

AĞUSTOS 2019

Yüksek Lisans Tezi - Biyoloji

FEEDAN MOHAMMED JUNAİD

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ I (COI) GEN
DİZİLERİNE DAYALI *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE) POPULASYONLARININ GENETİK
ANALİZİ

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEEDAN MOHAMMED JUNAİD

AĞUSTOS 2019

**MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ I (COI) GEN DİZİLERİNE
DAYALI *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)
POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Canan CAN

İkinci Danışman

Doç. Dr. Murat KÜTÜK

Feedan Mohammed JUNAİD

Ağustos 2019



© 2019 [Feedan Mohammed JUNAID]

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ

Tezin Başlığı : Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz I (COI) Gen Dizilerine
Dayalı *Euaresia bullans* (Wiedemann, 1830) (Diptera:
Tephritidae) Populasyonlarının Genetik Analizi

Öğrencinin Adı Soyadı: Feedan Mohammed JUNAİD

Sınav Tarihi : 05.08.2019

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat KÜTÜK
İkinci Danışman

Prof. Dr. Canan CAN
Danışman

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Canan CAN

.....

Prof. Dr. Sakine Serap AVGIN

.....

Dr. Öğr. Üyesi Adile AKPINAR

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilmek suretiyle tezde yer aldığını beyan ederim.

Feedan Mohammed JUNAİD

ABSTRACT

GENETIC ANALYSIS OF *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) DIPTERA: TEPHRITIDAE) POPULATION BASED ON MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C OXIDASE I (COI) GENE SEQUENCES

JUNAID, Feedan Mohammed

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat KÜTÜK

August 2019

56 pages

In this study, fruit flies *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) that belongs to (Diptera: Tephritidae) which was collected from 7 different provinces in Turkey (Amasya, Çorum, Kahramanmaraş, Kayseri, Samsun, Sinop, Yozgat) a genetic analysis of the samples was done. In this context, 101 adult specimens were evaluated based on the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene region. 79 successful samples from the sequence products were analyzed and 17 haplotypes were identified. Calculating nucleotide ratios of fruit flies populations (C: 16.7%; T: 38.93%; A: 29.05% and G: 15.8%) It was observed that the base compounds were oriented towards Adenine and Thymine. As a result of the study, the genetic distance between populations was found to be 0.09% - 0.046%. This shows that the genetic variation among individuals of the *Euaresta bullans* species is at very low levels. According to the neutrality test (Tajima's D and Fu's Fs), result was $p < 0.05$ and this determines that the populations shows strong spread. Although they have spread in different habitat characteristics and different geographic regions, but they show similarity rate between populations. In particular, the high dependence of the host and the presence of the host in different environments is related to the wide tolerance of this species in terms of environmental difference. Finally, it was found that gene inheritance between *Euaresta bullans* populations was continued and not related to any geographic and ecological barrier and exponentially increased.

Key Words: *Euaresta bullans*, Fruit Flies, Tephritidae, COI, Turkey.

ÖZET

MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ I (COI) GEN DİZİLERİNE DAYALI *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ

JUNAİD, Feedan Mohammed
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji
Danışman: Prof. Dr. Canan CAN
İkinci Danışman: Doç. Dr. Murat KÜTÜK
Ağustos 2019

56 Sayfa

Bu çalışmada, meyve sinekleri (Diptera: Tephritidae) içerisinde yer alan *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) türüne ait Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde bulunan 7 ilden (Amasya, Çorum, Kahramanmaraş, Kayseri, Samsun, Sinop, Yozgat) toplanarak örneklerin populasyon genetik analizlerinin ortaya konulmuştur. Bu kapsamda, 101 ergin örnek, mitokondriyal sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesi baz alınarak değerlendirilmiştir. Sekans ürünlerinden başarılı sonuçlanan 79 örnek analiz edilmiş ve 17 haplotip belirlenmiştir. Meyve sinekleri popülasyonlarına ait nükleotit oranları hesaplanarak (C: %16,7; T: %38,93; A: %29,05 ve G: %15,8) baz bileşimlerinin Adenin ve Timin yönelimli olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın neticesi olarak populasyonlar arası genetik uzaklık %0,09 - %0,046 olarak saptanmıştır. Elde edilmiş olan bu durum *Euaresta bullans* türünün bireyleri arasında genetik varyasyonun çok düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Araştırmada yapılan nötralite test sonuçlarına (Tajima's D ve Fu's Fs) göre $p < 0,05$ bulunmuş ve populasyonların güçlü yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Farklı habitat özelliklerinde ve de farklı coğrafik bölgelerde yayılış göstermiş olmalarına rağmen belli oranda popülasyonlar arası üreme imkanı bulmuşlardır. Özellikle konukçu bağımlılığının yüksek olması ve konukçuların bulunduğu yerlerde farklı ortamlarda bulunabilmesi, bu türün çevre toleransı bakımından geniş bir toleransa sahip olması ile ilgilidir. Sonuç olarak, *Euaresta bullans* populasyonları arasında gen akışının devam ettiği, herhangi bir coğrafik ve ekolojik bir bariyer engeline takılmadığı, üssel olarak arttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Euaresta bullans*, Meyve Sinekleri, Tephritidae, COI, Türkiye.

Ailem hayatım boyunca bana her konuda destek veren düşüncelerime anam gösteren ve sevdimiz ana devletine gelip fazla bilgi ve kendimi geliştirmem için bana güvenen, maddi ve manevi yönden bana destek veren, biricik annem Dikra AKRAM ve biricik babam Mohammed JUNAİD'e,

Her zaman gönüle ve güzel sözler ile yanımda olan ve tez çalışmalarım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, zor zamanlarımda güler yüzleriyle ve şirin çocuklar ile beni motive eden değerli kız kardeşlerime,

Türkiye'e gelip yüksek lisansı kazanmak için bana destek veren konuşmaları ile bana pozitif enerji veren erkek kardeşlerim Abdullallah,Abdulummin,Abdullrahman JUNAİD'e,

Her zaman bana güzel dualar ile ve tatlı sözler ile bana hep destek gösteren teyzelerim ve kuzenlerime,

Tez çalışmasında hep Pozitif düşünceleri ile beni motive eden sevgili nişanlım Ali Hussein'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

“Canım aileme”

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Prof. Dr Canan CAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa başladığım günden bugüne her türlü bilgisini ve yardımını esirgemeyen ikinci danışman hocam Doç. Dr. Murat KÜTÜK'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama başladığım günden bu yana bana her türlü bilgin ve deneyiminden faydalanabildiğim ve her türlü konuda benden yardımını esirgemeyen ve bana yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi. Adile AKPINAR'a teşekkür ederim.

Örneklerin tez çalışmasında bana veren ve labratuvar çalışmalarında benden bilgilerini esirgemeyen ve tez yazma konusunda bana yardım eden değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi. Mehmet YARAN ve Öğr. Gör. Vedat GÖRMEZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde bana destek veren ve bir aile içinde kendimi hissetiren Irak Türkmen Öğrenci ve Gençler Birliği Gaziantep Şubesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans başlağımdan beri bana destek veren ve her türlü yol gösteren ve her zaman yardım istediğimde yanımda olan Abid NURİ ve Zekerye TURAN'a çok teşekkür ederim.

Her türlü bana manavi destek veren ve bana yardım eden ev arkadaşım ve yüksek lisans sürecesinde tanıştığım tüm arkadaşlarım Derya ARSLAN, Sevil GÜNEŞ, Selçuk BAŞBUĞA, Özge DEMİREL, Oğuz AKVEÇ, Talap TALAPOV ve Cansu BAĞCI'ya teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine, (TEF.YTL.18.20 no'lu proje) desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	VIII
ÖZET	viii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SEMBOLLER LİSTESİ.....	xiv
KISALTLAR LİSTESİ.....	xv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
1.1 Tephritidae Familyasının Genel Özellikleri.....	2
1.1.1 <i>Euaresta bullans</i> (Wiedemann,1830)'ın Morfolojisi	3
1.1.2 <i>Euaresta bullans</i> (Wiedemann,1830)'ın Biyolojisi	5
1.1.3 <i>Euaresta bullans</i> (Wiedemann,1830)'ın Zoocoğrafik Yayılışı	5
1.1.4 <i>Euaresta bullans</i> (Wiedemann,1830)'ın Türkiye Yayılışı	5
1.2 Böceklerde Mitokondriyal DNA (mt DNA) ve Sitokrom Oksidaz altbirimi 1 gen bölgesi (COI).....	6
BÖLÜM 2.....	13
KAYNAK ÖZETLERİ	13
BÖLÜM 3.....	20
MATERYAL VE METOD	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Örneklerin Elde Edilmesi	20
3.2 Metod	24
3.2.1 Örneklerin Hazırlanması	24
3.2.1.1 Laboratuvar Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	24
3.2.1.2 Laboratuvar Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	24

3.2.2	Moleküler Çalışmalar	25
3.2.2.1	Genomik DNA İzolasyonu	25
3.2.2.2	Spektrofotometrik Analizler	26
3.2.2.3	Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz I (COI) bölgesinin PZR ile çoğaltılması	26
3.2.3	Dizi Analizleri	31
BÖLÜM 4		32
BULGULAR		32
4.1	DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
4.2	PZR Görüntülerinin Elde Edilmesi	35
4.3	Mitokondrial DNA Sekans Varyasyonu	35
4.4	Populasyon Genetik Yapısı	38
4.5	Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılım Analizi	38
4.6	Tarafsızlık (Nötralite) Testleri	40
4.7	DNA Barkod	41
BÖLÜM 5		43
TARTIŞMA VE SONUÇ		43
KAYNAKLAR		46

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan <i>Euaresta bullans</i> erginlerinin toplandığı lokaliteler	21
Tablo 3.2 Kullanılan Primer Dizileri.....	27
Tablo 3.3 PZR Reaksiyon İçeriği	28
Tablo 3.4 PZR Isı Döngüleri	28
Tablo 4.1 DNA Konsantrasyonları (ng/µl) ve DNA saflık oranları (A260/280).	32
Tablo 4.2 <i>Euaresta bullans</i> populasyonlarına ait haplotip dağılımı ve frekansları...	36
Tablo 4.3 <i>Euaresta bullans</i> örneklerinin genetik çeşitlilik ve nükleotit çeşitliliği....	37
Tablo 4.4 Tajima's D ve Fu's Fs nötralite testleri.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 <i>Euaresta bullans</i> a- Ergin (dişi), b- Ergin (erkek), c- Baş, d- Kanat, e- 4	
Göğüs, Bacak, ovipozitör. 4	
Şekil 1.2 <i>Xanthium spinosum</i> L. 5	
Şekil 1.3 <i>Euaresta bullans</i> 'ın Türkiye'deki yayılışı 6	
Şekil 1.4 Böcek mitokondriyal genomun organizasyonu (Anonim2) 8	
Şekil 1.5 DNA barkodlamanın tür içi ve türler arası genetik uzaklık varsayımlarına 11	
göre dağılım frekansları. 11	
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar 24	
Şekil 3.2. PZR Cihazı ve cihaz ekranı 29	
Şekil 3.3 Jel elektroforez basamakları 30	
Şekil 4.1 <i>Euaresta bullans</i> türü PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü 35	
Şekil 4.2 Sekans sonuçlarına ait median joining haplotip ağı 37	
Şekil 4.3 <i>E. bullans</i> 79 sekansa ait beklenen ve gözlenen uyumsuzluk dağılımı. 39	
Şekil 4.4 <i>E. bullans</i> popülasyonlarına ait beklenen ve gözlenen uyumsuzluk dağılımı 39	
Şekil 4.5 <i>Euraesta bullans</i> (Hap1-16) popülasyonlarına ait Maximum Likelihood.. 42	
filogenetik ağacı (Mega X).. 42	

SEMBOLLER LİSTESİ

♂	Erkek
♀	Dişi
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
&	Ve
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
°	Enlem ve Boylamda Derece
'	Enlem ve Boylamda Dakika
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ng	Nanogram

KISALTLAR LİSTESİ

A	Adenin
A260/A280	DNA Konsantrasyonu
AE	Çözücü Çözeltisi
AL	Parçalama tamponu
ATL	Doku parçalama tamponu
AW1	Yıkama Çözeltisi 1
AW2	Yıkama Çözeltisi 2
bç	Bas çift
BOLD	Barkod veri sistemi
cm	Santimetre
OICI	itokrom C Oksidaz 1Klor
CytB	Sitokrom B -isoenzim
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit
E	Doğu
EB	<i>Euaresta bullans</i>
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
F	İleri Primer
G	Guanin
Gr	Gram
HCL	Hidroklorik Asit
Hox	Temel Gelişim Geni

Lt	Litre
ML	Maksimum Likelihood
Mmol	Milimol
Mm	Milimetre
MEGAX 64	Filogenetik Ağac Yapımı Programı
Mt	Mitokondriyal
N	Kuzey
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NJ	Neighbor Joining
Ng	Nanogram
π	Nükleotit Çeşitliği
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Primer
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
Sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmleri
TBE	Tris-borik-EDTA tampon çözeltisi
Trna	Taşıyıcı Ribo Nükleik Asit
UV	Ultraviyole
V	Volt
Wg	Kanat Gelişim Geni

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Böcekler dünya üzerinde en fazla çeşitlilik gösteren canlılardır ve muazzam şekilde farklı form aralıklarında evrimleşmişlerdir. Çöllerden Antartika'ya kadar, hemen hemen tüm ekosistemlerde geniş bir dağılım gösterirler. Böceklerin bu şekilde geniş dağılım göstermesi, onların iyi bir ekolojik adaptasyona sahip olduklarının kanıtıdır. Böceklerin bu biyolojik başarıları, inanılmaz vücut yapıları, büyüklükleri, çiftleşme stratejileri, beslenme ve davranışlarındaki adaptasyon yeteneklerinden kaynaklanır. Sadece türlerin %10'unun tanımlanması taksonomistlerin neredeyse 200 yılını almıştır ve halen tanımlanmayı bekleyen çok sayıda böcek türü bulunmaktadır. (Güz ve Kiliçer, 2012)

Böcekler dünyadaki en bol bulunan yaşam formları olup 1 milyonun üzerinde tür içerir. 2010 yılında dünya koruma birliğinden elde edilen istatistiksel verilere göre yeryüzünde toplam 62.305 omurgalı türü olduğunu belirtilmiştir. 1.305.250 omurgasız türü, 321,212 bitki türü ve yaşam formları 51,563 tür olarak belirtilmiştir. Omurgasızlar arasında, böcekler yaklaşık 1 milyonun üzerinde tür ile temsil edilirler (Anonim1).

Böceklerin bu kadar yaygın olma nedenleri, hangi genlerin ve hangi genetik mekanizmaların böceklerin yaşam formlarını düzenledikleri ve en önemlisi insanları doğrudan ve dolaylı olarak nasıl etkiledikleri bugüne kadar üzerinde çalışılan konular olmuştur. (Güz ve Kiliçer, 2012)

Böcekler Arthropoda şubesine ait Insecta sınıfı içerisinde 31 takımdan oluşurlar (Wheeler vd. 2001). Meyve sinekleri familyası ise yaklaşık 120000 tür ile temsil edilen Diptera takımına ait Brachycera alt takımı ve bu alttakım içinde yer alan Tephritoidea üst familyasına ait 9 familyadan biridir. Tephritidae familyasını diğer 9 familyadan ayıran karakterler ise, kanat damarlarından subcostal damar ile costal damarın yaklaşık 90 derecelik bir açı yapması ve baş üzerinde frontal setaların bulunması olarak bildirilmiştir (Yaran, 2014).

Dünya üzerinde geniş bir yayılım gösteren Meyve sinekleri (Diptera: Tephritidae) familyası tarımsal açıdan oldukça önemli türleri bünyesinde barındırmaktadır. Türler bitkinin meyve, çiçek, kabuk, gövde yaprak veya köklerinde larva gelişimlerini tamamlamaktadır. Bu yüzden gerçek meyve sinekleri olarak bilinirler. (Hancock ve Drew, 1995).

Tephritidae familyasından dünyada 492 cinse ait 4716 tür ve palearktik bölgeden de 137 cinse ait 882 türün varlığı bilinmektedir (Pape vd. 2011; Norrbom, 1999). Ülkemizde ise familya ya ait bugüne kadar 165 tür rapor edilmiştir. (Yaran vd. 2018).

1.1 Tephritidae Familyasının Genel Özellikleri

Meyve sinekleri familyasına ait türler yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere 4 yaşam evresine sahiptirler. Tephritidae Familyasına ait tüm türler tam metamorfoz geçirirler. Yıllık döl sayıları ise türler arasında farklılıklar gösterebilir. Türler ergin bireyler ortalama olarak 1 – 2 hafta yaşam süresine sahiptir, bazı türler yılın her döneminde rastlamak mümkündür. (Carey ve Liedo, 1999).

Meyve sineklerin larvaları çoğunlukla bitki dokusu içerisinde gelişirler. Fitofag türlerin larvaları meyve içinde, tohumlarda, gal oluşumuna neden olarak yaprak üzerinde veya çiçeklerde beslenebilirler. Türlerin çoğunluğunun larvaları bitki kök, gövde, çiçek tablası ve meyvelerinde galeri oluşturarak hayat evrelerine devam ederler. Ergin sinekler çoğunlukla akıcı yapıdaki bitki üzerinde bulunan polen damlacıkları, özsu ve su damlacıkları ya da mikroorganizmalarla beslenmelerini sağlarlar (Norrbom, 1999).

Meyve sineklerinin larvaları bitkilerin dokularında beslenirken yalnız ve bitkide tek bir larva veya toplu halde bulunabilirler. Bazen de farklı türlerin larvaları aynı bitki üzerinde gelişimlerini sürdürebilir ve kendi besinlerini paylaşabilirler (Headrick ve Goeden, 1990).

Meyve sinekleri bitkiler ile beslenen fitofag böceklerdir. *Bactrocera oleae* (Gmelin) gibi bazı türleri monofag olup, yalnızca zeytinin meyvesinde yaşam döngüsünü geçirir ve zeytinde çok ciddi ekonomik zararlar oluşturabilir. Bazı türler ise polifag olup, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) türü gibi 300'den daha fazla konukçusu

bulunmaktadır. Ve bir çok kültür bitkisinde zararlara neden olabilir (Liquidio vd. 1991).

Pek çok meyve sineği konukçu bitkisi üzerinde çiftleşme davranışını gerçekleştirir (Norrbon, 1999).

Tephritidae familyasına ait olan sinekler çok çeşitli karakterlerle tanınırlar. Bu karakterlerden en belirgin olanı birçok türün kanat desenlenmesine sahip olmasıdır. Meyve sinekleri çoğunlukla orta veya küçük boyutlu sinekler olarak bilinirler. Meyve sinekleri familyasına ait türler, costal damar ve subcostal damarın 90 derecelik açı ile birleşmesi ve baş üzerinde bulunan frontal setalar ile diğer familyalardan ayrılırlar. Meyve sineklerinin genel morfolojik karakterleri genellikle; Antenleri tüysüz ya da dolgun arista ile oluşur; kanatlar genellikle sarı, siyah veya kahverengili bantlı ya da ağımsı desenlidir. Kanat üzerinde genel olarak değişik biçimlerde desenlere sahiptirler. Bazı türlerde kanat deseni bulunmaz. Erkeklerde karın beş bölüm ve dişilerde altı bölümden (Şekil 1.a,b) meydana gelmiş olup (altıncı bölüm dişilerde yumurta borusudur) dışarıdan kolayca ayırt edilebilir. Dişi bireylerde bulunan ovipozitörler yoğun kitin yapıdadır ve türden türe değişmekle birlikte uzun bir yapısı vardır. (Gharajedaghi vd. 2012) .

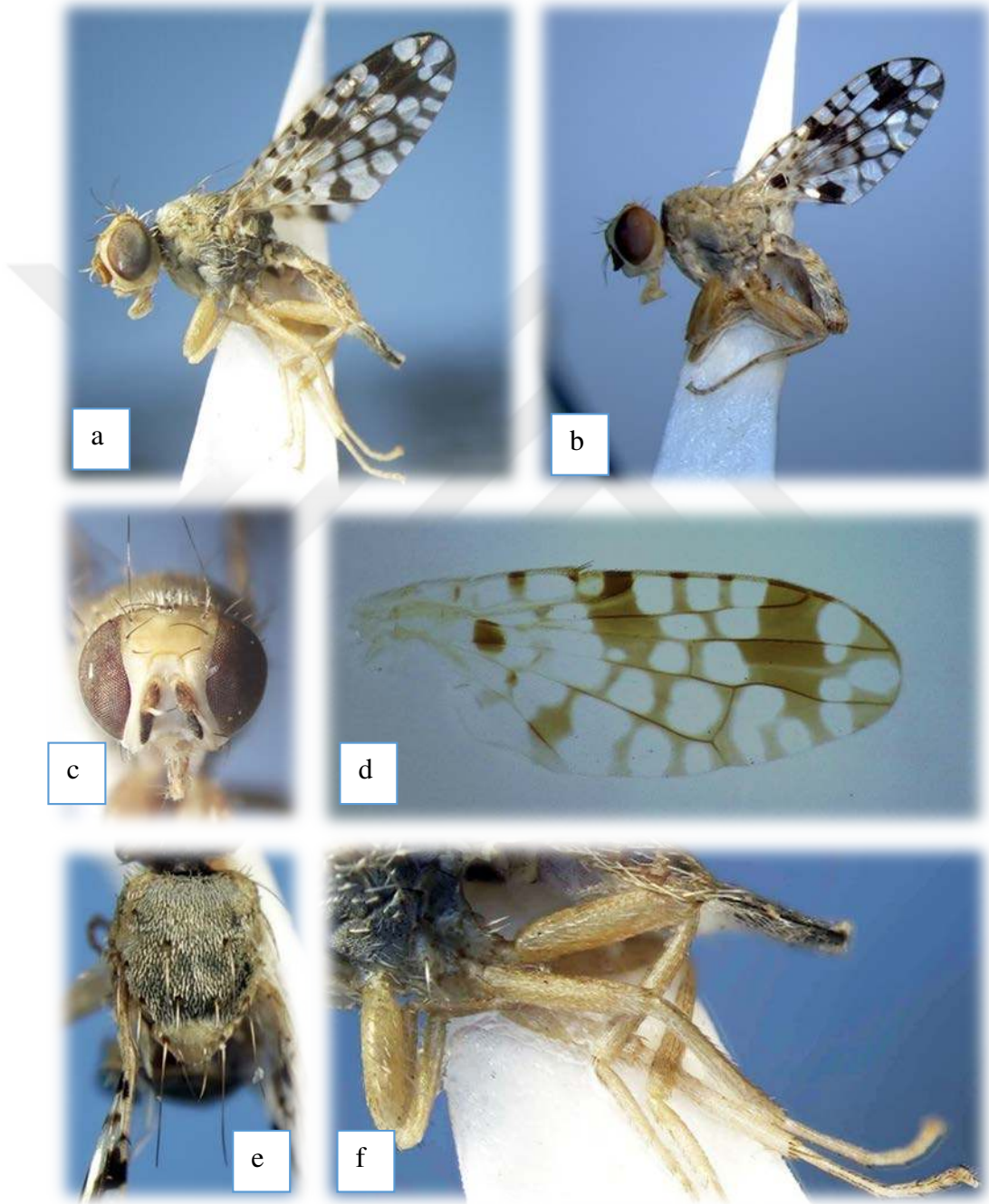
1.1.1 *Euaresia bullans* (Wiedemann, 1830)'ın Morfolojisi

Baş: beyazdan sarıya açık tonlarda; 2 çift kahverengi frontal seta mevcut (Şekil 1.C); anten uzun ve kahverengi, dişilerde antenin ikinci ve üçüncü segmenti kahverengi, arista basal yarısı sarı veya beyaz, apical yarısı kahverengi; oksiput'un üst parçası az ya da çok siyah; ocellar nokta koyu kahverengi, küçük kıllar beyaz; büyük kıllar kahverengi, hortum sarı, üzeri küçük beyaz kıllı (Freidberg ve Kugler, 1989).

Göğüs: zemin rengi temel olarak siyah, notopleural alanın kenarları ve scutellum sarı, üzeri sarı – yeşilimsi tozlu, prescutellar seta ve dorsocentral seta'ların dip kısımların da küçük siyah alanlar mevcut (Şekil 1.e), halter sarı (Freidberg ve Kugler, 1989).

Kanat: koyu kahverengi - siyah ağımsı desenli (Şekil 1.d), kanat kökü hiyalin, r_1 ve r_{2+3} hücreleri içerisinde sıralanmış üç tane büyük dörtgen hiyalin alan mevcut, pterostigma siyah, an hücresinin uç kısmı kısa sivri (Freidberg ve Kugler, 1989).

Karın: genel olarak sarı görünümlü üzeri siyah nokta desenli, siyah noktalar özellikle tergitlerin lateral kenarlarında, üzeri gri tozlu, seta ve setula'lar sarımsı, oviscapae parlak siyah ve konik biçimli (Şekil 1.a,f), uç kısımlarda uzun sarı kıllı; aculeus uç kısmında sivri (Freidberg ve Kugler, 1989).



Şekil 1.1 *Euaresta bullans* a- Ergin (dişi), b- Ergin (erkek), c- Baş, d- Kanat, e- Göğüs, bacak, ovipozitör.

1.1.2 *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830)'ın Biyolojisi

Euaresta bullans larvaları *Xanthium spinosum* L. bitkisi üzerinde gelişimini tamamlarlar. Gelişimini tamamlayan larvalar toprağa düşerek pupa evresine girer ve kışı toprakta pupa olarak geçirirler (Freidberg ve Kugler, 1989; Kütük, 2003a).



Şekil 1.2 *Xanthium spinosum* L.

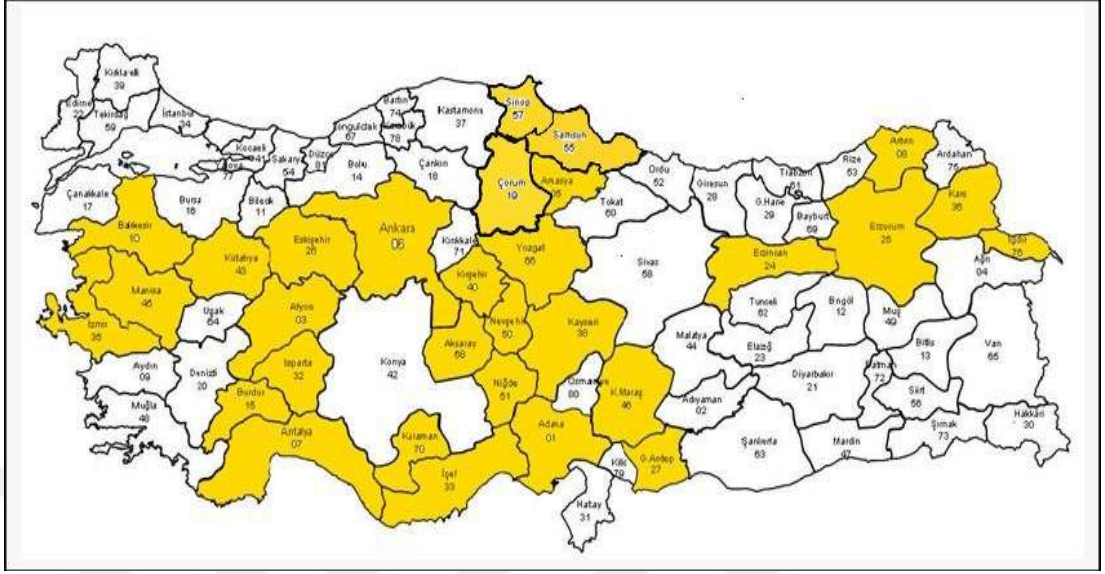
1.1.3 *Euaresta bullans* (Wiedemann,1830)'ın Zoocoğrafik Yayılışı

Amerika Birleşik Devletleri, ve Güney Amerika, Avrupa'da Bulgaristan, İtalya, İspanya, Yunanistan, Fransa, Macaristan, Makedonya, Moldova, Rusya, Slovakya, Ukrayna, İran, İsrail, Türkiye, Güney Afrika'nın bir çok ülkesi ve Avusturalya (Hendel, 1927; Giray, 1969; Giray, 1979; Foote, 1984; Freidberg ve Kugler, 1989; Norrbom vd. 1999; Kütük, 2003a).

1.1.4 *Euaresta bullans* (Wiedemann,1830)'ın Türkiye Yayılışı

Türkiye'de geniş bir yayılışa (Şekil 1.3) sahip bir tür olan *Euaresta bullans* birçok ile varlığı tespit edilmiştir. Tespit edildiği lokalitelerde de birey sayısı bakımından da oldukça fazla olduğu görülmüştür. Özellikle konukçusu üzerinden ayrılmadan

erginlerin sürekli artabildiği tespit edilmiştir. Konukçu bitkisinin bulunduğu birçok bölgede var olduğu bilinmektedir.(Yaran, 2014).



Şekil 1.3 *Euaresta bullans*'ın Türkiye'deki yayılışı; (sarı renkli alanlar): (Yayılış alanları Giray, 1969, 1979; Kütük, 2003; Kütük ve Özgür, 2003; Kambur, 2003; Pakyürek 2006; Kütük, 2008; Yaran, 2009; Bayrak, 2011; Görmez, 2011; Avşar, 2014; Yaran, 2014; Torbalı, 2018 kaynakları referans alınarak oluşturulmuştur).

1.2 Böceklerde Mitokondriyal DNA (mt DNA) ve Sitokrom Oksidaz Altbirimi 1 gen Bölgesi (COI)

Mitokondriyal DNA (mt DNA) evrim oranını hızlandırması, kısa birleşme süresi ve maternal kalıtım nedeniyle böceklerde en çok kullanılan markırlardan biridir ve barkod geni olarak bilinir. Haplitipler arasındaki evrimsel ilişkileri yeniden kurma imkanı sayesinde mitokondriyal DNA, bir türün köken bölgesinin belirlenmesi, istila ve tarihsel demografi gibi tarihsel süreçleri yeniden yapılandırmak için özellikle bilgi vericidir ve defalarca araştırma amaçlı kullanılmıştır (Wan vd. 2011).

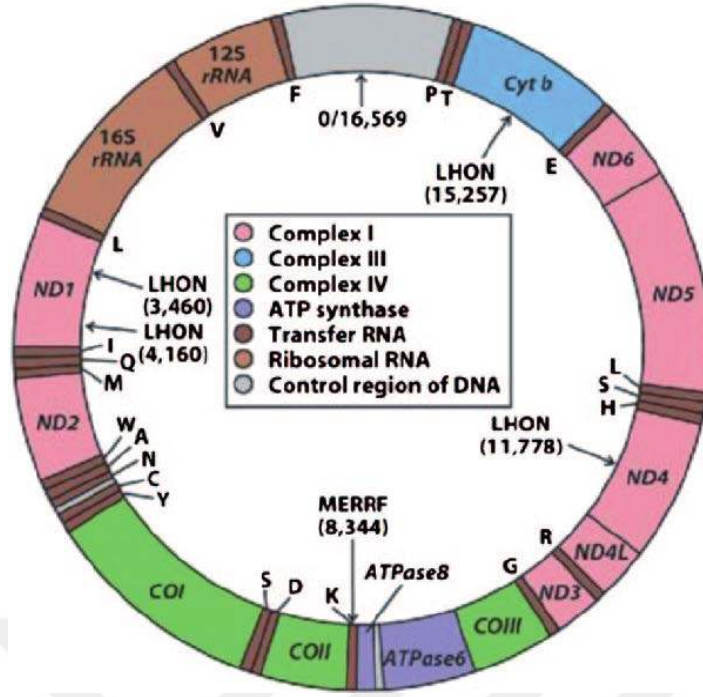
“DNA barkod” terimi, ilk kez 1993 yıllarında kullanılmaya başlanmış (Arnot, 1993) ve daha sonra bu barkod terimi literatürlerde yaygın olarak kullanılmıştır. DNA barkodu, spesifik mitokondriyal gen bölgesi olan COI (Sitokrom Oksidaz 1), kısa korunmuş DNA dizilerinin kullanılmasıyla, bir türün tanımlanmasını ifade eder (Hebert vd. 2003).

Mitokondrial DNA verileri, türlerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde son yıllarda kullanılan en yaygın verilerdir. Ökaryotik canlılarda mitokondrial DNA'daki mutasyon oranları değişkendir. Mitokondride bazı bölgeler mutasyon oranı yüksek olduğu için hızla değişirken, bazı bölgelerin mutasyon oranı çok düşüktür ve bu bölgeler korunmuş bölgeler olarak bilinir. Mt DNA'daki bu farklı bölgeler farklı sistematik seviyelerin analizine imkân verir (Simon vd. 1994).

Mitokondriyal genom düzenlenmesi omurgasız grupları içerisinde en fazla böcekler sınıfındaki türler için incelenmiştir. Böceklerin mitokondrileri, çift sarmallı dairesel bir genomdur ve her iki yanında genler kompakt olarak dağılmıştır (Şekil 1.4). Böceklerin genlerinde 14,503 baz çifti ile 19,517 baz çifti arasında değişen sayıda nükleotit dizileri bulunmaktadır (Lewis vd. 1995; Beckenbach ve Joy, 2009). Şu ana kadar incelenen böceklerin (wallaby louse biti dışında) mitokondriyal genomlarındaki genlerin düzenlenmesi korunmaktadır, çünkü tüm türler aynı protein-kodlama rRNA genleri ve tRNA genleri ile aynı düzenlemeye sahiptir. Sadece birkaç tRNA geninin pozisyonları farklıdır. Özellikle, “hot spot” bölgesinde kontrol bölgesine yakın olan iki tRNA gen kümesinde bulunmaktadır (trnK-trnD ve trnAtrnR-trnNtrnS1-trnE-trnF) (Dowton ve Austin 1999).

Böceklerde mtDNA 2 ribozomal RNA (rRNA) geni, 22 transfer RNA (tRNA) geni ve 13 protein kodlama genini içeren 37 genden oluşur (Clay ve Wolstenholme, 1985; Crozier, 1993; Mitchel vd. 1993).

Mitokondriyal DNA, ekstra kromozomal bir genomdur, mtDNA markırları böceklerde filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde ve evrimsel tarihin çıkarımında tercih edilir. Tür içi ve tür arasındaki karşılaştırmalarda kullanılır (Emadi vd. 2010).



Şekil 1.4 Böcek mitokondriyal genomun organizasyonu (Anonim 2)

DNA barkodu, mitokondriyal genomun standart bir bölgesinden gelen kısa bir DNA dizisidir ve türlerin tanımlanması için kullanılır. DNA barkodlamanın asıl amacı, bir veya daha fazla referans genin büyük ölçekli bir taramasını kullanarak, bilinen türlerin bireylerine ait DNA verilerini kaydetmek ve yeni türleri keşfetmektir. (Hebert vd. 2003).

Özellikle DNA barkod genlerinin keşfi ve uygulamada ki maliyet azalmalarından sonra taksonomistler uzun yıllardır bu DNA barkod yöntemini türlerin sınıflandırmasında uygulamaktadırlar.

Tautz vd. (2002), DNA dizilerini ilk kez taksonomide (DNA taksonomisi olarak da adlandırılır) kullanılmasını uygun görmüşlerdir. Daha sonra Hebert vd. (2003) DNA barkodlama kavramını ve tek bir mtDNA geni olan mitokondriyal sitokrom c oksidaz I (COI) için, hayvan DNA barkodlama çalışmalarında genel sekans olarak kullanılmasını önermiştir.

DNA barkodu % 97.9 hassasiyete sahiptir (Goodfellow, 1992), aynı zamanda hayvan genetik çeşitliliği için yeni, hızlı ve uygun bir tanımlama stratejisini sağlar (Morin vd. 2004). DNA barkodlama sırasında kullanılan COI'in dezavantajları da vardır, özellikle elde edilmesi çok zor ve yeterli varyasyonlara sahip değildir, bazı türler

COI sekanslarının düşük evrim oranlarından dolayı COI ile tanımlanamamaktadır. Ancak COI primeri, bir maternal kökenli mtDNA dizisidir ve tür çeşitliliğini etkileyebilmektedir (Hajibabaei vd. 2006).

Böceklerde özelinde mt DNA çalışmaları sırasında en fazla DNA dizisi çıkarılmış genler sitokrom oksidaz alt birim 1 ve 2, 12S ribozomal RNA ve 16S ribozomal RNA (COI ve COII, 12S rRNA ve 16S rRNA) genleridir (Caterino vd. 2000; Hebert vd. 2003; Shokralla vd. 2011).

Behura vd. (2006)'da mitokondriyal DNA markırlarının popüler olması nedenlerinin şunlar olduğunu bildirmiştir:

1. Dokuların her bir hücresinde binlerce mitokondri bulunur. Bu yüzden, mitokondriyal DNA sayısı çok fazladır ve genellikle elde edilmesi çok kolaydır.
2. mt DNA'nın çoğaltılması saklanmış örneklerde ve bu örneklerin bulunduğu uygun olmayan koşullarda bile kolaydır.
3. mt DNA hücre DNA'sından çok daha küçüktür ve evrimsel gelişmesi daha hızlıdır.
4. mt DNA geni sadece anne tarafından aktarılan bir gendir ve bu durum mt DNA'yı çeşitli organizmaların populasyon yapısı ve filogenetik çalışmaları için güçlü bir mekanizma haline getirmiştir.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz alt birim 1 (COI) geni, moleküler sistematik için kullanılan en popüler markırlardan biridir, Bu genin fragmanları genellikle akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak için kullanılır (Behura vd. 2006).

Sistematik entomolojide en eski ve önemli sorunlardan biri takımlar arasındaki yakınlıkları ve onların kökenlerini saptamaktır. Homolojik yapıların karşılaştırılmasındaki güçlükler, morfolojik yapıların ayırt edilmesinde karşılaşılan zorluklar, genital organ yapılarının küçük ve diseksiyona dayanıksız olması ve tür içi varyasyonlar sistematikçileri moleküler biyolojinin daha gelişmiş çözümler sunan yaklaşımlarını uygulamaya yöneltmiştir. Küçük karşılaştırmalı nükleer gen bölgeleri olan 18S ve 28S, bazı histon alt üniteleri, mitokondriyal genlerin bazı parçaları (COI, COII, cytB, 16S ve 12S) ve bazı gelişim genleri (Wg-Kanat, Hox) arthropodları

karşılaştırmalı olarak analiz etmeye yarayan işlevsel gen bölgeleridir (Ballard vd. 2004; Güz ve Kılınçer, 2012).

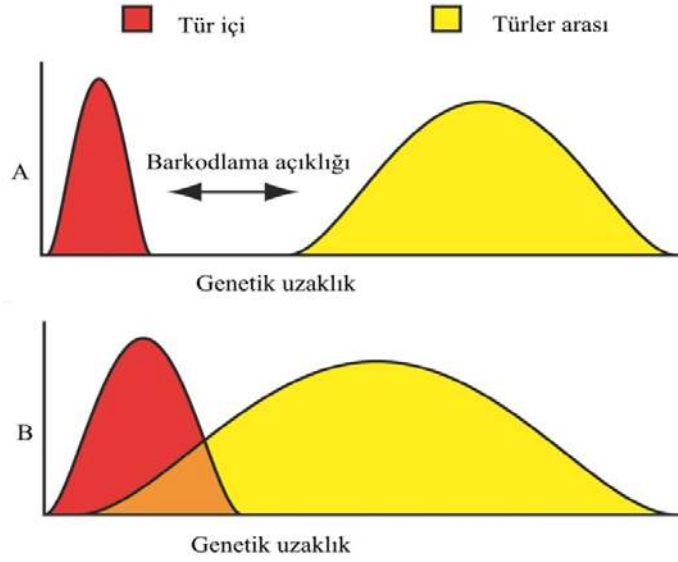
Filogenetik yakınlığı belirlemek için evrimsel olarak korunmuş bölgelerin çoğaltılması ve çeşitli bilgisayar programlarıyla bu bölgelerin dizilerinin karşılaştırılması günümüz moleküler biyoloji ve filogenetik çalışmalarında esas alınmıştır. Geçtiğimiz 30 yıldan bu yana popülasyonlar ve türlerin evrimsel ilişkilerini ortaya koymak için mitokondriyal gen bölgeleri kullanımı yaygınlaşmıştır. Hayvanlarda mitokondriyal gen bölgeleri arasında evrimsel olarak iyi korunmuş bölgelerden biri de sitokrom oksidazdır (Brown, 1985)

Genellikle 14000-17000 baz çifti uzunluğunda olan mitokondriyal genom metazoa için en korunmuş bölgedir. Bu büyüklük bütün olarak analiz etmekte zorluklar oluştursa da böcek filogenetiğini ortaya koymak için tek tek gen bölgelerinin analizi mümkündür (Cywinyłca vd. 2010).

Mitokondrinin en önemli bileşenlerinden sitokrom c oksidaz enziminin amino asit dizisi de günümüzde birçok organizma için çalışılmıştır. Çarpıcı şekilde sitokromların 70'ten 80'inci pozisyona kadar aynı amino asitlere sahip olduğu görülmüştür. Sitokrom c evrimsel olarak hemoglobin, fibrinin gibi diğer proteinlerden daha konservatiftir. Sitokrom c'nin amino asit translasyonunu gerçekleştiren nükleotid zinciri boyunca meydana gelen değişikliklerin yerini de işlevsel olarak benzer amino asitler tamamlamıştır. Değişikliklerin çoğu nötral mutasyonlardan oluşmuştur (Yalçın, 2012)

Hebert vd. (2003)'te standart sitokrom c oksidaz subunit I'in Kanada kökenli Tabanidlerin identifikasyonunda çok iyi çalıştığını göstermiştir. Yaşamın barkodlanması (The Barcoding of Life) projesinin önde gelen çalışanlarından Hebert ve arkadaşları hayvan türlerinin sınıflandırılmasında sitokrom oksidaz alt ünite I (COI) dizilerinin kümeleme ile hizalandıktan sonra komşu bağlama (neighbor joining, NJ) yöntemiyle analiz edilmesinin etkili ve uygun bir yol olduğunu ortaya koymuşlardır (Hebert ve ark., 2003). NJ, dizilerin dallanması çok düşük olduğunda tür seviyesindeki filogeniyi düzenleyebilmek için uygundur (Cywinyłca vd. 2010).

Tür seviyesinde dallanmalar çok düşük değerlerde olduğunda homoplasiyi azaltmayı amaçlayan en iyi metrik yöntem olan Kimura 2 parametresinin NJ analizinde kullanılması uygundur (Cywinylca vd. 2010).



Şekil 1.5 DNA barkodlamanın tür içi ve türler arası genetik uzaklık varsayımlarına göre dağılım frekansları. (a) tür içi ve türler arasındaki varyasyonun ayrı dağılımından doğan DNA barkodlama açıklığı, (b) tür içi varyasyonun ve türler arası varyasyonun çakışma nokta dağılımı sonucu DNA barkodlama açıklığının bulunmaması (Meyer ve Paulay, 2005).

COI geninin standart bir primer ve belirteç olarak benimsenmesinin çıkan sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank ve BOLD (Barcode Of Life Data Systems) gibi geniş çaplı ve halka açık veri tabanlarına da yansımıştır. DNA Barkodlama geninde standart olarak diziler gerçekleştirildikten sonra GenBank ve BOLD gibi veri tabanlarına COI gen dizilerinin girişinde büyük bir artış görülmüştür. Bu veri çeşitliliği ve yoğunluğu, G-C değişimleri gibi nükleotid kompozisyonadaki evrimsel değişimler de dâhil olmak üzere hayvanlar, bitkiler ve mantarlardaki birçok moleküler evrimsel hipotezin incelenmesine olanak sağlamıştır (Keskin ve Atar, 2013).

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan 7 ayrı ilden (Amasya, Çorum, Kahramanmaraş, Kayseri, Samsun, Sinop, Yozgat) farklı zamanlarda toplanmış meyve sinekleri (Diptera: Tephritidae) türlerinden olan *Euaresta bullans* populasyonlarının mitokondrial COI geni kullanarak DNA dizilerini incelemek, populasyonlar arasında gen akışının olup olamdığını belirlemek, coğrafik yayılış açısından etkilenme derecesi ve gen aktarmanın durumu hakkında bilgileri ortaya koymaktır. *Euaresta bullans* taksonuna ait uluslararası veri bankalarında (Genbank) DNA barkod kaydı oluşturmaktır.



BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya üzerinde yayılış gösteren birçok canlı türü tanımlanmış olmasına rağmen günümüzde henüz tanımlanmamış türler bulunmaktadır. Böceklerin gerçekleştirilen bazı analizler ekolojik ölçekte elde edilen verilerden ziyade taksonomistlerin hesaplamalarından elde edilen tahminler veya bölgesel örneklemelerden çıkan bilince dayalı tahminler yönündedir ve buna göre böceklerin tür sayısı 4-6 milyon arasında değiştiği görülmektedir. (Gök, 2012). Tür tanımlama, biyoçeşitliliği anlamının ve tanımlamanın en temel bileşenlerinden biridir. Özellikle son yıllarda biyoçeşitliliğe artan ilgi türlerin güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. İlk bilim adamlarından bu yana geleneksel olarak, tür tanımlama morfolojik teşhislere dayanmaktadır. Ancak tanımlama işlemi sırasında bilim adamının subjektif gözlemleri zaman zaman elde edilen verilerin doğruluğuna gölge düşürmektedir. DNA dizileme teknolojilerindeki gelişmeler ve azalan maliyet ile birlikte türlerin doğru, hızlı ve kolayca tanımlanması mümkün olabilmektedir. DNA'ya dayanan taksonomi metodu olarak bilinen barkodlama, özellikle son yıllarda türlerin tanımlanmasında ve yeni türlerin keşfinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kriptik türlerin tanımlanması da yine DNA barkodlama sayesinde elde edilen bilgiler ışığında gerçekleşmektedir (Hajibabaei vd. 2006)

Özellikle Diptera takımı ve Tephritidae familyasının populasyon yapılarını anlamaya yönelik DNA barkod çalışmaları son yıllarda oldukça fazla çalışılan bir konudur. Aşağıda, Tephritidae familyası ve Diptera takımı ile ilgili yapılmış DNA barkod ve populasyon yapılarına dair çalışmalarla ilgili literatür bilgileri sunulmuştur.

Malacrida vd. (1998), çalışmalarında Afrika, Akdeniz adaları, Akdeniz Bölgesi, Latin Amerika, Pasifik ve Avustralya bölgelerinden elde edilen toplam 17 populasyon üzerinde çalışma yürütmüşlerdir. Elde edilen genetik verilerine göre

Ceratitis capitata'nın Doğu ve Güney Afrika'daki atalarının popülasyonları yakın geçmiş zamanda birkaç popülasyonun ortaya çıkmasına sebep olduğunu saptamışlardır. Afrika-Akdeniz bölgesinde mesafeye göre izolasyon hiyerarşik bir göç yapısı ile uyumlu olduğunu öte yandan, Latin Amerika ve Pasifik'te ise popülasyon yapısı daha sonraki genişlemelere takiben birkaç coğrafi olarak ayrılmış kolonizasyondan oluştuğunu öne sürmüşlerdir.

Jamnongluk vd. (2002), *Bacterocera tau* tür kompleksi içerisindeki türlerin Mitokondrial COI geni dizilimlerini kıyaslamışlardır. Çalışma sonucunda, *Bacterocera tau* türleri arasında sekans dizileri mesafesi 0.06 ile %28 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda *B. tau* kompleksi ile dış grup (*Ceratitis capitata* ve *Bacterocera dorsalis*) arasında sekans dizi mesafesi %29 olarak belirlenmiştir.

Smith vd. (2002), mitokondriyal 16S ve 12S rRNA ve CO II + tRNA^{Lys} + tRNA^{Asp} genlerini kullanarak 16 *Dacini* türü dahil olmak üzere 34 meyve sineği türünün filogenetik analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda *Dacus* ve *Bactrocera*'nın her birinin monofiletik gruplar olduğunu ortaya koyarak elde edilen sonuçların genellikle morfolojiye dayanan sınıflandırma ile uyumlu olduğunu ortaya koymuşlardır.

De Meyer vd. (2005), çalışmasında COI primeri kullanarak Diptera takımın içeren 449 tür için DNA barkod araştırması yapmış ve bu çalışmada barkodlamanın tür tanımlaması için kullanılabilirliğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmanın Sonucunda barkodlama ile tür içi ve türler arası yanlış tanımlamaların giderildiğini savunmuşlardır.

Fakhri (2008), tarafından yapılan çalışmada İran'ın 15 farklı yöresini temsil eden işçi arı kullanılmıştır ve DNA analizi yapılmıştır aynı zamanda çalışmanın sonucunda iki farklı haplotip elde edilmiştir.

Mengual vd. (2008), çalışmalarında *Volucella pellucens* türünü grup dışı olarak kullanmış ve Pipizini (Eristalinae) kabilesinin temsilcileri de benzer larva besleme modu ile de dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Toxomerini kabilesinin *Ocyptamus* ve *Eosalpingogaster* cinsleri ile monofiletik olduğu ancak bu cinsler ile aynı kabile'de değerlendirildiği ortaya çıkarılmıştır. Geleneksel olarak Syrphini kabilesi içerisinde yer alan bazı cinslerin bu grubun dışında olduğu ve diğer kabile ve

cinsler ile kardeşliği ortaya konmuştur. Bunun dışında Bacchini kabilesi birkaç farklı kabileye dönüştürülmüştür. Paragini kabilesi monofiletik bir grup olarak belirlenmiş ve *Allobaccha* cinsinin kardeş grubu olduğu kaydedilmiştir. Mevcut sonuçlar değerlendirildiğinde, Syrphinae'ın alt familyasının yeniden sınıflandırılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Rivera ve Currie (2009), Simuliidae familyasında veya karasineklerde 615bp sitokrom c oksidaz I (COI) fragmanının etkinliğini DNA barkodu olarak test etmiştir. Familyaya yönelik bir ön barkod profili oluşturmak için 255 tanımlanmış Nearktik karasineği türünün tür komplekslerindeki türler arasından toplam 65 (% 25) adet tür kullanılmıştır. Familya içerisindeki türler arası genetik ayrışma ortalama % 14.93 (dağılım 2.83-15.33) olarak belirlenmiş, morfolojik olarak farklı türler arasında intraspesifik genetik ayrışma ortalama % 0.72 (dağılım% 0-3.84) olmuştur. DNA barkodları, morfolojik olarak farklı türlerin neredeyse % 100'ünü (toplam örneklenmiş taksonların % 87'si) doğru bir şekilde tanımlarken, tür komplekslerinde (örneklenen taksonların % 13'ü) maksimum sapma değerleri nispeten daha yüksek olarak (maks.% 4.58 - 6.5) belirlenmiştir ki bu durum kriptik türlerin çeşitliliğini göstermiştir. Çalışma sonucunda, DNA barkodlamanın Simuliidae türlerindeki kriptik çeşitliliği tanımlaması ve keşfi için etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Virgillio vd. (2009), *Dacus* türlerinin Afrika'daki 32 temsilcisi ile yapmış oldukları moleküler temelli çalışmada iki mitokondriyal gen bölgesi (COI, 16S) ve bir nükleer gen bölgesi ile 32 türün filogenetik akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmışlardır. Bunun yanı sıra türlerin konukçu bitki tercihlerinin de filogenetik akrabalık durumları ile olan ilişkilerini kıyaslamışlardır.

Zhang vd. (2010), çalışmalarında *Bacterocera* türlerinin 16S rDNA ve COI gen bölgelerini kullanarak filogenetik analizi yapmışlardır. Analiz sonuçları, nükleotit çeşitliliği alt cinsler arasında % 9,1 ile 19,0 arasında değiştiğini göstermiştir aynı zamanda net ayrışma alt cinsler arasında % 4,6 ila% 12,7 arasında değiştiğini göstermiştir. Maksimum parsimoni yöntemine dayanan filogenetik analizlerin sonuçlarına göre, *Bactrocera* ve *Zeugodacus* alt cinslerinin parafiletik olduğunu desteklemiştir.

Ludena vd. (2010), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) Andean-Ecuadorian bölgesi popülasyonlarının COI ve COII (Sitokrom Oksidaz I için 405 baz çifti ve Cytochrome Oxidase II için 224 baz çifti) çıkarılarak filogenetik ilişkilerini ortaya koymuştur. Filogenetik ilişkiler, Maximun parsimoni (MP) yöntemi ve haplotip ağları kullanılarak çıkarılmıştır. *A. fraterculus*'un Ekvador-Ekvador popülasyonu COI bölgesi için monomorfi bulunmuş ve *A. fraterculus*'un Güney Amerika ova popülasyonları dizisine girdiği ortaya çıkmıştır. COII lokasyonunda *A. fraterculus*'in Ekvador popülasyonlarında değişkenliği büyük bir haplotip göstermektedir. Her bir haplotip bir bazda değişiklik göstermiş ve Andean-Ecuadorian bölgesinden *A. fraterculus*'un dokuz haplotipi belirlenmiştir.

Virgilio vd. (2010), çalışmalarında altı böcek takımının (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera ve Orthoptera) 15.948 DNA barkoduna sahip geniş bir veritabanı üzerinde simülasyonlar yaparak böcek DNA barkodunun ve "mini barkodun" genel bir değerlendirmesini yapmışlardır. Çalışma sonucunda, takımlar arasında önemli farklılıkların olduğu görülmüştür ve en yüksek farklılıklar Hymenoptera ve Orthoptera arasında tespit edilirken en düşük farklılıklar Diptera takımı arasında tespit edilmiştir.

Li vd. (2011), Güney Çin ve Güney-Doğu Asya'da Laos ve Myanmar'dan 15 farklı bölgesinden toplanan *Bactrocera dorsalis* popülasyonlarının mitokondriyal DNA COI geni (640 baz çifti) analiz edilmiştir. En fazla genetik çeşitlilik Laos ve Myanmar bölgelerinden tespit edilmiştir. Ayrıca anakara Çin'deki bazı *B. dorsalis* popülasyonlarının arasında yüksek genetik çeşitlilik ve önemli farklılıklar gösterdiği bölgede uzun süre izole popülasyon olarak korunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Barr vd. (2012), mitokondriyal DNA COI geni kullanarak *Ceratitis capitata*'nın (Diptera: Tephritidae) moleküler sınıflandırmasını yapmıştır. Çalışmada *Ceratitis* cinsine ait 44 türü mitokondriyal COI gen bölgesine göre kıyaslayarak *C. capitata* türünün hem tür içi hem de türler arası benzerlik oranlarını değerlendirmişlerdir. Morfolojik benzerlik gösteren örneklerin Mitokondriyal COI gen bölge karşılaştırmaları sonucunda *C. capitata* türünün *C. caetrata* türü ile % 99 benzerlik gösterdiği ortaya koyulmuş ve bu iki türün ayrımı için farklı gen bölgeleri üzerinde çalışılması gerekliliği belirtilmiştir.

Jordaens vd. (2012), çalışmalarında 56 Avrupa *Sarcophaga* türüne ait 126 birey kullanılarak moleküler sınıflandırma yapmıştır. Çalışmada, 127 baz çiftlik mini-barkod bölgesinin *Sarcophaga* türlerini tanımlamak için yetersiz olduğu (80.7–82.5 %) ortaya çıkarılmıştır. Ancak 658 baz çifti kullanılmasıyla (98.2–99.3 %) başarı elde edilmiştir.

Lim vd. (2012), Malezya ve Endonezya'dan toplanan *Bactrocera caudata* türünün (Diptera: Tephritidae) COI ve 16S DNA dizileri ile genetik analizini yapmıştır. Her iki gen bölgelerinden elde edilen sekans sonuçlarına göre aralarında ortak bir haplotip olmadığı gösterilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda, çalışma yapılan populasyonların iki farklı genetik soy olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Prabhakar vd. (2012), Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) populasyonlarının genetik yapısını Mitokondriyal sitokrom oksidaz (COI) gen sekanslarına dayanarak ortaya çıkarmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sekans sonuçlarına göre anlamlı bir farklılığın olmadığı ve çok küçük varyasyonların saptandığını belirtmişlerdir.

Yalçın (2012), Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan Tabanidae türlerinin COI gen bölgesi kullanarak filogenetik analizini yapmıştır. Analiz sonuçlarına göre morfolojik olarak da birbirinden ayırt edilmesi zor olan iki tür arasında 90% bootstrap değeriyle aynı dalda bulunmuşlardır.

Smit vd. (2013), Avrupa'da yayılış gösteren meyve sineği türlerinin (Diptera, Tephritidae) yarısının barkodlanarak moleküler tanımlaması amacı ile yapmış olduğu fizibilite çalışmasında Meyve sineklerinden 42 cinse ait 135 türün analizini yapmıştır. Çalışma sonucunda COI barkod dizilerine dayalı benzerlik ve mesafeler analiz edilerek çalışmada kullanılan tüm türlerin %73,3 başarı ile ayrıştığı gözlenmiştir. Özellikle *Terellia* ve *Urophora* cinsleri gibi problemli cinslerdeki tek nükleotit polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) nedeni ile başarı oranı düşük çıkmıştır. SNP'ler çıkarıldığında başarı oranı %87,1 olarak belirlenmiştir.

Mayra vd. (2014), *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)'ın Meksika populasyonlarının genetik yapısı üzerine yapmış oldukları çalışmada, Meksikanın altı farklı bölgesinden toplanan *A. ludens* populasyonlarının farklılaşma düzeyleri ile

genetik farklılıkları orta seviyede olduğu sonucu elde edilmiştir. Genetik yapının coğrafik mesafe açısından, populasyonlar arasında bağlantılı olmadığı belirlenmiştir.

Tusan (2016), çalışmasında Doğu Akdeniz'in farklı bölgelerinden toplanan *Ceratitis capitata* türünün moleküler sistematik analizi yapılmıştır. Çalışılan örneklerden toplam 7 haplotip elde edilmiştir ve haplotiplerin bölge farklılıklarına göre gen akışları belirlenmiştir.

Krosch vd. (2015), *Dacini* ırkının 125 temsilcisi ile yapmış oldukları çalışmada 16S, COI, COII ve beyaz göz geni ile çalışmada kullanılan türlerin akrabalık ilişkilerini anlamaya çalışmışlardır. *Zeugodacus* alt cinsini *Bactrocera* ve *Dacus* cinslerinden ayırarak farklı bir cins olduğunu ve *Dacus*'un Afrika'ya taşınmasından önce ayrılan bir cins olduğunu kanıtlamışlardır.

Ünal (2016), çalışmasında DNA dizi analiz yöntemlerinden yararlanılarak Türkiye'nin Trakya bölgesinin il ve ilçelerinde yetiştirilen bal arısı populasyonları arasındaki genetik varyasyonun mtDNA (COI) geni kullanarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda üç farklı haplotip elde edilmiştir.

Jiang vd. (2016), *Dacus longicornis*'in (Diptera: Tephritidae) ilk kez mitokondriyal genomunun tamamını elde ederek yeni nesil dizileme ile *Dacini* kabilesinin filogenisini ortaya koymuştur. Çalışmada *D. longicornis*'in mitogenom verileri, diğer tephritid türlerinin yayınlanmış tüm homolog dizileriyle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda filogenetik analiz sonuçlarına göre *Zeugodacus* ile *Dacus* arasında yakın bir filogenetik ilişki elde edilmiştir. Ayrıca dairesel 16233 bazçiftlik mitogenom diğer atasal böcek gruplarında olduğu gibi 37 gen bölgesi içermektedir.

Souza vd. (2016), Coreidae ve Pentatomidae (Heteroptera) familyalarındaki Mitokondriyal COI geninin kullanmasıyla evrimsel çıkarımlar analizi yapmış ve bu familyalara ait türleri kullanarak bilgilendirici filogenetik çıkarımlar yapma potansiyellerini değerlendirmiştir.

Manger vd. (2017), çalışmalarında *Bactrocera* cinsine ait 10 türün DNA barkod dizilerine göre genetik analizlerini yapmışlardır. Çalışma sonucunda, türler arasındaki genetik sapmanın % 0 – 21,9 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Akar (2018), tarafından yapılan çalışmasında Şanlıurfa ilinden toplanan 4 populusyona ait 35 *Phlebotomus papatasi* örneğinde mtDNA COI analizi yaparak, 6 değışken bölge ve 6 haplotip tespit edildiğı bildirilmiştir.

Mammadova (2018), Çalışmasında Gaziantep ilinden toplanan *Xysticus* (Thomisidae) cinsine ait örümceklerde morfolojik ve moleküler araştırmalar yapmışlar. Örümceklerin morfolojik çalışmaları sonucunda cinse ait 5 tür tanımlanmıştır ve örneklerden 2 gen bölgesi (mitokondrial COI ve nükleer ITS) kullanılarak moleküler olarak analiz edilmiştir. Tür içi ve türler arası benzerlik oranı hesaplanmıştır.

Sudiarta vd. (2018), *Bactrocera occipitalis* (Diptera:Tephritidae) türünün mitokondriyal sitokrom C oksidaz 1 (COI) geni kullanarak moleküler tanımlamasını yapmışlardır. Çalışmada Filipinler ve Endonezya'nın farklı bölgelerinden toplanan *B. occipitalis* türünün morfolojik tanımlaması ve sekans benzerliği kıyaslanmıştır. Filogenetik analizlere göre örneklerin farklı bölgelerden toplanmış olmalarına rağmen *B. occipitalis*'in populusyonları arasında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.

Krosch vd. (2018), yaptıkları çalışmada meyve sineklerinin barkodlarının genişletilmesi ve kullanılan COI primerlerinin geliştirilmesi amacıyla özellikle *Bactrocera* cinsinin alt gruplarındaki türlerin benzerlik oranlarına bakılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Örneklerin Elde Edilmesi

Euaresta bullans, meyve sinekleri (Diptera: Tephritidae) familyasının Tephritinae alt familyasına ait Tephritini kabilesi içerisinde yer alan ve Palearktik bölge de geniş yayılış gösteren türlerinden biridir. Ülkemizin farklı bölgelerinden yapılan faunistik ve sistematik temelli çalışmalarda *E. bullans* türünün birçok bölgeden kaydı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, 2003 - 2018 yılları arasında ülkemizin farklı illerinden (Amasya, Kahramanmaraş, Samsun, Sinop, Kayseri, Çorum ve Yozgat) toplanmış ve Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Laboratuvarında bulunan standart müze materyali olarak içnelenmiş *E. bullans* örnekleri ve %99'luk alkolde oda sıcaklığında muhafaza edilen *E. bullans* örnekleri kullanılmıştır.

Çalışma konusunu oluşturan *Euaresta bullans* örnekleri farklı araştırmacılar tarafından toplanmıştır. Amasya, Çorum, Kahramanmaraş, Samsun ve Sinop illerinden Görmez (2011 - 2018) tarafından; Kayseri ilinden Kütük (2005) tarafından; Yozgat ilinden Torbalı (2018) tarafından toplanan örnekler bu çalışmada kullanılmıştır.

Örneklerin teşhisleri stereo mikroskop altında morfolojik karakterleri incelenerek Freidberg ve Kugler, (1989) ve Kütük (2003) kaynaklarından yararlanılarak yapılmıştır.

Ergin *E. bullans* örnekleri *Xanthium spinosum* L. bitkisi üzerinden atrapla toplandıktan sonra etil asetatlı öldürme şişeleri (5 dk) içerisinde öldürülmüştür. Elde edilen örnekler laboratuvara getirilerek üçgen kağıtlar üzerine yapıştırılmış ve oda koşullarında böcek muhafaza dolaplarında muhafaza edilmiştir. 2018 yılı içerisinde Çorum ilinden toplanan örnekler araziden toplandıktan sonra etil alkol (99%)' de muhafaza edilmiştir.

Arazi çalışmaları sırasında *Euaresta bullans*'ın toplandığı istasyonların il, ilçe, koordinat, yükseklik ve tarih bilgileri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan *Euaresta bullans* erginlerinin toplandığı lokaliteler

Örnek kodu	İl	İlçe/Mevki	Toplanma tarihi	Rakım	Koordinat
EB1 ♂	Amasya	Göynücek/Kertme	01/07/2017	855 m	N:40°27' E:35°27'
EB2 ♂	Amasya	Göynücek/Kertme	01/07/2017	855 m	N:40°27' E:35°27'
EB4 ♂	Amasya	Göynücek/Kertme	01/07/2017	855 m	N:40°27' E:35°27'
EB5 ♀	Amasya	Göynücek/Kertme	01/07/2017	855 m	N:40°27' E:35°27'
EB6 ♂	Amasya	Gömüşhacıköy/sarıköy	15/06/2017	720 m	N:40°51' E:35°23'
EB7 ♂	Amasya	Gömüşhacıköy/sarıköy	15/06/2017	720 m	N:40°51' E:35°23'
EB8 ♂	Amasya	Gömüşhacıköy/sarıköy	15/06/2017	720 m	N:40°51' E:35°23'
EB9 ♀	Amasya	Gömüşhacıköy/sarıköy	15/06/2017	720 m	N:40°51' E:35°23'
EB10 ♂	Amasya	Taşova/Dutluk	01/07/2017	255 m	N:40°44' E:36°17'
EB11 ♂	Amasya	Taşova/Dutluk	01/07/2017	255 m	N:40°44' E:36°17'
EB12 ♂	Amasya	Taşova/Dutluk	01/07/2017	255 m	N:40°44' E:36°17'
EB13 ♂	Amasya	Taşova/Dutluk	01/07/2017	255 m	N:40°44' E:36°17'
EB14 ♀	Amasya	Taşova/Dutluk	01/07/2017	255 m	N:40°44' E:36°17'
EB15 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB16 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB17 ♂	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB18 ♂	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB19 ♂	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB20 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB21 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB22 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB23 ♂	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB24 ♂	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB25 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'

Tablo 3.1 Davam

EB26 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB27 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB28 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB29 ♀	Çorum	Sungurlu/Çayan	23/06/2018	850 m	N:40°22' E:34°15'
EB30 ♂	Kahraman maraş	Andırın/Merkez	08/07/2010	940 m	N:37°33' E:36°21'
EB31 ♂	Kahraman maraş	Andırın/Merkez	08/07/2010	940 m	N:37°33' E:36°21'
EB32 ♂	Kahraman maraş	Andırın/Merkez	08/07/2010	940 m	N:37°33' E:36°21'
EB33 ♀	Kahraman maraş	Çağlayancerit/Merkez	15/06/2010	960 m	N:37°37' E:37°29'
EB34 ♂	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB35 ♂	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB36 ♂	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB37 ♂	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB38 ♂	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB39 ♀	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB40 ♀	Kahraman maraş	Bozlar/Merkez	16/07/2010	930 m	N:37°41' E:37°26'
EB41 ♀	Kahraman maraş	Göksun/Merkez	18/07/2009	1340 m	N:38°01' E:36°29'
EB42 ♀	Kahraman maraş	Göksun/Beli yaylası	19/07/2009	1606 m	N:37°51' E:36°24'
EB43 ♂	Kahraman maraş	Göksun/Doğankonak	23/07/2010	1600 m	N:38°15' E:36°26'
EB44 ♂	Kahraman maraş	Göksun/Kanlıkavak	24/07/2010	1416 m	N:38°06' E:36°38'
EB46 ♂	Kahraman maraş	Göksun/Kızılöz	18/07/2010	1700 m	N:38°01' E:36°40'
EB48 ♂	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB49 ♂	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB52 ♂	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB53 ♂	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB54 ♂	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB56 ♀	Kayseri	Yahyalı/Yeşilköy	06/07/2005	1020 m	N:37°55' E:35°31'
EB57 ♂	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'
EB58 ♀	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'

Tablo 3.1 Davam

EB59 ♂	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'
EB60 ♀	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'
EB61 ♀	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'
EB62 ♂	Samsun	Bafra/Kabaçukur	18/08/2017	123 m	N:41°19' E:35°50'
EB 63 ♂	Samsun	Ladik/Merkez	30/07/2017	894 m	N:40°54' E:35°54'
EB64 ♂	Samsun	Ladik/Merkez	30/07/2017	894 m	N:40°54' E:35°54'
EB65 ♀	Samsun	Ladik/Merkez	30/07/2017	894 m	N:40°54' E:35°54'
EB66 ♂	Samsun	Ladik/Merkez	30/07/2017	894 m	N:40°54' E:35°54'
EB68 ♂	Samsun	Vezirköprü/Yukarınarlı	14/06/2003	355 m	N:41°10' E:35°15'
EB69 ♂	Samsun	Vezirköprü/Yukarınarlı	14/06/2003	355 m	N:41°10' E:35°15'
EB72 ♀	Samsun	Vezirköprü/Yukarınarlı	14/06/2003	355 m	N:41°10' E:35°15'
EB75 ♀	Samsun	Vezirköprü/Yukarınarlı	14/06/2003	355 m	N:41°10' E:35°15'
EB76 ♂	Samsun	Vezirköprü/Yukarınarlı	14/06/2003	355 m	N:41°10' E:35°15'
EB78 ♂	Sinop	Boyabat/Gökçeğaçsa kızı	14/06/2017	462 m	N:41°36' E:34°35'
EB81 ♀	Sinop	Boyabat/Gökçeğaçsa kızı	14/06/2017	462 m	N:41°36' E:34°35'
EB83 ♀	Sinop	Boyabat/Gökçeğaçsa kızı	14/06/2017	462 m	N:41°36' E:34°35'
EB85 ♂	Sinop	Durağan/Aşağıkaracaö ren	14/06/2017	200 m	N:41°24' E:35°05'
EB86 ♂	Sinop	Durağan/Aşağıkaracaö ren	14/06/2017	200 m	N:41°24' E:35°05'
EB87 ♂	Sinop	Durağan/Aşağıkaracaö ren	14/06/2017	200 m	N:41°24' E:35°05'
EB88 ♀	Sinop	Durağan/Aşağıkaracaö ren	14/06/2017	200 m	N:41°24' E:35°05'
EB93 ♂	Yozgat	Akdağmadeni/Bulgurlu	28/06/2017	1430 m	N:39°48' E:35°53'
EB94 ♂	Yozgat	Akdağmadeni/Bulgurlu	28/06/2017	1430 m	N:39°48' E:35°53'
EB95 ♂	Yozgat	Akdağmadeni/Bulgurlu	28/06/2017	1430 m	N:39°48' E:35°53'
EB97♀	Yozgat	Merkez/Evci	19/06/2018	1192 m	N:39°51' E:34°42'
EB98♂	Yozgat	Merkez/Evci	19/06/2018	1192 m	N:39°51' E:34°42'
EB102♂	Yozgat	Sorgun/ Doğankent	28/06/2017	1090 m	N:39°41' E:35°23'
EB104♂	Yozgat	Sorgun/ Doğankent	28/06/2017	1090 m	N:39°51' E:34°42'
EB105♂	Yozgat	Sorgun/ Doğankent	28/06/2017	1090 m	N:39°51' E:34°42'

3.2 Metod

3.2.1 Örneklerin Hazırlanması

Örnekler Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Laboratuvarında bulunan böcek dolaplarından çıkardıktan sonra pens yardımıyla stereo mikroskop altında kanatları ayrılıp kodlanan ependorf tüplerine bırakılmış ve aynı işlemler 99% alkol içerisinde bulunan örnekler içinde yapılmıştır. Ependorf tüpleri üzerine her örneğin kodu ve cinsiyeti yazıldıktan, sonra ependorf tüplerine yerleştirildikten sonra DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.1 Laboratuvar Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Absolute etanol (99%), dNTP set, Primerler, Proteinaz K, DNA ladder, Tris, Tris-HCL, EDTA Agaroz, Etidyum bromür, Borik asit, MgCl₂, Taq Polimeraz, Yükleme Tamponu (6X) ve hepsi kullanılan kimyasallar (Qiagen, Sigma, Merck, Almanya) tarafından yapılmıştır.

3.2.1.2 Laboratuvar Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Laboratuvar çalışmaları sırasında aşağıda sıralanan cihazlar kullanılmıştır; Homojenizatör (Şekil 3.1a), İnkübatör, Derin dondurucu, Hassas Terazî (Şekil 3.1c), Mikrodalga fırın, Otoklav, Su saflaştırma cihazı, Otomatik pipetler, Santrifüjler (küçük, büyük) Güç kaynağı, Spektrofotometre (Nanodrop, ND- 1000), Vorteks, Yatay elektroforez sistemi cihazı ve Jel görüntüleme sistemi (Şekil 3.1b).



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar a) Homojenizatör, b) UV cihazı ve Bilgisayar, c) Isıticılı manyetik karıştırıcı

3.2.2 Moleküler Çalışmalar

Morfolojik olarak teşhisleri yapılmış örnekler ve böcek dolaplarında muhafaza edilen örnekler ile % 99 luk etil alkolde muhafaza edilen tüm *Euaresta bullans* örneklerinin DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş daha sonra PZR çalışmaları da yapılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin DNA dizi analizleri (sekans) yapılmıştır. Dizi analizleri sonucu elde edilen veriler ilgili programlar kullanılarak işlenmiş ve filogenetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir

3.2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Laboratuvarında bulunan Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Handbook izolasyon kitinin protokolü kullanarak aşağıda verilen işlem sıraları sonucunda örneklerden DNA'lar izole edilmiştir.

1. Ependorf tüplerine böceğin tamamı (kanat hariç) eklenmiş içine iki bilye eklenerek (örneği tamamın parçalamak için) izole birinci adımına başlamıştır.
2. Ependorf tüplerine 180 µl ATL Buffer ilave edilerek 1 saat 35 dk. Homojenizatör'de parçalama işlemine tabi tutulmuştur.
3. Homojenizatörden alınan örneklerle 20 µl proteinaz K eklenmiştir ve vorteks (karıştırıcı) uygulanmış ve örnekler tamamen parçalanması amacıyla 56°C'de ayarlanmış etüvde 24 saat bekletilmiştir.
4. 24 saat etüvde bekletilen örnekler etüvden çıkarılarak ve her bir ependorf tüpü 15 saniye vortekslenmiştir.
5. Tüplere 200 µl Buffer AL eklenmiştir ve tekrar vortekslenmiştir.
6. Vortekslenen ependorf tüplere 200 µl etil alkol (96-100%) eklenmiştir ve tüpler yeniden vortekslenmiştir.
7. Daha sonra 2 mililitrelik DNeasy Mini spin kolonlara örnekler alınmış ve 8000 rpm'de (devri/dakika) 1 dk santrifüj edilmiştir. DNeasy Mini spin kolonların toplama tüpü atılmış ve süpernatantlar alınmıştır.
8. Yeni bir 2 ml' lik toplama tüpüne üstüne filtreli kısmı yerleştirilip 500 µl Buffer AW1 eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

9. Santrifüj sonrası yeniden spin kolonların toplama tüpü atılmış, filtreli kısmı yeni toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Her bir örneğin üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenmiş ve 14000 devir de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.
10. Sonra örneklerin yine filtreli üst kısmı uzaklaştırılmış ve 2 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur.
11. Örneklerin üzerine 100 µl Buffer AE eklenmiş ve 1 dk oda sıcaklığında (15-25 °C) bekletilmiştir. Sonrasında ise bu örnekler 8000 devirde 1 dk santrifüj edilmiş ve filtreli kısmı atılmıştır.
12. İzole edilen DNA' ları uzun süre saklamak amacıyla -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2 Spektrofotometrik Analizler

İzole edilen örneklerin DNA konsantrasyonunu ölçmek için spektrofotometre cihazı yardımıyla 260 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları okunmuştur. Örneklerin saflık değerleri ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunlukları oranlanarak belirlenmiştir.

3.2.2.3 Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz I (COI) bölgesinin PZR ile çoğaltılması

İstenilen nitelikte DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedeflenen mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz I ile bölgenin çoğaltılması PZR ile gerçekleştirilmiştir. Özgün primer yardımıyla PZR cihazında çoğaltılmıştır. PZR tekniği için fazlalaştırılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan saran bir çift sentetik primer, dNTP'ler (A, T, G ve C); sıcaklığa dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg²⁺) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

PZR tekniğinde ilk birkaç döngü türe özgü DNA parçalarının hedef DNA'da yapışacakları bölgeleri tarama fazıdır. Çoğalma daha sonra başlamaktadır. PZR tekniğinin tüm döngüleri bir önceki döngüde sentezlenen örneklerin bozulması (denatürasyonu) ile başlar. PZR tekniği ile çoğaltılan DNA bölgesi agaroz jel içerisinde yürütülebilir ve bantlar gözlemlenebilir. Hedef bölgelerinin çoğaltılmasında da yukarıda anlatılan PZR tekniği kullanılmaktadır. Bu durumda mtDNA bölgesine özgü hazırlanmış primerler denatüre olarak tek kollu hale getirilmiş DNA kitlesi içerisinde kendisine özgü komplementer bölgeye bağlanmakta

PZR süreci ile kontrol edebildiği uzunluktaki tek kollu molekülü çift kollu hale getirmektedir.

Bu primer belirli uzunluktaki DNA kitlesi içerisinde kendine bütünler daha doğrusu işlev görebileceği ne kadar komplementer bölge varsa hepsinde yükseltgenme işlevini sürdürmektedir.

PZR tepkimesi üç basamaktan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla: 1-) Denatürasyon, 2-) Bağlanma (Annealing), 3-) Uzama (Extension) aşamalarıdır.

Denatürasyon

Çift zincirli yapıda olan DNA'nın tek zincir formu haline gelebileceği basamaktır.

Bağlanma

Primerlerin bağlandığı basamaktır. Sıcaklık 50 ile 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır.

Uzama

DNA Polimeraz enzimi tarafından zincir uzamasının gerçekleştirildiği basamaktır. PZR üç basamaktan (denaturation, annealing, extension) oluşan bir işlemdir. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrarlanarak başlangıçtaki DNA molekülü milyonlarca parçacığa çoğalmasını sağlar. Çalışmamızda mtDNA COI gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer Folmer (1994), (Barrett ve Hebert, 2005), çalışmasından yararlanılmış olup dizileri (Tablo 3.2) verilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan Primer Dizileri

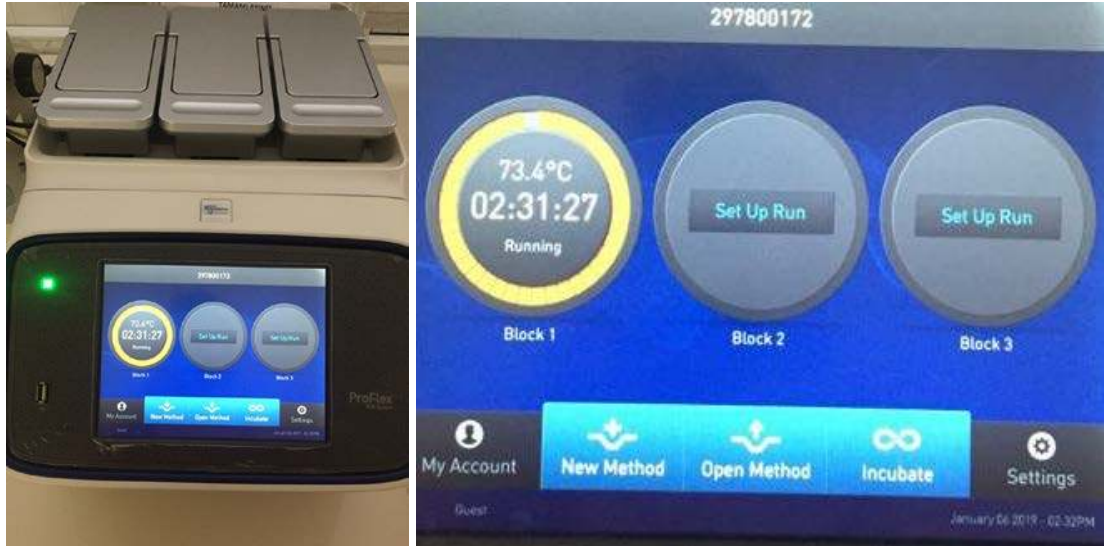
Gen	Kullanılan Primer Dizileri	PZR Ürününün Büyüklüğü
COI	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' (Folmer vd. 1994) 5'-GGATGGCCAAAAAATCAAAATAAATG-3' (Barrett ve Hebert, 2005)	655 bp

Tablo 3.3 PZR Reaksiyon İçeriği

Reaksiyon İçeriği	Miktar
ddH ₂ O	15,8 µl
10X Taq Buffer (KCl)	2,5 µl
dNTP mix	0,5 µl
2,5 mM MgCl ₂	2 µl
10 µmol İleri Primer	1µl
10 µmol Geri Primer	1µl
5U/1µl Taq Polimeraz Enzimi	0,12 µl
Genomik DNA	2 µl
Toplam Hacim: 25 µl	

Tablo 3.4 PZR Isı Döngüleri

Denatürasyon	96 °C’de	1 dakika
	94 °C’de	1 dakika
Döngü	55 °C’de	1 dakika
	72 °C’de	1,30 dakika
Sonlanma	72 °C’de	7 dakika
Döngü sayısı	35	

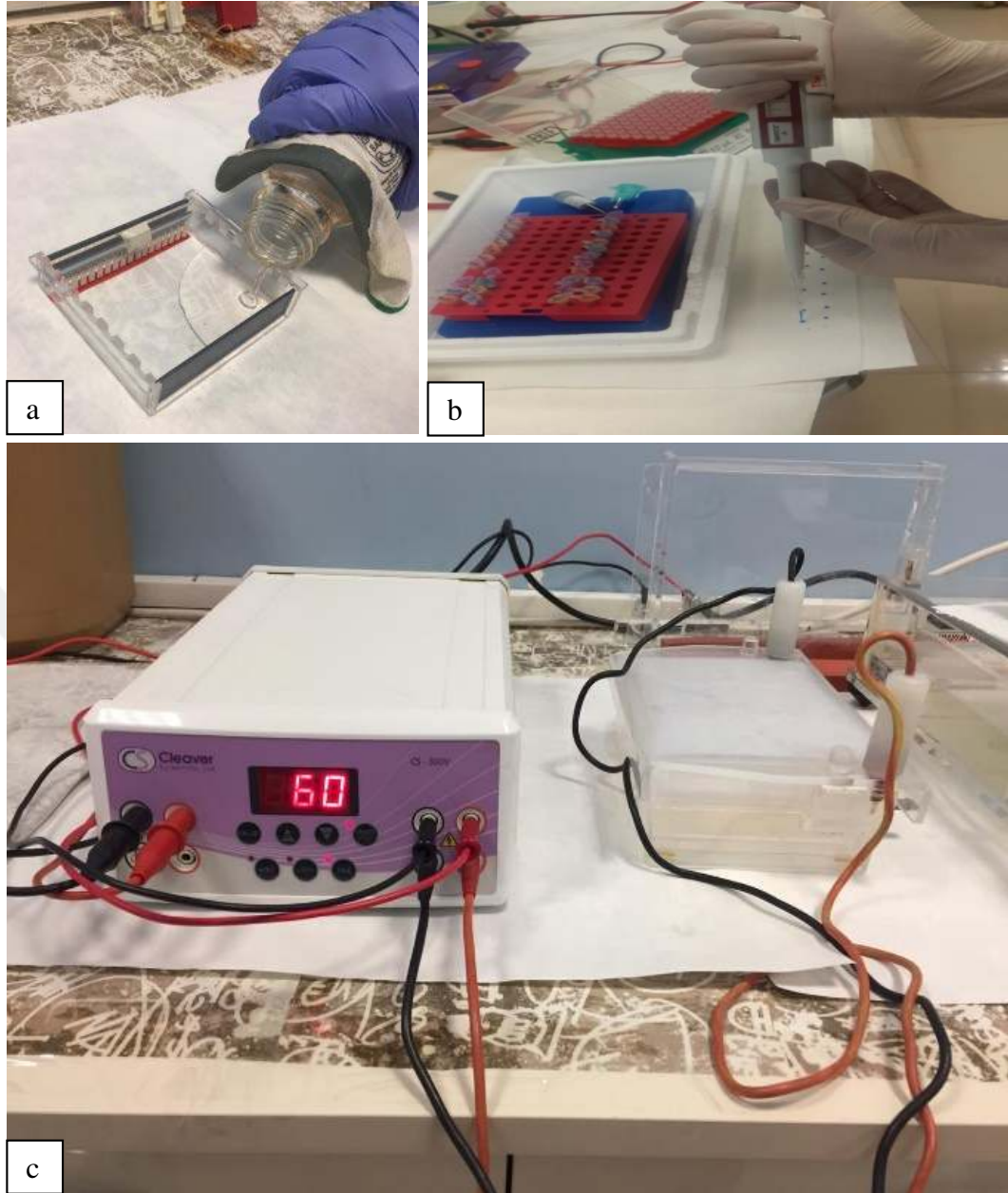


Şekil 3.2. PZR Cihazı ve cihaz ekranı; a) Cihazın genel görünümü b) Cihaz ekranı.

PZR ürünlerinin görülebilmesi için agaroz jel hazırlanmış ve jel donduktan sonra örnekler havuzlara yüklenmiştir. Bu amaçla agaroz jel 1xTBE tamponu içinde mikrodalga fırında kaynatılarak hazırlanmıştır ve 56 °C'ye soğutulduktan sonra DNA'nın görünür hale gelmesi için etidium bromürden 25 µl (10mg/ml) ilave edilmiştir. Etidium bromürün avantajları; daha güvenli, duyarlı, mikrodalgalara dayanıklı, daha uzun süre oda sıcaklığında kimyasal özelliğini yitirmeyen ve UV transimülatörde daha iyi görüntülenmiştir.

Jel tabaka kalınlığı yaklaşık 5 mm olacak şekilde dökülmüştür. Jel polimerizasyonunun ardından 1xTBE tamponu içeren elektroforez tankına alınmıştır (Şekil 3.3). Her bir kuyucuğa 6 µl PZR ürünü ve 3 µl yükleme tamponu (boya) olacak şekilde toplam 9 µl ürün yüklenmiştir. Örnekler 80 Volt'da 45 dakika yürütülmüş ve sonrasında UV ışık altında incelenmiştir.

Agaroz'da kullanılan Reaktif Miktar: 1x TBE 80 ml; Agaroz 1,2 gr; etidium bromürden 25µl.



Şekil 3.3 Jel elektroforez basamakları; a) Agaroza dökülmesi, b) PZR örneğin boyanması, c) Örneklerin yürütülmesi)

3.2.2.4 MtDNA COI Dizilerinin Sekans İşlemleri

mtDNA COI dizi analizi; öncelikle hizmet alımı yapılacak firmaya (Medsantek) gönderilmiştir. Dizi analizleri hizmet alımı yapılan firma tarafından ‘Sanger-Coulson Zincir Sonlanma’ metodu ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Dizi Analizleri

Euaresta bullans popülasyonlarına ait mitokondriyal sitokrom oksidaz I geni (COI) Sanger dizileme ile sekans işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmada kullanılan 105 örnekten toplamda 79 kaliteli sekans elde edilmiştir. Elde edilen DNA dizileri Finch TV (Version 1.4. Geospiza. Inc. 2004-2006) programı yardımı ile diyagramlar şeklinde görüntülenmiş ve Seq Trace (0.9.0) (Stucky, 2012) ile manuel olarak diziler düzeltilmiştir. Sonuç olarak örneklerin DNA dizi uzunlukları 655-658 bp elde edilmiştir ve haplotipler tanımlanmıştır. Tüm örnekleri içeren haplotip sayısı (H), haplotip çeşitliliği (Hd) ve nükleotit çeşitliliği (π) hesaplanmıştır (DnaSP ver.5.10 software Rozas vd. 2010). Nükleotit çeşitliliğinin istatistiksel olarak önemi parametrik olmayan permutasyon metodu ile analiz edilmiştir (Arlequin ver.3.5.(Excoffier ve Lischer 2010)).

E. bullans popülasyonlarının mitokondriyal haplotipleri ve genetik uzaklıkları Kimura 2 parametresine göre hesaplanmıştır (MegaX ver 10.0.5). Haplotipler arasındaki evrimsel ve coğrafya arasındaki ilişkiler median joining network (NJ) algoritması ile network çizilmiştir (Network ver.5.0). *E. bullans*'a ait genetik uzaklık (F_{st}) ile coğrafik uzaklık (decimal) arasındaki ilişkileri belirlemek amacıyla Mantel test (Mantel,1967) uygulanmıştır (Genalex 6.5 (Peakall ve Smouse 2006, 2012).

Populasyonların yayılışları hakkında fikir edinmek amacıyla mismatch (Roger ve Harpending 1992) dağılımlarına bakılmıştır. Beklenen ve gözlenen yayılım değerleri; yayılma öncesi yapılanmaları (Qo), yayılma sonrası popülasyon yapısı (Q1), raggednes index ve ssd (sum of squared deviation) değerleri hesaplanmıştır (Arlequin ver.3.5.(Excoffier and Lischer 2010)).Tüm bu hesaplamalar Bootstrap 1000 tekrar baz alınarak yapılmıştır.

Populasyonların denge durumlarını değerlendirmek amacıyla nötralite testleri olan Fu's F_s testi (Fu,1997) ve Tajima 's D testi (Tajima, 1989) uygulanmıştır ((DnaSP ver.5.10 software) Rozas vd. 2010).

BÖLÜM 4

BULGULAR

Çalışmada Türkiye'nin farklı bölgeleri ve bu bölgelere ait 7 farklı ilinden (Amasya, Çorum, Kahramanmaraş, Kayseri, Samsun, Sinop ve Yozgat) toplanmış *Euaresta bullans* türünün DNA konsantrasyonları ölçülerek mitokondierial COI bölgesi üzerinden genetik analizleri yapılmıştır. Populasyonlar arasında haplotipler belirlenerek genetik analizleri üzerinden gen akışı hakkında bilgiler elde edilmiştir.

4.1 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA izolasyonları sonucunda elde edilen DNA konsantrasyonları (Tablo 4.1) belirlenmiş olup en düşük DNA konsantrasyonu (1.43 ng/μl) iken en yüksek DNA konsantrasyonu (152.07 ng/μl) olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.1 DNA Konsantrasyonları (ng/μl) ve DNA saflık oranları (A260/280).

Örnek numarası	DNA konsantrasyonu	A260/280 Oranı
EB 1	6.62	1.34
EB 2	11.48	2.30
EB 4	1.43	2.58
EB 5	7.85	10.42
EB 6	4.48	0.04
EB 7	12.25	2.61
EB 8	7.26	2.60
EB 9	8.91	2.66
EB 10	32.92	2.66
EB 11	19.23	2.66
EB 12	21.35	2.66
EB 13	31.39	2.66
EB 14	49.81	1.80
EB 15	92.79	1.39
EB 16	39.44	2.10
EB 17	88.91	1.33
EB 18	26.04	1.82

Tablo 4.1 Devam

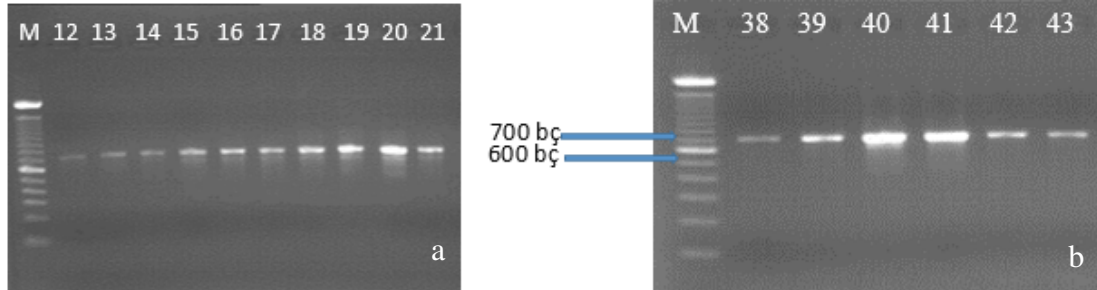
EB 19	32.722	1.05
EB 20	55.16	2.10
EB 21	41.59	2.02
EB 22	44.32	1.30
EB 23	54.83	2.66
EB 24	42.28	2.07
EB 25	79.88	1.39
EB 26	31.62	1.74
EB 27	42.37	1.92
EB 28	107.43	1.20
EB 29	24.03	1.30
EB 30	10.66	1.66
EB 31	8.82	1.67
EB 32	17.92	1.56
EB33	48.08	1.52
EB 34	24.22	1.47
EB 35	30.36	1.47
EB 36	8.94	2.39
EB 37	14.02	1.52
EB 38	22.18	1.75
EB 39	56.14	1.47
EB 40	48.96	1.64
EB 41	54.54	1.27
EB 42	27.62	1.31
EB 43	88.32	1.86
EB 44	55.30	1.87
EB 46	52.90	1.37
EB 48	32.13	1.79
EB 49	34.36	1.59
EB 52	102.68	1.35
EB 53	57.14	1.66
EB 54	23.39	1.74
EB 56	110.02	1.68
EB 57	21.35	1.55
EB 58	40.39	1.30
EB 59	24.29	1.69
EB 60	14.52	1.34

Tablo 4.1 Devam

EB 61	12.90	1.80
EB 62	14.14	1.69
EB 63	17.70	2.19
EB 64	14.47	1.90
EB 65	26.78	1.73
EB 66	13.38	1.66
EB 68	29.41	1.68
EB 69	152.07	1.18
EB 72	36.63	1.77
EB 75	46.96	1.37
EB 76	23.49	1.18
EB 78	35.98	1.74
EB 81	39.65	1.40
EB 83	54.67	1.45
EB 85	36.70	1.88
EB 87	53.87	1.33
EB 88	10.34	1.29
EB 93	16.33	1.25
EB 94	46.69	1.15
EB 95	14.23	1.30
EB 97	17.52	1.25
EB 98	8.35	1.58
EB 102	7.31	1.50
EB 104	18.07	1.67
EB105	23.64	1.28

4.2 PZR Görüntülerinin Elde Edilmesi

Elde edilen *Euaresta bullans* türünün mitokondriyal COI gen bölgesi dizilerini belirlemek amacıyla PZR işlemi (Şekil 4.1) yapılmıştır.



Şekil 4.1 *Euaresta bullans* türü PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü

(M:Marker (100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000bp), a)

EB12, EB13, EB14, EB15, EB16, EB17, EB18, EB19, EB20, EB2. b)

EB38, EB39, EB40, EB41, EB42, EB43; PZR ürünleri.

4.3 Mitokondrial DNA Sekans Varyasyonu

Euraesta bullans popülasyonlarına ait haplotip dağılımı ve frekansları (Tablo 4.2) belirlenerek 642 bp uzunluğuna sahip, 79 sekans verisi analiz edilmiştir. Herbir sekans verisi için Genbank numaraları alınmıştır (MK720413-MK720490 ve MK851178). Çalışmada tüm 7 lokasyona ait 79 örneği içeren 17 haplotip belirlenmiştir. Haplotip 1 en fazla frekansa sahiptir ve tüm lokasyonlardan bireyler içermektedir. Diğer 16 haplotip aynı düşük frekansa sahiptir.

Euaresta bullans popülasyonlarına ait tüm örneklerin sekans verilerine dair haplotip ve nükleotit çeşitlilikleri (Tablo 4.3) hesaplanmıştır.

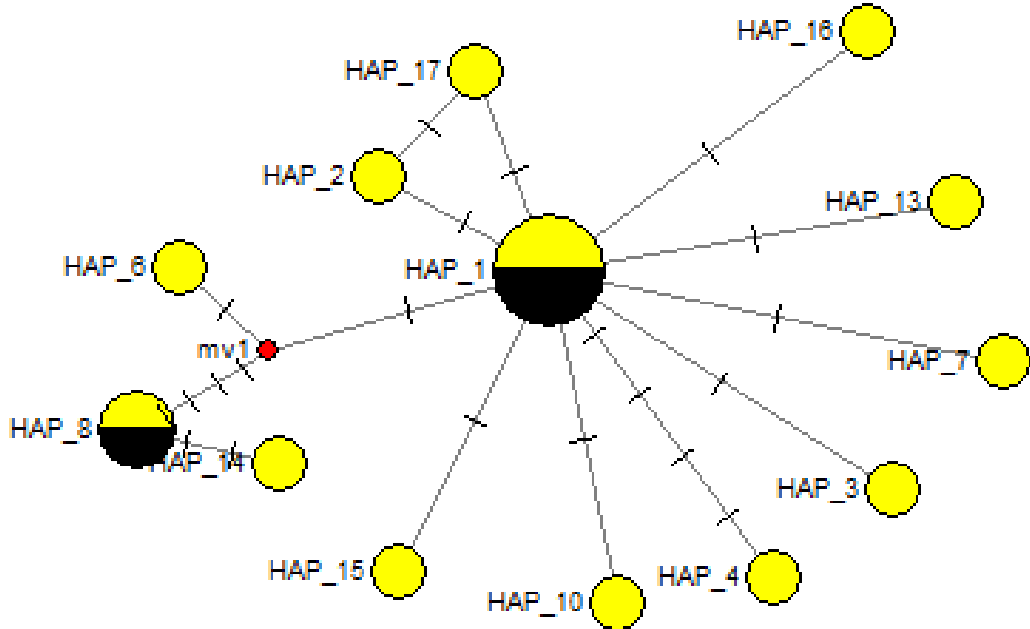
Tablo 4.2 *Euaresta bullans* populasyonlarına ait haplotip dağılımı ve frekansları

Lokasyon	Haplotipler																	n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Kahramanmaraş	15																1	16
Sinop	4	1	1	1														7
Yozgat	6														1	1		8
Amasya	10				1								1	1				13
Samsun	12					1	1											14
Çorum	10							1	1	1	1	1						15
Kayseri	6																	6
Frekansı	0,8	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	79

Tablo 4.3 *Euaresta bullans* örneklerinin genetik çeşitlilik ve nükleotit çeşitliliği

Lokasyon	Örnek sayısı	Genetik çeşitlilik	Nükleotit çeşitliliği
Yozgat (Grup1)	8	0,4643+/-0,2000	0,0007+/-0,0008
Amasya (Grup2)	13	0,4231+/-0,1645	0,0017+/-0,0013
Çorum (Grup3)	15	0,3619+/-0,1448	0,00177+/-0,0013
Kahramanmaraş(Grup4)	16	0,2645+/-0,1327	0,00015+/-0,0013
Kayseri (Grup5)	6	0,3826+/-0,1985	0,0006+/-0,0007
Samsun(Grup6)	14	0,2747+/-0,1484	0,00067+/-0,00072
Sinop (Grup7)	7	0,3643+/-0,2000	0,0007+/-0,0008

Haplotiplere ait median joining (MJ) ağı (Şekil 4.2) çizilmiştir ve Haplotip 1 etrafında diğer haplotipler dağılmış olup genişleme gösteren yıldız benzeri bir yapılanma (Slatkin ve Hudson, 1991) göstermektedir Bu durum; popülasyonlar arasında hala gen akışının devam ettiği, bireyler arasındaki ilişkinin sürdüğü yani genetik sürüklenmenin devam ettiği anlamına gelmektedir.



Şekil 4.2 Sekans sonuçlarına ait median joining haplotip ağı .

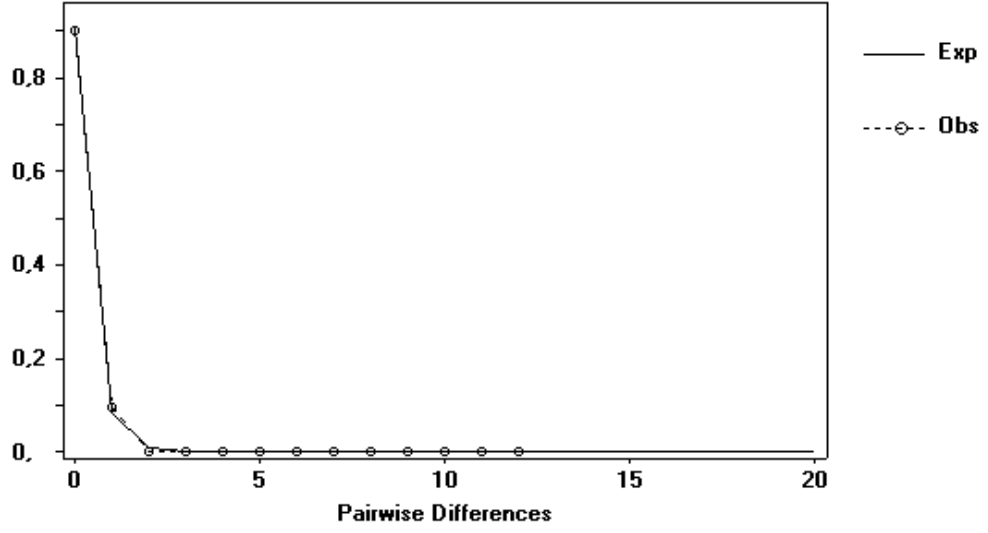
4.4 Populasyon Genetik Yapısı

7 ile ait doğal ortamlardan yakalanan *E. bullans* popülasyonları arasında, coğrafik uzaklık ile genetik uzaklık arasındaki ilişkileri belirleyen mental test (Mantel, 1967) gerçekleştirilmiştir. R^2 değeri 0,0003 hesaplanmıştır. Bu sonuç genetik ve coğrafik uzaklık arasındaki ilişkinin çok zayıf olduğunu yani genetik verilerin coğrafik uzaklıklarla ilişkili olmadığı, coğrafik uzaklık verilerinin genetik çeşitliliği etkilemede önemsiz olduğu belirlenmiştir.

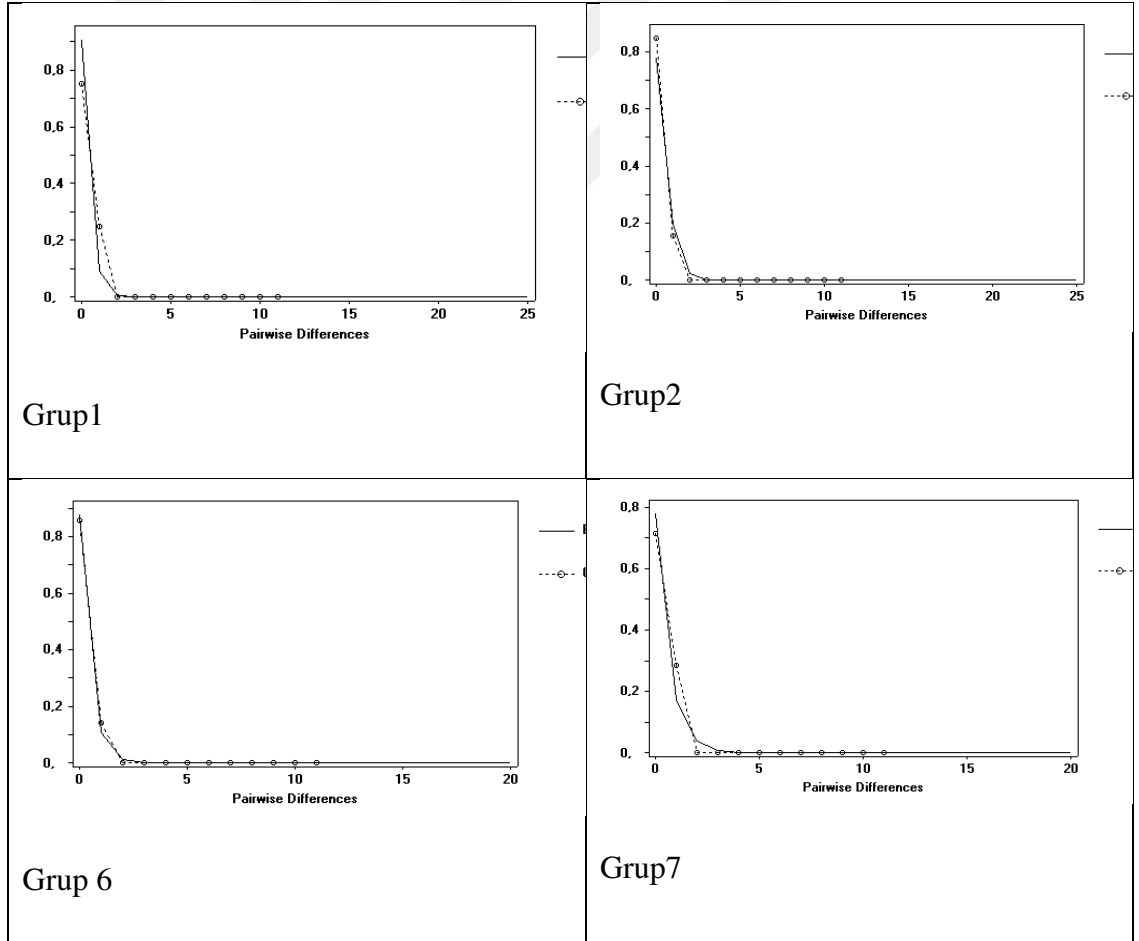
4.5 Uyumsuzluk (Mismatch) Dağılım Analizi

Çalışmada mismatch analizi ile popülasyon içi haplotip çiftleri arasında gözlenen farklılıkların dağılımı hesaplanmıştır. Nüfus yoğunluğu üstselsel olarak artan popülasyonlar tek modlu (unimodal) grafik olarak gözlenirler. Uyumsuzluk analizleri ile popülasyonların birey sayılarındaki değişimleri ile ilgili geçmişe dönük bilgiler sunar. Analizler sonucunda çalışmamızda; SSD değeri 0,90 şeklinde elde edilmiş olup $p > 0.05$ olması durumunda popülasyonların nüfussalsel olarak benzer genişleme oranlarına sahip olduklarını göstermektedir. Bulunan bu değer tüm örnekler için geçerli olup lokaliteler bazında değerlendirildiğinde de SSD sonuçları benzerdir.

Raggedness indeksi (RI), p değerine bağlı olarak mismatch dağılımının anlamlı olup olmadığını test etmek için önemlidir. SSD ve rg indekslerinin düşük sonuçlar vermesi gözlenen sonuçların beklenen ya da tahmin edilenler ile uyup uymadığını belirler. Sonuçlarda $p > 0.05$ ise H_0 hipotezi (H_0 dağılım tek modludur) kabul edilmektedir. Tek modlu grafiklerde nüfusun göç baskısı veya darboğaz etkisi altında kalmadan üstselsel olarak artmakta olduğunu belirler (Slatkin vd. 1991; Schneider vd. 1999; Rogers 1995) (Şekil 4.2, Şekil 4.3)



Şekil 4.3 *E. bullans* 79 sekansa ait beklenen ve gözlenen uyumsuzluk dağılımı.



Şekil 4.4 *E. bullans* popülasyonlarına ait beklenen ve gözlenen uyumsuzluk dağılımı (Yozgat (Grup 1), Amasya (Grup2), Samsun (Grup6) ve Sinop (Grup7)).

4.6 Tarafsızlık (Nötralite) Testleri

Tajima D testi, popülasyonlardaki ayırık site sayısını (S) ve haplotipler arasındaki çift farklılıklarını (π) referans alan iki teta (θ) değerini kıyaslamaktadır (Tajima 1989a;1993). Başka bir ifade ile Tajima D testi, popülasyonların standart nötral modelden sapmasını test etmektedir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ olduğu durumlarda anlamlı olarak yorumlanan değerlerde doğal seçim, nüfus dalgalanmaları ile beklenen S ve π parametrelerinin değişiminden kaynaklanmakta olan demografik bir genişleme durumunu göstermektedir. ($p > 0,05$) olduğu durumlarda ise popülasyonlarda nadir varyasyon sayısı düşüktür ve popülasyon bir darboğazdan geçmektedir şeklinde yorumlanabilir (Hasan vd. 2008). Çalışmamızda Yozgat, Amasya, Samsun ve Sinop illerindeki *E. bullans* popülasyonlarının Tajima D değerleri negatif (Tablo 3.3) olup bu durum bu 4 ildeki popülasyonların herhangi bir seçim baskısı veya darboğazdan geçmedikleri üstsel olarak çoğaldıkları ve hızlı nüfus artışı olduğu sonucuna varılabilir.

Tablo 4.4 Tajima's D ve Fu's Fs nötralite testleri

Lokasyon	Tajima's D	Fu's Fs
Yozgat (Grup1)	-1,054	-0.182
Amasya (Grup2)	-1,149	-0,537
Çorum (Grup3)	-	-
Kahramanmaraş(Grup4)	-	-
Kayseri (Grup5)	-	-
Samsun(Grup6)	-1,155	-0,595
Sinop (Grup7)	-1,006	-0,095

Diğer bir nötralite testi olan Fu's Fs testi popülasyondaki nüfus artışına duyarlı bir istatistik analizdir (Fu, 1997). Anlamlı olarak nitelendirilen $F_s < 0$ sonuçları

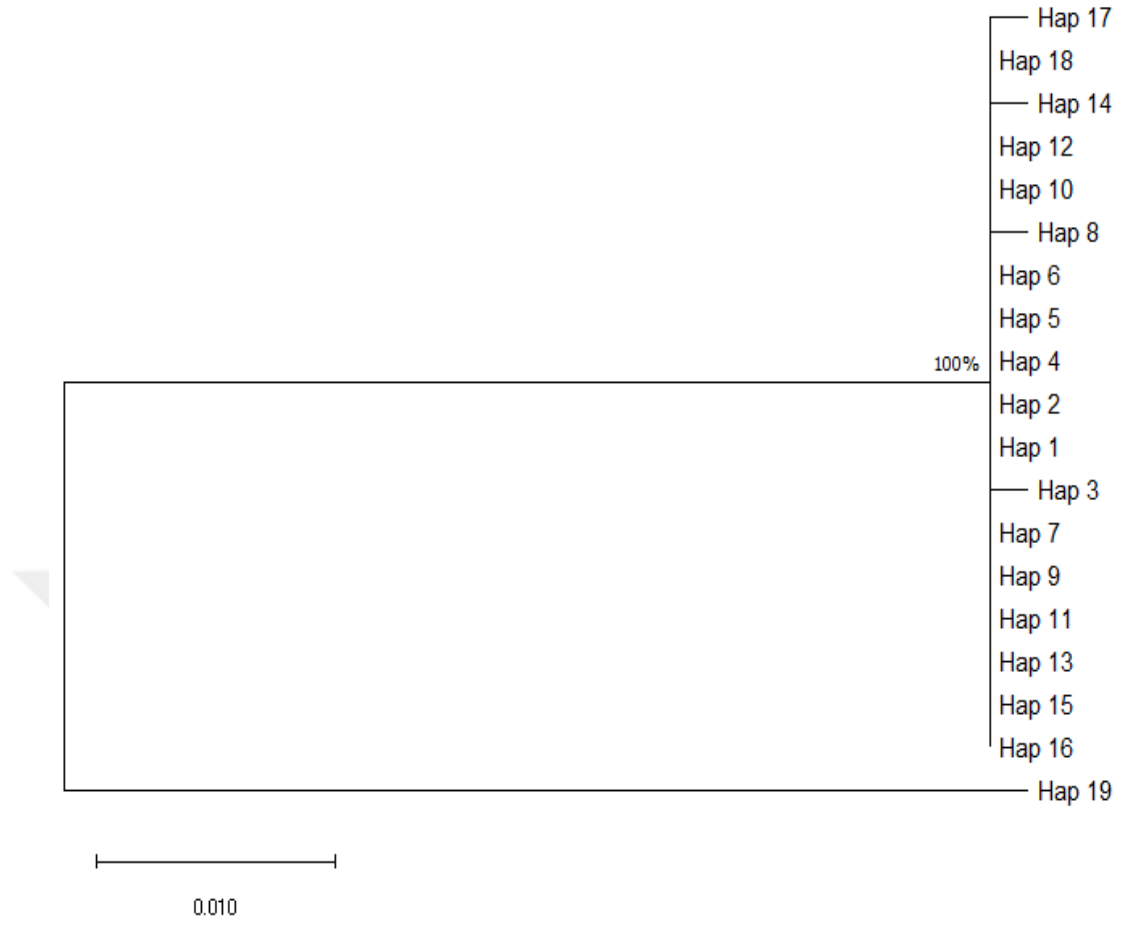
popülasyonların genişlemekte olduğunu belirtirken $F_s > 0$ durumunda popülasyonların seçim baskısı veya darboğazdan geçmelerinden kaynaklı allel eksikliğini temsil etmektedir (Li vd. 2009). Çalışmamızda elde edilen negatif değerler Yozgat, Amasya, Samsun ve Sinop lokasyonlarındaki popülasyonların genetik sürüklenmelerinin devam ettiği demografik olarak genişledikleri belirlenmiştir.

4.7 DNA Barkod

Hebert vd. 2003 yılında yaptıkları araştırmada hayvanlarda mitokondriyal sitokrom oksidaz I geninin 5' uzundan ortalama 655 bp'lik kısmının 'standart barkod geni' olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu bağlamda 79 DNA dizisi verisi analiz edildi ve 79 DNA barkod kaydı alınmıştır (Genbank).

DNA dizileri baz alınarak tüm örneklerle ait nükleotit frekansları belirlenmiştir. C; %16,17, T; %38,93, A; %29,05 ve G; %15,85'tir. Baz bileşimlerinin %67,98 ile Adenin ve Timine yönelimli olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada DNA sekansları kullanılarak tüm örneklerle ait en iyi evrimsel model belirlenmiştir ve Akaike Information Kriterine (AIC) göre TrN+G olarak belirlendi (Paup). Bu evrimsele veriye göre Maximum Likelihood filogenetik ağacı oluşturulmuştur. (Şekil 4.4)



Şekil 4.5 *Euraesta bullans* (Hap1-16) popülasyonlarına ait Maximum Likelihood filogenetik ağacı (Mega X). Hap 19 dış grup olarak belirlenen *Euaresta aequalis* (EU484478.1) taksonudur.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Türkiyen'nin farklı bölgeleri içerisinde bulunan 7 farklı ilinde (Amsaya, Çorum, Kahramanmaraş, Kayseri, Samsun, Sinop ve Yozgat) *Xanthium spinosum* bitkisi üzerinden toplanan ve farklı koşullarda muhafaza edilen *E. bullans* populasyonlarının morfolojik tanımları yapılmış ve mt COI gen bölgeleri analiz edilerek populasyonlar arası genetik ilişkiler ortaya koyulmuştur.

Çalışmada elde edilen DNA verilerinin analizi sonucunda, populasyonlar arası genetik uzaklık %0,09 ile %0,046 arasında belirlenmiştir. Bu sonuç genetik varyasyonun çok düşük olduğunu göstermektedir. Doğal populasyonlardaki genetik varyasyon evrimsel ve demografik süreçler arasındaki dengenin bir sonucudur (Li vd. 2013). Varyasyonun düşük olması *E. bullans* populasyonlarının bir darboğazdan geçmediklerini veya herhangi bir ekolojik bir engel ile karşılaşmadıklarını göstermektedir. Nitekim tüm lokasyonlardan yakalanan örneklerin yapılan analizler sonucunda gelişme gösterdiği, populasyonların halen bir etkileşim içinde oldukları belirlenmiştir.

Düşük genetik varyasyon bazı meyve sineklerinde de tespit edilmiştir. *Bactarocera latifrons* Tayland örneklerinde % 0,09 – 0,86 (Meeyen vd. 2014); Türkiye'den çalışılan *B. oleae* populasyonlarında ise %0,09-0,48 (Dogac vd. 2013) olarak belirlemiştir. Genetik çeşitlilikte ise geçirmiş olduğu demografik yapılar bakmak gerekmektedir. Özellikle haplotip çeşitliliği $>0,5$ ve nükleotit $\pi > 0,005$ olduğu zaman populasyonların evrimsel tarihleri uzundur ve genetik çeşitlilik yüksektir (Rosetti ve Remis, 2012).

Çalışmamızda haplotip çeşitliliği ($H_d=0,36$) elde edilmiş olup nükleotit çeşitliliği (0.000159 ± 0.000302) şeklinde belirlenmiş ve bu sonuçlar populasyonlarımızın düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmada popülasyonların tek modlu bir dağılım (Rogers ve Herpending 1992) gösterdiği belirlenmiştir. Örnek yakalanan 7 lokalitedeki popülasyonlar tek tek değerlendirildiğinde ani ve mekânsal yayılımların birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Bu durum popülasyonların herhangi bir engel veya göç etkisi altında kalmadan sayısal olarak arttığını göstermektedir.

E. bullans popülasyonlarını içeren median joining (MJ) network yapılanması da mismatch analizleri ile uyumlu sonuçlar vermektedir. Çizilen network grafiğinde popülasyonların belirgin bir darboğazdan geçemedikleri, baskın haplotip 1 etrafında toplandıkları belirlenmiştir. Network yapılanmasının yıldız benzeri olduğu ve bireylerin gelişme gösterdiği, bireyler arasında genetik aktarımın devam ettiği tespit edilmiştir.

Mitokondrial COI gen bölgesi baz alınarak gerçekleştirilen DNA dizi analizleri, nötralite testlerinden olan Tajima D ve Fu's Fs analizlerinden her ikisi içinde sonuçlar negatif değerlerde çıkmıştır. Bu negatif değerler popülasyonlardaki güçlü yayılımı desteklemektedir (Fu ve Li, 1993). Zira tüm lokasyonlardaki örneklerin halen etkileşimde olması türün yayılış açısından güçlü oluşunu destekler niteliktedir. Ayrıca popülasyonlardaki genetik çeşitlilik ve coğrafik uzaklık arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Lokasyonlar arasında güçlü bir bariyer engeli olmadığından düşük genetik çeşitlilik olduğu belirtilmiş. Keza yüksek dağlar pek çok türün gen akışında önemli coğrafik bariyerlerdir (Meeyen vd. 2014; Kunprom vd. 2015). Çalışmamızda lokasyonlar arasında bu tür için aşılamayacak belirgin bir coğrafik bariyer bulunmamaktadır. Çalışmada kullanılan iller arasında bir çok canlı türü için bariyer sayılabilecek yüksek dağların bulunması coğrafik bariyer olarak düşünülebilir. Ancak araştırmada 7 ilden toplanan *E. bullans* popülasyonlarından polimorfizm belirlenememiştir. Bu durum bu illerden yakalanan meyve sineği örneklerinin DNA dizilerinde belirgin bir fark olmadığını ve bu durumun morfolojiye yansıdığını desteklemektedir.

E. bullans örnekleri beslendiği *Xanthium spinosum* (Bathurst Burr) bitkisini monofag olarak tercih etmektedirler ve ortalama 25-35 °C de çıkmaktadırlar. Sıcaklık referansının düşük olması çeşitliliği etkileyen faktörleri azaltmaktadır. Ayrıca Farklı coğrafyalarda yaşayan *X. spinosum*'un çıkış dönemleri bölgenin iklimsel şartlarına bağlı olarak farklı dönemlerde olabilmektedir. Nitekim Samsun

ilinde hem Temmuz hemde Ağustos aylarında örnek yakalanırken Amasya’da Haziran ve Temmuzda örnekler elde edilebilmiştir. Farklı lokasyonlarda olsalar dahi böceklerin beslendikleri *X. spinosum* bitkisi benzer ekolojik koşullarda yetişmekte ve bu koşullarda böcekler beslenebilmektedir. Seçilim baskısına maruz kalmamaktadırlar.

Çalışmada elde edilen *E. bullans* DNA dizileri Genbank’a eklenmiş ilk verilerdir. Ayrıca Türkiye’nin komşu bölgelerinde taksona ait bir Genbank üzerinden bir veri bulunmaması karşılaştırma olanağını kısıtlamıştır. Bu araştırmanın sonuçları daha sonraki barkodlama çalışmaları için referans niteliğindedir.



KAYNAKLAR

Avşar, R. (2014). Kırşehir ili Meyve Sinekleri (Diptera: Tephritidae) Faunası ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep. 125 s.

Akar, A. (2018). Tatarcık (Diptera : Phlebotomidae) Populasyonlarının Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi. (Yüksek lisans tezi), Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 44-45s.

Arnot, D. E., Roper, C., Bayoumi, R. A. (1993). Digital Codes From Hypervariable Tandemly Repeated DNA Sequences In The Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Gene Can Genetically Barcode Isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **61**, 15-24.

Anonim1:http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2010_1RL_Stats_Table_1.pdf.

Anonim 2 : http://chimerasthebooks.blogspot.in/2011_12_01_archive.html (Erişim tarihi: 09.07.2019)

Bayrak, N. (2011). Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi Tephritinae Ve Terellinae (Diptera: Tephritidae) Faunastik Ve Sistematiği Çalışmalar. (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 28s.

Barr, N. B., Islam, M. S., Meyer, M. De., Mcpherson, B. A. (2012). Molecular Identification Of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Using DNA Sequences Of The COI Barcode Region. *Annals of The Entomological Society of America*. **105** (2), 339 – 350.

Ballard, J. W. O., Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. **13**, 729-744.

Brown, W. M. (1985). The Mitochondrial Genome Of Animals. In: *Molecular Evolutionary Genetics*, R.J. MacIntyre (ed.). 95-130. New York: Plenum Press.

Beckenbach, AT., Joy, JB. (2009). Evolution Of The Mitochondrial Genomes Of Gall Midges (Diptera: Cecidomyiidae) Rearrangement And Severe Truncation Of tRNA Genes. *Genome Bio Evol.* **1**, 278–287s.

Carey, J. R., Liedo, P. (1999). Mortality Dynamics Of Insects: Gneral Principles Derived From Aging Research On The Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Amsterdam Entomol.* **45**, 49 – 55.

Cywinska, A., Hannan, M. A., Kevan, P. G., Rouhley, R. E., Iranpour, M., Hunter, F. F. (2010). Evaluation Of DNA Barcoding And Identification Of New Haplomorphs In Canadian Deerflies And Horseflies. *Medical and Veterinary Entomology.* **24**, 382-410.

Clary, D., Wolstenholme, D. R. (1985). The Mitochondrial Molecule Of Drosophila Yakuba Nucleotide Sequence Gene Organization And Genetic Code. *Journal of Molecular Evolution.* **22(3)**, 252-271.

Dowton, M., Austin, A. D., (1999). Evolutionary Dynamics Of a Mitochondrial Rearrangement ‘‘Hot Spot’’ In The Hymenoptera. *Mol Biol Evol.* **16(2)**, 298–309.

Doğaç, E., Kande, M. I., Taskın, V. (2013). The Genetic Polymorphism And Colonization Process Of Olive Fly Populations In Turkey. *PLos One.* **8**, e56067.

Emadi, A., Crim, MT., Brotman, DJ. (2010). Analytic Validity Of Genetic Tests To Identify Factor V Leiden And Prothrombin G20210A. *Am J Hematol.* **4**, 264-270, ISSN 0361-8609.

Excoffier, L., Lischer, H. (2010). Arlequin Süite Ver3.5: A New Series Of Programs To Perform Population Genetics Analyses Under Linux And Windows. *Mol Ecol Resour.* **10 (3)**, 564-567.

Foote, R. H. (1984). Family Tephritidae, p. 66-149. In A. Soos and L. Papp eds., Catalogue of Palaearctic Diptera. Vol. 9, Amsterdam, Micropozidae – Agromyzidae. Akademiae Kiado, Budapest And Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 466 p.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA Primers For Amplification Of Mitochondrial Cytochrome Coxidase Subunit I From Diverse

Metazoan İnvertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3 (5)**, 294-299.

Finch, T.V. 1.4. www.geospiza.com/ftvdlinfo.html (Erişim tarihi: 09.07.2019)

Fu, YL. (1997). Statistical Test Of Neutrality Of Mutations Against Population Growth, Hitch Hiking And Back Ground Selection. *Genetics*. **147**,915-925.

Fu YX, Li WH.(1993). Statistical Test Of Neutrality Of Mutations. *Genetics*. **133**, 693-709.

Fakhri, B. (2008). Farklı İran Bal Arısı (*A.mellifera meda*) Popölasyonlarında COI-COII Mitokonderiyel DNA Lokusları Arasında Yer Alan Bölgedeki Genetik Varyasyonun PCR-RFLP Yöntemi İle Belirlenmesi. (yüksek lisans tezi). Ankara üniversitesi, Zootekni Anabilim Dalı, 45s.

Freidberg, A., Kugler, J. (1989). Fauna Palaestina Insecta IV. Diptera: Tephritidae. Israel At Keterpress Enterprises, *Jerusalem*, 212 s.

Gharajedaghi, Y., Khaghaninia, S., Farshbaf, R., (2012). An İnvestigation Of The Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) Fauna İn Ajabshir Region (East Azerbaijan Province) With The New Record From Iran (part 2). *Munis Entomology & Zoology*. **7(1)**, 617–625.

Güz, N., & Kiliñer, N. (2012). Böcek Sistematiğinde Moleküler Markörlerin Kullanımı. *Türk. Entomol. Bült.* **2(2)**, 125–145.

Goodfellow, PN. (1992). Variation İs Now The Theme. *Nature*. **359**, 777-778 .

Giray, H. (1969). Ege Bölgesinde Yabani Otlarda Bulunan Trypetidae (Diptera) Türleri İle İlgili Faunistik Araştırmalar. Ege Üni, Ziraat Fak Dergisi. **6 (1)**, 71-78.

Giray, H. (1979). Türkiye Trypetidae (Diptera) Faunasına Ait İlk liste. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*. **3(1)**,35-46.

Görmez, V. (2011). Kahramanmaraş İli Meyve Sinekleri (Diptera:Tephritidae) Faunası Ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar.(Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.86-199 s.

Hancock, D. L., Drew, R. A. I. (1995). Observations On The Genus *Acanthonevra* Macquart In Thailand And Malaysia (Diptera : Tephritidae). *Entomologist*. **114**, 99-103.

Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N. (2006). DNA Barcodes Distinguish Species Of Tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**, 968-971.

Hasan, A. U., Suguri, S., Fujimoto, C., Itaki, R.L., Harada, M., Kawabata, M., Bugoro, H., Albino, B. (2008). Genetic Diversity In Two Sibling Species Of The *Anopheles Punctulatus* Group Of Mosquitoes On Guadalcanal In The Solomon Islands. *BMC Evol Biol*. **8**,318.

Headrick, D. H., Goeden, R. D. (1990). Resource Utilization By Larvae Of *Paracantha Gentilis* (Diptera: Tephritidae) In *Cupitula* For *Cirsium Colliforicum* And *C. Proteanum* (Asteraceae) In Southern California. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **92**, 512-520.

Hebert, P.D.N, S. Ratnasingham ve JR Dewaard . (2003) . Barcoding Hayvan Ömrü: Sitokrom c Oksidaz I Yakın İlişkili Türler Arasında Sapmalar. Londra B *Biyolojik Bilimler Kraliyet Derneği'nin 270 Bildirgesi* (Suppl), 596-599.

Hebert, P,D,N., Cywinska, A., Ball, SL, L., deWaard, J,R. (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc R Soc Biol Sci*. **270**,313-321.

Hendel, F. (1927). 49. Trypetidae Die Fliegen Der Palaerktischen Region. *Stuttgart*. **5 (1)**, 221s.

Jordaens, K., Sonet, G., Richet, R., Dupont, E., Braet,Y., Desmyter, S. (2012). Identification Of Forensically Important *Sarcophaga* Species (Diptera: Sarcophagidae) Using The Mitochondrial COI Gene. *Electronic supplementary material*. **127**, 491–504 (doi:10.1007/s00414-012-0767-6).

Jamnongluk,W., Baimai, V., Kittayapong, P. (2002). Molcular Phylogeny Of Tephritied Fruit Flies In The Bacterocera Tau Complex Using The Mitochomderial COI Sequences.*Genome*. **46**,112-118.

Jang, F., Pan, X., Li, X., Yu, Y., Zhang, J., Jiang, H., Dou, L., Zhu, SH. (2016) The First Complete Mitochondrial Genome Of *Dacus longicornis* (Diptera: Tephritidae) Using Next-Generation Sequencing And Mitochondrial Genome Phylogeny OF Dacini Tribe. *Scientific RepoRts*. **6**, 36426.

Kambur, G. (2003). Eskişehir Tephritidae (Diptera) Faunası Ve Türlerinin Yayılışları. (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir. 76 s.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. **35**, 1547-1549

Kunprom, C., Sopalodawan, PN., Pramual, P. (2015). Population Genetics And Demographic History Of Guava Fruit Fly *Bactrocera Correcta* (Diptera: Tephritidae) İn North Eastern Thailand . *European JEntomol*. **112**, 227-234.

Kroscha, M. N., Schutze, M. K., Armstrong, Graham, G. C., Yeates, K. D., Clarke, A. R. (2015). A Molecular Phylogeny For The Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic And Biogeographic İmplications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **3**, 513-523.

Keskin, E., Atar, H. H. (2013). DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Türk Bilimsel Derleme Dergisi*. **6 (2)**, 01-08.

Kütük, M. (2003). Güneybatı Anadolu Bölgesi Tephritidae Faunası Ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar. (Doktora tezi) , Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 217 sayfa.

Kütük, M. (2008). The Fruit Fly (Diptera:Tephritidae) Fauna Of Kayseri And Sivas Provinces With A New Record For Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. **32**, 271-285.

Lewis, DL., Farr, CL., Kuiken, L. S. (1995). *Drosophila Melanogaster* Mitochondrial DNA: Completion Of The Nucleotide Sequence And Evolutionary Comparisons. *Insect Mol Biol*. **4(4)**, 263–278.

- Li, Y., Wu, Y., Chen, H., Wu, J., Li, Z. (2011). Population Structure And Colonization Of *Bactrocera Dorsalis* (Diptera: Tephritidae) In China, Inferred From MtDNA COI Sequences. *J. Appl. Entomol.* **136**, 241–251.
- Li, J., Ye, Y., Wu, C., Qi, P., Guo, B., Chen, Y. (2013). Genetic Variation Of *Mytilus Coruscus* Gould (Bivalvia: Mytilidae) Populations In The East China Sea Inferred From MtDNA Gene Sequence. *Biochem syst Ecol.* **50**, 30-38.
- Li, YL., Kong, X.Y., Yu, Z.N., Kong, J., Ma, S., Chen, L.M., (2009). Genetic Diversity And Historical Demography Of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus Chinensis* In Yellow Sea And Bohai Sea Base On Mitochondrial DNA Analysis. *Afr j. Biotechnol.* **8(7)**, 1193-1202.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A Software For Comprehensive Analysis Of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics.* **25**, 1451-1452.
- Ludeña, B., Bayas, R., Pintaud, J. CH. (2010). Phylogenetic Relationships Of Andean-Ecuadorian Populations Of *Anastrepha Fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) Inferred From COI And COII Gene Sequences. *Entomologique de France.* **46(3-4)**, 344-350.
- Lim, E. PH., Tan, J., Suana, I. W., Eamsobhana, P., Yong, H. S. (2012). Distinct Genetic Lineages Of *Bactrocera Caudata* (Insecta: Tephritidae) Revealed By COI And 16S DNA Sequences. *PLoS ONE.* **7(5)**, e37276.
- Liquido, N. J., Shinoda, A. L., Cunningham, T. (1991). Host Plants Of Mediterranean Fruit Fly (Diptera : Tephritidae). An Annotated World Review. Misc. Publ. *Entomol. Soc. Am.* **77**, v + 52 s. DOI 10.1007/978-1-4615-9388-1.
- Malacrida, A.R., Marinoni, F., Torti, C., Gomulski, L.M., Sebastiani, F., Bonvicini, C., Gasperi, G., Guglielmino, C.R. (1998). Genetic Aspects Of The Worldwide Colonization Process Of *Ceratitis Capitata*. *The Journal of Herdity.* **89(6)**, 501-7. DOI: 10.1093/jhered/89.6.501.
- Manger, A., Behere, G. T., Firake, D. M., Sharma, B., Deshmukh, N. A., Firake, P.D., Azad, N. S. Th., Ngachan, S.V. (2017). Genetic Characterization Of

Bactrocera Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) From Northeastern India Based On DNA Barcodes. *Mitochondrial DNA a DNA Mapp Seq Anal.* **29 (5)**, 792 – 799.

Mayra, C., Molina, N., Montoya, L., CiSneroS, S. Z., Liedo, P. (2014). Genetic Structure Of Populations Of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) İn Mexico. *Florida Entomologist.* **97(4)**, 1648-1661.

Meyer, C.P., Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based On Comprehensive Sampling. *PLoS Biology.*, **3(12)**, 2229-2238.

Medsantek.<http://www.medsantek.com.tr/> (Erişim tarihi: 09.07.2019)

Morin P. A., Luikart G., Wayne R. K., and the SNP American Association of Blood Banks, Arlington, workshop group .(2004). SNPs İn Ecology, Evolution VA, USA, pp. 277D280. And Conservation. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 208-216.

Mitchell, S.E., Cockburn, A.F., Seawight, J.A. (1993) The Mitochondrial Genome Of *Anopheles Quadrimaculatus* Species A: Complete Nucleotide Sequence And Genome Organization. *Genome* **36 (6)**, 1058-1073. <https://doi.org/10.1139/g93-141>.

Menguala.X., Stahls, G., Rojo, S. (2008). First Phylogeny Of Predatory Flower Flies (Diptera, Syrphidae, Syrphinae) Using Mitochondrial COI And Nuclear 28S rRNA Genes: Conflict And Congruence With The Current Tribal Classification. *Cladistics.* **24**, 543–562. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00200.x>.

Meeyen, K., Nanorksopaldawan, P., Pramual, P. (2014). Population Structure, Population History And DNA Barcoding Of Fruit Fly *Bactrocera latifrons* (Hendel) (Diptera:Tephritidae). *Entomol Sci.* **17**, 219-230.

Mental, N. (1967). The Detection Of Disease Clustering And A Generalized Regression Approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (Erişim tarihi: 09.07.2019)

Network. <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm> (Erişim tarihi: 09.07.2019)

Norrbom, A. L. (1999). A Generic Reclassification An Pylogeny Of The Tribe Myopitini (Tephritinae) In Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny And Evolution Of Behavior. *London: Press CRC*. 581-627.

Özgür, A. F., Kütük, M. (2003). Adana İli Meyve Sinekleri (Tephritidae: Diptera) Faunasının Tespiti. *Journal of Agriculture Fac. Ç.U.***18**, 35-44.

Pape, T., Blagoderov, V., Mostovski, M.B. (2011). Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.- Q. (Ed.) Animal biodiversity: An Outline Of Higher-Level Classification And Survey Of Taxonomic Richness. *Zootaxa*. **3148**, 222-229 .

Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: Genetic Analysis İn Excel. Population Genetic Software For Teaching And Research-An Update. *Bioinformatics*. **28**, 2537-2539.

Prabhakar, C. S., Mehta, P. K., Sood, P., Singh, S. K., Sharma, P., Sharma, P. N. (2012). Population Genetic Structure Of The Melon Fly, *Bactrocera Cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) Based On Mitochondrial Cytochrome Oxidase (*COI*) Gene Sequences. *Genetica*. **140 (1-3)**, 83-91.

Pakyürek B. (2006), Gazi Üniversitesi Zooloji Müzesindeki Tephritidae (Diptera) Familyası Örneklerinin Değerlendirilmesi. (Yüksek lisans tezi) Gazi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara, 432 sayfa.

Rogers, A.R. (1995). Genetic Evidence For A Pleistocene Population Explosion. *Evolution*. **49 (4)**, 608-615.

Rogers, A.R., Herpending, H. (1992). Population Growth Makes Waves İn The Distribution Of Pairwise Genetic Differences. *Mol Biol Evol*. **9**, 552-569.

Rosetti, N., Remis, M.I. (2012). Spatial Genetic Structure And Mitochondrial DNA Phylogeography Of Argentinean Populations Of The Grasshoper *Dichroplus Elongatus*. *PLoS One*.**7**,e40807.

Rozas J, Librado P, Sanchez-Del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R. (2010). DnaSP Version 5 Help Contents [Help File]. Disponible En <http://www.ub.edu/dnasp>.

Rivera, J., Currie, D. C. (2009). Identification Of Nearctic Black Flies Using DNA Barcodes (Diptera:Simuliidae). *Molecular ecology resources*. **9(1)**, 224-236. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02648.x

Simon, M., Benit, P., Vassal, A., Dubois, C., Faye, G. (1994). Sequence Of The PHO2-POL3 (CDC2) Region Of Chromosome IV Of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast*. **10(12)**, 1653-6.

Schneider, S., Excoffier, L. (1999). Estimation Of Past Demographic Parameters From The Distribution Of Pairwise Differences When The Mutation Rates Vary Among Sites: Application To Human Mitochondrial DNA. *Genetics*. **152 (3)**, 1079-89.

Slatkin, M., Hudson, R.R. (1991). Pairwise Comparisons Of Mitochondrial DNA Sequences In Stable And Exponentially Growing Populations. *Genetics*. **129 (2)**, 555-562.

Stucky, B.J.(2012). SeqTrace: A Graphical Tool For Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*. **23**, 90–93. doi: 10.7171/jbt.12-2303-004.

Smith, P. T., Mcpherson, B. A., Kambhampati, S. (2002). Phylogenetic Analysis Of Mitochondrial DNA Supports The Monophyly Of Dacini Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. **95(6)**, 658-664.

Sudiarta,I.P., Martiningsia, D., Wijaya, I. N. (2018). Molecular Identification Of Exotic Fruit Fly *Bactrocera Occipitalis* (Diptera: Tephritidae) Using Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) Gene.*International journal of bioscience and biotechnology*.**1**, 2303-3371.

Souza, H.V., Marchesin, S.R.C., Itoyama, M.M. (2016). Analysis Of The Mitochondrial COI Gene And Its Informative Potential For Evolutionary Inferences In The Families Coreidae And Pentatomidae (Heteroptera). *Genetics and Molecular Research*. **15 (1)**, 15017428. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017428>.

Smit, J., Reijnen, B., Stokvis, F. (2013). Half Of The European Fruit Fly Species Barcoded (Diptera, Tephritidae); A Feasibility Test For Molecular Identification. *ZooKeys*. **365**, 279-305.

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. (2002). DNA Points The Way Ahead In Taxonomy. *Nature*. **418**, 479. <https://doi.org/10.1038/418479a>.

Tajima, F. (1989). Statistical Methods For Testing The Neutral Mutation Hypothesis By DNA Polymorphism. *Genetics*. **123**(3), 585-595.

Tajima, F. (1993). Measurement Of DNA Polymorphism. In: Mechanisms Of Molecular Evolution Introduction To Molecular Paleopopulation Biology, Edited By Takahata, N. And Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: *Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc* .37-59.

Tusan, A. (2016). Doğu Akdeniz Bölgesi Yayla Ve Ova Bölgesindeki Ceratitis Capitata Wiedeman (Diptera: Tephritidae) Popülasyonlarının Mitokondrail DNA Bölgelerindeki (COI-COII) Varyasyonların Araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitü. 63s.

Torbalı, M. (2018). Yozgat İlinde Meyve Sinekleri (Diptera :Tephritidae) Faunası Ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimler Enstitüsü. 135 s.

Virgilio, M., De Meyer, M., White, I. M., Bacheljau, T. (2009). African Dacus (Diptera: Tephritidae: Molecular Data And Host Plant Associations Do Not Corroborate Morphology Based Classifications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **51**, 531-539.

Virgilio, M., Bacheljau, TH., Nevado, B., Meyer, M. De. (2010). Comparative Performances Of DNA Barcoding Across Insect Orders. *BMC Bioinformatics*. **11**, 206.

Ünal, G. (2016). Trakya Bölgesindeki Bal Arılarında (Apis Mellifera L.) MtDNA Sitokrom C Oksidaz Altbirim I (COI) Geni Analizi. (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 49-50s.

Wan, X., Nardi, F., Zhang, B., Liu, Y. (2011). The Oriental Fruit Fly, *Bactrocera Dorsalis* In China: Origin And Gradual Inland Range Expansion Associated With Population Growth. *PLoS One*. **6** (10), e25238.

Wheeler, C. W., Whiting, M., Wheeler, D. Q., Carpenter, M. J.(2001). The Phylogeny Of The Extant Hexapod Orders. *Cladistics*. **17**, 113–169. doi:10.1006/clad.2000.0147.

Yalçın, Ş. (2012). Bazı Tabanidae (Diptera Tabanidae) Türlerinin COI Gen Bölgesi İle Filogenetik Akrabalıklarının Analizi (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Ersitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 39-40s

Yaran, M. (2009). Gaziantep İli Meyve Sinekleri (Diptera : Tephritidae) Faunası Ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü. 48 s.

Yaran, M. (2014). Aksaray, Mersin, Nevşehir, Ve Niğde İllerinde Meyve Sinekleri (Diptera :Tephritidae) Faunası Ve Sistematiği Üzerine Araştırmalar. (DoktoraTezi). Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimler Enstitüsü. 266 s.

Yaran, M., Kütük, M., Görmez, V., Ömrükoyuncu, M. (2018). A New Species And Additional Record Of Terellia Robineau-Desvoidy (Diptera: Tephritidae) From Turkey With A Key For The Cerajocera Group. *Turkish Journal Of Zoology*. **42**, 661-665.

Zhang, B., Liu, H. Y., Wu, W. X., Wang, L. Z. (2010). Molecular Phylogeny Of Bacterocera Species (Diptera: Tephritidae: Dacini) İnferred From Mitchonderial Sequences Of 16S rDNA And COI Sequences. *Florida Entomologist*, **93(3)**, 369-377.