4 dönem geçirmekte ve 1 ile 2 hafta içerisinde ergin olmaktadırlar. Kışı genellikle yumurta veya ergin dönemde geçirmektedirler. Biyolojik dönemleri, yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve erginden meydana gelmektedir. Döllenmiş yumurtalardan hem dişi hem de erkek, döllenmemiş yumurtalardan da erkek bireyler çıkmaktadır (Jepson vd. 1975).

Çizelge 1.2 Tetranychidae familyasının taksonomik kategorileri

Familya	Tetranychidae
Altfamilya	Tetranychinae
Tribüs	Tenuipalpoidini
	Eurytetranychini
	Tetranychini
Altfamilya	Bryobinae
Tribüs	Bryobiini
	Hystrihonychini
	Petrobiini

Bu familyanın önemli zararlılarından olan *Tetranychus urticae* Koch dişilerinin vücudu oval, vücut uzunluğu 0.3-0.5 mm, genişliği 0.2-0.3 mm'dir. Vücut ortasına yakın mesafede iki tarafta bir çift siyah leke bulunur (Jeppson vd. 1975). Bu türe ait bireyler, çok yoğun ağ örmekte, ördükleri ağların çokluğu da popülasyon yoğunluğunu göstermektedir. Dişilerin ortalama yaşam süresi yaklaşık 30 gündür. Bu süre boyunca dişi başına ortalama yumurta bırakma sayısı 90-110 arasında değişmektedir (Pritchard ve Baker 1955).

Tetranychid türlerini morfolojik karakterlerle teşhis etmek için Hoyer ortamında hem dişi hem de erkek bireylerin preperasyonu yapılmalıdır. Dişilerde ventral, erkeklerde lateral pozisyon verilmiş bireylerin dorsal kıl tablosu (chaetotaxy), peritrem yapısı, integümentteki striae'ların deseni, pedipalpus ve bunun üzerindeki tırnak, kimyasal duyu kılıkları (chemoreseptör) ve örü organı (spinneret) yapısı, pretarsus yapısı, bacak tarsusundaki dokunma kılıkları (mechanoreseptör) ve dublex setalar ve erkek çiftleşme organı (eadagus) vb. morfolojik karakterler kullanılmaktadır. Bu çok sayıda karakterin kullanılarak türlerin tanımlanması oldukça zordur. Ayrıca fenotipik değişkenlikler teşhislerin doğru yapılmasını güçleştirmektedir. Bu problemler, türlerin tanımlanması için morfolojik ve moleküler yaklaşımların birleştirilmesi ihtiyacını göstermektedir (de Mendonca vd. 2011).

Ülkemizde, Çizelge 1.3'de görüldüğü gibi, 30 farklı Tetranychidae türü tespit edilmesine karşılık, moleküler teşhis ile ilgili sadece 2 çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilkinde bir direnç belirleme çalışması yapılmış olup 10 adet *T. urticae* popülasyonuna ait COI dizilimleri elde edilmiştir, fakat bu teşhis morfolojik teşhis ile doğrulanmamıştır (İnak vd. 2019). İkincisi de (İnak 2021) tarafından yapılan doktora tez çalışmasıdır.

Moleküler teknikler, popülasyonlar / türler içindeki ve arasındaki varyasyonları incelemek için son yirmi yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kırmızıörümcek türlerini (Ben-David vd. 2007; Matsuda vd. 2014) tanımlamak ve diğer birçok kriptik türü (Hebert vd. 2004; Carew vd. 2011) çözmek için DNA bazlı tür içi ve türler arası varyasyonlar kullanılmıştır. ITS2 veya mitokondriyal Sitokrom Oksidaz I (COI) bölgeleri gibi kısa DNA dizilerini kullanan DNA barkodu, bir türün farklı popülasyonları içindeki ve popülasyonlar arasındaki spesifik olmayan varyasyonları incelemek için etkili bir araçtır (de Rojas vd. 2011; Döker vd. 2011; El Sheikha 2019; Valenzano vd. 2020).

Çizelge 1.3. Türkiye’de tespit edilen tetranychidae türleri

Tür	Referanslar
<i>Amphitettranychus viennensis</i> (Zacher, 1920)	Düzgüneş 1961
<i>Bryobia berlesei</i> Eyndhoven, 1957	Düzgüneş 1963
<i>Bryobia dikmenensis</i> Eyndhoven & Vacante, 1985	Eyndhoven ve Vacante 1985
<i>Bryobia kissophila</i> Eyndhoven, 1955	Düzgüneş 1963
<i>Bryobia praetiosa</i> Koch, 1836	Düzgüneş 1954
<i>Bryobia rubrioculus</i> (Scheuten, 1857)	Düzgüneş 1954
<i>Eotetranychus carpini</i> (Oudemans, 1905)	Önuçar ve Ulu 1988
<i>Eotetranychus coryli</i> Reck, 1950	Ozman ve Cobanoğlu 2001
<i>Eotetranychus populi</i> (Koch, 1838)	Düzgüneş 1965
<i>Eotetranychus pruni</i> (Oudemans, 1931)	Düzgüneş 1963
<i>Eotetranychus rubiphilus</i> (Reck, 1948)	Altunç ve Akyazı 2020
<i>Eotetranychus tiliarium</i> (Hermann, 1804)	Düzgüneş 1963
<i>Eotetranychus uncatus</i> Garman, 1952	Yanar ve Ecevit, 2005
<i>Eurytetranychus buxi</i> (Garman, 1935)	Çobanoğlu vd. 2014
<i>Eutetranychus orientalis</i> (Klein, 1936)	Jeppson vd. 1975
<i>Oligonychus aceris</i> (Shimer, 1869)	Önuçar ve Ulu 1988
<i>Oligonychus coffeae</i> (Nietner, 1861)	Gökçe vd. 2020
<i>Oligonychus coniferarum</i> (McGregor, 1950)	Ecevit 1977
<i>Oligonychus ununguis</i> Jacop, 1905	Yüksel ve Ulusoy, 2000
<i>Panonychus citri</i> (McGregor, 1916)	Düzgüneş 1952
<i>Panonychus ulmi</i> (Koch, 1836)	Düzgüneş 1963
<i>Petrobia (Petrobia) latens</i> (Müller, 1776)	Düzgüneş 1963
<i>Tetranychus desertorum</i> Banks, 1900	Düzgüneş 1962
<i>Tetranychus evansi</i> Baker & Pritchard, 1960	Kazak vd. 2017
<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida, 1927	Altunç ve Akyazı 2020
<i>Tetranychus solanacearum</i> Cobanoğlu & Ueckermann, 2015	Çobanoğlu vd. 2015
<i>Tetranychus tumidellus</i> Pritchard & Baker, 1955	Düzgüneş 1959
<i>Tetranychus turkestanii</i> (Ugarov & Nikolskii, 1937)	Düzgüneş 1954
<i>Tetranychus urticae</i> Koch, 1835	Düzgüneş 1954
<i>Tetranychopsis horridus</i> (Canestrini & Fanzago, 1876)	Ozman ve Cobanoğlu 2001

Ribozomal DNA'nın ITS2 gen bölgesi, tetranychid türlerini ayırt etmek için bir barkod olarak kullanılabilir. Örneğin, *Tetranychus kanzawai* Kishida ve *Tetranychus hydrangea* Pritchard and Baker'nın ITS2 dizileri, bunların kriptik türler

olduğunu gösterir, bu da üreme deneyleriyle doğrulanmıştır (Navajas vd. 2011). ITS2 dizisi tarafından morfolojik tanımlamanın zorluğunun üstesinden gelmek için geliştirilmiş bir moleküler tanı aracı, kesilen fragmentlerin uzunluk polimorfizmidir (RFLP) (Osakabe 2008; Arimoto vd. 2013). PCR-RFLP yaklaşımı, onlarca *Tetranychus* türünü tanımlamak için kullanılmış ve daha fazla türü ayırt etme yeteneğine sahiptir. Mitokondriyal COI geninin 5' ucu, *Tetranychus* türlerini tanımlamak ve filogenetik evrimlerini analiz etmek için yaygın olarak bir barkod olarak kullanılmaktadır. Yüksek ayrışması, COI'yi tür içi varyasyonu araştırmak için uygun kılmakta, ancak filogenetik tür ilişkilerini çözmedeki kullanışlılığı sınırlı kalmaktadır (Navajas vd. 1998; Ros ve Breeuwer 2007). Halka açık veri tabanlarında dizilerin olmaması ve ara sıra güvenilmezliği, moleküler tanı araçları olarak kullanımlarını kısıtlamaktadır (de Mendonca 2011).

Bununla birlikte, küçük organizmalarla ilgili çalışmalarda karşılaşılan yaygın bir sorun, daha sonraki analizler için bireylerden yeterli miktarda nükleik asit elde edilmesindeki zorluktur. Bir çözüm, çeşitli DNA polimerazları kullanarak genomik DNA'yı artırmak olmuştur. Son zamanlarda, phi29 polimeraz kullanılarak adının whole genome amplification (WGA) veya multiple displacement amplification (MDA) olduğu bir teknik geliştirilmiştir (Cheung ve Nelson 1996; Telenius vd. 1992; Zhang vd. 1992).

Tüm genom amplifikasyonu, genomda birden fazla priming bölgesini kullanan random heksamer kullanarak bir template küçük miktarından (<1 ng) tüm genomun temsili amplifikasyonunu gerçekleştirir (Dean vd. 2002; Lage vd. 2003). phi29 polimeraz, orijinal olarak *Bacillus subtilis* fajından 29 izole edilmiştir (Blanco ve Salas 1984). Enzim ve yöntem, yüksek doğruluk ve tüm genomun tarafsız ve kapsamlı bir şekilde büyütülmesi ile karakterize edilir ve amplifiye DNA'nın çeşitli müteakip uygulamalarına izin verir. Bu nedenle, teknik, adli biyoloji, epidemiyoloji, biyogüvenlik ve klinik çalışmalara uygulanmıştır (Sorensen vd. 2004).

Mitokondriyal (Mt) genomları, birçok yararlı özelliğe sahip olması nedeniyle (örneğin haploidi, kompaktlık, maternal kalıtım, nispeten yüksek mutasyon oranları ve rekombinasyon eksikliği) moleküler filogenetik çalışmalarda genetik belirteçler olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Tao vd. 2014).

Çoğu metazoan mitokondriyal genom daireseldir, yaklaşık 16 kb uzunluğa sahiptir ve 13 protein kodlayan gen (PCG), iki rRNA geni (rRNA) ve 22 tRNA geni (tRNA) dahil, 37 geni kodlamaktadır (Boore 1999). Şu anda mevcut Genbankası incelendiğinde: 43 Acariformes ve 102 Parasitiformes olmak üzere, toplam 145 Acari tüm mitokondriyal genomu mevcuttur.

Bu tüm mitokondriyal genomları dizilemenin başka faydaları da olacaktır. Örneğin, akarisit direnç genlerinin moleküler evriminin iç yüzünü anlamayı sağlamalıdır. Akarisit direncinin hızlı gelişimi, kırmızıörümceklerde uzun süredir devam eden bir problemdir (Osakabe 2010; Van Leeuwen vd. 2010). Birkaç akarisit, mitokondriyal solunum inhibitörleri olarak tanımlanmıştır (Dekeyser 2005; Van Leeuwen vd. 2010; Hayashi 2013). Akarisit bifenazata direnç, mitokondriyal sitokrom b genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Van Leeuwen vd. 2008, Van Leeuwen vd. 2011). Genomlar, ayrıca gen yeniden düzenlemeleri (Boore vd. 1998; Boore ve Brown 1998; Dowton ve Austin 1999; Dowton vd. 2002; Boore 2006; Boore ve Fuerstenberg

2008; Dermauw vd. 2010), kontrol bölgesinin evrimsel modeli ve yapısı (Zhang vd. 1995; Zhang ve Hewitt 1997), nükleotid bileşimindeki zincir asimetrisi (Wei vd. 2010) ve RNA ikincil yapısı (Masta 2010) hakkında bilgi sağlayacaktır.

Cardinium, *Rickettsia*, *Spiroplasma* ve *Wolbachia*, birçok eklembacaklı türünü enfekte eden endosimbiyontların temsili cinsleridir (Jeyaprakash ve Hoy 2000; Zchori-Fein ve Perlman 2004; Engelstadter ve Hurst 2009; Duron ve Hurst 2013). *Cardinium* Bacteroidetes şubesinde yer alır ve konakçılarında sitoplazmik uyumsuzluk, partenogenez ve feminizasyon gibi üreme değişikliklerine neden olur (Zchori-Fein ve Perlman 2004; Zchori-Fein vd. 2004; Gotoh vd. 2007; Zhu vd. 2012).

Rickettsia ve *Wolbachia*, Rickettsiales (alfa-proteobakteriler içinde) takımında, bu da üreme değişikliklerine (erkek feminizasyonu, thelytokous partenogenez, sitoplazmik uyumsuzluk ve erkek ölümü) neden olur ve ayrıca pestisit direnci gelişimi ile de ilişkilendirilmiştir (Werren 1997; Stouthamer vd. 1999; Stevens vd. 2001; Perlman vd. 2006; Hosokawa vd. 2010; Liu ve Guo 2019). *Spiroplasma*, Mollicutes'e aittir (Firmicutes içinde), ayrıca konağının biyotik ve abiyotik streslere karşı korunmasında rol oynar (Bolanos vd. 2015; Heyworth ve Ferrari 2015; Frago vd. 2017; Guidolin vd. 2018). Son tahminler, artropodlarda bakteri istilası *Cardinium* için %13'e, *Rickettsia* için %24'e, *Spiroplasma* için %5–10 ve *Wolbachia* için %52'ye kadar (Duron vd. 2008; Weinert vd. 2015; Mathé-Hubert vd. 2019) ulaştığı yönündedir.

Yararlı endosimbiyontlar ve onların konukçuları arasındaki ilişkiler, uzun süreler sürebilmektedir. Bununla birlikte teorik olarak, mtDNA varyasyonunun ve evriminin, mitokondri ile birlikte kalıtılan endosimbiyontlardan önemli ölçüde etkilenebileceği öngörülmektedir (Heddi vd. 2001; Zchori-Fein ve Brown 2002; Scarborough vd. 2005; Oliver vd. 2006; Rio vd. 2006). *Wolbachia* ve mitokondrinin birlikte iletimi, bakterilerin enfeksiyonla ilişkili mitotipin seçici bir şekilde taranmasının bir sonucu olarak, mitokondrinin DNA çeşitliliği üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptir (Birungi ve Munstermann 2002; Baudry vd. 2003; Dean vd. 2003; Jiggins 2003; Dyer ve Jaenike 2004; Shoemaker vd. 2004). Ayrıca, eğer bir popülasyon bir veya daha fazla endosimbiyont ile enfekte olmuşsa, o zaman mitokondriyal polimorfizm kalıpları, bu endosimbiyontlar üzerinde etkili olan doğal seçim tarafından değiştirilecektir. Böylece endosimbiyontlar genetik çeşitliliği azaltabilecek ya da artırabilecektir (Dean vd. 2003; Keller vd. 2004).

Popülasyonlar arasındaki gen akışının değerlendirilmesi, insektisit direnci ve konukçu özgülüğü gibi tarımsal açıdan önemli genetik özelliklerin sabitlenme ve yayılma mekanizmasını aydınlatmak için de önemlidir (Weeks vd. 1995; Tsagkarakou vd. 1997; Tsagkarakou vd. 1998).

Bu tez çalışması kapsamında, Antalya, Burdur, Isparta illerinden toplanan Tetranychidae familyası bireylerinin hem morfolojik, hem tüm genom amplifikasyonu (whole genom amplification), hem de yeni nesil sekanslama moleküler yöntemleri kullanılarak teşhis edilmesi hedeflenmiştir. Bu illere ek olarak, Türkiye'nin diğer illerinden toplanan *T. urticae* popülasyonlarında genetik polimorfizm araştırılmıştır. Bu genetik polimorfizmin sebeplerinden biri olan endosimbiyontların varlığı tespit edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Tetranychidae Familyasının Moleküler Taksonomisi İlgili Bilgiler

Navajas vd. (1992), farklı kırmızıörümcek türlerinden elde ettikleri 300 bazlık ITS2 dizilimlerini kullanarak filogenetik ağaç oluşturmuş ve oluşturulan bu ağacın morfolojik özellikler ile oluşturulan ağacı doğruladığından bahsetmişlerdir.

Hinomoto vd. (2007), Kuzey Vietnam'ın tarım alanlarından topladıkları Tetranychidae familyası türlerini incelemişler, topladıkların örneklerin mitokondriyal sitokrom oksidaz alt birim I dizilerini elde etmişler ve elde edilen bu dizileri DNA veritabanlarında saklanan bilinen dizilerle karşılaştırılarak akarları tanımlamışlardır. Filogenetik analizlerle DNA barkodlama yaklaşımının birlikte kullanımının, özellikle *Tetranychus* cinsi akarlarının tür teşhisi için yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Ros ve Breeuwer (2007), yaptıkları derlemede, Tetranychidae familyasına ait GenBank'ta mevcut olan mitokondriyal COI dizileri ile genel bir filogenetik analiz gerçekleştirmişlerdir. Verilerin GenBank'a girilmesinde, verilerin yorumlanmasını daha da bozan hatalar yapıldığı bildirilmiştir.

Ben-David (2007), İsrail'de yapmış olduğu çalışmada, ITS2 gen bölgesini barkod olarak kullanarak Tetranychidae familyasından *Bryobia praetiosa*, *Aplonobia histricina*, *Petrobia harti*, *P. tunisiae*, *Eutetranychus orientalis*, *E. palmatus*, *Panonychus ulmi*, *P. citri*, *Schizotetranychus asparagi*, *Oligonychus perseae*, *O. afasiaticus*, *O. mangiferus*, *Tetranychus urticae*, *T. turkestanii*, *T. evansi* ve *T. ludeni* olmak üzere, 16 türü tanımlamıştır. ITS2 bölgesini barkod olarak kullandıkları tanımlamada, morfolojik kriterlere göre tanımlanan 16 türden 14'ü doğru olarak tanımlanmıştır.

Li vd. (2010), Çin'den topladıkları tarımsal açıdan önemli Tetranychidae familyasında dokuz türün mitokondriye dayalı (sitokrom c oksidaz alt birimi 1) ve nüklear (ribozomal RNA geninin ITS 1 ve 2) dizileri incelemişlerdir. Sonuçların, morfolojik olarak tanımlanmış *Tetranychus*, *Panonychus*, *Amphitetranychus* ve *Petrobia*'nın monofili olduğunu doğruladığını, ancak *Amphitetranychus viennensis*'in Tetranychidae içindeki pozisyonunun doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir.

de Mendonca vd. (2011), GenBank girişi *T. urticae* olarak saklanan ITS2 rDNA'nın 105 ve 138 COI mtDNA dizisinin ve *Tetranychus* (s. str.) ile morfolojik olarak yakından ilişkili diğer 14 taksonun kimliğini analiz etmiş ve değerlendirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışma için toplanan ve morfolojik kriterlere göre tanımlanan 18 *T. urticae* örneğinin de ITS2 ve COI dizileri oluşturulmuş ve analiz edilen veri setine dahil edilmiştir. GenBank veri tabanında saklanan diziler arasında, *Tetranychus* (s. str.) grubunda, özellikle *T. urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai* ve *T. truncatus* arasında çok sayıda görünüşte yanlış kimlik vakası tespit edilmiştir. Güvenilmez diziler (yanlış tanımlanmış veya şüpheli) yaklaşık %30 olarak tahmin edilmiştir. Halka açık veri tabanlarında güvenilir dizi erişimleri için kesin tür teşhisini garanti etmek için morfolojik ve moleküler yaklaşımların birlikte kullanılması ihtiyacını vurgulamışlardır.

Matsuda vd. (2012), 17 *Oligonychus* türünü mitokondriyal DNA'nın sitokrom c oksidaz alt birim I genini ve nükleer ribozomal RNA geninin 28S ve ITS bölgelerini kullanarak morfolojiye dayalı sınıflandırma ile tutarlı bir şekilde tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Jahan vd. (2013), Bangladeş'ten topladıkları *Oligonychus coffeae*'yi tanımlamada morfolojik tanımlamanın kısıtlı olması, uzman gerektirmesinden dolayı, ITS2 kullanılarak elde edilen DNA dizisinin mevcut diğer GenBank DNA dizileriyle karşılaştırılmasıyla moleküler olarak tanımlamışlar, bu yöntemin güvenilir sonuçlar sağlayacağından ve yalnızca erginlerde değil, nimflerde de başarıyla uygulanabileceğinden bahsetmişlerdir. *Oligonychus coffeae*'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasının, faaliyetlerin izlenmesinde ve dolayısıyla Bangladeş'te ekonomik zarara neden olan değerli çay yapraklarını korumak için rasyonel kontrol stratejilerinin tasarlanmasında faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

Matsuda vd. (2013), Japonya'daki *Tetranychus* türlerinin nükleer ribozomal DNA'nın dahili kopyalanmış ayırıcı bölgesini ve mitokondriyal DNA'nın sitokrom c oksidaz alt birim I genini kullanan DNA dizileri ile teşhis edilip edilemeyeceğini araştırmışlardır. Japonya'da bilinen 13 *Tetranychus* türünün dizilerini elde etmişlerdir. ITS ağacındaki 13 türden 10'unu tanımlayabilmişlerdir. Sitokrom c oksidaz alt birimi I ağacında, Japonya'da bilinen 13 *Tetranychus* türünün tümünü tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Bennur (2015), Hindistan'da sebze alanlarında yaptığı çalışmada, Tetranychidae familyasından *Tetranychus truncatus*, *T. macfarlanei* ve *T. okinawanus*'u COI ve ITS2 bölgesini barkod olarak kullanarak tanımlamıştır. ITS2 bölgesinin de COI bölgesi gibi Tetranychidae familyasının türlerini tanımlamada barkod olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Khaing vd. (2015), Kore'deki *Panonychus* cinsinin dört türü arasındaki morfolojik ve moleküler farklılıkları, önceden bilinen iki tür, *P. citri* ve *P. ulmi* ve iki yeni tanımlanmış tür, *P. mori* ve *P. caglei* olarak belirlemişlerdir. Ek olarak, bu dört türün kimliğini kesin olarak teşhis etmek için türe özgü primerler tasarlamışlardır.

Sakamoto vd. (2017), tüm *Stigmaeopsis* (Tetranychidae) türlerinin morfolojileri ve tanısal karakterleri (dorsal kılların uzunluğu) ile tanımlanması zor olduğunu ve bu karakterlerin sadece taze örnekleri tanımlamak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle, bu türleri tespit etmek için moleküler düzeyde, mitokondriyal DNA'nın sitokrom c oksidaz alt birim I (COI) genini ve nükleer ribozomal RNA genleri (18S ve 28S) kullanılarak, yedi *Stigmaeopsis* türünün [*Stigmaeopsis celarius*, *S. longus*, *S. miscanthi* (hem düşük hem de yüksek saldırganlık fenotipleri), *S. nanjingensis*, *S. tenuinidus*, *S. saharai* ve *S. Takahashii*] 20 suşunu tanımlamışlardır.

Matsuda vd. (2018), Tetranychinae altfamilyasının filogenisini analiz etmek için bilinen kırmızıörümceklerin 72 türünün RNA-Seq verisini elde etmişlerdir. Tetranychinae altfamilyasının moleküler filogenisinin, mevcut morfolojiye dayalı taksonomi ile tam olarak uyuşmadığını ve bu altfamilyanın taksonomisinin, bu çalışmanın ortaya koyduğu moleküler ilişkilere göre revize edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Arabuli vd. (2019), *Amphitetanynchus quercivorus* (Ehara & Gotoh), *A. savenkoe* (Reck) ve *A. viennensis* (Zacher) türlerini, morfolojik özellikler, melezleme deneyleri, esteraz zimogramları ve mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birimi I (COI) geninin kombinasyonlarını kullanarak ayrıntılı olarak araştırmışlardır. Üç tür arasında peritremlerde ve erkek aedeagusda morfolojik farklılıklar gözlemlendiğini, morfolojik olarak benzer *A. savenkoe* ve *A. quercivorus* arasındaki karşılıklı çaprazlamalarda tam üreme izolasyonu doğrulandığını (dişi yavru üretilmediği) rapor etmişlerdir. Esteraz zimogramların, türler arası olarak farklı, ancak tür içi olarak aynı olduğunu (belirli bir türdeki bireyler arasında) ve COI ağacındaki %100 bootstrap değerleri ile her üç türün de açıkça ayrı sınıflar oluştuğunu bildirmişlerdir.

Ovalle vd. (2020), akarların morfolojik olarak tanımlanmasının zor olduğunu, dorsal seta ve aedeagus gibi yapıların yaygın olarak kullanıldığını, ancak bunların popülasyonlar arasında farklılıklar gösterebileceğini ve bu tekniğin zaman alıcı ve özel taksonomik uzmanlık gerektirdiğini bildirmişlerdir. Örnekleri tür düzeyinde sınıflandırmak için başarılı bir alternatifin, mitokondriyal sitokrom oksidaz I (COI) geninin bir bölgesinden yararlanmak olduğundan bahsetmişlerdir.

2.2. Akarlarda Genetik Polimorfizm İle İlgili Çalışmalar

Navajas vd. (1994), farklı ülkelerden topladıkları *Mononychellus progresivus* bireylerinde, tür içi genetik varyasyonu belirlemek için ITS ve COI dizilimlerini karşılaştırmışlardır. ITS ve COI geni için sırasıyla %0-0.4, %0-2.1 olmak üzere, düşük varyasyon bulmuşlardır.

Tsagkarakou vd. (1998), aynı bölgeden açık ve sera alanlarından topladıkları *Tetranychus urticae* popülasyonlarında gen akışını araştırmak için allozyme polimorfizmini kullanmışlardır. Genetik farklılaşmanın, her iki tür habitatta da coğrafi mesafe ile önemli ölçüde ilişkili olduğundan bahsetmişlerdir.

Xie vd. (2006), Çin'de 13 farklı bölgeden topladıkları *Tetranychus urticae* popülasyonlarında COI bölgesi çoğaltılarak dizileme yapmışlar ve 453 nükleotid uzunluğundaki COI bölgesinde 36 nükleotidi polimorfik bulmuşlardır.

Carbonnelle vd. (2007), tek bir konukçu bitki (ısırgan otu) üzerinden bir güney-kuzey kesiti boyunca toplanan Batı Avrupa *Tetranychus urticae* popülasyonlarının genetik yapısını analiz etmek için beş mikrosatelit lokusu kullanmışlardır. Beş mikrosatelit lokustaki varyasyon sonuçları, coğrafi uzaklığın genetik yapıdan sorumlu faktör olduğunu ortaya koymuştur.

Nishimura vd. (2007), Japonya'dan topladıkları yedi *Tetranychus kanzawai* popülasyonunu genetik yapısını analiz etmek için mitokondriyal sitokrom oksidaz alt birim I (COI) geninin DNA dizilerini ve ribozomal RNA geninin ITS1 bölgesini, popülasyon yapısının detaylı analizi içinde mikrosatellite markörleri kullanmışlardır. Yaptıkları analizler sonucu, tüm popülasyon çiftlerinin önemli ölçüde farklılaştığını ve bu farklılaşmanın, popülasyonlar arasındaki coğrafi mesafeden değil, konukçu bitki etkisinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yuan vd. (2010), *Panonychus citri* (McGregor)'nin popülasyon genetik yapısını karakterize etmek için, Çin'in üç narenciye ekim bölgesinden [Yangtze Nehri'nin (UMYR) üst ve orta kısımları, Yungui Platosu (YGP) ve Güney Çin'in narenciye kuşağı (SC)], topladıkları 15 popülasyondaki genetik varyasyonu ITS1 bölgesi kullanılarak araştırmışlardır. Moleküler varyans analizi (AMOVA), UMYR, YGP ve SC arasında önemli bir popülasyon genetik yapısının bulunmadığını göstermiştir. Ancak, UMYR + YGP ile SC arasında önemli bir global ST ve genetik yapı bulunmuştur. Konukçu bitkilerin *P. citri* popülasyonlarının genetik yapısı üzerindeki önemli etkisi, AMOVA tarafından beş konukçu grubu ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, Mantel testi, coğrafi izolasyonun genetik farklılaşmadan sorumlu bir faktör olduğunu ortaya koymuştur

Sun vd. (2012) Çin'de 25 *Tetranychus urticae* popülasyonunu (18'i kırmızı, 7'si yeşil form) 8 microsatellite lokusu ile taramışlar, kırmızı formda genetik çeşitliliği yeşil formdan daha yüksek bulmuşlardır.

Salinas-Vargas vd. (2016), Meksika'nın en önemli beş turuncgil üreticisi eyaletteki altı bölgede bulunan meyve bahçelerinden portakal, misket limonu, greyfurt ve mandalina ağaçlarındaki akarları örnekleyip, *Brevipalpus* akarlarının popülasyonları arasındaki tür çeşitliliğini ve genetik varyasyonu incelemişlerdir. Konukçu bitkiler ve konumlar arasındaki genetik varyasyonu, mitokondriyal sitokrom oksidaz alt birimi I (COI) bölgesinden elde edilen nükleotid dizi verilerinin analizi ile değerlendirmişlerdir. Bu bölgelerde hem *Brevipalpus yothersi* hem de *B. californicus* bulunmuştur. AMOVA ve haplotip analizleri sonucunda, *B. yothersi* genetik popülasyon yapısı ile coğrafi köken veya turuncgil konukçu bitki türleri arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuşlardır.

Karasu vd. (2018), Erzincan'ın Ahmediye ve Ekşisu sınırları içinde yer alan 17 farklı alandan alınan *Eustigmaeus erciyesiensis* (Acari: Stigmaeidae) örneklerinde genetik farklılıkları RAPD-PCR yöntemi ile analiz etmişlerdir. RAPD-PCR çalışmalarında, toplam 12 primer denenmiş ve hepsi genoma bağlandığı için tümü değerlendirmeye alınmıştır. Amplifikasyon sonucu, büyüklüğü 100 bp ile 4000 bp arasında değişen toplam 134 bant elde edilmiştir. Çoğalan DNA bantlarından 74 tanesinin polimorfik olduğu gözlemlenmiştir. Toplam polimorfizm oranı %55,2 olarak hesaplanmıştır.

Choi vd. (2018), Kore'nin çeşitli bölgelerinden topladıkları *Amphitetranychus viennensis*'te mitokondriyal (COI) geni ve nükleer ribozomal DNA'nın ITS2 bölgesinin nükleotid dizilimlerini belirlemişlerdir. Sekans karşılaştırması sonucu, Kore örneklerinin, biri Geoje ve Jinju örneklerini içeren, diğeri ise Geoje/Jinju örnekleri dışındaki tüm örnekleri içeren iki gruba ayrıldığını göstermiştir. Geoje/Jinju örnekleri hariç, çoğu örnekte, hem COI hem de ITS2 dizilerindeki varyasyonları sırasıyla % 1.04 ve % 0.99'dan az, ancak, iki grup arasındaki varyasyonları sırasıyla %6,23–6,92 ve %3,02–4,02 olarak bulmuşlardır. Ayrıca, GenBank veri tabanındaki dizilerle yaptıkları filogenik analizde, Kore'nin güney bölgesinde yer alan Geoje/Jinju'dan alınan örneklerin en çok Japon örneklerine, diğerlerinin ise en çok Çin ve Tayvan örneklerine benzediğini bildirmişlerdir.

Mirza vd. (2020), Suudi Arabistan'nın farklı bölgelerinden çeşitli konukçular üzerinden topladıkları 10 *Eutetranychus orientalis* popülasyonunda 40 farklı morfolojik özelliğe dayalı fenotipik varyasyonları değerlendirmişlerdir. Ayrıca, bu fenotipik olarak değişen popülasyonların tür teşhisini doğrulamak için ITS2-rDNA dizilerini kullanmışlardır. Tüm popülasyonlarda fenotipik varyasyonlar dorsal kılların şekli ve uzunluğu, d1 ve e1 kılları arasındaki çizgili desen ve bacak kaetotaksisinde bulunmuştur. Bu morfolojik olarak değişen popülasyonların rDNA dizi analizi, 10 farklı ITS2 Suudi haplotipiyle sonuçlanmıştır. Fenotipik ve genetik varyasyonların, coğrafi dağılımlarından çok konukçu bitkilerle ilgili olduğundan bahsetmişlerdir. *Phoenix dactylifera*'dan toplanan *E. orientalis* popülasyonu hem fenotipik olarak hem de genetik olarak farklı bulunmuştur. Farklı bölgelerden *Ziziphus* sp., *Morus* sp. ve *Azadirachta indica*'dan elde edilen haplotipler aynı alt dalda gruplanmıştır. Farklı konukçu bitkilerde yaşayan farklı *E. orientalis* popülasyonları arasında fenotipik varyasyonların olduğu sonucuna varmışlar, bu türün fenotipik tür içi varyasyonlar göz önünde bulundurularak dikkatlice tanımlanması gerektiğini bildirmişlerdir.

2.3. Tetranychidae Familyasında Endosimbiontlar

Gotoh vd. (2003), Japonya'dan topladıkları 42 farklı Tetranychidae türünde 16S rDNA (O'Neill vd. 1992) ve *ftsZ* gene (Holden vd. 1993) primerlerini kullanarak *Wolbachia*'yı tespit etmişlerdir. *Wolbachia*'yı 42 farklı Tetranychidae türünden 7'sinde saptamışlardır. Bu yedi tür, *Panonychus*, *Shizotetranychus*, *Oligonychus* ve *Tetranychus* cinslerinin üyeleridir.

Yu vd. (2011), *Wolbachia* enfeksiyonunun, bilinen enfeksiyon durumu olan 198 bireyden mitokondriyal sitokrom oksidaz I (COI) geninin bir kısmını dizileyerek kırmızıörümceklerdeki mtDNA varyasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları neutrality McDonald–Kreitman ve testleri sonucu, *Wolbachia* enfeksiyonunun kırmızıörümceklerde mtDNA varyasyonu üzerinde net bir etkisini göstermediğini bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2013), Çin'den 12 farklı popülasyondan *Tetranychus truncatus*, 3 farklı popülasyondan *T. urticae*, 3 farklı popülasyondan *T. kanzawai*, 2 farklı popülasyondan *T. pueraricola*, 2 farklı popülasyondan *T. phaselus* türlerini toplamışlardır. Bu türlerde, wsp primerlerini kullanarak *Wolbachia*'nın bulunma aralığını sırasıyla yüzde 37.5–100, 40–100, 31.4–100, 50–86.1 ve 62.5–70 olarak belirlemişlerdir.

İkten ve Şahin (2016), yeni nesil sekanslama yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, 100 bireyden toplu DNA izolasyonu yapmışlar ve *T. urticae*'de en az 3 farklı *Wolbachia* ırkı tespit etmişlerdir.

Sakamoto vd. (2018), *Wolbachia/Cardinium* enfeksiyon durumunu belirlemek amacıyla, Japonya genelinden 45 akar, *Oligonychus castaneae* Ehara & Gotoh (Acari: Tetranychidae) popülasyonu toplamışlardır. Daha sonra, *Wolbachia* ve/veya *Cardinium* enfeksiyonunun etkilerini netleştirmek için hem mtDNA'nın sitokrom c oksidaz alt birim I (COI) geni hem de nükleer DNA'nın 28S rRNA genine dayalı olarak oluşturdukları *O. castaneae*'nin filogenetik ağaçlarını karşılaştırmışlardır. 106 *Wolbachia* ile enfekteli birey ve 250 *Cardinium* ile enfekteli birey olmak üzere,

toplamda 450 enfekteli birey ve enfeksiyon oranını da %79 olarak bulmuşlardır. Çift enfekteli birey gözlemlenmemiştir. 28S ağacında, hemen hemen tüm popülasyonlar tek bir grup, COI ağacında coğrafi dağılımdan daha çok *Wolbachia/Cardinium* enfeksiyonunu yakından takip eden dört ayrı grup oluşturmuşlardır.

Zhu vd. (2018), Çin'den 21 bölgeden, 12 konukçu bitkiden topladıkları 935 *Tetranychus truncatus*'un doğal popülasyonlarında endosimbiontları araştırmışlardır. Üç fakültatif endosimbiontu (*Wolbachia*, *Cardinium* ve *Spiroplasma*), farklı enfeksiyon frekanslarında tespit etmişlerdir (sırasıyla %52.5, %26.3 ve %8.6). Endosimbiont bulunma oranlarının, çevresel faktörlerle ilişkiler sergilediğini: *Wolbachia* bulunma oranlarının, yıllık ortalama sıcaklığın daha yüksek olduğu yerlerde artarken, *Cardinium* ve *Spiroplasma* bulunma oranlarının ise daha yüksek rakımlardan gelen yerlerde arttığını bildirmişlerdir. *Wolbachia*'nın, *Lycopersicon esculentum* ve *Glycine max*'dan toplanan akarlarda *Zea mays*'dan toplananlara göre daha yaygın olduğundan bahsetmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile konukçu endosimbiont etkileşimlerinin, iklim ve diğer coğrafi olarak bağlantılı faktörlerin yanı sıra, konukçunun besin bitkisi dahil olmak üzere, çevresel faktörlerle ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır.

Pina vd. (2020), İspanya'da turuncgil bahçelerinden topladıkları *Aplonobia histricina* (Berlese), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *E. orientalis* (Klein), *Panonychus citri* (McGregor), *Tetranychus evansi* (Baker and Pritchard), *T. turkestanii* (Ugarov and Nikolskii) ve *T. urticae* popülasyonlarında *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* ve *Wolbachia* endosimbiont bakterilerin varlığını belirlemişlerdir. PCR sonucunda, sadece *Wolbachia*'yı tespit etmişlerdir.

2.4. Akarlarda Yeni Nesil Dizileme Çalışmaları

Konakandla vd. (2006), predatör akarlar gibi bireysel küçük organizmalardan elde edilebilen sınırlı miktarda DNA nedeniyle moleküler genetik çalışmalar yürüten sorunların üstesinden gelmek için Chelex DNA ekstraksiyonunu kullanarak tüm genom amplifikasyonu (WGA) geliştirmişlerdir. Chelex süspansiyonunda izole edilen tek bir akar, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henrot'dan (Acari: Phytoseiidae) DNA, WGA'ya tabi tutulmuştur. WGA ile elde edilen DNA, polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılmıştır ve ardından doğrudan sekanslama yapılmıştır. Bu nedenle, Chelex DNA ekstraksiyonu ve WGA'nın kombinasyonunun, bireysel akarları kullanarak birden fazla lokus için moleküler markerları incelemede basit ve sağlam bir teknik olduğu gösterilmiştir. Bu metodların (Chelex ekstraksiyonu ve ardından WGA yöntemlerinin), bireysel akarların genotiplerine ihtiyaç duyulan genetik çalışmalar için çok sayıda PCR reaksiyonu için kullanılacak büyük miktarda DNA şablonu sağladığı sonucuna varmışlardır.

Ming-Long vd. (2010), dünya çapında bir narenciye zararlısı olan *Panonychus citri*'nin mitokondriyal genomunun tamamını sıralamış ve diğer Acari ile bir karşılaştırma yapmışlardır. *Panonychus citri*'nin mitokondriyal genomunun, 13.077 bp'lik tipik bir dairesel molekül olduğunu ve genellikle metazoanlarda bulunan 37 genin tam setini içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, başlıca protein kodlama geninin (PCG'ler), büyük bir rRNA geninin ve A + T bakımından zengin bölgenin önemli boyutta küçülmesinden dolayı, tüm dizilenmiş Acari ve diğer Chelicerata'daki en küçük

mitokondriyal genom olduğundan bahsetmişlerdir. *Panonychus citri* için mitokondriyal gen sırasının, *Panonychus ulmi* ve *Tetranychus urticae* için aynı olduğunu, ancak bir dizi gen translokasyonu ve / veya inversiyonu ile diğer Acari'den belirgin şekilde farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Liu vd. (2013), Çin'den enfekteli köpek derilerinden elde ettikleri *Rhipicephalus sanguineus*'un (RSC) tüm mitokondriyal (mt) genomunu sekanslamışlar ve ABD'den elde edilen (RSU) *R. sanguineus*'unki ile karşılaştırmışlardır. Tüm mt genomundaki nükleotid dizisi farkını, RSC ve RSU arasında %11.23 olarak saptamışlardır. 13 protein kodlayan gen için karşılaştırma yapıldığında, RSC ve RSU arasında hem nükleotid (% 9.34-15.65) hem de amino asit (% 2.54-19.23) seviyelerinde dizi farklılıkları ortaya çıkarmışlardır.

Chen vd. (2014) yaptıkları çalışmada, *Tetranychus* cinsine ait *Tetranychus urticae* (yeşil ve kırmızı formları), *T. kanzawai*, *T. ludeni*, *T. malaysiensis*, *T. phaselus*, *T. pueraricola* türlerinin moleküler evrimlerini ve akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla, mitokondriyal genomlarının sekans dizilimlerini elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda yedi mitokondriyal genomda, yaklaşık 13.000 bç kodlayan tipik dairesel moleküller olduğunu ve bunların genellikle metazoanlarda bulunan 37 genin tam setinden oluştuğunu belirtmişlerdir. Mitokondriyal (mt) genlerin sırası/düzeninin *Panonychus citri* ve *P. ulmi*'nin mt genomları ile aynı, ancak diğer Acari'dekinden çok farklı olduğunu bulmuşlardır. Mitokondriyal genomların J iplikçiklerinin yüksek (yaklaşık %84) A + T içeriğine, negatif GC-çarpıklıklarına ve pozitif AT-çarpıklıklarına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2019), predatör akar *Neoseiulus cucumeris*'in yaklaşık 40.000 yumurtasını kullanarak 173 Mb nükleer genomunu (51.75 Gb çift taraflı Illumina okumalarından) rapor etmişlerdir. Yaklaşık tekrarlayan dizilerin 20.6 Mb olduğu (bu genomun ~%11,93'ü) ve açıklamalı 18.735 protein kodlayan gen (tipik bir gen 2888 bç boyutunda) tespit ettiklerini; protein kodlayan genlerin toplam uzunluğunun yaklaşık 50.55 Mb olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu genlerin diğer araknid genomları ile karşılaştırıldığında, yaklaşık %37 (6981) *N. cucumeris*'e özgü olduğunu bildirmişlerdir.

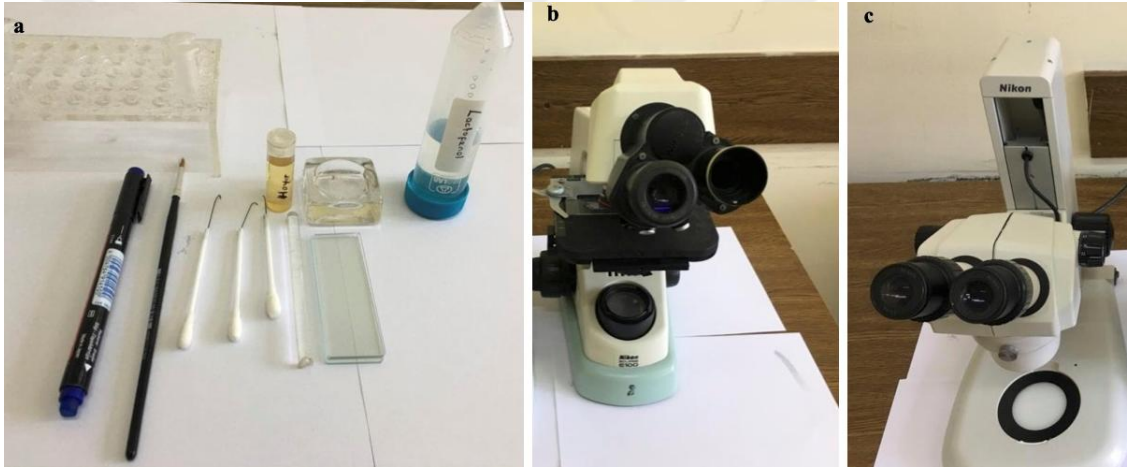
Lan vd. (2020), *Cheyletus malaccensis*'in (Acari: Cheyletidae) tüm mitogenomu, yeni nesil dizileme ile dizilmiştir. Dizileme ve anotasyon açıklamadan sonra, 13 protein kodlama geni, 2 ribozomal RNA içeren *C. malaccensis*'in dairesel 14.732 bç mitogenomunu bulmuşlardır. *Cheyletus malaccensis*'in mt genom dizisinin moleküler düzeyde çözülmesinin, morfolojik tanımlama sırasında belirsizlikleri azaltılabileceği ve Acariformes grubunun filogenisinin yeniden yapılandırılmasında yararlı olabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini 2017-2019 yılları arasında Antalya, Isparta ve Burdur illerinin merkez ve ilçelerinden konukçu bitki ayrımı yapmaksızın toplanan Tetranychidae familyasına ait akar örnekleri ve bu üç ile ek olarak Türkiye'nin farklı illerinden toplanan *Tetranychus urticae* Koch bireyleri oluşturmuştur.

Akarların araziden toplanması aşamalarında, buz kutusu, kese kağıdı, polietilen kilitli poşet, cam yazar, konum bilgilerini yazmak için küçük not kağıtları, kurşun kalem, toplanılan akar örneklerinin saklanması aşamasında, 1.5 mL kilit kapaklı tüpler ile morfolojik çalışmalar için %70'lik, moleküler çalışmalar için %96'lık etanol kullanılmıştır. Tür tespiti ve preparasyon çalışmaları sırasında, (0) ve (00) numaralı samur fırça, syrakus, lam, lamel (ISOLAB markalı), "Sigma-Aldrich" firmasından alınan laktik asit, gliserin, kloralhidrat, fenol kristali, gum arabicum ve etüv (Nüve) kullanılmıştır (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1 Preparatlar hazırlanırken kullanılan malzemeler

Ön teşhis için akar materyali Nikon markalı stereo mikroskop altında incelenip, preparatlar ise Nikon E100 markalı ışık mikroskobu altında hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatların fotoğraflarının çekimi Amscope Markalı dijital kamera ile yapılmıştır.

Moleküler çalışmalarda ise DNA izolasyonu basamağında; CTAB (Cetyldimethylethyl Ammonium Bromide) "Amresco" firmasından, NaCl, Trisma base, kloroform, EDTA, etanol ve polyacrylamide kimyasalları "Sigma-Aldrich" firmasından ve isopropanol ve izoamil alkol kimyasalları da "Merck" firmasından temin edilmiştir. DNA izolasyonunun inkübasyon basamağı için gerekli "Boeco Bio TDB-100" kuru blok ve PCR için "Blue-Ray Biotech" ve "PeqLab primus 96" cihazları kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan tüm ürünler (10X Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 5 U/μL Taq DNA polimeraz, dNTP Set) "Thermo" firmasından, *Urtica* COI deg R-F, ITS R-F, Sing1 R-F, Sing2 R-F ve tüm mitokondriyi çoğaltmada

kullanılan primerler ise “Sentebiolab” firmasından tahsis edilmiştir. Elde edilen ürünleri görüntülemek için “Biomax” markalı agaroz ve “Sigma-Aldrich” markalı EtBr (ethidium bromide) kullanılmıştır.

DNA’yı, elde edilen WGA ve PCR ürünlerini parçalamak için ultrasonik banyo cihazı (Monorex) kullanılmıştır (Şekil 3.2b-d). Tüm genom amplifikasyonu metodunda kullanılan 0.1 µg/µL rastgele hexamer primeri ve 10 U/µL Phi29 DNA polimerase Thermo firmasından temin edilmiştir. Tasarlanan index primer ve adaptörler ise “Invitrogen” firmasından sipariş edilmiştir. Yeni nesil dizileme için hazırlanan kütüphanelerde 10 U/µL T4 polynucleotide Kinase (Thermo), 5 U/µL T4 DNA polimerase (Thermo), 5 U/µL T4 DNA ligase (Thermo), Taq DNA polimerase (Thermo) enzimleri ile “AmpureXP” bead (Beckman) ve miktar ölçümlerinde SYBR green (Thermo) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. a) Entomoloji 2 laboratuvar genel görünüm b-c) Moleküler çalışmalarda kullanılan PCR cihazı d) Ultrasonik banyo

3.2. Metot

3.2.1. Tetranychidae familyası türlerinin örneklerinin toplanması

Çalışma alanı olarak seçilen Antalya, Burdur ve Isparta illerinin merkez ve tüm ilçelerine 2016-2018 yıllarında değişik zaman aralıklarında gidilerek, konukçu bitki ayırt etmeksizin Tetranychidae familyasına ait türler coğrafik konum belirleme sistemine göre (GPS) kayıt altına alınarak toplanmıştır. *Tetranychus urticae* popülasyonları ise Türkiye’nin farklı illerinden toplanmıştır.

3.2.2. Örneklerin preparasyonu

Akar örneklerinin preparatı Düzgüneş (1980)'e göre yapılmıştır. Preparasyonda izlenen yöntem aşağıdaki gibidir.

1. %70'lik etanolde saklanan akarların preparatları yapılmadan önce akarların berraklaşması için syrakus kabına ince uçlu bir iğne yardımıyla alınarak, üzerlerine 2-3 damla laktofenol damlatılmıştır.

2. Laktofenole konulan akarlar, renklerinin açılıp, teşhis karakterlerinin ortaya çıkması için 30-35°C'ye ayarlı etüv içinde bekletilmiştir. Akarların yeterince berraklaşıp berraklaşmadığını anlamak için zaman zaman stereo mikroskop altında kontrolleri yapılmıştır.

3. Preparatların yapılmasında Hoyer ortamı kullanılmıştır. Yeteri kadar berraklaşmış akarlar, stereo mikroskop altında ince uçlu iğne yardımıyla, üzerine Hoyer damlatılmış temiz, kuru bir lam üzerine alınmış ve bu ortama aktarılmıştır.

4. Akara Hoyer ortamında teşhis için uygun pozisyon (genellikle dorso-ventral pozisyon, Tetranychidae familyası türlerinin erkek bireylerinin aedeagus yapısı için lateral pozisyon) verildikten sonra, lamel ile tekniğine uygun şekilde, yavaşça kapatılmıştır. Lamel kapatılırken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir.

5. Hazırlanan preparatlar, 40-45 °C'ye ayarlı etüvde, 3-4 gün bekletilerek kurutulmaya bırakılmıştır.

6. Hazırlanan preparatların sağ ve sol tarafına birer etiket yapıştırılmış, üzerine gerekli bilgiler kaydedilmiştir. Etiket bilgilerinde; akar örneğinin alındığı yer, konukçu bitki, toplanma tarihi, teşhis edilen türün bilimsel adı ve teşhis eden kişiye ait bilgiler yer almıştır.

7. Lamellerin kenarına örneklerin hava alarak bozulmalarını engellemek amacıyla şeffaf oje sürülerek saklanmıştır.

Morfolojik teşhis; Pritchard ve Baker (1955), Jeppson (1975), Hatzinikolis ve Emmanouel (1991), Zhang (2003), Auger vd. (2003) gibi kaynaklardan yararlanılarak yapılmıştır.

3.2.3. Akar örneklerinden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için örneklerin tamamına (hem tek birey, hem de toplu 100 birey olarak ayrılan), Doyle ve Doyle (1987)'nin geliştirdikleri 'CTAB' protokolü uygulanmıştır. Bu protokolde:

1) Akar örnekleri 1.5 mL'lik tüplere alınmış, üzerine 150 µl %0.3 merkaptetanol içeren CTAB tampon çözeltisinden (%2 (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCL pH:8) eklenip, ezme çubuğu yardımıyla ezilmiştir.

2) Ezilen örneklerin üzerine 350 µl daha bu tampon çözeltiden eklenerek, DNA'nın bu çözeltiliye geçmesi için önceden 65 °C'ye ayarlanan kuru blokta 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3) İnkübasyondan alınan örneklerin üzerine proteinleri uzaklaştırılabilmesi için 500 µl kloroform- izoamil alkol (24:1 oranında) ilave edilip tüpler iyice çalkalanmıştır. Çalkalanan tüpler 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüje konulmuştur.

4) Santrifüjden alınan tüplerin alt kısmında kloroformun, üst kısmında ise DNA'nın bulunduğu olmak üzere, iki ayrı faz oluştuğu görülmüştür. Üst fazdan yaklaşık 400 µl alınıp, 1.5 mL'lik yeni tüpe aktarılmıştır. Üzerine yeniden 400 µl kloroform- izoamil alkol ilave edilip ependorf tüpler iyice çalkalanmıştır. Çalkalanan tüpler 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüje konulmuştur.

5) Santrifüjden alınan örneklerden yeni 1.5 mL'lik tüplere üst fazdan 300 µl alınmış, DNA'yı çöktürmek için üzerine 300 µl (alınan üst faz ile eşit hacimde) soğuk isopropanol eklenmiş, 15 defa yavaş bir şekilde alt-üst edilmiştir. Örnekler -20 °C'de bir gece bekletilmiştir.

6) -20°C'de bir gece bekletilen örnekler, 20 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandığında, tüplerin dibinde pelet oluşumu gözlenmiştir.

7) Daha sonra, oluşan pelete zarar vermeden tüpteki sıvı yavaşça dökülmüş, üzerine 500 µl soğuk %70'lik etanol ilave edilip, 5 dakika santrifüje bırakılmıştır. Bu işlem bir defa daha tekrar edilmiştir. Bu aşamadan sonra, içindeki etanol tüpün dibindeki pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.

8) En son tüpler kurutulmaya bırakılmıştır (yaklaşık 1,5 saat). Daha sonra tüplere tek birey için 35 µl, toplu olarak çıkarılanlar (pool) için 80 µl otoklavlı saf su ilave edilmiştir.

9) Tüp içerisindeki DNA'nın sıvıya geçebilmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiş, daha sonra DNA'nın bozulmaması için örnekler -20 °C'de saklanmıştır.

Tek bireyden DNA izolasyonunda yeterli başarı sağlanamadığından, izolasyonda stok olarak hazırlanan (%50'lik) Linear Polyacrylamide solüsyonu %7.5 oranında seyreltilip, bu solüsyondan DNA izolasyon aşamasında (5. basamakta) yeni tüpe alınan ikinci üst fazın üzerine alınan miktar kadar eklenmiş ve dikkatlice karıştırılmıştır. LPA'nın bu basamakta 1:1 oranında eklenmesi ve yavaşça karıştırılması, DNA izolasyon başarısı açısından kritiktir. Daha sonra, oluşan son hacim kadar -20 °C'de saklanan isopropanol eklenip, yavaşça karıştırılmıştır.

Etanolde toplu olarak saklanan akar örneklerinin DNA'larının bir kısmının etanole geçmiş olabileceği ihtimali değerlendirilmiştir. Bu nedenle, tüp içerisinde toplu olarak (yaklaşık 100 birey) saklanan *Tetranychus urticae* bireylerinde etanole geçiş olup olmadığının testlenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla akarlara zarar vermeden, tüp içerisindeki etanol yeni bir tüpe alınmıştır. Üzerine aynı miktarda %7.5 oranında seyreltilen polyacrylamide eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Üzerine son hacim -20 °C'de saklanan isopropanol eklenip, yavaşça karıştırılmıştır. Geri kalan basamaklar aynı

şekilde uygulanmıştır. Buradaki başarının nedeni, LPA ilavesinin oluşacak iz miktardaki DNA peletini çöktürebilir ve görünür hale getirmesidir.

Tezde tek birey akardan DNA izolasyonu başarı oranını anlamak için (tek birey akardan elde edilen DNA'nın agaroz jelde görüntülenmemesinden dolayı) Çizelge 3.1'de verilen Doç. Dr. Cengiz İKTEN'in tasarladığı *Urtica* COI F/R primerleri ile mitokondriyal "Cytochrome Oxidase Subunit I" (COI) gen bölgesi, ITS F/R primerleri ve ITS gen bölgesi çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu son hacim 15µl olacak şekilde; 10x Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 µM F-primer, 10 µM R-primer, 0.5 ünite Taq DNA polimeraz, ultra saf su ve DNA içermektedir. ITS ve COI primerleriyle kurulan PCR aşamaları Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Internal Transcribed Spacer (ITS) ve Cytochrome oxidase (COI) bölgesine ait DNA dizileri kullanılarak, tasarlanan primerlerler

Primer Adı	Dizi
ITSF	5' GGTGAAATTCTTGGAYCGTCGCAAGAC 3'
ITSR	5' CGCGTGCRGCCCCRGACATCTAAG 3'
UrticaCOIF	5' TAGGTAAAAAAGAAGTTTTTGG 3'
UrticaCOIR	5' GTAAATCCTCCAATAGAAAATATAA 3'

Çizelge 3.2. ITS primerleri ile kurulan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	95	90	
Bağlanma	60	75	35
Uzama	72	75	
Son Uzama	72	300	1

Çizelge 3.3. COI primerleri ile kurulan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	150	1
Denatürasyon	94	50	
Bağlanma	53	50	35
Uzama	72	70	
Son Uzama	72	300	1

3.2.4. Tüm genom amplifikasyonu (whole genome amplification)

Yeni nesil dizileme öncesi gerekli olan kütüphane hazırlığı için, yaklaşık 150 nanogram yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA olması gerektiğinden ve bu miktar DNA Tetranychidae'nin tek bir bireyinden elde edilememesi nedeniyle, tek bireylerden

izolasyon sonucu elde edilen iz miktardaki DNA'nın öncelikle artırılması gerekmektedir.

Bu nedenle, tüm genomun eşit olarak çoğaltılabildiği, PCR temelli olmayan WGA (Whole genome amplification) protokolü kullanılmıştır. Bu işlem için elde edilen az miktardaki DNA; 0.02 µg random hexamers (6 baz uzunluğunda rastgele primer karışımı) kullanılarak 5 unite Phi29 DNA polimeraz, 20 mM dNTP ve tampon çözelti içerisinde 16 saat boyunca 30°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur (Çizelge 3.4). Elde edilen WGA ürünü çoğaltılmış DNA'nın kalite ve miktarı %1,5'luk agaroz jel ortamında kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.4. WGA bileşenleri

Bileşenler	Miktarı
Random hexamer primeri	0,5 µl
dNTP (20 mM)	2,16 µl
BSA (100 mg/ml)	0,1 µl
H ₂ O	1,24 µl
DNA	2 µl
Buffer 1X	0,5 µl
H ₂ O	1,24 µl
phi 29 polimeraz (5 unit)	0,25 µl

WGA protokolü, az miktarda olan tek bireyin DNA'sının çoğaltılması işlemi olduğundan, bazen bu protokolde spesifik olmayan amplifikasyonlar (Tetranychidae DNA'sının çoğalmaması) oluşabildiğinden ve bu spesifik olmayan çoğalmanın dizileme analizleri yapılmadan evvel anlaşılamamasından dolayı, bir popülasyondaki birçok (pool DNA) bireylerden de yeni nesil dizileme kütüphanesi hazırlanmaya karar verilmiştir. Bu işlem için yüz birey akardan CTAB metodu ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA'nın kalitesi ve miktarı %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.2.5. Mitokondriyal genomun amplifikasyonu

Toplanan akarların tüm mitokondriyal bölgesinin sekans dizilimini (yaklaşık 13100 bç) elde etmek amacıyla, gen bankasındaki Tetranychidae dizilimleri dikkate alınarak, Primer3 Plus programı kullanılarak primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.5). Tasarlanan primerler kullanılarak, her bir primer çifti için hedef ürünler elde edilmiştir.

Çizelge 3.5. Tüm mitokondriyal bölgeyi çoğaltmak için tasarlanan primerler ve dizilimleri

Primer adı	Primer sekansı
913F	GCYACWATAATTATTGCYATYCC
941R	CCWGTWGGRATRGCAATAATTAT
3043F	TTGAACTGAGTTCAAATCGGTG
3062R	CCGATTTGAACTCAGTTCAAGTTA
6399F	TGTACATATTGCCATCACTTTTCAT
6424R	ATGAAAGTGATGGGCAATATGTACA
6491F	CCGTATATTCAATTTCCAATTGAA
6515R	TTCAATTGGAAATTGAATATACGG
8342F	TAGWATAGCAAARGARAATTTTTTCC
8368R	GGAAAAAATTYTCYTTTGCTA
10962F	CCHACHCCWATTTTCAGCAATAGT
11011R	CCTGCTGTTACAAGAGTTGAACT
12154F	ATTTATTTTATTATTCAAGARATWAGATC
12183R	GATCTWATYTCTTGAATAATAAAATAAAT

Tetranychidae familyasına ait akarlardan elde edilen genomik DNA'lardan komple mitokondriyal genomun PCR ile çoğaltılması için beş spesifik primer çifti kullanılmıştır (Çizelge 3.6; Şekil 3.3). PCR reaksiyonu son hacim 15 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Gradient PCR reaksiyonu; 10x Dream Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 µM F-primer 10 µM R-primer, 0.5 ünite DreamTaq DNA polimeraz, ultra saf su ve DNA içermektedir (Çizelge 3.7). Tüm bu primerler, hem pool DNA hem de tek birey akar DNA'sında denenmiştir. Kullanılan beş primer çiftiyle de kurulan PCR aşamaları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

PCR sonucu oluşan ürünleri 10:2 oranında yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra, içinde 5 mg/L EtBr bulunan %1.5'luk agaroz (Tris Acetate- EDTA, pH:8) jele yüklenerek 80 volt DC'de yaklaşık 50 dk ayrıştırılmıştır. Jel ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.6. Tüm mitokondriyi çoğaltmak için kullanılan primerler

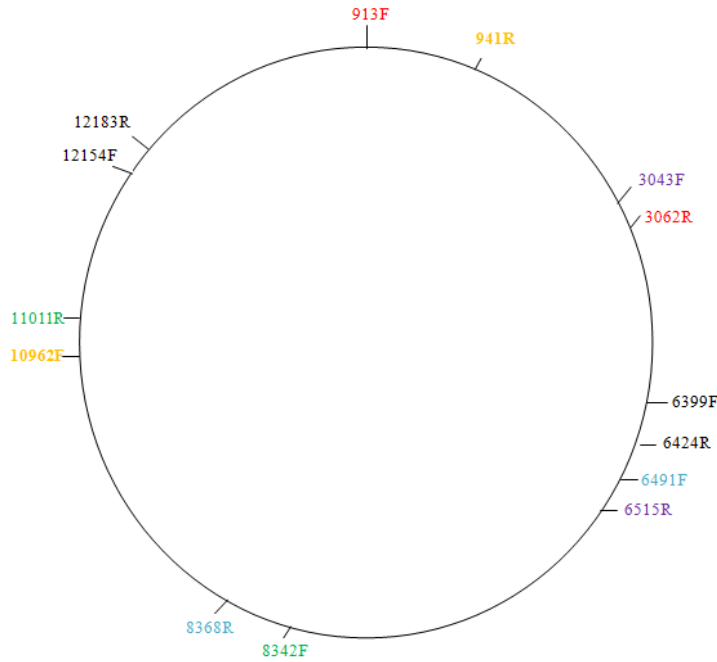
Primerler	Beklenen PCR Ürün Büyüklüğü (bp)
913F-3062R	2149
3043F-6515R	3472
6491F-8368R	1877
8342F-11011R	2669
10962F-941R	3079

Çizelge 3.7. Mitokondriyal genomun gradient PCR ile çoğaltılması için gerekli bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
MgCl ₂ (25 mM)	1,25
DreamTaq Buffer (10x)	1,5
dNTP (10 mM)	1,25
H ₂ O	7
DreamTaq DNA polimeraz (5u/µl)	0,2
F-primer (10 pmol)	1
R- primer (10 pmol)	1

Çizelge 3.8. Tüm mitokondriyal bölgeyi çoğaltmada kullanılan gradient PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	92	20	36
Bağlanma	52±07	60	
Uzama	68	240	
Son Uzama	72	420	1

**Şekil 3.3.** Tüm mitokondriyi çoğaltmada kullanılan primerler ve mitokondriyal genomdaki pozisyonları

3.2.6. Yeni nesil dizileme kütüphanelerin oluşturulması

PCR amplifikasyonu ile Tetranychidae familyasına ait akar örneklerinden farklı mitokondriyal gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu çoğaltma işleminde, 5 farklı primer kombinasyonu kullanılmış ve PCR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel sisteminde görüntülenerek PCR başarısı teyid edilmiştir.

PCR aşaması sonrasında elde edilen ürünler, WGA ürünleri ve pool olarak elde edilen DNA'lar kütüphane aşamasından evvel bir kez daha kalite ve miktarları yönünden agaroz jel sisteminde tekrar kontrol edilmiştir. Kontrol sonrası, kalite, saflık ve ampikon büyüklükleri kayıt altına alınarak, NGS işlemleri için uygun oldukları tespit edilmiştir.

Elde bulunan tüm ürünler (PCR ampikonları, WGA ürünleri ve pool DNA) ile NGS Kütüphanesi hazırlığına başlanmıştır. Bu aşamada, ürünler öncelikle “ultrasonik banyo” ya da “fragmentase” enzimi ile fragmentasyona tabi tutulmuştur. Fragmentasyon sonucu oluşan ürünler, “AmpureXP” ile “size selection” ve “temizlik” işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu aşama sonrası elde edilen fragmentasyon ürünlerinin kalite ve miktarları agaroz jel sisteminde kontrol edilmiştir. İstenen boyuta indirgenen bu fragmentasyon ürünlerinin uçları “End repair” ve “A tailing” işlemleri ile NGS adaptörlerine uygun hale getirilmiştir. Bu aşama sonrasında, uçları düzeltilen ürünler tekrar “AmpureXP” bead'leri kullanılarak enzimlerden temizlenmiştir. Takiben, her ürün kendine özgü barkod barındıran ve aynı zamanda Illumina chiplerine bağlanmayı sağlayan adaptörler ile “ligation” işlemine tabi tutulmuştur. Ligation sonrası, tekrar “AmpureXP” kullanılarak temizlenen ürünler, Illumina spesifik primerler kullanılarak PCR işlemine tabii tutulmuştur. Bu şekilde oluşturulan her kütüphanenin kalite ve kantitesi agaroz jel sisteminde kontrol edilmiştir. Oluşturulan bireysel kütüphaneler miktarına bağlı olarak uygun oranda genel bir havuzda birleştirilmiş ve oluşan karışım kütüphane Illumina platformunda 150 bp büyüklüğünde iki yönlü dizilemeye tabii tutulmuştur.

3.2.7. Filogenetik analizler

Filogenetik ağaçlar oluşturulurken; tez kapsamında elde edilen sekanslara ilaveten, GenBank'a daha önceden yüklenen Tetranychidae familyasına ait ilgili sekanslar da kullanılmıştır. Filogenetik ağaçları oluşturmak amacıyla cins içi ve cinsler arası genetik uzaklıkları belirlemek için MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılmıştır (Kumar vd. 2018). MEGA programı tarafından COI ve ITS geni için en iyi modeller olarak belirlenmiş (Kimura 1980) ve 1000 bootstrap kullanılarak maksimum benzerlik algoritması ile filogenetik ağaçlar elde edilmiştir.

3.2.8. Biyoinformatik analizler

Dizileme sonrası elde edilen “fastq” dosyaları öncelikle “je demultiplex” programı kullanılarak “debarcoding” işlemine tabi tutulmuş ve her örneğin kendine özgü “fastq” dosyaları oluşturulmuştur. Oluşturulan bireysel “fastq” dosyalarının herbiri “fastp” ve takibinde “trim galore” programları kullanılarak Illumina spesifik adaptörlerden ve düşük kalite ve kısa okumalardan arındırılmıştır. Temizliği

tamamlanan okumaların, “assembly” işlemleri “megahit” ve “metaspades” programları ile gerçekleştirilmiştir. “Assembly” işlemi gerçekleştirilen her PCR ürününe ait dosya içerisinde ilgili PCR ürününü oluşturmakta kullanılan primerlerin varlığı ve uygun oryantasyonda olduğu ve “assembly” içerisinde iki primer arası uzaklığın agaroz jelde elde edilen büyüklük ile uyumlu olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Bu kriterleri geçen “assembly” sonuçları, ilgili örneğe ait “fasta” dosyası olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, oluşturulan “fasta” dosyası “referans genome” kabul edilerek ilgili örneğe ait temizliği yapılmış “fastq” dosyası içerisindeki dizi okumaları “referans genome” üzerine align edilmiştir. Bu işlem “bowtie2” programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ilgili örneğe ait “bam” ve “bai” dosyaları olarak kaydedilmiştir.

Oluşturulan PCR assembly işlemlerinde herhangi bir hatanın oluşup oluşmadığı ise “bam” dosyaları “Integrated Genome Browser” programında içerisinde kullanılarak görsel açıdan kontrol edilmiş ve herhangi bir “misassembly” görüldüğünde, “fasta” dosyası manuel olarak düzeltilmiştir. Son düzeltmeleri de gerçekleştirilen her örneğe ait “fasta” dosyaları her bir lokus için bir araya getirilerek “multifasta” dosyası oluşturulmuştur. Oluşturulan “multifasta” dosyası daha sonra “ClustalW” programında “alignment” işlemine tabii tutulmuştur. Her lokus için ayrı ayrı oluşturulan “alignment” dosyaları görsel olarak incelenerek “alignment kalitesi” ve polimorfik bölgelerin varlığı araştırılmış ve akabinde filogenetik analizler için MEGA 7 programında kullanılmıştır.

Tetranychus urticae türü, Tetranychidae familyası içerisinde tüm genomu yayınlanan tek tür olması ve ekonomik öneme sahip olması nedeniyle, bu türe ait Melek Borazanı bitkisinden toplanan bir popülasyondan elde edilen DNA ile hazırlanan kütüphane, yüksek sayıda Illumina okumasına tabi tutulmuştur. Bu örnekten elde edilen diziler referans genome ile “alignment” yapıldıktan sonra, “freebayes” programı kullanılarak “10X genome coverage” ve “minimum %75 varyant içerme” kriterlerinde polimorfizm taramasına tabi tutulmuştur. Oluşturulan “vcf” dosyası içerisindeki “SNP”, “MNP” ve “Indel” varyasyonları ayrı ayrı taranmış ve referans genom ile bu popülasyona ait örnek arasındaki polimorfizm değerleri ortaya konulmuştur. Ayrıca, “Indel” polimorfizmine ait veriler detaylı analize tabi tutularak referans genome ile bu örnek arasında oluşan en az 10 bp büyüklüğündeki insersiyon ve delesyonlar belirlenmiştir. Yine, bu veri seti içerisinde bulunan SSR bölgeleri “STR-FM” programı aracılığıyla belirlenmiştir.

WGA sonrası ya da çoklu bireylerden doğrudan elde edilen DNA’lar ile oluşturulan kütüphanelerde endosibiyont varlığının ortaya çıkarılması işleminde, öncelikle her bir örnek için “metaspades” programı ile “assembly” dosyası oluşturulmuştur. “Multi-fasta” formatındaki bu dosya içerisinde potansiyel endosibiyontlara ait “contig” varlığını ortaya koymak için bilinen endosibiyont genomları tek bir “multi-fasta” dosyası olarak birleştirilmiş ve “BBtools” programında “bait” dosyası olarak kullanılmıştır. Bu aşamada minimum 100 bp uzunluğunda tam eşleşme kriteri kullanılarak “assembly” dosyası içerisinde yer alan endosymbiontlara ait “contig” ler ayrı bir dosyaya aktarılmış ve sayıları belirlenmiştir.

PCR ya da WGA sonrası ve çoklu bireylerden doğrudan elde edilen DNA’lar ile oluşturulan kütüphanelerde tüm mitokondri ve ribosomal DNA (rDNA) bölgelerinin ortaya çıkarılması işleminde, yukarıda endosibiyont yaklaşımında olduğu gibi öncelikle “metaspades” programı kullanılarak “assembly” dosyası oluşturulmuştur. Oluşturulan

bu dosyalarda mitokondriyal ve rDNA varlığı “BBtools” programı kullanılarak ortaya konulmuştur. Ancak, her bir hedef bölge için seçilen “bait” dosyası için farklı “multifasta” dosyaları kullanılmıştır. Bu amaçla, genbankasında Tetranychidae familyası için bildirilen tüm mitokondriyal DNA dizilimleri “multi-fasta” formatında bir araya getirilmiş ve “bait” dosyası olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde, rDNA için genbankası ayrıca taranmış ve bulunan rDNA bilgileri farklı bir “multi-fasta” dosyası içerisinde “bait” olarak kullanılmıştır. “Bait” dosyaları ile seçilen “contig” bilgileri BLAST analizine tabii tutularak sonuçlar teyit edilmiştir. Mitokondriyal genome anotasyonu için MITOS (Bernt vd. 2013), MFannot (Beck ve Lang 2010) ve GeSeq (Tillich vd. 2017) olmak üzere, 3 farklı program kullanılmıştır. MITOS programı protein kodlayan genler ve tRNA bölgelerinin, MFannot programı sadece protein kodlayan genlerin ve GeSeq programı ise tRNA bölgelerinin tahmin edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin sıralanmasında oluşturulan fiziksel haritalar OGDRAW programı ile çizilmiştir. Elde edilen rDNA contigleri içerisinde “SSU”, “ITS1”, “5S”, “ITS” ve LSU bölgelerinin başlangıç ve bitiş noktaları ise “StructRNAfinder” programı ile tahmin edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Bulgular

4.1.1. Elde edilen Tetranychidae türleri hakkında bilgiler

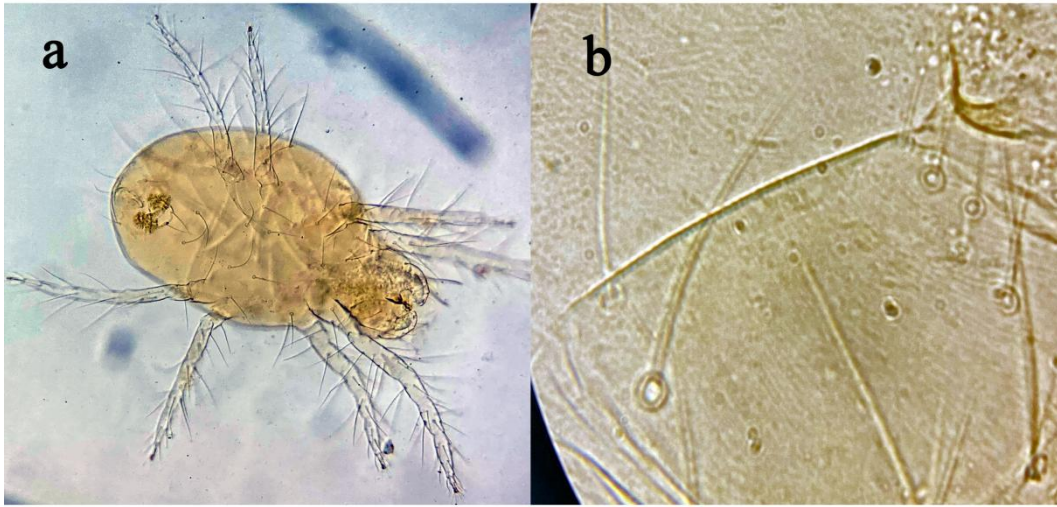
Tez kapsamında elde edilen türlerin sinonimleri, yayılışları ve konukçuları Migeon ve Dorkeld (2021)'ye göre verilmiştir.

Tür: *Amphitetranynchus viennensis* (Zacher, 1920)

Taksonomi: Tetranychidae – Tetranychinae – Tetranychini

Sinonim: *Tetranychus* (*Epitetranynchus*) *viennensis* Zacher 1920, *Tetranychus crataegi* Hirst 1920, *Tetranychus crataegi* Zacher 1921, *Apotetranychus virginis* Ugarov 1937, *Apotetranychus longipenis* Pritchard & Baker 1955.

Tanımı: Dorsalde diğer Tetranychid'lerde olduğu gibi toplam 26 adet kıl bulunur (Şekil 4.1a). Dupleks setae tarsuslarda yer alır, 1. çift bacakta 2 adet ve 2. çift bacakta 1 adet bulunur. Peritremin sonu ağ şeklindedir. Erkek aedeagus keskin bir biçimde eğilmiş, kaudası uca doğru sivri olup, düz ve dikey şekildedir (Şekil 4.1b) (Pritchard ve Baker, 1955).



Şekil 4.1. *Amphitetranynchus viennensis* a) dişi birey b) erkek bireyde aedeagus yapısı

İncelenen materyal: Antalya: Korkuteli 37° 11' 8.7576" N, 30° 1' 24.1104" E *Prunus cerasus* 3♀, 1♂, Burdur: Ağlasun *Prunus avium* 37° 38' 26.502" N, 30° 29' 49.8156 E 3♀, 1♂

Yayılışı: Oryantal ve Palearktik bölgeler.

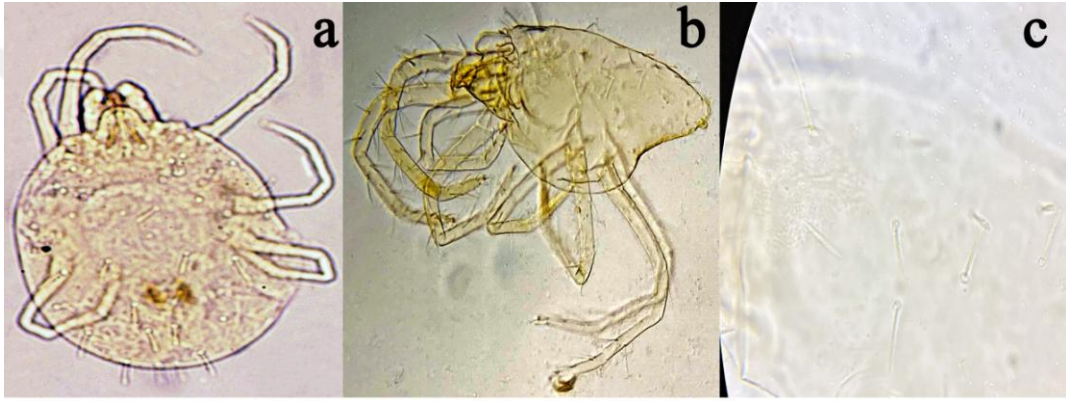
Konukçuları: Apocynaceae, Betulaceae, Compositae, Caprifoliaceae, Fagaceae, Grossulariaceae, Hydrangeaceae, Moraceae, Malvaceae, Oleaceae, Rosaceae, Sapindaceae, Salicaceae ve Ulmaceae familyalarına giren 70 bitki türü.

Tür: *Eutetranychus orientalis* (Klein, 1936)

Taksonomi: Tetranychidae - Tetranychinae - Eurytetranychini

Sinonim: *Anychus latus* Canestrini & Fanzago sensu Hirst 1923, *Anychus ricini* Rahman & Sapro 1940, *Eutetranychus monodi* André 1954, *Anychus orientalis* Klein 1936, *Eutetranychus anneckeii* Meyer 1974, *Eutetranychus sudanicus* El Badry 1970

Tanımı: 13 çift dorsal vücut kıllarının tümü tüberküllerden çıkar, uzunluk ve şekil olarak değişir. Erkek, dişiden çok daha küçüktür ve üçgen şeklinde sona doğru daralır. (bacak I vücut uzunluğunun yaklaşık 1.5 katı kadardır) (Şekil 4.2b). Vücut kılları kısa ve bir x10 lens ile görülemez (Şekil 4.2c) (Smith-Meyer, 1981; Dhooria & Butani, 1984).



Şekil 4.2. *Eutetranychus orientalis* **a)** dişi birey **b)** erkek birey **c)** seta yapısı

İncelenen materyal: Antalya: Konyaaltı, 36° 53' 16.6" N 30° 38' 55.8" E *Melia azedarach* 4♀, 2♂, 36° 53' 16.6" N 30° 38' 55.9" E *Citrus sinensis* 2♀, 1♂

Yayılışı: Afrotropikal, Avustralasya, Oryantal, Palearktik bölgeler.

Konukçuları: Aizoaceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Araceae, Araliaceae, Arecaceae, Asparagaceae, Bromeliaceae, Bixaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Casuarinaceae, Celastraceae, Cleomaceae, Combretaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cupressaceae, Ebenaceae, Euphorbiaceae, Fagaceae, Heliconiaceae, Juglandaceae, Lauraceae, , Lythraceae, Leguminosae, Lamiaceae, Magnoliaceae, Malvaceae, Musaceae, Meliaceae, Menispermaceae, Molluginaceae, Moringaceae, Moraceae, Muntingiaceae, Myrtaceae, Nelumbonaceae, Nyctaginaceae, Oleaceae, Oxalidaceae, Passifloraceae, Poaceae, Pontederiaceae, Pedaliaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Santalaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Salvadoraceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Tamaricaceae, Verbenaceae ve Vitaceae familyalarına giren 228 bitki türü.

Tür: *Oligonychus* sp.

Taksonomi: Tetranychidae – Tetranychinae – Tetranychini

İncelenen materyal: Antalya: Konyaaltı 36° 53' 04.9" N 30° 39' 07.7" E *Picea orientalis*



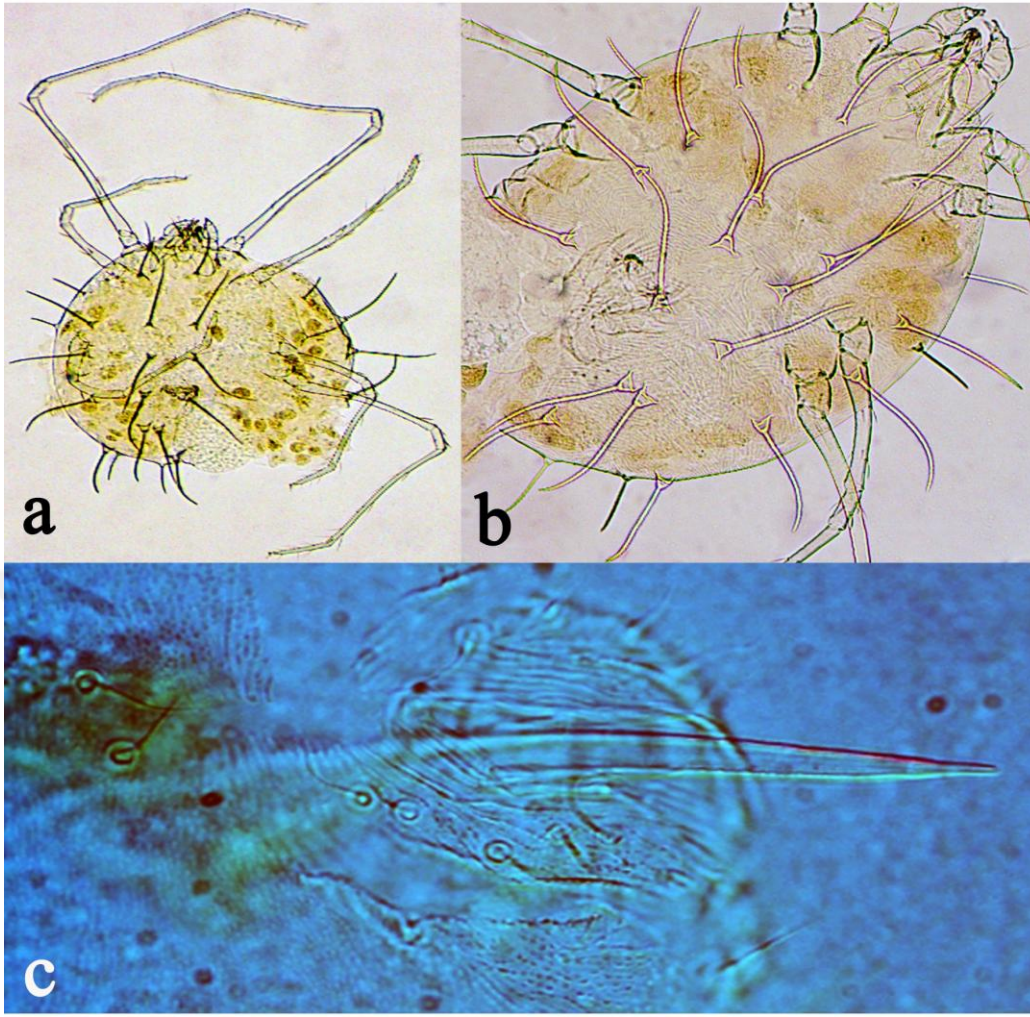
Şekil 4.3. *Oligonychus* sp. dişi birey

Tür: *Petrobia (Tetranychina) harti* (Ewing, 1909)

Taksonomi: Tetranychidae – Bryobiinae – Petrobiini

Sinonim: *Tetranychina agerati* Sayed 1946, *Tenuicrus errabundus* Womersley 1940, *Petrobia (Tetranychina) harti* Ewing 1909, *Tetranychina macdonoughi* McGregor 1917, *Neobryobia spectabilis* Reck 1941, *Tetranychina spectabilis* Reck 1941, *Tetranychina tuberculata* Kishida 1921.

Tanımı: Dorsal setae tüberküller üzerinde kümelenmiştir. Peritreme golf sopası gibi kısa kancada biter ve çıkıntı yapmaz. Dorsal setae f1, dorsuma medial olarak yerleştirilmiş diğer kıllardan daha kısadır. Bacak I, vücudun iki katı uzunluğundadır. Erkek bireyde aedeagus neredeyse düzdür, distalde keskin bir noktaya doğru eşit şekilde incilir (Anonymous, 2021) (Şekil 4.4c).



Şekil 4.4. *Petrobia harti* **a)** dişi genel görünüm **b)** seta **c)** aedagus (Anonymus, 2021)

İncelenen materyal: Antalya: Konyaaltı 36°53'58.6"N 30°39'00.1"E *Trifolium* sp. 4♀,1♂

Yayılışı: Afrotropikal, Avustralasya, Nearktik, Neotropikal, Oryantal, Palearktik bölgeler.

Konukçuları: Brassicaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Leguminosae, Malvaceae, Moraceae, Oxalidaceae, Plantaginaceae, Poaceae: Polygonaceae, Rosaceae, Rutaceae, Solanaceae, Theaceae, Violaceae ve Vitaceae familyalarına giren 44 bitki türü.

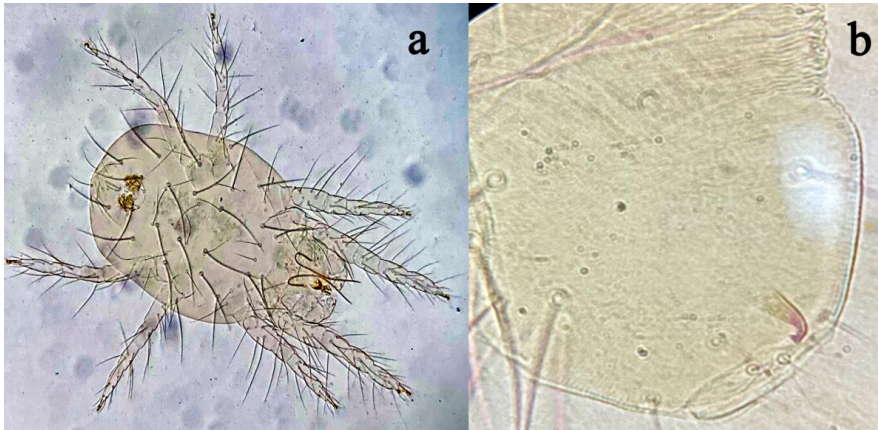
Tür: *Tetranychus urticae* Koch, 1835

Taksonomi: Tetranychidae – Tetranychinae – Tetranychini

Sinonim: *Epitetranychus alceae* Oudemans 1928, *Acarus ferrugineus* Boisduval 1867, *Tetranychus ferrugineus* Boisduval 1867, *Tetranychus althaeae* von Hanstein 1901, *Tetranychus aspidistrae* Oudemans 1931, *Tetranychus eriostemi* Murray 1877,

Distigmatus pilosus Donnadieu 1875, *Tetranychus bimaculatus* Harvey 1892, *Acarus rosarum* Boisduval 1867, *Epitetranychus caldarii* Oudemans 1931, *Acarus textor* Fourcroy 1785, *Tetranychus fragariae* Oudemans 1931, *Epitetranychus aequans* Zacher 1916, *Tetranychus choisyae* Oudemans 1931, *Epitetranychus reinwardtiae* Oudemans 1930, *Acarus cinnabarinus* Boisduval, 1867, *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval 1867, *Acarus cucumeris* Boisduval 1867, *Tetranychus aduncus* Flechtmann & Baker 1967, *Tetranychus reetalis* Basu 1963, *Tetranychus cucumeris* Boisduval, 1867, *Tetranychus cucurbitacearum* Sayed 1946, *Tetranychus dahliae* Oudemans 1937, *Tetranychus major* Donnadieu 1875, *Epitetranychus althaeae* von Hanstein 1901, *Tetranychus dugesii* Cano & Alcacio 1886, *Tetranychus arabicus* Attiah 1967, *Tetranychus fervidus* Koch 1841, *Eotetranychus cucurbitacearum* Sayed 1946, *Tetranychus fici* Murray 1877, *Tetranychus fransseni* Oudemans 1931, *Acarus haematodes* Boisduval 1867, *Tetranychus urticae* Koch 1835, *Epitetranychus hamatus* Zacher 1916, *Tetranychus inaequalis* Targioni Tozzetti 1878, *Eotetranychus inexpectatus* André 1933, *Tetranychus minor* Donnadieu 1875, *Tetranychus multisetis* McGregor 1950, *Tetranychus stellariae* Oudemans 1931, *Tetranychus piger* Donnadieu 1875, *Tetranychus manihotis* Oudemans 1931, *Tetranychus plumistoma* Donnadieu 1875, *Tetranychus reinwardtiae* Oudemans 1930, *Tetranychus ricinus* Saba 1973, *Tetranychus rosarum* Boisduval 1867, *Tetranychus russeolus* Koch 1838, *Acarus sambuci* Schrank 1781, *Tetranychus sambuci* Schrank 1781, *Epitetranychus sambuci* Schrank 1781, *Tetranychus vitis* Boisduval 1867, *Acarus telarius* Linnaeus 1758, *Tetranychus telarius* Linnaeus 1758, *Tetranychus telarius* Smith & Baker 1968, *Tetranychus telarius haematodes* Boisduval 1867, *Tetranychus longitarsis* Donnadieu 1875, *Tetranychus textor* Fourcroy 1785, *Tetranychus urticae dianthica* Dosse 1952, *Tetranychus viburni* Koch 1838, *Schizotetranychus viburni* Koch 1838, *Tetranychus violae* Oudemans 1931, *Acarus vitis* Boisduval 1867, *Eotetranychus scabrisetus* Ugarov & Nikolskii 1937.

Tanımı: Dorsaldeki el ve fl setaları arasındaki çizgilenme elmas biçimindedir. Bu alandaki çizgilenmelerin üzerindeki loblar üçgen veya yarım daire şeklindedir (Vacante, 2010). Erkek bireylerde aedeagus net şekilde küçük bir baş'ın bulunduğu boyun kısmı sağa doğru kıvrık biçimdedir. Posterior ve anteriordeki dirsek kısmı keskin olup, birbirine eşittir (Şekil 4. 5b) (Roggia vd. 2008, Zhang 2003).



Şekil 4.5. *Tetranychus urticae* a) dişi birey genel görünümü b) aedeagus yapısı

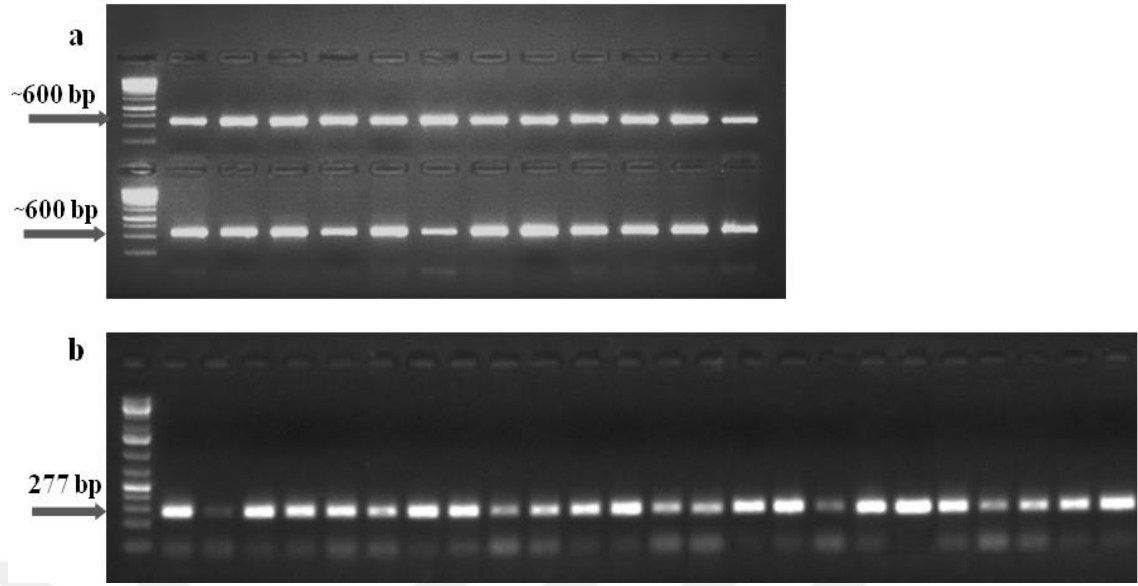
Yayılışı: Avustralasya, Afrotropikal, Palearktik, Neotropikal, Nearktik, Oryantal bölgeler.

Konukçuları: Acanthaceae, Actinidiaceae, Aizoaceae, Alstroemeriaceae, Apiaceae, Amaryllidaceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Apocynaceae, Annonaceae, Aquifoliaceae, Araliaceae, Arecaceae, Araucariaceae, Aristolochiaceae, Araceae, Asparagaceae, Berberidaceae, Betulaceae, Bignoniaceae, Balsaminaceae, Brassicaceae, Boraginaceae, Bromeliaceae, Buxaceae, Calophyllaceae, Campanulaceae, Cannabaceae, Cannaceae, Capparaceae, Caricaceae, Caryophyllaceae, Celastraceae, Cistaceae, Clethraceae, Commelinaceae, Caprifoliaceae, Combretaceae, Cleomaceae, Compositae, Cornaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cupressaceae, Cyperaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Ebenaceae, , Elaeagnaceae, Equisetaceae, Fagaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Goodeniaceae, Grossulariaceae, Garryaceae, Gesneriaceae, Hydrangeaceae, Heliconiaceae, Juglandaceae, Iridaceae, Lythraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Leguminosae, Linaceae, Moringaceae, Magnoliaceae, Meliaceae, Marantaceae, Menispermaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Moraceae, Nothofagaceae, Nyctaginaceae, Musaceae, Olacaceae, Onagraceae, Paeoniaceae, Orchidaceae, Papaveraceae, Paulowniaceae, Pedaliaceae, Phytolaccaceae, Phyllanthaceae, Passifloraceae, Pinaceae, Pittosporaceae, Plantaginaceae, Platanaceae, Plumbaginaceae, Poaceae, Polemoniaceae, Polygonaceae, Primulaceae, Portulacaceae, Ranunculaceae, Pontederiaceae, Resedaceae, Rutaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Saxifragaceae, Sapindaceae, Scrophulariaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Strelitziaceae, Thymelaeaceae, Theaceae, Tropaeolaceae, Ulmaceae, Urticaceae, Verbenaceae, Violaceae, Vitaceae, Xanthorrhoeaceae, Zygophyllaceae ve Zingiberaceae familyalarına giren 1169 bitki türü.

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. DNA izolasyonu

İzolasyon aşamasında hem LPA kullanılarak hem de kullanılmadan tek bireyden çıkarılan DNA'ların amplifikasyon kontrolleri, COI ve ITS gen bölgelerinin elde edilmesi amacıyla tasarlanan primerler ile ilgili bölgeler çoğaltılarak, elde edilen PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jele yüklenmesi ile yapılmıştır (Şekil 4.6). Sonuçlar, DNA izolasyonunda LPA kullanımının tek birey akar örneğinden DNA izolasyonundaki başarısını %20 düzeyinden mitokondriyal COI bölgesi için %80 oranına, ITS gen bölgesi için ise %90 oranına çıkardığını göstermektedir (Çizelge 4.1).

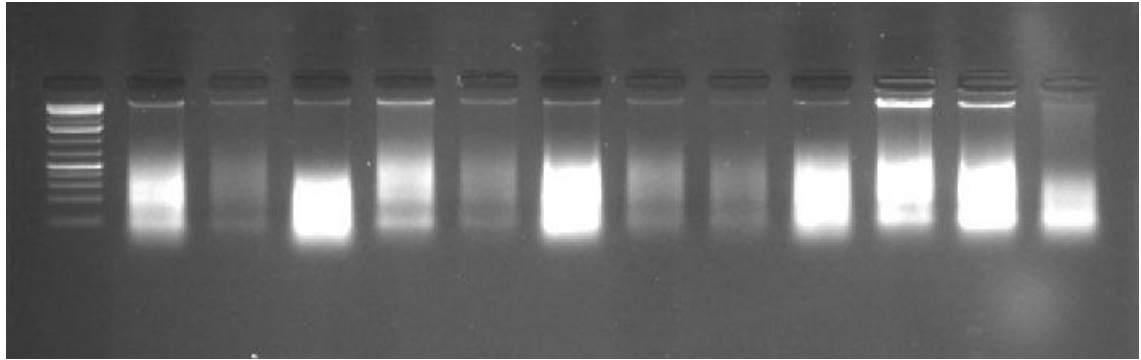


Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan ITS (a) ve COI (b) primer setleri ile PCR analizlerinde test edilen 24 örneğin oluşturduğu PCR ürünleri. (a) Ladder 1 kb, (b) Ladder 100 bç.

Çizelge 4.1. DNA izolasyonunda LPA kullanımının başarı oranları

COI için (Amplifikasyonu gerçekleşen izolasyonsayısı /toplam izolasyon sayısı)		ITS için (Amplifikasyon gerçekleşen izolasyon sayısı /toplam izolasyon sayısı)	
LPA kullanılan	LPA kullanılmayan	LPA kullanılan	LPA kullanılmayan
8/10	2/10	9/10	3/10

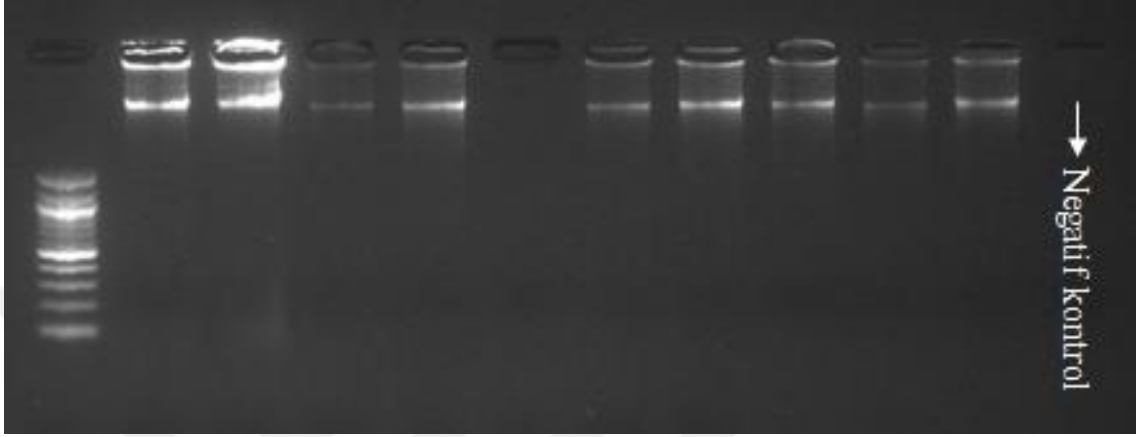
Yüz birey akardan toplu olarak çıkarılan DNA'ların kalite ve miktar kontrolleri ise %1'lik agaroz jelde yapılmıştır (Şekil 4.7). Sonuçlar Tetranychidae familyasında bulunan az miktar dokuya sahip artropodlarda 100 bireyden elde edilen DNA miktarının agaroz jelde kalite ve kantite yi kontrol etmek için yeter sayı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan Tetranychidae familyasından elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

4.2.2. Bütün genom amplifikasyonu (whole genome amplification)

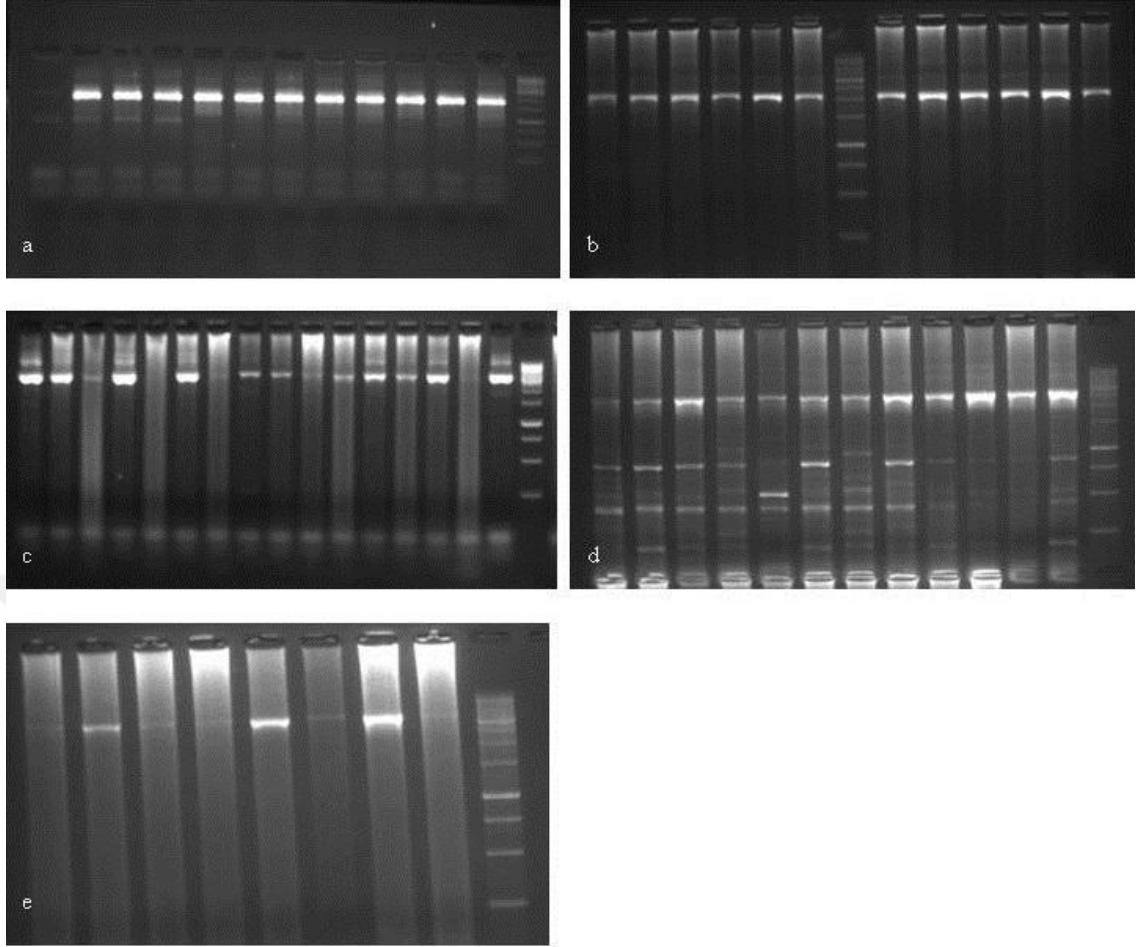
WGA yaklaşımı ile tek birey akardan elde edilen DNA'nın *phi* 29 polimeraz enzimi ve random primer yardımıyla çoğaltılmasının mümkün olduğu görülmüştür. Ancak, elde edilen DNA profili doğrudan çoklu bireyden elde edilen DNA profilinden farklılık göstermekte ve agaroz jelde yüksek moleküler ağırlığa sahip iki farklı boyutta DNA görüntüsü oluşmaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. WGA ürünü çoğaltılmış DNA

4.2.3. Tüm mitokondriyal genomun PCR ile amplifikasyonu

PCR amplifikasyonu ile farklı Tetranychidae familyasından hem tek hem de pool (100 birey) bireylerden farklı mitokondriyal gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu çoğaltma işleminde, 5 farklı primer kombinasyonu (913F-3062R, 3043F-6515R, 6491F-8368R, 8342F-11011R ve 10962F-941R) kullanılmış ve PCR sonucu oluşan ürünler, %1,5'luk agaroz jel sisteminde görüntülenerek PCR başarısı teyit edilmiştir (Şekil 4.9). PCR amplifikasyonu için kullanılan primerler, ağırlıklıla *Tetranychus urticae* göz önüne alınarak diyazn edilmesi sebebi ile bu tür dışındaki türlerde tüm mitokondriyi oluşturacak PCR amplifiasyonlarının hepsi gerçekleştirilememiştir. Hatta, bazı *T. urticae* popülasyonlarında 5 primer çiftinden yalnızca ikisinin amplifikasyonu gerçekleşmiştir (Adana pamuk). Bu durum, tür içi ve gruplar arası polimorfizm oranının yüksek olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.9. Farklı Tetranychidae bireylerinden elde edilen DNA'lar ile **a)** 6491F-3062R; **b)** 913F-3062R; **c)** 10962F-94R; **d)** 8342F-11011R; **e)** 3043F-6515R primerlerini kullanılarak elde edilen PCR ürünleri

4.3. Filogenetik Analizler

4.3.1. *Tetranychus urticae* popülasyonlarında filogenetik analiz

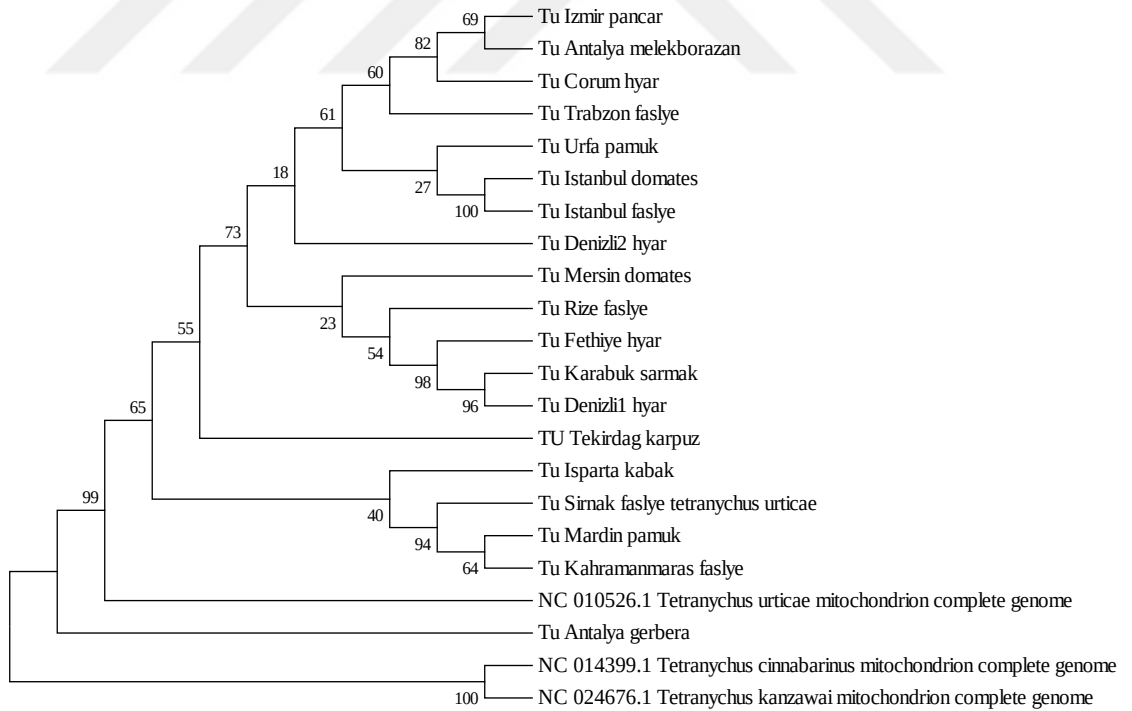
Tez çalışması kapsamında Çizelge 4.2'de verilen farklı lokasyon ve konukçu bitkilerden toplanan *Tetranychus urticae* türüne ait sekans dizilimleri ile her bir türe ait NCBI GenBank veri tabanından elde edilen diziler ClustalW programı kullanılarak alignment analizi yapılmış ve MEGA 7 programına yüklenmiştir. Maximum Likelihood dendrogramı Kimura 2-parameter modeli kullanılarak 1000 bootstrap tekrarı ile filogenetik ağaçları oluşturulmuştur (Kimura 1980).

Tetranychus urticae türüne ait bireylerin COI gen bölgeleri (1536 bç) kullanılarak çizilen dendrogramda (Şekil 4.10) İzmir pancar, Antalya melekborazanı, Çorum, Trabzon, Urfa, İstanbul, İstanbul fasulye, Denizli hıyar, Mersin, Rize, Fethiye, Karabük, Denizli, Tekirdağ, Isparta, Şırnak, Mardin, Kahramanmaraş ve Antalya bireyleri ile GenBank'tan elde edilen NC 010526.1 *Tetranychus urticae* aynı grupta yer almış ve en yüksek Boot Strap (Seç dağıt testi) (1000 tekrarlı) değerinde %99 oranında benzerlik belirlenmiştir. GenBank'tan elde edilen *Tetranychus* cinsine ait NC 014399.1

Tetranychus cinnabarinus ve NC024676.1 *Tetranychus kanzawai* türleri, çalışmada elde edilen 19 bireyden farklı dış grupta yer alarak kendi aralarında %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 4.10). Filogenetik analizde iç gruplarda konukçu bitki ve lokasyonlar arasında belirgin bir ayrım görülmemiştir. COI gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin Burdur'da patlıcan ve Adana'da pamuktan toplanan *Tetranychus urticae* popülasyonlarında çalışmamasından dolayı, bu iki popülasyon analizlere dahil edilmemiştir.

Çizelge 4.2. *Tetranychus urticae* örneklerinin toplandığı iller ve konukçu bitkileri

Lokasyon	Konukçu bitki	Lokasyon	Konukçu bitki
Adana	Pamuk	İzmir	Pancar
Antalya	Gerbera	Kahramanmaraş	Fasulye
Antalya	Melek Borozanı	Karabük	Sarmaşık
Burdur	Patlıcan	Mardin	Pamuk
Çorum	Hıyar	Mersin	Domates
Denizli 1	Hıyar	Rize	Fasulye
Denizli 2	Hıyar	Şanlıurfa	Pamuk
Fethiye	Hıyar	Şırnak	Fasulye
Isparta	Kabak	Tekirdağ	Karpuz
İstanbul	Domates	Trabzon	Fasulye
İstanbul	Fasulye		



Şekil 4.10. *Tetranychus urticae* türüne ait bireylerin COI gen bölgesinin Kimura 2-parameter Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı

4.3.2. Tetranychidae familyasına ait farklı türlerde filogenetik analiz

Çalışmada elde edilen farklı akar türlerine ait bireyler, NCBI GenBank veri tabanından alınan türler arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemek için çalışmada elde edilen bireylere ait sekans dizilimleri ile her bir türe ait NCBI GenBank veri tabanından elde edilen diziler ClustalW programı kullanılarak alignment analizi yapılmış ve MEGA 7 programına yüklenmiştir. UPGMA dendrogramı Kimura 2-parameter modeli kullanılarak 1000 bootstrap tekrarı ile filogenetik ağaçları çizilmiştir (Kimura 1980). Morfolojik olarak tanısı yapılmış olan akar türlerine ait örneklerin filogenetik analiz sonucunda, GenBank'taki benzer akar türleri ile aynı gruplarda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.11). Çalışma sonuçları, COI gen bölgesinin bireylerin tür teşhislerinde oldukça yararlı bilgiler sağladığını göstermiştir.

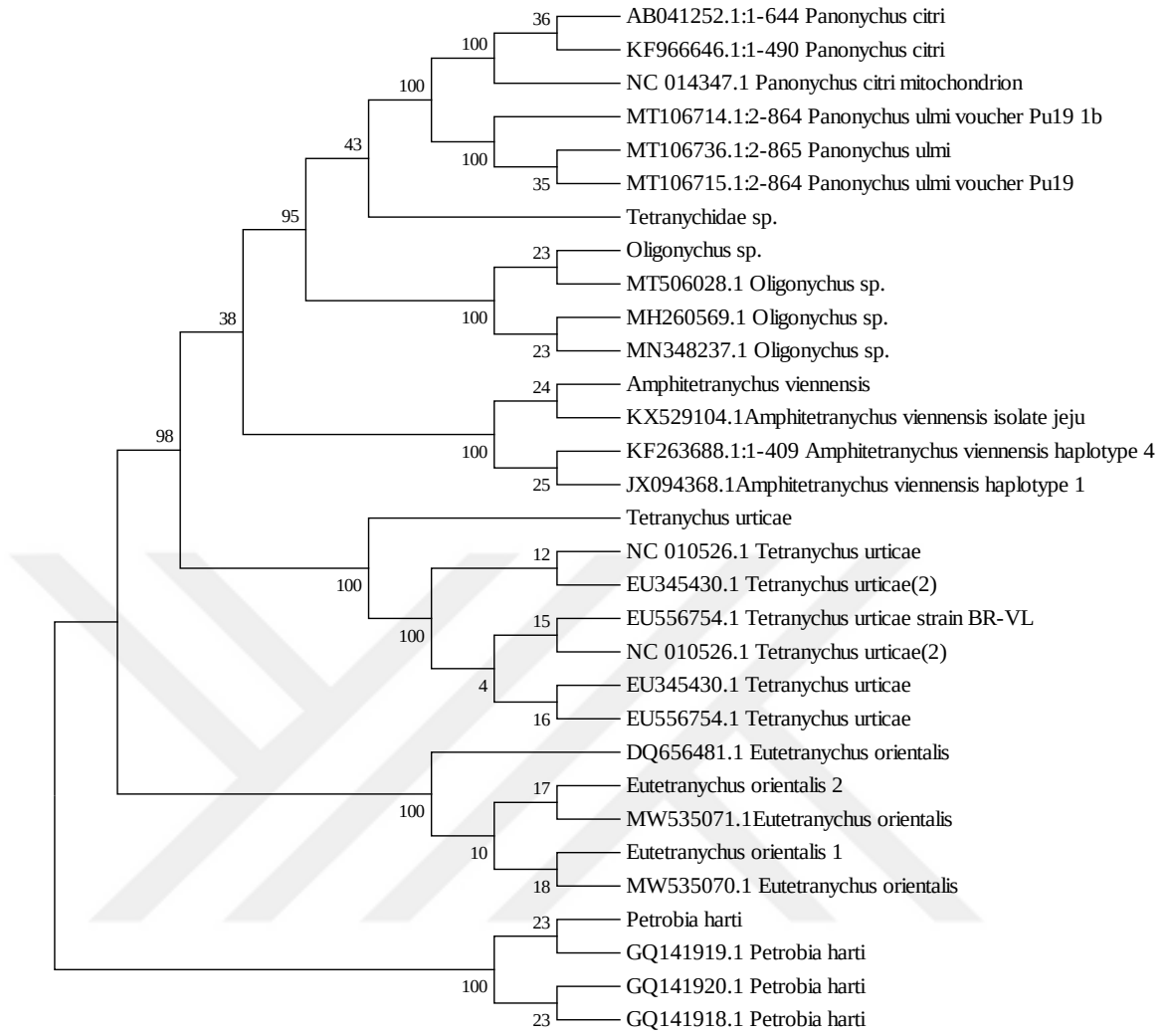
Çalışmada elde edilen *Tetranychus urticae* ile GenBank'tan elde edilen NC0110526.1, EU345430.1, EU556754.1, NC010526.1, EU345430.1 ve EU556754.1 *Tetranychus urticae* aynı grupta yer almış ve benzerlik oranı %100 olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında elde edilen *E. orientalis* türüne ait 1 ve 2 nolu örnekler ile GenBank'tan elde edilen DQ656481.1, MW535071.1 ve MW535070.1 *Eutetranychus orientalis* aynı grupta yer almış ve benzerlik oranı %100 olarak belirlenmiştir.

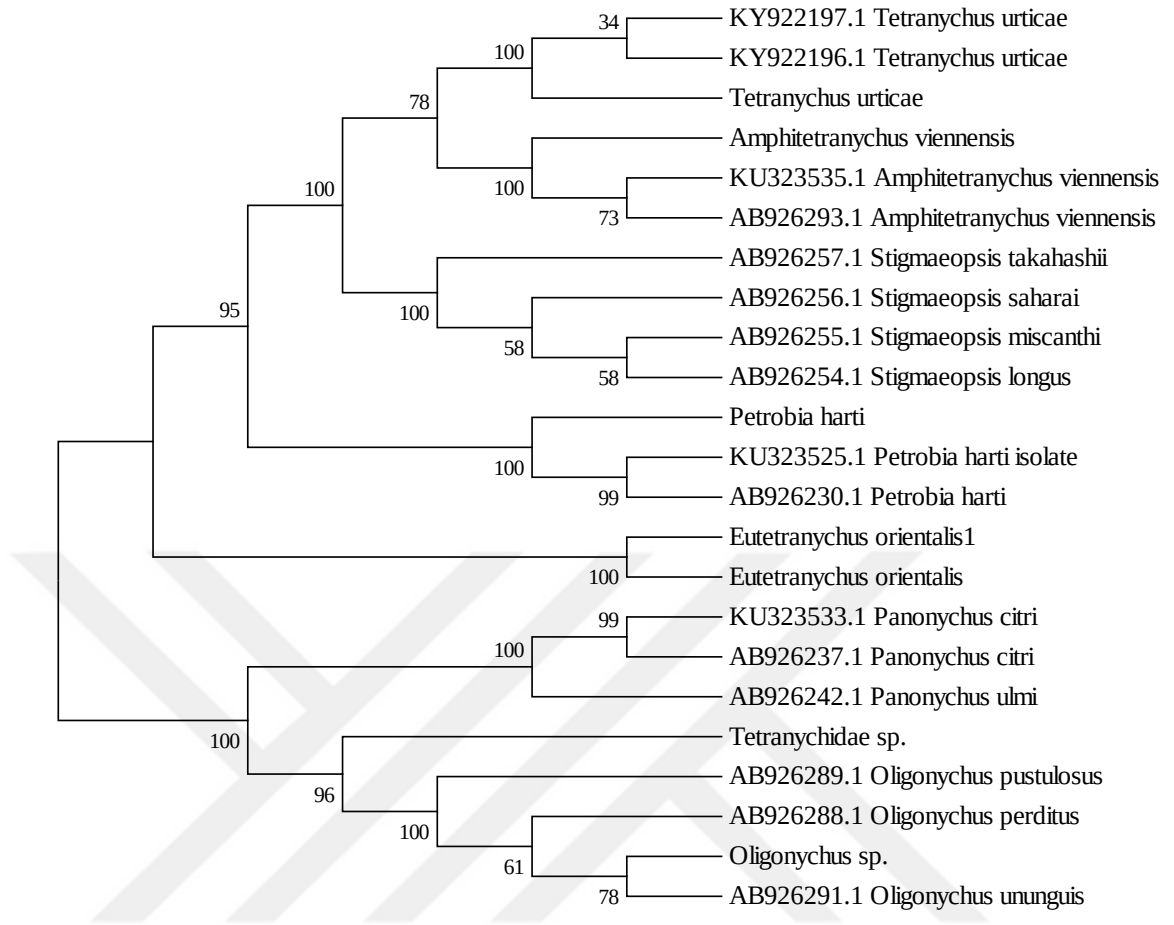
Çalışmada elde edilen *P. harti* ile GenBank'tan elde edilen GQ141919.1, GQ141920.1 ve GQ141918.1 *P. harti* aynı grupta yer almış ve benzerlik oranı %100 olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında elde edilen *Oligonychus* sp. türüne ait *Oligonychus* sp. ile GenBank'tan elde edilen MT506028.1, MH260569.1 ve MN348237.1 *Oligonychus* sp. aynı grupta yer almış ve benzerlik oranı %100 olarak belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen *Amphitettranychus viennensis* türüne ait *Amphitettranychus viennensis* ile GenBank'tan elde edilen KX529104.01, KF263688.1:1-409 ve JX094368.1 *Amphitettranychus viennensis* aynı grupta yer almış ve benzerlik oranı %100 olarak belirlenmiştir.

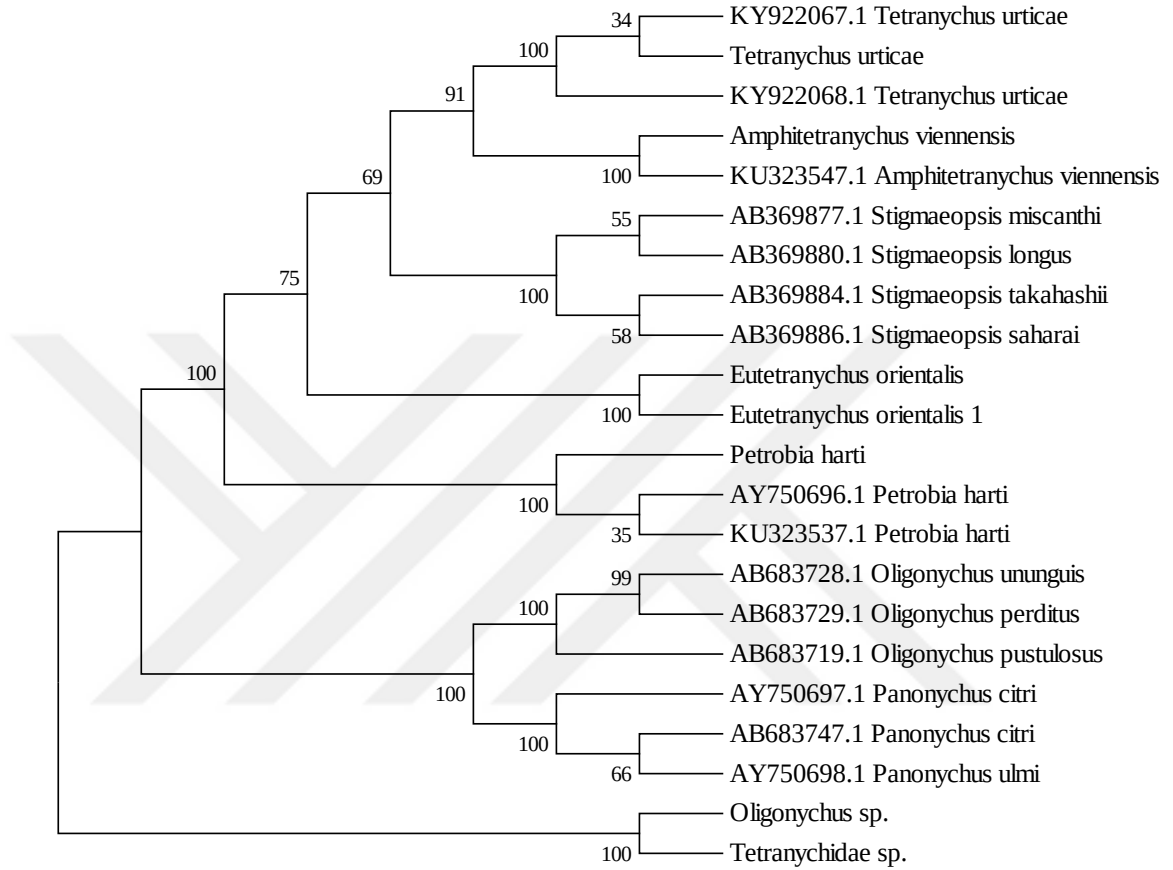


Şekil 4.11. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin COI gen bölgesinin Kimura 2-parameter Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı



Şekil 4.12. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin 18S gen bölgesinin Kimura 2-parameter Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı

Çalışmada Tetranychidae familyasına ait farklı türlerin 18S ve 28S gen bölgeleri ile GenBank'tan elde edilen benzer türler aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.12; Şekil 4.13). Her bir tür filogenetik dendogramlarda GenBank'tan alınan türler ile %100 benzerlik oranı göstermiştir. Çalışma sonuçları, ITS ve COI gen bölgelerinin bireylerin tür teşhislerinde oldukça yararlı bilgiler sağladığını göstermiştir.



Şekil 4.13. Tetranychidae familyasındaki farklı türlerin 28S gen bölgesinin Kimura 2-parameter Maximum Likelihood modeli temel alınarak çizilen filogenetik dendrogramı

Günümüzde akarların karakterizasyonunda morfolojik tanımlamanın yanında moleküler tanımlama çalışmalarına da ihtiyaç duyulmaktadır. Hurtado vd (2008), tarla örneklerinde farklı Tetranychidae türlerinin bir karışımından oluştuğundan, *T. urticae* popülasyon karakterizasyonunda gerekli ilk adımın moleküler tekniklere dayalı tür ayrım kriterlerinin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında, *T. urticae*, *Tetranychus turkestani*, *Tetranychus evansi*, *Tetranychus ludeni* ve *Panonychus citri*'nin karakterizasyonunda (ITS) 1 ve 2'nin ve intergenik 5.8S nükleer rDNA fragmanının nükleotid varyasyonu belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda bu türler için ITS2 bölgelerinin, ITS1'den çok daha fazla korunduğunu bulmuşlardır. Aynı ekolojik bölgeden elde edilen *T. urticae* örnekleri arasında gözlemlenen ITS2 dizisinin yüksek homojenliği, bu DNA dizisini tür ayrımı için mükemmel bir araç olduğunu ve çalışmalarda verimli bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Moleküler çalışmalarda genel tanı bölgelerinden olan ITS ve COI gen bölgeleri dünyada yaygın olarak akar türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Lee vd. 1999;

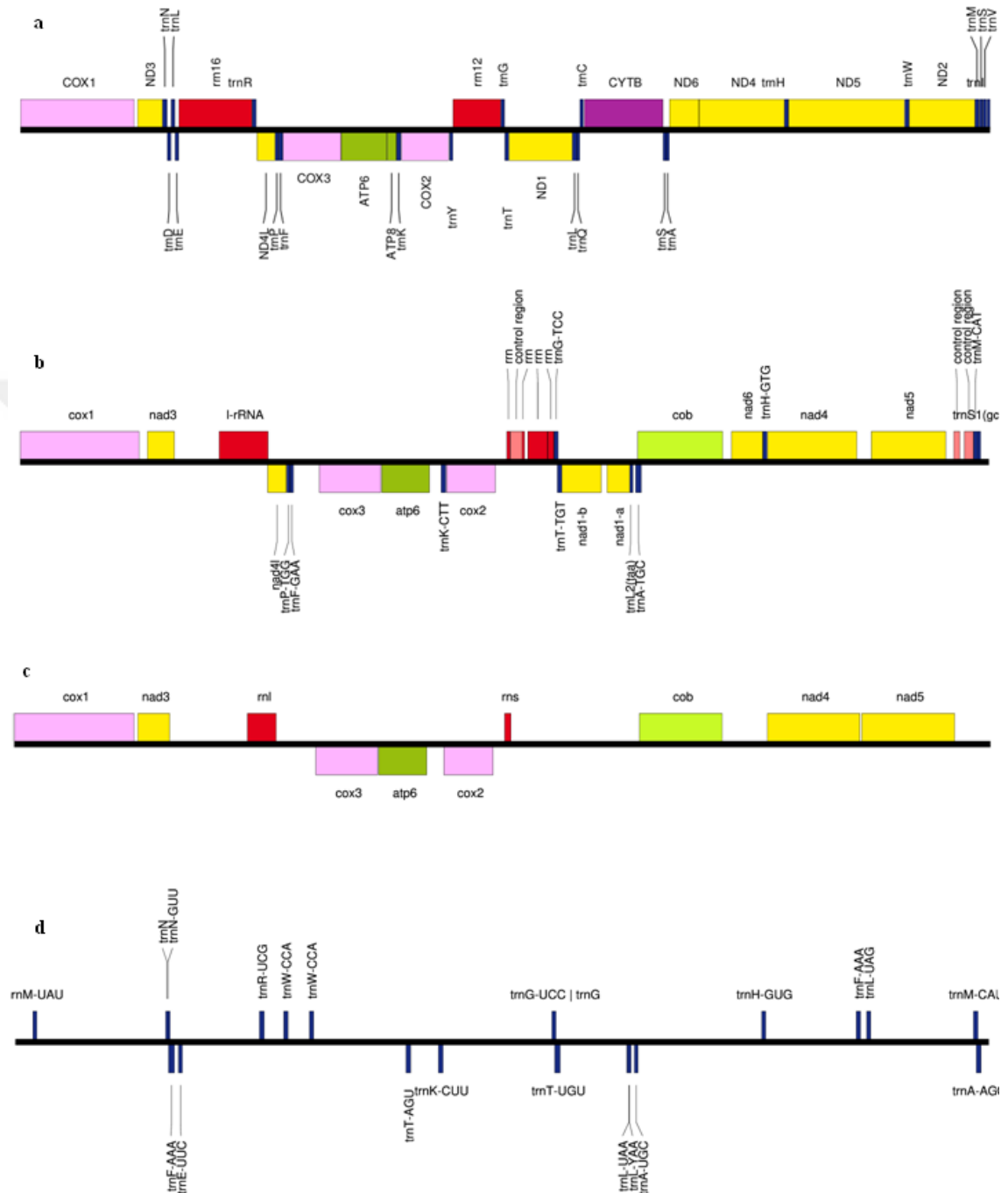
Navajas ve Fenton 2000; Osakabe vd. 2002; Ben-David vd. 2007; Hurtado vd. 2008; Katsura ve Tatsuya 2009; Li vd. 2010; Matsuda vd. 2012; Matsuda vd. 2013; Matsuda vd. 2014). Bu nedenle bu çalışmada da elde edilen akarların moleküler tanımlanmasında ITS ve COI gen bölgeleri kullanılmıştır.

Matsuda vd. (2012), *Oligonychus* cinsinin morfolojik olarak benzer türler içerdiğini aedeagusun eğrilik yönüne göre morfolojik olarak ayırt edilmesinin zor olduğunu türleri ayırmada moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında *Oligonychus* türlerini tanımlamak için DNA tabanlı yöntemler geliştirmek ve aralarındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için, mitokondriyal DNA'nın sitokrom c oksidaz alt birim I genini ve 17 tür için nükleer ribozomal RNA geninin ITS ve 28S bölgelerini incelemişlerdir. Bu çalışma ile benzer şekilde akarlarda COI gen bölgesinin türleri tanımlamada kullanılabileceği görülmüştür.

Matsuda vd. (2014), Tetranychidae türlerinin teşhisinin morfolojik olarak yapılmasının zor olduğunu bildirerek, tür çeşitliliğini belirlemede ITS ve COI gen bölgelerini kullanarak türlerinin taksonomisini belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar morfolojiye dayalı tür ve akrabalık ayrımlarının yanıltıcı olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle Tetranychinae'nin tanısal morfolojik karakterlerinin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini bildirerek türleri ayırmada kullanılan ITS ve COI gen bölgelerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde ITS ve COI gen bölgeleri türleri ayırmada etkili bir şekilde kullanılmıştır.

4.4. Tez Kapsamında Elde Edilen Türlerin Genom Anotasyonu

4.4.1. *Petrobia harti* mitokondriyal genom anotasyonu



Şekil 4.14. *Petrobia harti* tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

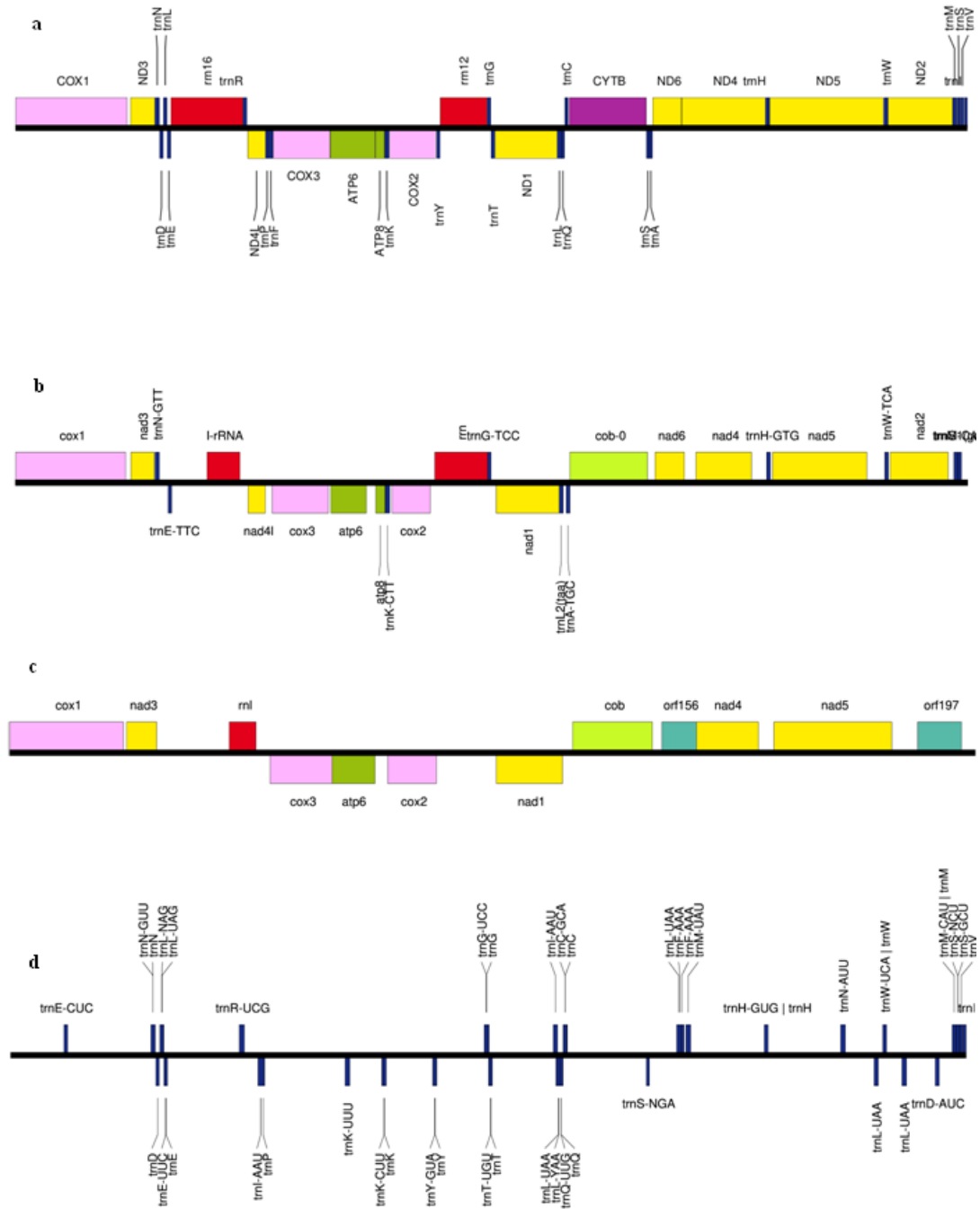
Petrobia harti türüne ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 12553 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere, 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. *P. harti* bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında Şekil 4.14 b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.14 c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.14 d’de verilmiştir. MITOS kullanılarak toplam 11 adet protein kodlayan gen, 10 adet tRNA gen bölgesi, 2 adet rRNA gen bölgesi ve 3 kodlama yapmayan kontrol bölgesi (Şekil 4.14 b), MFannot kullanılarak 9 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi (Şekil 4.14 c), GeSeq kullanılarak 20 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.14 d) bulunmuştur. Genlerin mitokondriyal genom sıralanışı diğer Tetranychidae familyasındaki türlerle aynı bulunmuştur (Ek 1).

Mevcut gen bankasında bulunan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *Tetranychus urticae*’nin mitokondriyal genom anotasyonu incelenmiş ve elde edilen nd2 ve atp8 geni (Şekil 4.14 a), *P. harti* anotasyonunda da tahmin edilememiştir. Bunun da nedeninin, o bölgeye ait dizilimin elde edilen 12553 bç mitokondriyal assembly içerisinde de yer almaması olduğu düşünülmektedir.

4.4.2. *Amphitetranynchus viennensis* mitokondriyal genom anotasyonu

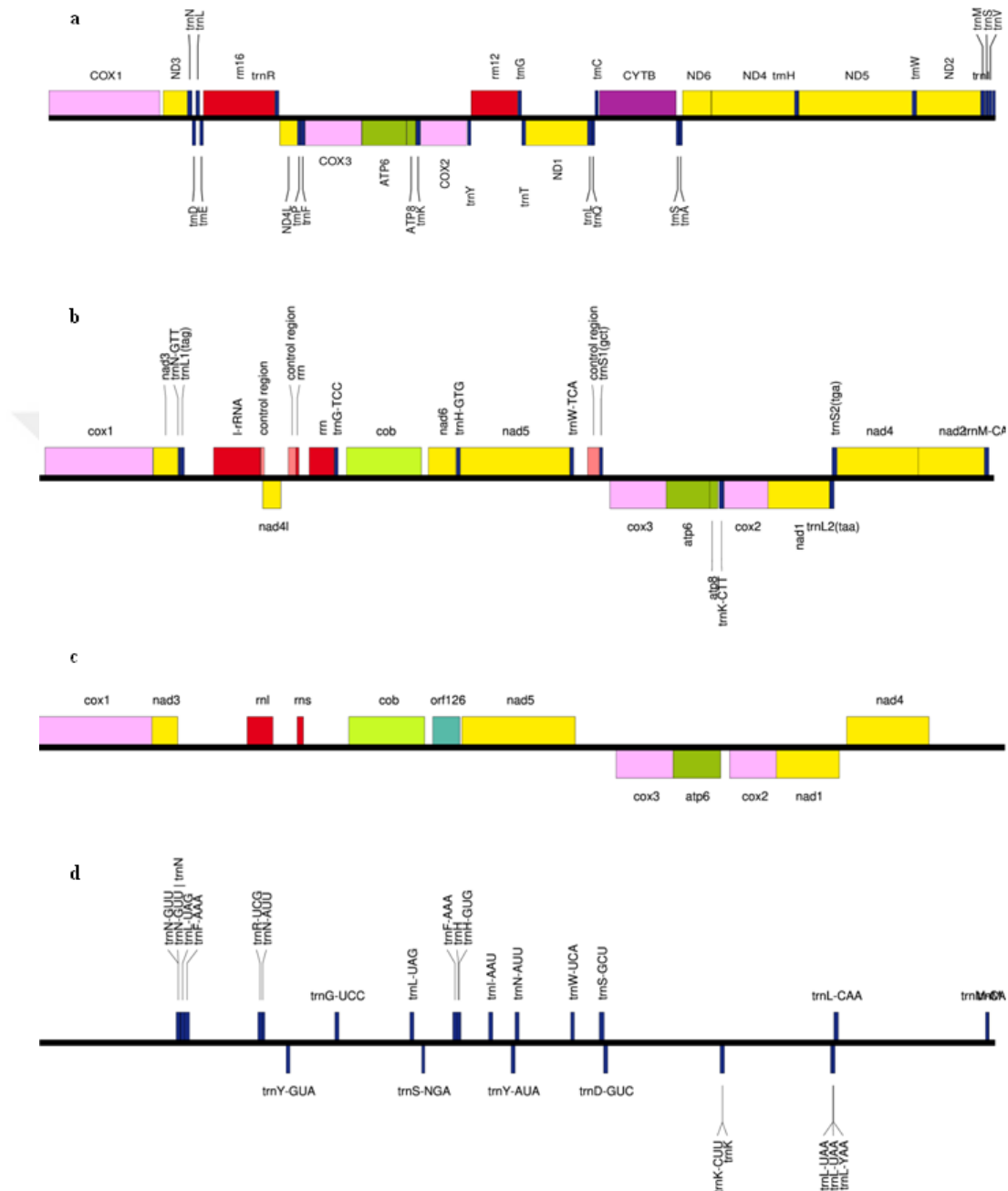
Antalya Korkuteli’nde konukçu bitki *Prunus cerasus*’tan toplanan *Amphitetranynchus viennensis* türüne ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 13020 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. *A. viennensis* tüm mitokondriyal genom içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında Şekil 4.15 b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.15 c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.15 d’de verilmiştir. MITOS kullanılarak toplam 13 adet protein kodlayan gen, 10 adet tRNA gen bölgesi, 2 adet rRNA gen bölgesi (Şekil 4.15 b), MFannot kullanılarak 11 adet protein kodlayan gen ve 1 adet rRNA gen bölgesi (Şekil 4.15 c), GeSeq kullanılarak 30 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.15 d) tahmin edilmiştir. Protein kodlayan genlerin düzeni diğer Tetranychidae familyasındaki türlerle benzerdir (Ek 1).

Mevcut gen bankasında bulunan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *Tetranychus urticae*’nin mitokondriyal genomu anotasyon incelenmiş, elde edilen tüm protein kodlayan genler (Şekil 4.15 a), *A. viennensis* anotasyonundada yer aldığı ve oluşan mitokondriyal genomun tam olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.15. *Amphitetranychus viennensis* tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

4.4.3. *Eutetranychus orientalis* mitokondriyal genom anotasyonu



Şekil 4.16. *Eutetranychus orientalis* tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışımı gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

Antalya Konyaaltı'ndan konukçu bitki *Citrus sinensis*'ten toplanan *Eutetranychus orientalis* türüne ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 13103 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere, 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. *E. orientalis* bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında Şekil 4.16 b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.16 c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.12 d'de verilmiştir. MITOS kullanılarak toplam 13 adet protein kodlayan gen, 9 adet tRNA gen bölgesi, 2 adet rRNA gen bölgesi ve 3 kodlama yapmayan kontrol bölgesi (Şekil 4.16 b), MFannot kullanılarak 10 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi (Şekil 4.16 c) elde edilmiştir. GeSeq kullanılarak 22 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.16 d) tahmin edilmiştir. Genlerin düzeni diğer araştırmacıların mevcut gen bankasına girmiş oldukları Tetranychidae familyasındaki türlerin gen sıralamasından farklı olduğu görülmüştür (Ek 1).

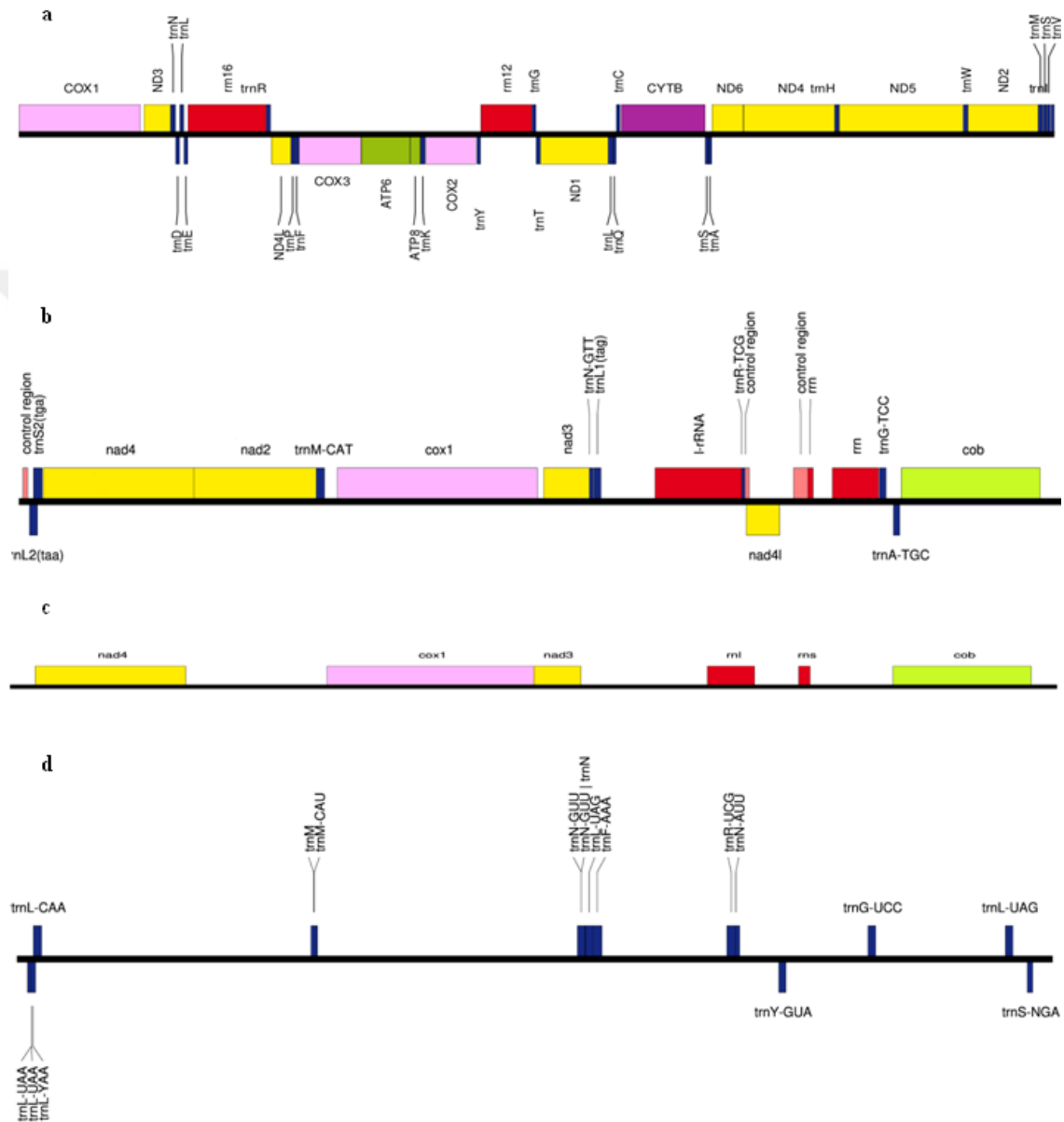
Mevcut gen bankasında bulunan tüm Tetranychidae familyasına ait türlerin protein kodlayan gen sıralanışları tamamıyla aynıdır, bu türlerden biri olan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *Tetranychus urticae*'nin mitokondriyal genomu anotasyonu incelenmiş, tüm genler (Şekil 4.16 a), *E. orientalis* anotasyonunda da var olduğu görülmüştür. Ancak, genlerin mitokondri üzerindeki sıralanışı, diğer Tetranychidae familyası türlerinin diziliminden farklıdır. Cox1, Nad3, Nad4l ve Nad2 geni aynı sıralanışa sahip, cob, nad6, nad5, cox3, atp6, atp8, cox2, nad1 ve nad4 genlerinin sıralanış düzeni değişmiştir. Tez çalışması kapsamında bu farklı gen sıralanışı Tetranychidae familyasında ilk kez bulunmuştur.

Antalya Konyaaltı'nda konukçu bitki *Melia azedarach* üzerinden toplanan *E. orientalis* türüne ait mitokondriyal assembly sonrası üç parça olarak elde edilen 8000 bç, 1468 bç ve 1021 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla tüm dizilimler ayrı ayrı MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere 3 farklı anotasyonon programına tabi tutulmuştur. *Eutetranychus orientalis* bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında 8000 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.17 b, 1468 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.18 a, 1021 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.19 a; MFannot programı kullanıldığında 8000 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.17 c, 1468 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.18 b, 1021 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.19 b; GeSeq programı kullanıldığında 8000 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.17 d, 1468 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.18 c, 1021 bç dizilim bilgisi için Şekil 4.19 c'de verilmiştir.

8000 bç dizilim bilgisi için MITOS kullanılarak toplam 6 adet protein kodlayan gen, 8 adet tRNA gen bölgesi, 3 adet rRNA gen bölgesi ve 3 kodlama yapmayan kontrol bölgesi (Şekil 4.17 b), MFannot kullanılarak 10 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi (Şekil 4.17 c), GeSeq kullanılarak 15 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.17 d) tahmin edilmiştir. 1468 bç dizilim bilgisi için MITOS kullanılarak toplam 3 adet protein kodlayan gen, 1 adet tRNA gen bölgesi ve 1 kodlama yapmayan kontrol bölgesi (Şekil 4.18 a), MFannot kullanılarak 2 adet protein kodlayan gen bölgesi (Şekil 4.18 b), GeSeq kullanılarak 1 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.18 c) tahmin edilmiştir. 1021 bç dizilim bilgisi için ayrı ayrı hem MITOS, hem de MFannot kullanılarak sadece Nad5 geni, GeSeq kullanılarak 3 adet tRNA gen bölgesi (Şekil 4.19 c) tahmin edilmiştir.

Gen düzeni bakımından mevcut gen bankasında bulunan diğer Tetranychidae familyasında türleri ile kıyaslandığında, Antalya Konyaaltı'nda konukçu bitki *Citrus sinensis*'ten toplanan örnekteki gözlenen farklılık bu örnekte de tespit edilmiştir.

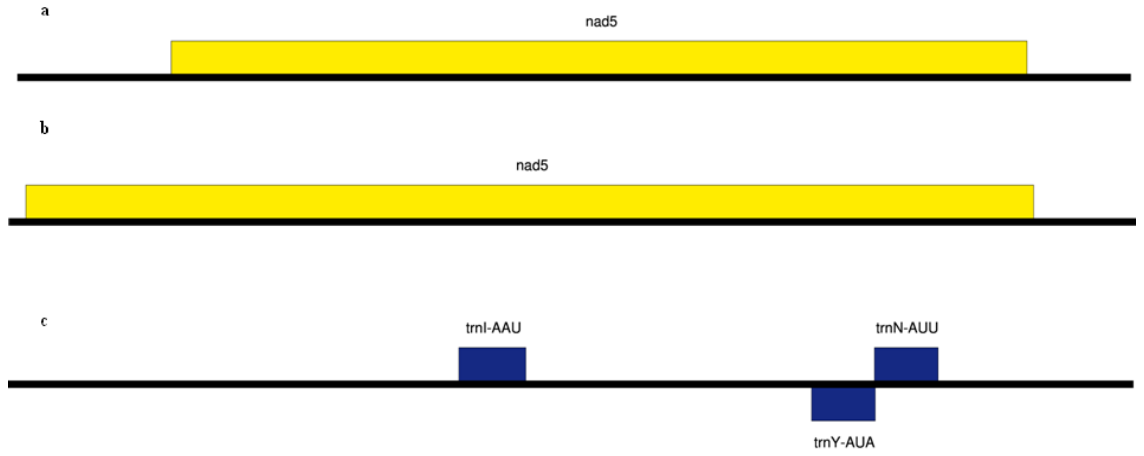
Sonuç olarak, Antalya Konyaaltı'nda iki farklı konukçu bitkiden (*Citrus sinensis* ve *Melia azedarach*) toplanan örnekteki genom anotasyonu birbiriyle tutarlı bulunmuş ve gen düzeni farklılığı doğrulanmıştır.



Şekil 4.17. *Eutetranychus orientalis* tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışımı gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

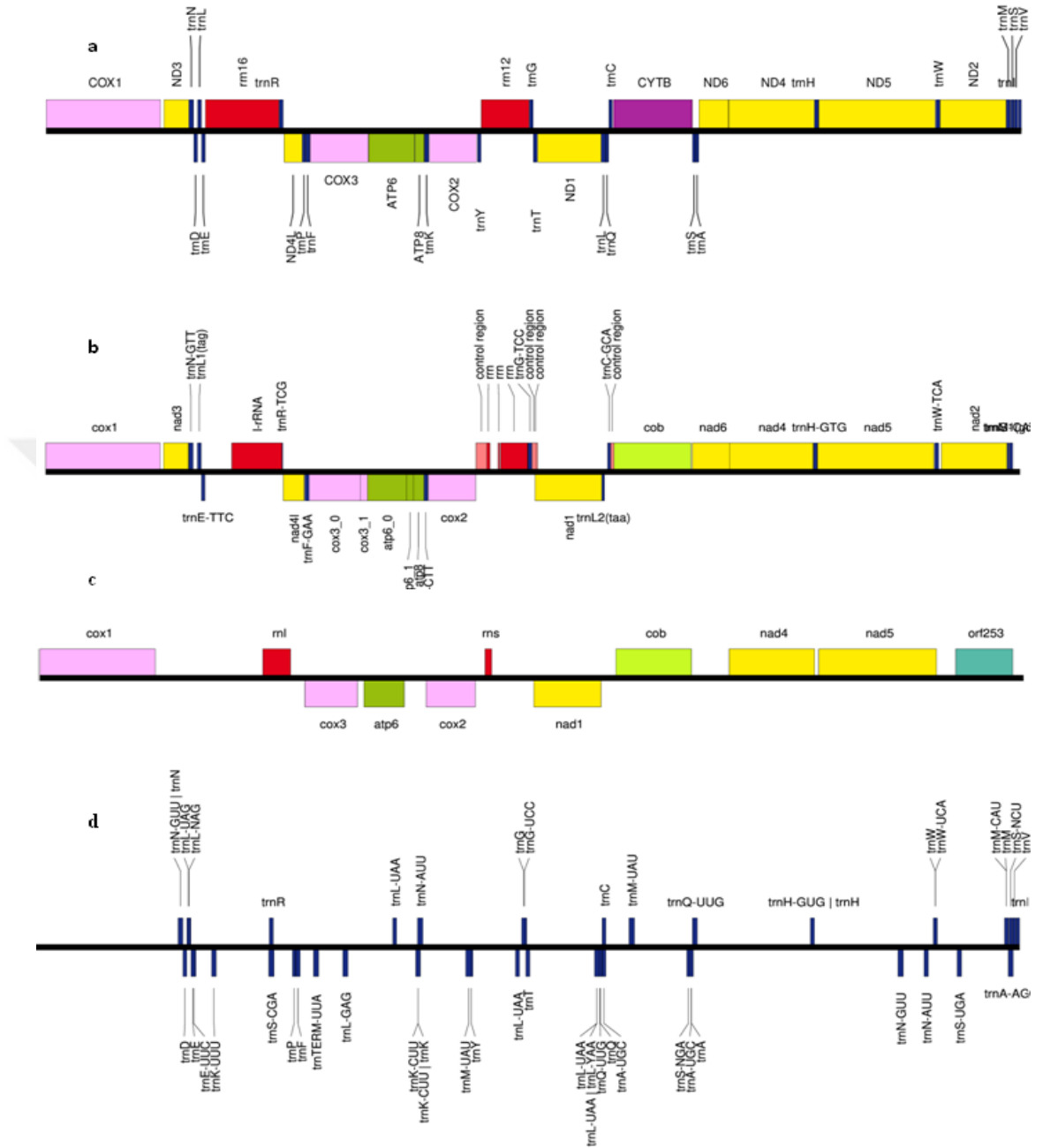


Şekil 4.18. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **a)** MITOS programı ile tahmin edilen; **b)** MFannot programı ile tahmin edilen; **c)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri



Şekil 4.19. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **a)** MITOS programı ile tahmin edilen; **b)** MFannot programı ile tahmin edilen; **c)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

4.4.4. *Tetranychus urticae* mitokondriyal genom anotasyonu



Şekil 4.20. *Tetranychus urticae* tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

Antalya Konyaaltı'nda konukçu bitki *Brugmansia aurea*'dan toplanan *T. urticae* türüne ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 13088 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi

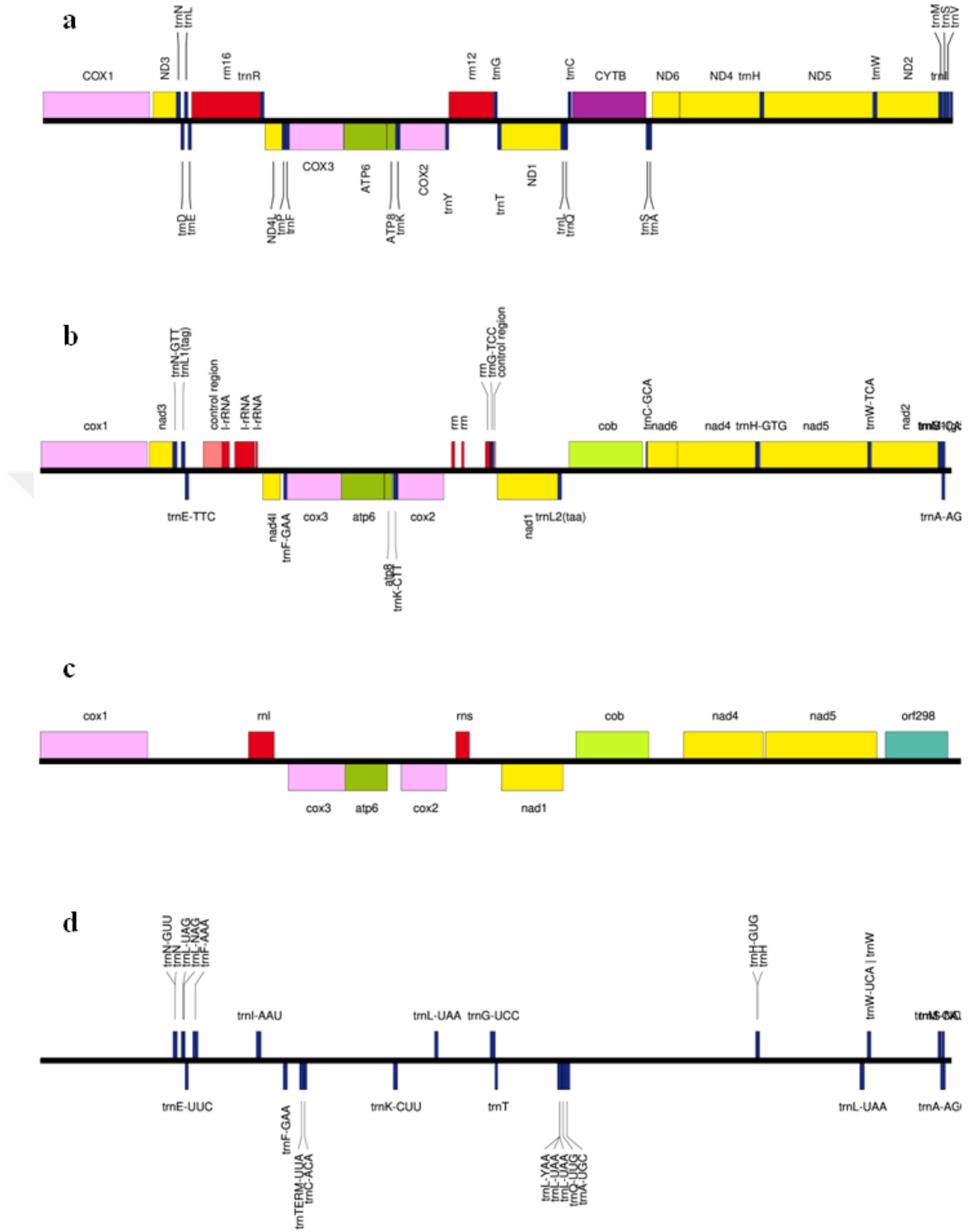
amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. *T. urticae* (13088 bç) bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında Şekil 4.20 b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.20 c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.20 d’de verilmiştir. Şekil 4.20 b incelendiğinde MITOS kullanılarak toplam 13 adet protein kodlayan gen, 12 adet tRNA gen bölgesi, 4 adet rRNA gen bölgesi ve 3 kodlama yapmayan kontrol bölgesi, Şekil 4.20 c incelendiğinde MFannot kullanılarak 9 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi, Şekil 4.20 d incelendiğinde GeSeq kullanılarak 30 adet tRNA gen bölgesi bulunmuştur. Genlerin düzeni diğer Tetranychidae familyasındaki türlerle benzerlik göstermektedir (Ek 1).

Mevcut gen bankasında bulunan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *T. urticae*’nin mitokondriyal genom anotasyonu incelenmiş ve tüm genlerin hepsi aynı düzende tez kapsamında yapılan *T. urticae* anotasyonunda da elde edilmiştir.

4.4.5. *Oligonychus* sp. mitokondriyal genom anotasyonu

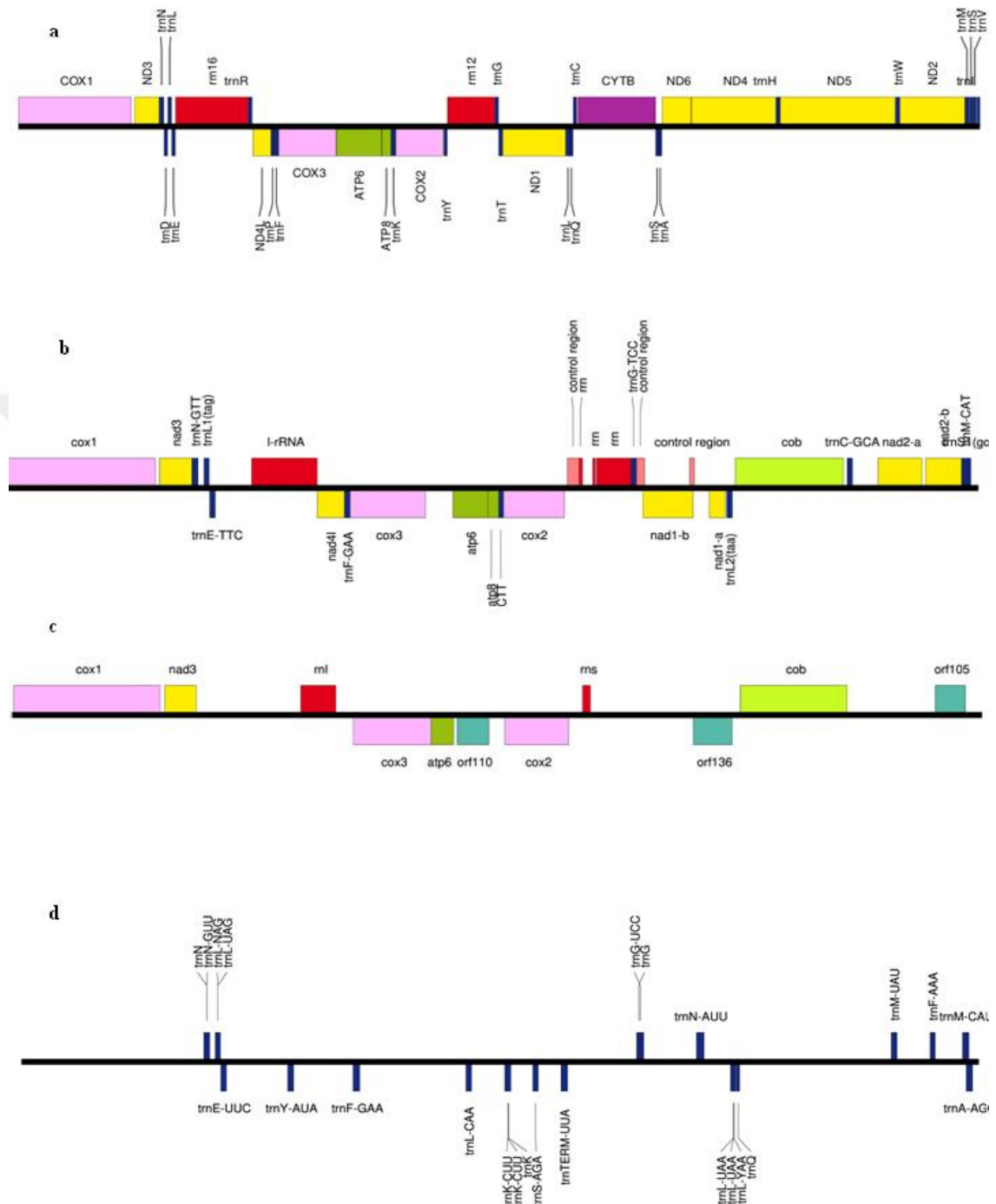
Antalya Konyaaltı’nda konukçu bitki *Juniperus* sp.’den toplanan *Oligonychus* sp.’ye ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 13183 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere, 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. *Oligonychus* sp. bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında, Şekil 4.21b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.21c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.21d’de verilmiştir. Şekil 4.21b incelendiğinde MITOS kullanılarak toplam 13 adet protein kodlayan gen, 11 adet tRNA gen bölgesi, 6 adet rRNA gen bölgesi ve 2 kodlama yapmayan kontrol bölgesi, Şekil 4.21c incelendiğinde MFannot kullanılarak 9 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi, Şekil 4.21d incelendiğinde, GeSeq kullanılarak 20 adet tRNA gen bölgesi bulunmuştur.

Mevcut gen bankasında bulunan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *T. urticae*’nin mitokondriyal genom anotasyonu incelenmiş ve tüm genlerin hepsi aynı düzende tez kapsamında yapılan *Oligonychus* sp. anotasyonunda da elde edilmiştir. Genlerin düzeni diğer Tetranychidae familyasındaki türlerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.21. *Oligonychus* sp. tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışını gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

4.4.6. Tetranychidae sp. mitokondriyal genom anotasyonu



Şekil 4.22. Tetranychidae sp. tüm mitokondriyal genomunun anotasyonu. **a)** Tetranychidae familyasındaki bireylere ait tüm mitokondriyal genomunun gen bankası verilerine göre protein kodlayan genlerin ve tRNA bölgelerinin genel sıralanışımı gösteren fiziksel harita. Mevcut çalışmada elde edilen dizilimin; **b)** MITOS programı ile tahmin edilen; **c)** MFannot programı ile tahmin edilen; **d)** GeSeq programı ile tahmin edilen protein kodlayan gen ve tRNA bölgeleri

Antalya Konyaaltı'nda konukçu bitki *Juniperus* sp.'den toplanan Tetranychidae sp.'ye ait mitokondriyal assembly sonrası elde edilen 10163 bç dizilim bilgisi mitokondriyal genomunun sahip olduğu genler ve bölgelerin yerlerinin belirlenmesi amacıyla MITOS, MFannot ve GeSeq olmak üzere, 3 farklı anotasyon programına tabi tutulmuştur. Tetranychidae sp. bütün mitokondriyal genom gen içeriğini ve düzenini gösteren bilgiler MITOS programı kullanıldığında Şekil 4.22 b, MFannot programı kullanıldığında Şekil 4.22 c, GeSeq programı kullanıldığında Şekil 4.22 d'de verilmiştir. Şekil 4.22 b incelendiğinde MITOS kullanılarak toplam 11 adet protein kodlayan gen, 9 adet tRNA gen bölgesi, 4 adet rRNA gen bölgesi ve 3 kodlama yapmayan kontrol bölgesi, Şekil 4.22 c incelendiğinde MFannot kullanılarak 9 adet protein kodlayan gen ve 2 adet rRNA gen bölgesi, Şekil 4.22 d incelendiğinde, GeSeq kullanılarak 18 adet tRNA gen bölgesi bulunmuştur.

Mevcut gen bankasında bulunan (accession number NC_010526.1) 13103 bç *Tetranychus urticae*'nin mitokondriyal genom anotasyonu incelenmiş ve bu anotasyonda tahmin edilen nad4 ve nad6 genleri tez kapsamında yapılan Tetranychidae sp. anotasyonunda da elde edilememiştir. Bunun da nedeninin o gen bölgelerinden yeterince assembly elde edilememesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Nad4 ve Nad6 geninin dışındaki geri kalan 11 genin sıralanışı diğer Tetranychidae familyasındaki türlerle benzerlik göstermektedir (Ek 1).

Chen vd. (2014), *T. urticae*'nin yeşil ve kırmızı formları, *T. kanzawai*, *T. ludeni*, *T. malaysiensis*, *T. phaseolus*, *T. pueraricola* mitokondriyal genomlarını sekanslayıp, karşılaştırmışlar ve yedi mitokondriyal genomunda, yaklaşık 13.000 bç kodlayan tipik dairesel moleküller olduğunu ve bunların genellikle metazoanlarda bulunan 37 genin tam setinden oluştuğunu belirtmişlerdir. Mitokondriyal (mt) genlerin sırası/düzeninin *P. citri* ve *P. ulmi*'nin mt genomları ile aynı, ancak diğer Acari'dekinden çok farklı olduğunu bulmuşlardır. Chen vd. (2014), *Tetranychus truncatus* Ehara türünün mitokondriyal genomunu sekanlamışlar, 13089 bç kodlayan tipik dairesel moleküller olduğunu ve mt genlerinin sırasının aynı tetranychidae familyası içinde olan *T. urticae*, *P. citri* ve *P. ulmi*'de olduğu gibi korunduğunu bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da tüm mitokondriyal genomun büyüklüğü ve mitokondriyal (mt) genlerin sırası/düzeni (*E. orientalis* türü hariç) tez kapsamında bulunan sonuçlar ile aynı bulunmuştur. Tez kapsamında elde edilen türlerin tüm mitokondriyal DNA sekans bilgileri ekli dijital dosyada verilmiştir.

4.5. Tez Kapsamında Elde Edilen Türlerin Tüm Ribozomal DNA Gen Bölgesi

Çalışmada elde edilen akar türlerinin Ribozomal DNA gen bölgesine ait sekans bilgileri, başlangıç, bitiş kodonları ile elde edilen ürünlerin uzunlukları Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Tez kapsamında elde edilen türlerin tüm ribozomal DNA sekans bilgileri ekli dijital dosyada verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmada elde edilen akar türlerinin Ribozomal DNA gen bölgesine ait sekans bilgileri.

Gen Bölgesi	Tür	Başlangıç	Bitiş	Uzunluk
18S	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	793	2973	2180 bç
	<i>Eutetranychus orientalis</i>	2052	4223	2171 bç
	<i>Oligonychus</i> sp.	3824	5981	2157 bç
	<i>Petrobia harti</i>	894	3066	2172 bç
	<i>Tetranychus urticae</i>	1092	3124	2033 bç
	<i>Tetranychidae</i> sp.	1364	3531	2167 bç
ITS1	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	2974	3405	431 bç
	<i>Eutetranychus orientalis</i>	4224	4752	528 bç
	<i>Oligonychus</i> sp.	5982	6543	561 bç
	<i>Petrobia harti</i>	3067	3516	449 bç
	<i>Tetranychus urticae</i>	3125	3611	486 bç
	<i>Tetranychidae</i> sp.	3532	4128	596 bç
5.8S	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	3406	3560	154 bç
	<i>Eutetranychus orientalis</i>	4753	4907	154 bç
	<i>Oligonychus</i> sp.	6544	6697	153 bç
	<i>Petrobia harti</i>	3517	3670	153 bç
	<i>Tetranychus urticae</i>	3612	3766	154 bç
	<i>Tetranychidae</i> sp.	4129	4283	154 bç
ITS2	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	3561	4004	443 bç
	<i>Eutetranychus orientalis</i>	4908	5449	541 bç
	<i>Oligonychus</i> sp.	6698	7220	522 bç
	<i>Petrobia harti</i>	3671	4040	369 bç
	<i>Tetranychus urticae</i>	3767	4242	475 bç
	<i>Tetranychidae</i> sp.	4284	4756	472 bç
28S	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	4005	8171	4166 bç
	<i>Eutetranychus orientalis</i>	5450	9591	4141 bç
	<i>Oligonychus</i> sp.	7221	10177	2956 bç
	<i>Petrobia harti</i>	4041	8343	4302 bç
	<i>Tetranychus urticae</i>	4243	8345	4102 bç
	<i>Tetranychidae</i> sp.	4757	7651	2894 bç

4.6. Endosimbiontların Tespiti

Arazi çalışmalarında farklı lokasyonlardaki farklı konukçu bitkilerden toplanarak laboratuvara getirilen yeni nesil dizileme ve tüm genom amplifikasyon metodu kullanılarak farklı akar türlerinde tanısı yapılan endosimbiontlara ait bilgiler

(tespit edilen endosimbiyont türleri, contig sayıları, endosimbiyont contig sayıları ve endosimbiyont içeren contig büyüklükleri) Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.4’de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 22, 23 ve 30 nolu örneklerde tüm genom amplifikasyon metodu kullanılırken, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29 numaralı örnekler için yeni nesil dizileme yöntemi kullanılmıştır. Tespit edilen endosimbiyont türlerine ait contig bilgileri her örneğe ait dijital dosyalar örnek numaralarındaki sırayla Ek’te verilmiştir.

Cardinium, yoncadan toplanan *P. harti* ile hem tesbih ağacı hem de portakaldan toplanan *E. orientalis* türünde tespit edilmiştir. Konyaaltı’nda ardıç bitkisinden toplanan *Oligonychus* sp.’de herhangi bir endosimbiyont bulunmamıştır. *A. viennensis* türünde *Wolbachia* tespit edilmiştir. İstanbul’da domatesten toplanan *T. urticae* türünde, hem *Wolbachia* ve hem de *Spiroplasma* varlığı bulunmuştur. Şanlıurfa’da pamuktan, Antalya’da melek borozanından, İstanbul’da kabaktan ve Antalya’da pamuktan toplanan *T. urticae* örneklerinde, elde edilen tüm contigler ile endosimbiyont contig eşleşmesi olmadığından dolayı, herhangi bir endosimbiyont varlığı bulunmamıştır.

Yapılan bu çalışmada, 30 örnekten 15’inde (%50) *Wolbachia*, 4’ünde *Cardinium*, 1’inde *Spiroplasma* ve 1’inde *Arsenophonus* simbiyontları bulunmuştur. 9 örnekte herhangi bir simbiyont tespit edilmemiştir. Bulunan sonuçlar daha önceki çalışmalar ile benzerlik göstermiştir (Zhang vd. 2013; Schausberger 2018; Zele vd. 2018; Zhu vd. 2019; Pina vd. 2020; Zhu vd. 2020a, b).

Zhang vd. (2013), *Wolbachia* enfeksiyon durumunu doğrulamak için multilocus dizi tiplemeyi kullanarak ve beş farklı *Tetranychus* türünde (*Tetranychus truncatus*, *Tetranychus urticae*, *Tetranychus pueraricola*, *Tetranychus phasericola*, *Tetranychus phasechus*) *Wolbachia* enfeksiyon durumu ile konak filogenisi, mitokondriyal çeşitlilik ve coğrafi aralık arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çin’de yaptıkları çalışmada, 21 popülasyondan beş farklı *Tetranychus* türü içinde *Wolbachia*’nın prevalansının %31.4 ile %100 arasında değiştiğini ve filogenetik açıdan dikkate değer ölçüde farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında, aynı *Tetranychus* türleri çok farklı suşları barındırabildiği gibi, aynı *Wolbachia*’nın bazen farklı akar türlerini de enfekte edebildiğini bildirmişlerdir. Bu gözlemler, *Wolbachia*’nın hem dikey hem de yatay olarak aktarıldığını ve bu nedenle bu çalışmada da olduğu gibi çok yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir.

Zele vd. (2018), bakteriyel endosimbiyontların, akarların evrimsel ekolojisinde önemli olduğunu, fakat endosimbiyontların dağılımı, yaygınlığı ve çeşitliliğinin hala büyük ölçüde keşfedilmediğini bildirmişlerdir. Bu amaçla, Güney-Batı Avrupa’nın otçul örümcek akarlarında en yaygın bakteriyel üreme manipülatörlerinin neden olduğu enfeksiyonları araştırmışlardır. Bu çalışma sonuçlarına da benzer şekilde üç *Tetranychus* türüne ait 16 popülasyon arasında, %61 oranla en yaygın endosimbiyont *Wolbachia* bulunmuştur. *Wolbachia*’yı %12-15 oranla *Cardinium* izlerken, sadece birkaç birey (%0.9-3) *Rickettsia* ile enfekte olmuştur. Çalışmalarında, *Arsenophonus* ve *Spiroplasma* tespit edilmemiştir. Bu endosimbiyontlar *T. evansi* ve *T. ludeni* de ilk kez rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmalarında, *Wolbachia* wsp ve *Rickettsia* gtlA genlerinde herhangi bir farklılık olmadığını, ancak *Cardinium* 16S rRNA’nın, üç akar türünün popülasyonları arasında ve içinde bir miktar farklılık olduğunu bildirmişlerdir.

Pina vd. (2020), İspanya’da turunçgil bahçelerinde görölen *Aplonobia histricina* (Berlese), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *E. orientalis*, *Panonychus citri* (McGregor), *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard, *Tetranychus turkestani* Ugarov and Nikolskii ve *T. urticae* akar türlerinin ve *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* ve *Wolbachia* endosimbiyantlarının görölme sıklığını araştırmışlardır. Çalışmalarında, bu çalışma ile benzer şekilde en yaygın bulunan akar türü *T. urticae* olmuştur. Fakat PCR çalışmalarında, endosimbiyonlardan sadece *Wolbachia* tespit etmişlerdir. Filogenetik analizde 16S rDNA, *ftsZ* ve *wsp* gen dizilerini kullanmışlar ve tespit edilen tüm *Wolbachia*’nın üst grup B’ye ait olduğunu bildirmişlerdir.



Çizelge 4.3. Çalışmada farklı konukçu bitkilerden toplanarak yeni nesil dizileme yöntemi ve tüm genom amplifikasyon metodu kullanılarak tanımlanan akar ve endosimbiyontlar

Örnek no	Toplanan lokasyon	Konukçu bitki	Kullanılan Yöntem *	Tür Adı	Endosimbiyont	Tüm Contig Sayısı	Endosimbiyont Contig Sayısı	Endosimbiyont İçeren Contig büyüklükleri
1	Antalya/ Kepez	Gerbera	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	8632	12	216-257 bp
2	Isparta	Kabak	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	1102	6	217-555 bp
3	Izmir	Pancar	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	1209	9	213-934 bp
4	Şırnak	Fasulye	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	1404	1	1278 bp
5	Çorum	Hıyar	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	5998	12	207-290 bp
6	Adana	Pamuk	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	4179	30	212-562 bp
7	Şanlıurfa	Pamuk	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Bulunamadı	7181	0	0
8	İstanbul	Domates	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia, Spiroplasma	2341	2	211-553 bp
9	Şırnak	Balkabağı	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Sodalis	1094	1	954 bp
10	Kahramanmaraş	Fasulye	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	3672	15	211-620 bp
11	Trabzon	Fasulye	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	529	2	283-427 bp
12	Burdur	Patlıcan	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	324	7	237-1032 bp
13	Denizli	Hıyar	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	367	2	1265-3522 bp
14	Antalya/ Korkuteli	Vişne	WGA	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	Wolbachia	3827	85	214-2558 bp
15	Antalya/ Korkuteli	Vişne	NGS	<i>Amphitetranychus viennensis</i>	Wolbachia	160462	283	208-26245 bp
16	Antalya/ Konyaaltı	Yonca	NGS	<i>Petrobia harti</i>	Cardinium	70671	9	689-4219 bp
17	Antalya/ Konyaaltı	Yonca	NGS	<i>Petrobia harti</i>	Cardinium	4449	1	4449 bp
18	Antalya/ Konyaaltı	Ardıç	NGS	<i>Oligonychus sp.</i>	Bulunamadı	71212	0	0
19	Antalya/ Konyaaltı	Ardıç	NGS	<i>Oligonychus sp.</i>	Bulunamadı	8212	0	0
20	Antalya/ Konyaaltı	Ardıç	NGS	<i>Tetranychidae sp.</i>	Bulunamadı	3084	0	0
21	Antalya/ Konyaaltı	Melek Borozanı	NGS	<i>Tetranychus urticae</i>	Bulunamadı	49137	0	0
22	Antalya/ Konyaaltı	Melek Borozanı	WGA	<i>Tetranychus urticae</i>	Bulunamadı	5674	0	0
23	Antalya/ Konyaaltı	Tesbih ağacı	WGA	<i>Eutetranychus orientalis</i>	Arsenophonus	2231	2	231-263 bp
24	İstanbul	Kabak	NGS	<i>Tetranychus urticae</i>	Bulunamadı	22650	0	0
25	Antalya/ Konyaaltı	Portakal	NGS	<i>Eutetranychus orientalis</i>	Cardinium	72048	5	214-381 bp
26	Tekirdağ	Fasulye	NGS	<i>Tetranychus urticae</i>	Wolbachia	95059	17	208-247 bp
27	Antalya/ Konyaaltı	Tesbih ağacı	NGS	<i>Eutetranychus orientalis</i>	Cardinium	102903	9	265-1174 bp
28	Antalya/ Aksu	Pamuk	NGS	<i>Tetranychus urticae</i> yeşil form	Wolbachia	126088	451	207-1246 bp
29	Antalya/ Konyaaltı	Ardıç	NGS	<i>Tetranychidae sp.</i>	Bulunamadı	152118	0	0
30	Antalya/ Aksu	Pamuk	WGA	<i>Tetranychus urticae</i> kırmızı form	Bulunamadı	65069	0	0

*WGA: tüm genom amplifikasyon metodu, NGS: yeni nesil dizileme metodu

4.7. *Tetranychus urticae* Türünde Genetik Polimorfizm

Tez çalışması kapsamında Melek Borazanı bitkisinden elde edilen *T. urticae* popülasyonundan oluşturulan yeni nesil dizileme kütüphanesi 150*2 uzunluğunda İllumina okumasına tabi tutularak yaklaşık 25 milyon DNA dizisi elde edilmiştir. Adaptör ve kalite temizliği sonrasında, yaklaşık 1,3 milyon DNA dizisi filtrelenerek, 23,7 milyon DNA dizisi kullanılmaya hazır hale getirilmiştir. Filtrelenen kütüphanede ilk yön okuma uzunluğu barkodların filtrelenmesi nedeniyle 139 bç, ikinci yön okuma ise 149 bç olarak gerçekleşmiştir. İki yön okuması için de ortalama GC oranı %33 olarak belirlenmiştir. Filtrelenen 23,7 milyon DNA dizisi “bowtie2” programında referans genom ile eşleşmeye (alignment) tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrasında, referans genom ile eşleşme oranı %87 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer, henüz rafine edilmemiş bir referans genoma ve ayrıca oldukça yüksek polimorfizm düzeyine sahip bir tür için, oldukça yüksek olup oluşturulan kütüphanenin kalitesini yansıtmaktadır. Bu rakamlar, ayrıca 90 milyon baz uzunluğundaki referans *T. urticae* genomunun her bir bazının ortalama 33 defa okunduğunu (33X coverage) ifade etmektedir. Bu değer, ortaya çıkarılacak polimorfik lokusların güvenilirliği açısından kritik olup ortalama 10-15X düzeyinde coverage değeri güven sınırı olarak kabul edilmektedir.

Eşleşme sonrası oluşturulan “bam” dosyası ve “freebayes” programı kullanılarak minimum 10X coverage değeri ile polimorfizm taraması yapılmıştır. Oluşan verilere ait özetler, Çizelge 4.5’de gösterilmektedir. Sonuçlara göre, 785391 adet SNP (tek nokta mutasyonu) 54283 adet MNP (birden fazla bazın eş zamanlı değişimi), 69193 adet insersiyon (mevcut genoma ekstra baz eklenmesi) ve 55219 adet delesyon (mevcut genomdan baz silinmesi) şeklinde polimorfizm tespit edilmiştir. Elde edilen tüm polimorfizm tiplerinde heterozigotluk oranı, yaklaşık %5-9 olarak bulunmuştur. Bu durum, analize tabi tutulan popülasyon içerisindeki bireylerde de popülasyon içi varyasyonun varlığını ifade etmektedir. Ayrıca, tespit edilen heterozigotluk oranının tüm polimorfizm tiplerinde de benzer oranda bulunması, oluşturulan veri setinin güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Sonuçlara göre, transition/transversion oranı 1,50 düzeyinde olup bu durum birçok canlı türünde elde edilen verilerle örtüşmektedir. Elde edilen 785391 adet SNP rakamı çok yüksek bir rakam olup ortalama her 100 baz referans genoma 0.87 adet SNP hesaplanmaktadır. Bu rakam, genel olarak birçok canlıda 1SNP/1000bç olarak kabul edilmektedir. Ancak, burada elde edilen yaklaşık 1SNP/100 bç rakamının yalnızca bir popülasyonun referans ile karşılaştırılmasından elde edilmiş olması, türün diğer örneklerinin karşılaştırılması durumunda çok daha yüksek oranda polimorfizmin var olabileceğine işaret etmektedir.

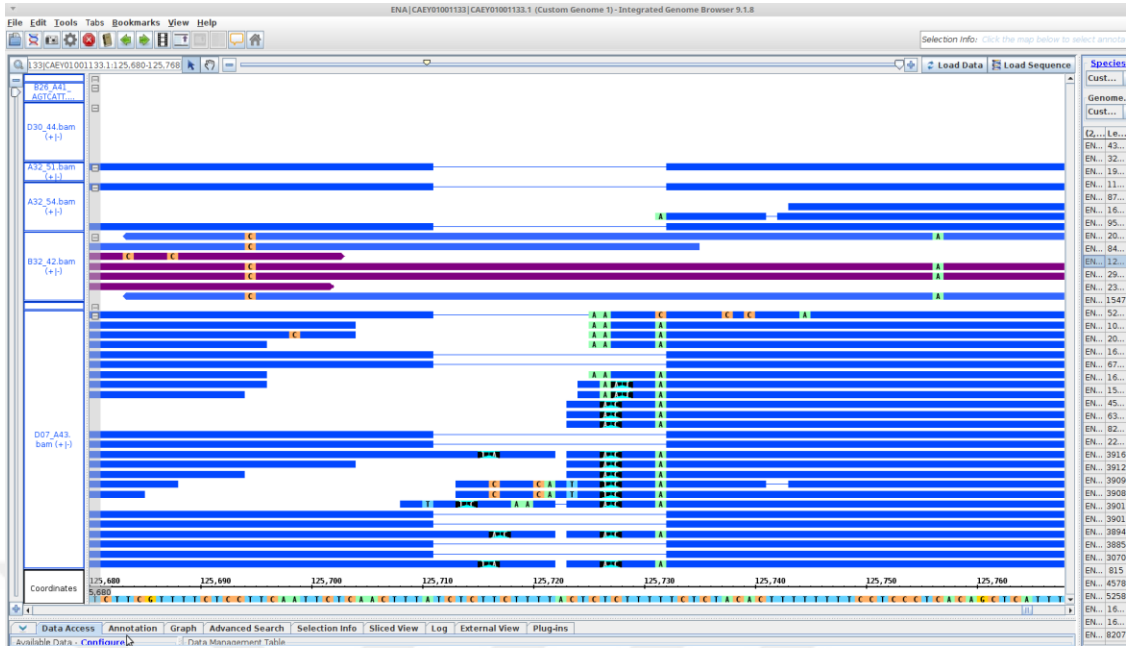
Çizelge 4.5. GenBankasında kayıtlı *Tetranychus urticae* genomu ve mevcut çalışmada Melek Borazanı bitkisinden toplanan *Tetranychus urticae* popülasyonundan elde edilen DNA dizilerinin 10X coverage değeri ile karşılaştırılması sonucunda ortaya konulan polimorfizm oranlarının dağılımı.

			Heterozigot/Homozigot	Oran
Toplam Polimorfizm	964086	Total Het/Hom	76601/887485	0.086
SNP	785391	SNP Het/Hom	64035/721356	0.089
MNP	54283	MNP Het/Hom	2801/51482	0.054
İnsersiyon	69193	İnsersiyon Het/Hom	5622/63571	0.09
Delesyon	55219	Delesyon Het/Hom	4143/51076	0.088
		İnsersiyon/Delesyon	69193/55219	1.25
		SNP Transition/Transversion	903883/602864	1.50

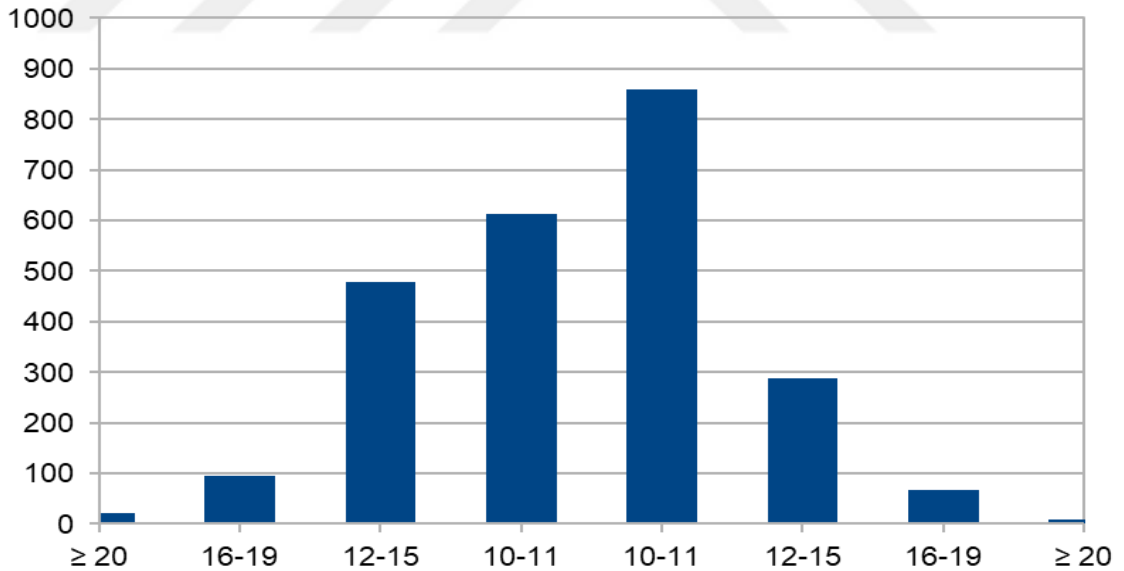
Mevcut çalışmada da görüldüğü üzere, küçük dokuya ve dolayısı ile sınırlı miktarda DNA izole edilebilen türlerde bireysel örnekler ile yeni nesil dizileme çalışması gerçekleştirmek oldukça zordur. Bu nedenle, mevcut veri seti derinlemesine analiz edilerek kısıtlı imkâna sahip laboratuarlarda kullanılabilecek polimorfik lokusların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, ilk aşamada belirlenen INDEL (İnsersiyon ve Delesyon) lokusları Excel dosyasında filtrelenerek referans genom ile minimum büyüklük farkı 10 bç olan ve potansiyel olarak agaroz jel elektroforez ile ayrıştırılabilecek genomik lokuslar ortaya konmuştur (Çizelge 4.6). Yapılan bu filtreleme çalışması ile toplam 124412 INDEL lokusundan 21 adet insersiyon ve 9 adet delesyon lokusunun referans genom 20 baz ve üzeri büyüklükte fark oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, 16-19 bç, aralığında büyüklük farkına sahip toplam 154 lokusun varlığı ortaya konulmuştur. Potansiyel olarak agaroz jel ile ayrıştırılabilecek lokusların genel frekans dağılımı Şekil 4.23’de verilmiş olup bu lokusların bir örneğine ait IGB Browser görüntüsü ise Şekil 4.24’de görülmektedir. Analiz sonucu elde edilen 2433 adet lokusun *T. urticae* genomunda dağılımı homojen olup scaffold düzeyindeki genomun birçok noktası bu lokuslarda temsil edilmektedir.

Çizelge 4.6. Gen bankasında kayıtlı *Tetranychus urticae* genomu ve mevcut çalışmada Melek Borazanı bitkisinden toplanan *Tetranychus urticae* popülasyonundan elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılması sonucunda 10 bç ve üzeri büyüklükte insersiyon ve delesyon içerdiği belirlenen lokus sayılarının büyüklük dağılımı

İnsersiyon	Lokus Sayısı	Delesyon	Lokus Sayısı
≥ 20bç	21	≥ 20bç	9
16-19bç	96	16-19bç	68
12-15bç	478	12-15bç	287
10-11bç	614	10-11bç	860
Toplam ≥ 10bç	1209	Toplam ≥ 10bç	1224



Şekil 4.23. *Tetranychus urticae* genomu CAEY01001133.1 contig bölümünün 125711 bç lokusunda yer alan ve Melek Borazanı bitkisi üzerinde elde edilen *T. urticae* DNA dizi karşılaştırması sonucu ortaya konulan 21 bç uzunluğunda (AT/ATCTCTTCTTTTACTCTCTTTT) delesyon bölgesi



Şekil 4.24. 10bç ve üstü INDEL markır büyüklüklerinin frekans dağılımı

Grbic vd. (2011), *T. urticae*'deki polimorfizmi incelemek ve gelecekteki genetik haritalama ve popülasyon genetiği çalışmaları için SNP'leri ve indelleri tanımlamak amacıyla, ikinci bir *T. urticae* popülasyonunu dizilemişlerdir. Montpellier ırkında, homozigot 151.763 SNP, heterozigot 250.186 SNP olmak üzere toplam 401.949 SNP bulmuşlardır. Aynı zamanda 1 ila 15 baz arasında değişen boyutlarda 67.957 delesyon

(sırasıyla 31.254 ve 36.703 homozigot ve heterozigot) ve 1 ila 6 baz uzunluğunda 72.694 insersiyon (sırasıyla 38.649 ve 34.045 homozigot ve heterozigot) tespit etmişlerdir. Elde edilen rakamsal veriler yapılan bu çalışma sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Rutin laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir diğer polimorfizm belirleme aracı mikrosatellit (SSR)'ler olup kırmızıörümcekler gibi küçük dokuya sahip organizmalarda SSR bölgerinin ve polimorfizm düzeylerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Mevcut veri setinde yapılan analizler ile referans genom ve çalışılan popülasyon arasında polimorfik olduğu tespit edilen toplam 9187 lokus bulunmuştur. Ortaya konulan polimorfik SSR lokuslarında en fazla polimorfizm gösterenler 5779 lokus ile 3bç tekrarı içerenler mikrosatellit bölgeleri olmuştur. Bunu takiben, 2979, 343 ve 86 adet lokus, sırasıyla 2bç, 4bç ve 5bç tekrara sahip mikrosatellit *T. urticae* genomunda polimorfik SSR bölgeleri olarak bulunmuştur. INDEL markırlarında olduğu gibi polimorfik SSR bölgelerinin dağılımı referans genomdaki birçok farklı scaffold bölgesinden gelmiş olup, tüm *T. urticae* genomunu temsil etmektedir.

Bu vd. (2015), *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867)'un nispeten düşük bir mikrosatellit yoğunluğuna sahip olduğunu, tipik olarak en bol bulunan mikrosatellit tipi olan dinükleotid tekrarlarının bile (696, %30.17), trinükleotidlerden (1583, %68.62) belirgin şekilde daha az sıklıkta olduğunu, etranükleotit, pentanükleotit ve bileşik SSR'ler, tüm SSR'lerin <%1'ini oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Grbic vd. (2011), *T. urticae* mikrosatellitlerinin belirgin bir profilinin olduğunu, mono-nükleotid tekrarlarının neredeyse yok ve normalde en bol bulunan mikrosatellit türü olan di-nükleotid tekrarlarının, tri-nükleotitlerden önemli ölçüde daha az bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce farklı araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermiştir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması ile Tetranychidae familyasına ait türlerin hem morfolojik hem de tüm genom amplifikasyonu ve yeni nesil dizileme gibi moleküler yöntemler kullanılarak teşhisi, endosibiyontların varlığı tespit edilmiştir. Klasik morfolojik teşhisin uzmanlık gerektirmesi, tanımlayıcı karakterlerin az sayıda olmasından dolayı akar teşhisi konusunda bir açığı kapatmak, teşhisi hem hızlandırmak hem de kolaylaştırmak amaçlanmıştır. Türkiye'nin farklı illerinden toplanılan *Tetranychus urticae* popülasyonlarında da genetik polimorfizm araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda, Tetranychidae familyasından, *Tetranychus urticae* (Koch, 1836), *Petrobia harti* (Ewing, 1909) türü, *Eutetranychus orientalis* (Klein, 1936), *Amphitetranychus viennensis* (Zacher, 1920), *Oligonychus* sp. ve Tetranychidae sp. türleri farklı konukçu bitkilerde tespit edilmiştir. *Tetranychus urticae*, örnek toplanılan her 3 ilde de bütün konukçu bitkilerde tespit edilmiştir. *Oligonychus* sp. türlerine Antalya İli Konyaaltı ilçesinden *Juniperus* sp, *Thuja* sp. bitkilerinde rastlanmıştır. *Eutetranychus orientalis* türü Antalya İli Konyaaltı ilçesinden *Citrus sinensis* ve *Melia azedarach* üzerinden örneklenmiştir. *Petrobia harti* Türkiye'de ilk kez Antalya İli Konyaaltı ilçesinden *Medicago sativa* üzerinde bulunmuştur. *Tetranychus urticae* popülasyonlarında *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Petrobia harti* popülasyonunda, *Amphitetranychus viennensis* bireylerinde *Cardinium* tespit edilmiştir. Ayrıca, tez kapsamında bulunan 6 türün yeni nesil dizileme ve farklı lokasyonlardan toplanan 18 tane *Tetranychus urticae* örneğinin mitokondriyal genomu çoğaltmak için tasarlanan spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle tüm mitokondriyal genom bilgileri elde edilmiş, *Eutetranychus orientalis* ve *Petrobia harti* türlerinin tüm mitokondriyal dizilim bilgisi ilk kez elde edilmiştir. Bunların dışında, tüm mitokondriyal genomu ortaya konan *Oligonychus* sp. ve bütüne yakını ortaya çıkarılan Tetranychidae sp. türlerine ait mitokondri dizilimleri de yeni kayıt niteliğindedir. Elde edilen bu türler dizilim bilgisi dikkate alınarak türe özgü spesifik primerler tasarlanarak PCR ile doğrulanmalıdır.

Tez çalışması kapsamında Melek Borazanı bitkisinden elde edilen *T. urticae* popülasyonundan yeni nesil dizileme yöntemi ile DNA dizileri elde edilerek, referans genom ile alignment yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen SNP bilgileri tartışılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Altunç, Y.E. ve Akyazı, R. 2020. Two new records for spider mite fauna of Turkey, *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Eotetranychus rubiphilus* Reck (Trombidiformes: Tetranychidae). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8 (8): 1598-1602.
- Anonymous, 2021. https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/spider_mites_australia/key/spider_mites_of_australia/Media/Html/entities/index.htm#O. [Son erişim tarihi: 20.07.2021].
- Arabuli, T., Negm, M. W., Matsuda, T., Kitashima, Y., Abramishvili, T., Akimov, I. A., Zhovnerchuk, O. V., Popov, S. Y. and Gotoh, T. 2019. Morphological identification of *Amphitetranychus* species (Acari: Tetranychidae) with crossbreeding, esterase zymograms and DNA barcode data. *PLOS One*, 14 (9): e0221951.
- Arimoto, M., Satoh, M., Uesugi, R. and Osakabe, M. 2013. PCR-RFLP analysis for identification of *Tetranychus* spider mite species (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 106: 661–668.
- Auger, P., Migeon, A. and Flechtman, C.H.W. 2003. A new species of *Eotetranychus* from France (Acari, Prostigmata: Tetranychidae). *Zootaxa*, 206 (1): 1-7.
- Baudry, E., Bartos, J., Emerson, K., Whitworth, T. and Werren, J.H. 2003. *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Molecular Ecology*, 12: 1843-1854.
- Beck, N. and Lang, B. 2010. MFannot, organelle genome annotation webserver. <http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl> [Erişim: 26.04.2021].
- Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U. and Morin, S. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 41 (3): 169–81.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., Pütz, J., Middendorf, M. And Stadler, P. F. 2013. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69 (2): 313-319.
- Birungi, J. and Munstermann, L.E. 2002. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of Entomology of Society America*, 95: 125-132.
- Blanco, L., Salas, M. 1984. Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 5325–5329.
- Bolanos, L. M., Servin-Garciduenas, L. E., Martinez-Romero, E. 2015. Arthropod–*Spiroplasma* relationship in the genomic era. *FEMS Microbiology Ecology*, 91 (2): 1–8.

- Boore, J.L. and Brown, W.M. 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current Opinion in Genetics Development*, 8: 668–674.
- Boore, J.L., Lavrov, D.V. and Brown, W.M. 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 392: 667–668.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27: 1767–1780.
- Boore, J.L. 2006. The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 439–446.
- Boore, J.L. and Fuerstenberg, S.I. 2008. Beyond linear sequence comparisons: the use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*, 363: 1445–1451.
- Brusca, R. C. and Brusca, G. J. 2003. Invertebrates. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Bu, C., Li, J., Wang, X.-Q., Shi, G., Peng, B., Han, J., Gao, P. and Younian, W. 2015. Transcriptome Analysis of the Carmine Spider Mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867) (Acari: Tetranychidae), and Its Response to β -Sitosterol. *BioMed Research International*, (7-8): 1–12.
- Carbonnelle, S., Hance, T., Migeon, A., Baret, P., Cros-Arteil, S. and Navajas, M. 2007. Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Experimental and Applied Acarology*, 41 (4): 225–241.
- Carew, M. E., Marshall, S. E. and Hoffmann, A. A. 2011. A combination of molecular and morphological approaches resolves species in the taxonomically difficult genus *Procladius* skuse (Diptera: Chironomidae) despite high intra-specific morphological variation. *Bulletin of Entomological Research*, 101 (5): 505–519.
- Chen D-S, Jin P-Y, Zhang K-J, Ding X-L, Yang S-X, et al. (2014). The complete mitochondrial genomes of six species of *Tetranychus* provide insights into the phylogeny and evolution of spider mites. *PLoS ONE*, 9 (10): e110625.
- Cheung, V. G. and Nelson, S. F. 1996. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14676–14679.
- Choi, C. W., Shim, J. K., Jung, D. O. and Lee, K. Y. 2018. Genetic variation of the hawthorn spider mite *Amphitetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae) in Korea. *Entomological Research*, 48 (3):165–173.
- Çobanoğlu, S., Erdoğan, T. ve Yeşilayer, A. 2014. Türkiye’de *Buxus sempervirens* L. (Buxaceae) ve *Cupressus macrocarpa* Hartw. (Cupressaceae) üzerinde yeni kayıt zararlı bir akar; *Eurytetranychus buxi* (Garman)(Acari: Tetranychidae). *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 4 (2): 97–105.

- Çobanoğlu, S., Ueckermann, E. A. and Kumral, N. A. 2015. A new *Tetranychus* Dufour (Acari: Tetranychidae) associated with Solanaceae from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 39 (4): 565-570.
- Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J. et al. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 5261–5266.
- Dean, M.D., Ballard, K.J., Glass, A. and Ballard, J.W.O. 2003. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics*, 165: 1959-1969.
- Dekeyser, M. A. 2005. Acaricide mode of action. *Pest Management Science*, 61: 103–110.
- de Mendonca, R. S., Navia, D., Diniz, I. R., Auger, P. and Navajas, M. 2011. A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Experimental and Applied Acarology*, 55: 1–23.
- Dermauw, W., Vanholme, B., Tirry, L. and Van Leeuwen, T. 2010. Mitochondrial genome analysis of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* and a revisit of the *Metaseiulus occidentalis* mitochondrial genome. *Genome*, 53: 285-301.
- de Rojas, M., Riazio, C., Callejon, R., Guevara, D. and Cutillas, C. 2011. Morphobiometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. *Parasitology Research*, 110 (1): 227–233.
- Dowton, M. and Austin, A.D. 1999. Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement ‘hot spot’ in the Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 298-309.
- Dowton, M., Castro, L.R. and Austin, A.D. 2002. Mitochondrial gene rearrangements as phylogenetic characters in the invertebrates: the examination of genome ‘morphology’. *Invertebrate Systematics*, 16: 345-356.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- Döker, İ. 2011. Çukurova Bölgesi’nde kullanılan bazı akarisitlere karşı turuncgil kırmızıörümceği *Panonychus citri* McGregor (Acari: Tetranychidae)’nin direnç düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 66 s.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J. and Hurst, G.D. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology*, 6: 27.
- Duron, O., Hurst, G.D. 2013. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. *BMC Biology*, 11 (1): 45.
- Düzgüneş, Z. 1952. Citrus mites in Turkey. *Bitki Koruma Bülteni*, 1: 6-11.

- Düzgüneş, Z. 1954. Orta Anadolu'da meyve ağaçlarına zarar veren Tetranychidae familyası türleri üzerinde sistematik ve biyolojik çalışmalar ve mücadele denemeleri. Ziraat Vekaleti Neşriyat ve Haberleşme Müdürlüğü, 706.
- Düzgüneş, Z. 1959. *Tetranychus tumidellus* "Yer-fıstığı akarı". *Bitki Koruma Bülteni* 1: 10–14.
- Düzgüneş, Z. 1961. Akdiken Akari. *Tetranychus viennensis* Zache. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 26: 389-396.
- Düzgüneş Z 1962. Pamuk akarları (kırmızı örümcekler). Türkiye Ziraatına Zararlı Olan Böcekler ve Mücadelesi, 6: 70–77.
- Düzgüneş, Z. 1963. Türkiyede Yeni Bulunan Akarlar. *Bitki Koruma Bülteni* (N. S.), 3: 237-246.
- Düzgüneş, Z. 1965. The variation in the peritreme of the genus *Eotetranychus* Oud.. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 7: 15-18.
- Düzgüneş, Z. 1980. Küçük arthropodaların toplanması, saklanması ve mikroskopik preparatlarının hazırlanması. T.C. Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zir. Müc. Ve Kar. Gn. Müd. Yay., Ankara, 77 s.
- Dyer, K.A. and Jaenike, J.J. 2004. Evolutionary stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics*, 168: 1443-1455.
- Ecevit, O. 1977. *Oligonychus coniferarum* (Mcgregor) Acarina: Tetranychidae) üzerinde morfolojik çalışmaları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(1).
- El Sheikha, A. F. 2019. Tracing insect pests: is there new potential in molecular techniques? *Insect Molecular Biology*, 28 (6): 759–772.
- Engelstadter, J. and Hurst, G. D. D. 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40: 127–149.
- Eyndhoven, G. L. V. and Vacante, V. 1985. The Berlese-Group of the genus *Bryobia* Koch (Acari, Tetranychidae). *Redia*, 68: 377-437.
- Frago, E., Mala, M., Weldegergis, B. T., Yang, C., McLean, A., Godfray, H .C. J., Gols, R. and Dicke, M. 2017. Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. *Nature Communications*, 8 (1): 1860.
- Grbic, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbic, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Cao Thi Ngoc, P., Ortego, F., Hernandez-Crespo, P., Diaz, I., Martinez, M., Navajas, M., Sucena, E., Magalhães, S., Nagy, L., Pace, R.M., Djuranovic, S., Smagghe, G., Iga, M., Christiaens, O., Veenstra, J.A., Ewer, J., Mancilla Villalobos, R., Hutter, J.L., Hudson, S.D., Velez, M., Yi, S.V., Zeng, J., Pires-daSilva, A., Roch, F., Cazaux, M., Navarro, M., Zhurov, V., Acevedo, G., Bjelica, A., Fawcett, J.A., Bonnet, E., Martens, C., Baele, G., Wissler, L., Sanchez-Rodriguez, A., Tirry, L., Blais, C., De-meestere, K., Henz, S.R., Gregory, T.R., Mathieu, J., Verdon, L., Farinelli, L., Schmutz, J., Lindquist, E.,

- Feyereisen, R. and Van de Peer, Y. 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479, 487–492.
- Gotoh, T., Noda, H. and Hong, X. Y. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity*, 91 (3): 208–216.
- Gotoh, T., Noda, H., Hong, X. Y. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity*, 91: 208–216.
- Gotoh, T., Noda, H. and Ito, S. 2007. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity*, 98 (1): 13–20.
- Gökçe, M. P., Karagöz, M., Faraji, F. and Çakmak, İ. 2020. Mite species composition and their population densities on chestnut trees in Turkey. *International Journal of Acarology*, 46 (4): 247-253.
- Guidolin, A. S., Cataldi, T. R., Labate, C. A., Francis, F. and Cônsoli, F. L. 2018. *Spiroplasma* affects host aphid proteomics feeding on two nutritional resources. *Scientific Reports*, 8 (1): 2466.
- Hatzinikolis, E. N. and Emmanouel, N. G. 1991. A revision of the genus *Bryobia* in Greece (Acari: Tetranychidae). *Entomologia Hellenica*, 9: 21-34.
- Hayashi, N., Sasama, Y., Takahashi, N. and Ikemi, N. 2013. Cyflumetofen, a novel acaricide-its mode of action and selectivity. *Pest Management Science*, 69: 1080–1084.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (41): 14812–14817.
- Heddi, A., Charles, H. and Khatchadourian, C. 2001. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: the ‘biological individual’ concept revisited. *Research in Microbiology*, 152: 431–437.
- Heyworth, E. R. and Ferrari, J. 2015. A facultative endosymbiont in aphids can provide diverse ecological benefits. *Journal of Evolutionary Biology Research*, 28 (10): 1753–1760.
- Hinomoto, N., Tran, D. P., Pham, A. T., Ngoc Le, T. B., Tajima, R., Ohashi, K., Osakabe, M. and Takafuji, A. 2007. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: A case study in northern Vietnam. *International Journal of Acarology*, 33 (1): 53–60.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X. Y. and Fukatsu, T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 769–774.
- Hoy, M. A. 2011. Agricultural acarology: introduction to integrated mite management. CRC Press, Boca Raton, 430 pp.
- Hurtado, M. A., Ansaloni, T., Sandrine, C. A., Jacas, J. A. and Navarro, M. N. 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider

- mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Annals of Applied Probability*, 153 (2):167-174.
- İkten C. and Şahin İ. 2016. Detection and genetic characterization of *Wolbachia* endosymbionts thru next generation sequencing of reduced Arthropod genomes. Turkey 6th Plant Protection Congress with International Participation, on the 5th and 8th September Konya, Turkey, Sayfa: ???.
- İnak, E. 2021. İç Anadolu Bölgesi'ndeki tetranychid akarların (Acari: Tetranychidae) DNA barkodlaması ve *Tetranychus urticae* popülasyonlarının bazı akarisitlere karşı direnç durumlarının belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 83 s.
- İnak, E., AlpKent, Y. N., Çobanoğlu, S., Dermauw, W. and Van Leeuwen, T. 2019. Resistance incidence and presence of resistance mutations in populations of *Tetranychus urticae* from vegetable crops in Turkey. *Experimental and Applied Acarology*, 78 (3): 343-360.
- Jahan, S. M. H., Rahman, M. A., Asaduzzaman, M., Bashar, H. M. K., Lee, K. Y. and Tin M. K. 2013. Morphological identification with molecular analysis of tea red spider mite *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acari: Tetranychidae) in Bangladesh. *Journal Of Eco-Friendly Agriculture*, 6 (6): 106-110.
- Jeppson, L. R., Keifer, H. H. and Baker, E. W. 1975. Mites injurious to economic plants. Univ of California Press, California, 614 pp.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M. A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplifications: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9: 393–340.
- Jiggins, F.M. 2003. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics*, 164: 5-12.
- Karasu, N., Doğan, S., Kuzucu, M. and Çankaya, M. 2018. Genetic variations based on RAPD-PCR in *Eustigmaeus erciyesiensis* (Acari: Stigmaeidae) populations inhabiting Erzincan (Turkey). *North-Western Journal Of Zoology*, 14: 122-126.
- Katsura, I. and Tatsuya, F. 2009. Molecular phylogeny of *Stigmaeopsis* spider mites (Acari: Tetranychidae) based on the Cytochrome Oxidase subunit I (COI) region of mitochondrial DNA. *Applied Entomology and Zoology*, 44(3): 343-355.
- Kazak, C., Döker, İ. and Karut, K. 2017. First record of invasive tomato spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in Turkey. *International Journal of Acarology*, 43 (4): 325-328.
- Keller, G.P., Windsor, D.M., Saucedo, J.M. and Werren, J.H. 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Molecular Ecology*, 13: 2405-2420.
- Khaing, T. M., Shim, J. K. and Lee, K. Y. 2015. Molecular identification of four *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae) in Korea, including new records of *P. caglei* and *P. mori*. *Entomological Research*, 45: 345–353.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16 (2): 111-120.
- Knapp, M., van Houten, Y., van Baal, E. and Groot, T. 2018. Use of predatory mites in commercial biocontrol: current status and future prospects. *Acarologia*, 58: 72-82.
- Konakandla, B., Park, Y., and Margolies, D. 2006. Whole genome amplification of Chelex-extracted DNA from a single mite: a method for studying genetics of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *Experimental and Applied Acarology*, 40 (3-4): 241-247.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6): 1547-1549.
- Lage, J. M., Leamon, J. H., Pejovic, T., Hamann, S., Lacey, M., Dillon, D., Segraves, R., Vossbrinck, B., Gonzalez, A., Pinkel, D. et al. 2003. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Resources*, 13: 294-307.
- Lan, Y., Feng, S., Xia, L., Li, Z., Cao, Y., Stejskal, V. and Wu, Y. 2020. The first complete mitochondrial genome of *Cheyletus malaccensis* (Acari: Cheyletidae): gene rearrangement. *Systematic and Applied Acarology*, 25 (8): 1433-1443.
- Lee, M.L., Suh, S.J. and Kwon, Y.J. 1999. Phylogeny and Diagnostic Markers of Six Tetranychus Species (Acarina: Tetranychidae) in Korea Based on the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2(2): 85-92.
- Li, G. Q., Xue, X. F., Zhang, K. J. and Hong, X. Y. 2010. Identification and molecular phylogeny of agriculturally important spider mites (Acari: Tetranychidae) based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on *Tetranychus*. *Zootaxa*, 2647: 1-15.
- Liu, G.H., Chen, F., Chen, Y.Z., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhou, D.H. and Zhu, X.Q. 2013. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. *International Journal of Biological Sciences*, 9(4):361-369.
- Liu, X. D. and Guo, H. F. 2019. Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. *Current Opinion in Insect Science*, 33: 84-90.
- Masta, S. E. 2010. Mitochondrial rRNA secondary structures and genome arrangements distinguish chelicerates: comparisons with a harvestman (Arachnida: Opiliones: *Phalangium opilio*). *Gene*, 449: 9-21.

- Mathé-Hubert, H., Kaech, H., Ganesanandamoorthy, P. and Vorburger, C. 2019. Evolutionary costs and benefits of infection with diverse strains of *Spiroplasma* in pea aphids. *Evolution*, 73 (7): 1466–1481.
- Matsuda, T., Fukumoto, C., Hinomoto, N. and Gotoh, T. 2013. DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 106 (1): 463-472.
- Matsuda, T., Hinomoto, N., Singh, R. N. and Gotoh, T. 2012. Molecular-based identification and phylogeny of *Oligonychus* species (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(3) :1043–1050.
- Matsuda, T., Kozaki, T., Ishii, K. and Gotoh, T. 2018. Phylogeny of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) inferred from RNA-Seq data. *PLOS One*, 13 (9): e0203136.
- Matsuda, T., Morishita, M., Hinomoto, N. and Gotoh, T. 2014. Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: *Tetranychidae*) based on the mitochondrial COI gene and the 18S and the 50 end of the 28S rRNA genes indicates that several genera are polyphyletic. *PLOS One*, 9 (10): e108672.
- Migeon, A. and Dorkeld, F. 2021. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Web sitesi: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>. [Erişim Tarihi: 30.05.2021].
- Ming-Long, Y., Dan-Dan, W., Bao-Jun, W., Dou, W. and Jin-Jun W. 2010. The complete mitochondrial genome of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae): high genome rearrangement and extremely truncated tRNAs. *Genomics*, 11: 597.
- Mirza, J. H., Kamran, M., Saleh, A. A. and Alatawi, F. J. 2020. Molecular and phenotypic variations in *Eutetranychus orientalis* (Klein) populations from Saudi Arabia. *PLOS One*, 15 (5): e0233389.
- Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S. and Gutierrez, J. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Experimental and Applied Acarology*, 15: 211–218.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H.R. and Mapangou-Divassa, S. 1994. Intraspecific diversity of the Cassava Green Mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Experimental & Applied Acarology*, 18: 351–360.
- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. and Boursot, P. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80: 742–752.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Williams, M. and Gotoh, T. 2011. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bulletin of Entomological Research*, 91(2):117-23.

- Nishamura, S., Hinomoto, N. and Takafuji, A. 2007. The genetic variations among populations of *Tetranychus kanzawai* complex (Acari: Tetranychidae) indicated by using mitochondrial, ribosomal, and microsatellite DNA markers. *Journal of The Acarological Society of Japan*, 16: 109-119.
- Oliver, K. M., Moran, N. A. and Hunter, M. S. 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 1273–1280.
- Osakabe, M., Hirose, T. and Masaru, S. 2002. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Applied Entomology and Zoology*, 37(3): 399-407.
- Osakabe, M., Kotsubo, Y., Tajima, R. and Hinomoto, N. 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 101: 1167–1175.
- Osakabe, M., Uesugi, R. and Goka, K. 2010. Evolutionary aspects of acaricide resistance development in spider mites. *Psyche A Journal of Entomology*, 2009: 1–11.
- Ovalle, T. M., Vásquez-Ordóñez, A. A., Jimenez, J. and Parsa, S., Cuellar, W. J. and Lopez-Lavalle, A. B. 2020. A simple PCR-based method for the rapid and accurate identification of spider mites (Tetranychidae) on cassava. *Scientific Reports*, 10: 1949.
- Ozman, S. K. and Cobanoglu, S. 2001. Current status of hazelnut mites in Turkey. *Acta Horticulturae*, 479-487.
- Önuçar, A. ve Ulu, O. 1988. Kestane ağaçlarında bulunan akar türleri hakkında kısa bilgiler. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 12 (1): 33-38.
- Perlman, S. J., Hunter, M. S. and Zchori-Fein, E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273 (1598): 2097–2106.
- Pina, T., Sabater-Muñoz, B., Cabedo-López, M., Cruz-Miralles, J., Jacas, J. and Hurtado, M. 2020. Molecular characterization of *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* and *Wolbachia* in mite species from citrus orchards. *Experimental and Applied Acarology*, 81: 335–355.
- Pritchard, A. E. and Baker, E. W. 1955. A revision of the spider mite family Tetranychidae. Pacific Coast Entomological Society, California, 472 pp.
- Rio, R. V., Wu, Y. N. and Aksoy, S. 2006. Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: tsetsefly and its microbial flora. *Home | Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 805–814.
- Roggia, S., Guedes, J.V.C., Kuss, R.C.R., Arnemann, J.A., Návia, D. 2008. Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, v.43, n.3, p.295-301.
- Ros, V. I. and Breeuwer, J. A. 2007. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography,

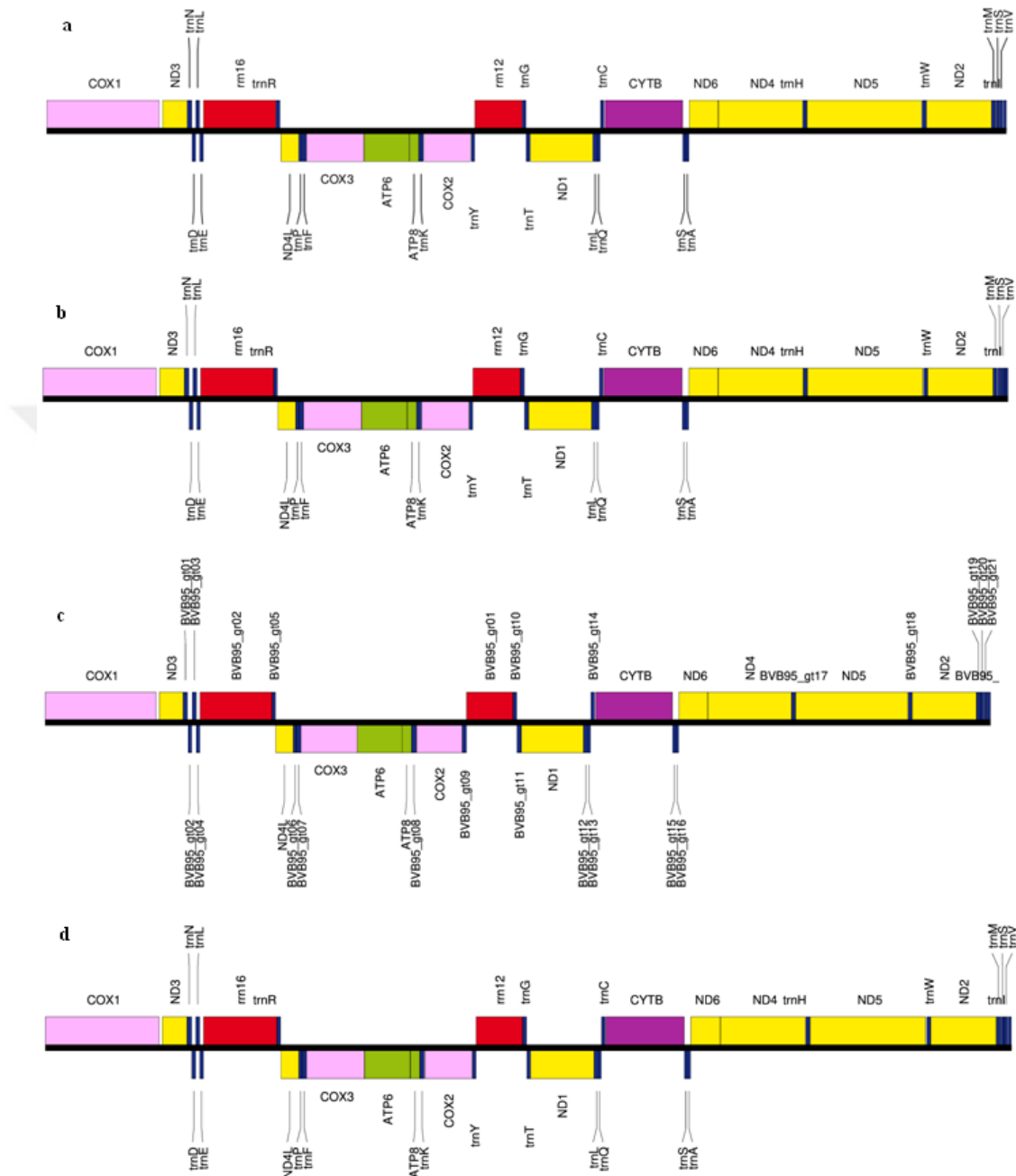
- reproductive parasites and barcoding. *Experimental and Applied Acarology*, 42: 239–262.
- Sakamoto, H., Matsuda, T., Suzuki, R., Saito, Y., Lin, J. Z., Zhang, Y. X., Sato, Y. and Gotoh, T. 2017. Molecular identification of seven species of the genus *Stigmaeopsis* (Acari: Tetranychidae) and preliminary attempts to establish their phylogenetic relationship. *Systematic and Applied Acarology*, 22 (1): 91- 101.
- Sakamoto, H., Suzuki, R., Nishizawa N., Matsuda, T. and Gotoh, T. 2018. Effects of *Wolbachia/Cardinium* infection on the mitochondrial phylogeny of *Oligonychus castaneae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 20 (10): 1–11.
- Salinas-Vargas, D., Santillán-Galicia, M. T., Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, A., Ortega-Arenas, L. D. and Mora-Aguilera, G. 2016. Analysis of genetic variation in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) populations from four species of *Citrus* host plants. *PLOS One*, 11 (10): e0164552.
- Scarborough, C. L., Ferrari, J. and Godfray, H.C. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310: 1781.
- Schausberger, P. 2018. Herbivore-associated bacteria as potential mediators and modifiers of induced plant defense against spider mites and thrips. *Frontiers in Plant Science*, 30 (9): 1107.
- Shoemaker, D.D., Dyer, K.A., Ahrens, M., McAbee, K. and Jaenike, J. 2004. Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of a *Wolbachia* endosymbiont infection. *Genetics*, 168: 2049-2058.
- Smith-Meyer, M.K.P. 1981. Mite pests of crops in southern Africa. Science Bulletin, Department of Agriculture and Fisheries, Republic of South Africa, 397: 65-67.
- Sorensen, K. J., Turteltaub, K., Vrankovich, G., Williams, J. and Christian, A. T. 2004. Whole-genome amplification of DNA from residual cells left by incidental contact. *Analytical Biochemistry*, 324: 312-314.
- Stevens, L., Giordano, R., Fialho, R.F. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 32: 519–545.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J. and Hurst, G. D. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53: 71-102.
- Sun, J. T., Lian, C., Navajas, M. and Hong, X. Y. 2012. Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BMC Genetics*, 13 (1): 8.
- Tao, M., You, C. P., Zhao, R. R., Liu, S. J., Zhang, Z. H., Zhang, C. and Liu, Y. 2014. Animal mitochondria: evolution, function, and disease. *Current Molecular Medicine*, 14: 115–124.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjöld, M., Ponder, B. A. and Tunnacliffe, A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general

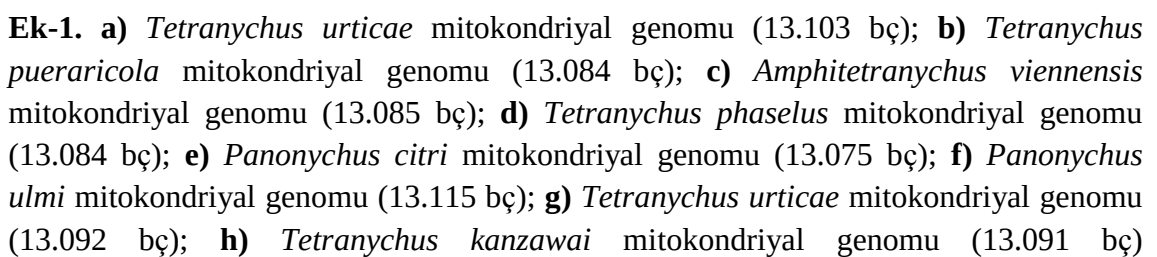
- amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718–725.
- Tillich, M., Lehwark, P., Pellizzer, T., Ulbricht-Jones, E. S., Fischer, A., Bock, R. and Greiner, S. 2017. GeSeq–versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research*, 45: 6-11.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Lagnel, J. and Pasteur, N. 1997. Population structure in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Crete based on multiple allozymes. *Heredity*, 78: 84-92.
- Tsagkarakou, A., Navajas, M., Papaioannou-Souliotis, P. and Pasteur, N. 1998. Gene flow among *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in Greece. *Molecular Ecology*, 7: 71-79.
- Vacante, V. 2010. Citrus mites: identification, bionomy and control. CABI Head Office, Cambridge, pp 378.
- Valenzano, D., Tumminello, M.T., Gualandri, V. and de Lillo, E. 2020. Morphological and molecular characterization of the *Colomerus vitis erineum* strain (Trombidiformes: Eriophyidae) from grapevine erineum and buds. *Experimental and Applied Acarology*, 80: 183-201.
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R. and Dermauw, W. 2015. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 12-21.
- Van Leeuwen, T., Van Nieuwenhuyse, P., Vanholme, B., Dermauw, W., Nauen, R. and Tirry, L. 2011. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenthrin resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. *Insect Molecular Biology*, 20: 135–140.
- Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Van Pottelberge, S., Van Nieuwenhuyse, P., Nauen, R., Tirry, L. and Denholm, I. 2008. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: Non-Mendelian inheritance in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 5980–5985.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W. and Tirry, L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 563- 572.
- Weeks, A., Fripp, Y. and Hoffmann, A. 1995. Genetic structure of *Halotydeus destructor* and *Penthaleus major* populations in Victoria (Acari: Pentheleidae). *Experimental and Applied Acarology*, 19: 633-646.
- Wei, S. J., Shi, M., Chen, X. X., Sharkey, M. J., van Achterberg, C., et al. 2010. New views on strand asymmetry in insect mitochondrial genomes. *PLOS One*, 5: e12708.
- Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z. and Welch, J. J. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282 (1807): 20150249.
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587-609.

- Xie, L., Hong, X. Y. and Xue, X. F. 2006. Population genetic structure of the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from China. *Annals of the Entomological Society of America*, 99 (5): 959-965.
- Yanar, D. ve Ecevit, O. 2005. Tokat ilinde elma (*Malus communis* L.) bahçelerinde görülen bitki zararlısı ve predatör akar türleri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20 (1): 18-23.
- Yu, M. Z., Zhang, K. J., Xue, X. F. and Hong, X. Y. 2011. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation and evolution in natural populations of *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology*, 20 (3): 311-321.
- Yuan, M. L., Wei, D. D., Wang, B. J., Dou, W. and Wang, J. J. 2010. The complete mitochondrial genome of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae): high genome rearrangement and extremely truncated tRNAs. *BMC Genomics*, 11: 597.
- Yüksel, B. ve Ulusoy, H. 2000. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde ladin örücü akarı (*Oligonychus ununguis* Jacobi)'nin zararı ve mücadelesi. *Orman Mühendisliği*, 36 (9): 28-31.
- Zchori-Fein, E. and Brown, J. K. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 711-718.
- Zchori-Fein, E. and Perlman, S. J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology*, 13 (7): 2009-2016.
- Zchori-Fein, E., Perlman, S. J., Kelly, S. E., Katzir, N. and Hunter M. S. 2004. Characterization of a *Bacteroidetes* symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus cardinium hertigii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 961-968.
- Zélé, F., Santos, I., Olivieri, I., Weill, M., Duron, O. and Magalhães, S. 2018. Endosymbiont diversity and prevalence in herbivorous spider mite populations in South-Western Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 94 (4): 1.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W. and Arnheim, N. 1992. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 5847-5851.
- Zhang, D. X., Szymura, J. M. and Hewitt, G. M. 1995. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 40: 382-391.
- Zhang, D. X. and Hewitt, G. M. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25: 99-120.
- Zhang, Z. Q. 2003. Mites of greenhouses: identification, biology and control. CABI Publishing, UK, 244 pp.
- Zhang, Y. K., Ding, X. L., Zhang, K. J. and Hong, X. Y. 2013. *Wolbachia* play an important role in affecting mtDNA variation of *Tetranychus truncatus*

- (Trombidiformes: Tetranychidae). *Environmental Entomology*, 42 (6): 1240-1245.
- Zhang, Y. K., Zhang, K. J., Sun, J. T., Yang, X. M., Ge, C. and Hong, X. Y. 2013. Diversity of *Wolbachia* in natural populations of spider mites (genus *Tetranychus*): evidence for complex infection history and disequilibrium distribution. *Microbial Ecology*, 65 (3): 731-739.
- Zhang, Y.X., Chen, X., Wang, J.P., Zhang, Z.Q., Wei, H., Yu, H.Y., Zheng, H.K., Chen, Y., Zhang, L.S., Lin, J.Z., Sun, L., Liu, D.Y., Tang, J., Lei, Y., Li, X.M. and Min, L. 2019. Genomic insights into mite phylogeny, fitness, development, and reproduction. *BMC Genomics*, 20:954.
- Zhu, L. Y., Zhang, K. J., Zhang, Y. K., Ge, C., Gotoh, T. and Hong, X. Y. 2012. *Wolbachia* strengthens *Cardinium*-induced cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Current Microbiology*, 65: 516-523..
- Zhu, Y. X., Song, Y. L., Hoffmann, A. A., Jin, P. Y., Huo, S. M. and Hong, X. Y. 2019. A change in the bacterial community of spider mites decreases fecundity on multiple host plants. *Microbiology*, 8: e743.
- Zhu, Y. X., Song, Y. L., Zhang, Y. K., Hoffmann, A. A., Zhou, J. C., Sun, J. T. and Hong, X. Y. 2018. Incidence of facultative bacterial endosymbionts in spider mites associated with local environments and host plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (6): e02546-17.
- Zhu, Y. X., Song, Z. R., Song, Y. L., Zhao, D. S. and Hong, X. Y. 2020a. The microbiota in spider mite feces potentially reflects intestinal bacterial communities in the host. *Insect Science*, 27: 859-868.
- Zhu, Y. X., Song, Z. R., Huo, S. M., Yang, K. and Hong, X. Y. 2020b. Variation in the microbiome of the spider mite *Tetranychus truncatus* with sex, instar and endosymbiont infection. *FEMS Microbiology Ecology*, 96: 2

7. EKLER





ÖZGEÇMİŞ

Hilal Şule TOSUN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2015- 2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi
2012-2014	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü, Isparta
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2006-2011	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2015 – Devam ediyor	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

ESERLER

1. Bilimsel Yayınları

1.1. Uluslararası İndexli Hakemli Dergilerde Yayımlanan Yayınları

1.1.2. Baki D., Tosun H. Ş., and Erler F. (2021). Efficacy of indigenous isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31: 56.

1.1.3. Eker T., Erler F., Adak A., İmrek B., Güven H., Tosun H.Ş., et al., (2018)."Screening of chickpea accessions for resistance against the pulse beetle, *Collosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae)", *JOURNAL OF STORED PRODUCTS RESEARCH*, vol.76, pp.51-57,

Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31: 56.

1.1.3. Eker T., Erler F., Adak A., İmrek B., Güven H., Tosun H.Ş., et al., (2018). "Screening of chickpea accessions for resistance against the pulse beetle, *Collosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae)", *JOURNAL OF STORED PRODUCTS RESEARCH*, vol.76, pp.51-57,

1.1.4. Erler F., Tosun H.Ş. (2017). "Plant oils as oviposition deterrents against winterform females of pear psylla, *Cacopsylla pyri* (L.) (Hemiptera: Psyllidae)", *PHYTOPARASİTİKA*, vol.45, pp.509-515.

1.1.5. Dogan A., Erler F., Erkan M., Ates A.O., Sabanci H.S., Polat E. 2016. "Microbial-based Production System: A Novel Approach for Plant Growth and Pest and Disease Management in Greenhouse-grown Peppers (*Capsicum annum* L.)", *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY*, vol.18, pp.371-386.

1.2. Ulusal hakemli dergide yayımlanan yayınları

1.2.1. Baki, D., Tosun, H.S., Erler F. Comparative evaluation of indigenous entomopathogenic fungal isolates and three commercial entomopathogenic fungal products against *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium confusum* du Val. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, 2020.

1.2.2. İmrek B., Güven H. , Erler F., Tosun H.Ş. 2017. "Bazı Bitki Uçucu Yağlarının Armut Psillidi [*Cacopsylla pyri* (L.) (Hemiptera: Psyllidae)]'nin Kışlık-Formuna Karşı Yumurta Bırakmayı Engelleyici ve Ovisidal Etkileri", *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, cilt.21, ss.259-265.

1.3. Uluslararası Bildiriler Kitabında Yayımlanan Yayınları

1.3.1. Erler F., Tosun, H. Ş., Baki D., Fumigant toxicity of essential oils from some aromatic and medicinal plants against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*, 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi, Antalya, Türkiye, 26-28 Eylül 2018.

1.3.2. Erler F., Tosun, H. Ş., Baki D., Ovicidal activity of essential oils from some medicinal and aromatic plants against the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis*, 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi, Antalya, Türkiye, 26-28 Eylül 2018.

1.3.3. Erler F., Ateş A.Ö., Tosun H.Ş., İkten C., İmrek B., Topuz E., et al., "Evaluation of two entomopathogenic fungi and their combination with summer oil for the control of Tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick)", *International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF-2018)*, İZMİR, TÜRKİYE, 2-5 Nisan 2018, vol.1, no.1, pp.119-119.

1.3.4. Erler F., Tosun H.Ş., İmrek B., Güven H., "Plant essential oils as oviposition deterrents and ovicides against pear psylla, *Cacopsylla pyri* (L.) (Hemiptera: Psyllidae)", *International Congress of the New Approaches and Technologies for*

Sustainable Development, ISPARTA, TÜRKIYE, 21-24 Eylül 2017, vol.1, no.1, pp.324-325.

1.3.5. Erler F., Eker T., İmrek B., Güven H., Toker C., Tosun H.Ş., et al., "Evaluation of chickpea genotypes for resistance against the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae)", International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development, ISPARTA, TÜRKIYE, 21-24 Eylül 2017, vol.1, no.1, pp.326-327.

1.3.6. Erler F., Tosun H.Ş., Güven H., İmrek B., "FUMIGANT ACTIVITY OF SOME PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST THE PULSE BEETLE, *CALLOSOBRUCHUS CHINENSIS* (L.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)", I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants 'Natural and Healthy Life', KONYA, TÜRKIYE, 10-12 Mayıs 2017, vol.1, no.1, pp.88-88.