



**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI
HELOPHORIDAE, HYDROCHIDAE VE HYDROPHILIDAE
TÜRLERİNİN MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ
C GENİNE DAYANARAK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Somayeh GHOLAM ZADEH

Doktora Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA
Ortak Danışman: Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ
2017
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI HELOPHORIDAE,
HYDROCHIDAE VE HYDROPHILIDAE TÜRLERİNİN
MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ C GENİNE
DAYANARAK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Somayeh GHOLAM ZADEH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Zooloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI HELOPHORIDAE, HYDROCHIDAE VE
HYDROPHILIDAE TÜRLERİNİN MİTOKONDRIYAL SİTOKOROM OKSİDAZ C GENİNE
DAYANARAK MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Ümit İNCEKARA danışmanlığında, Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ ortak danışmanlığında Somayeh Gholam Zadeh tarafından hazırlanan bu tez 13/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

İmza

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet POLAT

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26.01/2017 tarih ve 04.../...26... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI HELOPHORIDAE, HYDROCHIDAE VE HYDROPHILIDAE TÜRLERİNİN MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ C GENİNE DAYANARAK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Somayeh GHOLAM ZADEH

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA
Ortak Danışman: Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ

Moleküler belirteçler, farklı taksonlara ait organizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada mitokondriyal DNA'daki, sitokrom oksidaz c alt ünite I dizilerinin kullanımıyla Helophoridae, Hydrochidae ve Hydrophilidae familyalarının moleküler karakterizasyonu araştırılmıştır. Çalışılan bu familyalardan 33 türe ait 99 bireyin sekansları elde edilmiş ve UPGMA yöntemi kullanarak türlerin soy ağacı analizi yapılmıştır. UPGMA soy ağacına göre, daha önce morfolojik tür tayin yöntemiyle *Helophorus griseus*, *Helophorus daedalus* ve *Helophorus abeillei* olarak tanımlanan türlerin aynı tür olduğu belirlenmiştir. Elde edilen filogenetik analiz sonuçlarına göre birbirine en yakın cinslerin *Helophorus*, *Helochares* ve *Chaetarthria* (%0.002), en uzak cinslerin ise *Chasmogenus* ve *Berosus* (%3.97) olduğu tespit edilmiştir.

2017, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Helophoridae, Hydrochidae, Hydrophilidae, sitokrom oksidaz c, filogenetik analiz.

ABSTRACT

PHD Thesis

PHYLOGENY OF THE SOME SPECIES OF HELOPHORIDAE, HYDROCHIDAE AND HYDROPHILIDAE BASED ON MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXIDASE C GENE FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY

Somayeh GHOLAM ZADEH

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of Zoology

Advisor: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA
Co Advisor: Assoc. Prof. Dr. Coşkun GÜÇLÜ

Molecular markers represent an essential part in reconstruction of phylogenetic relationships between different taxa of organisms. In this thesis, phylogeny of the some species of Helophoridae, Hydrochidae and Hydrophilidae based on mitochondrial DNA cytochrome c oxidase gene subunit I was investigated. The sequences of 99 individuals belong to 33 species of these families were obtained. It is known that *Helophorus griseus*, *Helophorus daedalus* and *Helophorus abeillei*, have been morphologically determined as different species. According the our result, those species have same region. Based on phylogenetic analysis, low composition distance was seen among *Helophorus*, *Helochares* and *Chaetarthria* (%0.002), and high distance between *Chasmogenus* and *Berosus* (%3.97).

2017, 56 pages

Keywords: Helophoridae, Hydrochidae, Hydrophilidae, mitochondrial cytochrome oxidase c, phylogenetic analizis.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, çalışmamı inceleyip yapıcı eleştirileri ile yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ümit İNCEKARA ve eşdanışman hocam Sayın Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ'ye teşekkür ederim.

Sadece bu süreçte değil, her koşulda yanımda olan, bana güvenen, teşvik eden kısaca hayatımın her aşamasında maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen, çok değerli babam Zargham GHOLAM ZADEH, annem Tuba SAYI, kız kardeşim ve erkek kardeşlerime sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Fitopatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hidayet BOSTAN ve değerli öğrencisi Amanmohammad KOMAKI'ye tüm yardımları için teşekkür ederim.

5 yıl süren doktora çalışmalarım boyunca yardımları ile yanımda olan arkadaşlarıma (Mehmet BEKTAŞ, Kübra KOÇ, Soheyla KHOSRAVİFAR, Negar RAHİMİ, Zoleykha TALEBZADEH, Halil HÜSEYNİ, Sakine MOHAMMADI, Neda MOAYYEDZADEH, Bekir ŞEYHİ, Rasul TARAGGİKHAH, Ramin MOHAMMADI) teşekkürü bir borç bilirim.

Somayeh GHOLAM ZADEH

Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Hayvanlarda Mitokondriyal Genom.....	4
2.2. Sitokrom Oksidaz I Gen	6
2.3. Coleoptera Takımı	6
2.4. Hydrophiloidea Üst Familya	8
2.5. Helophoridae Familyası	10
2.6. Hydrochidae Familyası.....	12
2.7. Hydrophilidae Familyası	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Çalışılan Türlerin Hazırlanması	15
3.2. Moleküler Çalışmalar	16
3.2.1. Lizis	16
3.2.2. DNA izolasyonu	18
3.2.3. PCR	20
3.2.4. Jele yükleme	23
3.2.5. DNA gen dizilimi sonuçlarının değerlendirilmesi	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Canlıların biyoçeşitliliği	2
Şekil 2.1. <i>Pyrocoelia rufa</i> (Coleoptera) mitokondriyal genom	5
Şekil 2.2. Hansen 1991, Lawrence and Newton 1995 ve Archangelsky <i>et al.</i> 2005'e göre filogenetik sınıflandırma	9
Şekil 2.3. Helophoridae'nin genel vücut şekli, üstten	11
Şekil 2.4. Hydrochidae'nin genel vücut şekli, üstten	12
Şekil 2.5. Hydrophilidae'nin genel vücut şekli, üstten	14
Şekil 3.1. Lizis aşama	17
Şekil 3.2. İnkübasyon.....	18
Şekil 3.3. Qiagen robot	19
Şekil 3.4. Lizis edilmiş plateler ve bufferlerin robot içinde nasıl yerleşmeleri.	19
Şekil 3.5. DNA izolasyonunda robota uygulanan aşamalar	20
Şekil 3.6. PCR aşamaları	21
Şekil 3.7. PCR cihazı	22
Şekil 3.8. İnvitrogen etidyum bromid içerikli agaroz jel	23
Şekil 3.9. İnvitrogen tabela	24
Şekil 3.10. UV görüntüleme sistemi	24
Şekil 4.1. A: <i>Helophorus abeillei</i> , B: erkek genital organ.....	26
Şekil 4.2. A: <i>Helophorus daedalus</i> , B: erkek genital organ	26
Şekil 4.3. A: <i>Helophorus faustianus</i> , B: erkek genital organ	27
Şekil 4.4. A: <i>Helophorus fulgidicollis</i> , B: erkek genital organ.....	27
Şekil 4.5. A: <i>Helophorus griseus</i> , B: erkek genital organ	28
Şekil 4.6. A: <i>Helophorus helenae</i> , B: erkek genital organ	28
Şekil 4.7. A: <i>Helophorus lewisi</i> , B: erkek genital organ	29
Şekil 4.8. A: <i>Helophorus montenegrinus</i> , B: erkek genital organ.	29
Şekil 4.9. A: <i>Helophorus nubilus</i> , B: erkek genital organ	29
Şekil 4.10. A: <i>Helophorus pallidipennis</i> , B: erkek genital organ.....	30
Şekil 4.11. A: <i>Helophorus paraminutus</i> , B: erkek genital organ	30
Şekil 4.12. A: <i>Helophorus terminassianae</i> , B: erkek genital organ	30

Şekil 4.13. A: <i>Hydrochus ignicollis</i> , B: erkek genital organ	31
Şekil 4.14. A: <i>Hydrochus nitidicollis</i> , B: erkek genital organ.....	31
Şekil 4.15. A: <i>Anacaena limbata</i> , B: erkek genital organ	31
Şekil 4.16. A: <i>Anacaena lutescens</i> , B: erkek genital organ.....	32
Şekil 4.17. A: <i>Anacaena rufipes</i> , B: erkek genital organ.....	32
Şekil 4.18. A: <i>Berosus byzantinus</i> , B: erkek genital organ.....	32
Şekil 4.19. A: <i>Berosus fulvus</i> , B: erkek genital organ	33
Şekil 4.20. A: <i>Berosus guttalis</i> , B: erkek genital organ.....	33
Şekil 4.21. A: <i>Chaeterthria seminulum</i> , B: erkek genital organ.....	34
Şekil 4.22. A: <i>Chasmogenus livornicus</i> , B: erkek genital organ	34
Şekil 4.23. A: <i>Cymbiodyta marginella</i> , B: erkek genital organ.....	35
Şekil 4.24. A: <i>Enochrus bicolor</i> , B: erkek genital organ.....	35
Şekil 4.25. A: <i>Enochrus fuscipennis</i> , B: erkek genital organ	35
Şekil 4.26. A: <i>Helochares lividus</i> , B: erkek genital organ.....	36
Şekil 4.27. A: <i>Helochares obscurus</i> , B: erkek genital organ.....	36
Şekil 4.28. A: <i>Hydrochara caraboides</i> , B: erkek genital organ	36
Şekil 4.29. A: <i>Hydrophilus aterrimus</i> , B: erkek genital organ	37
Şekil 4.30. A: <i>Laccobius obscuratus</i> , B: erkek genital organ.....	37
Şekil 4.31. A: <i>Laccobius syriacus</i> , B: erkek genital organ.....	38
Şekil 4.32. A: <i>Paracymus aeneus</i> , B: erkek genital organ	38
Şekil 4.33. A: <i>Paracymus chalceolus</i> , B: erkek genital organ.....	39
Şekil 4.34. Türlerle ait jel görüntüleri.....	39
Şekil 4.35. Türlerin soy ağacı	40
Şekil 4.36. A+T oranı	41
Şekil 5.1. Hydrophiloidea filogenisiyle ilgili, Hansen (1991) ve Beutel (1994) tarafından sunulan iki alternatif öneri.....	47
Şekil 5.2. <i>Helophorus abeillei</i> , <i>Helophorus Daedalus</i> ve <i>Helophorus griseus</i> vücut ve aedeagofor karşılaştırmaları.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Coleoptera ve Hydrophiloidea üzerinde yapılan çalışmalar	9
Çizelge 3.1. CO1 için PCR şartlar	22
Çizelge 4.1. Kodon pozisyon oranları	43

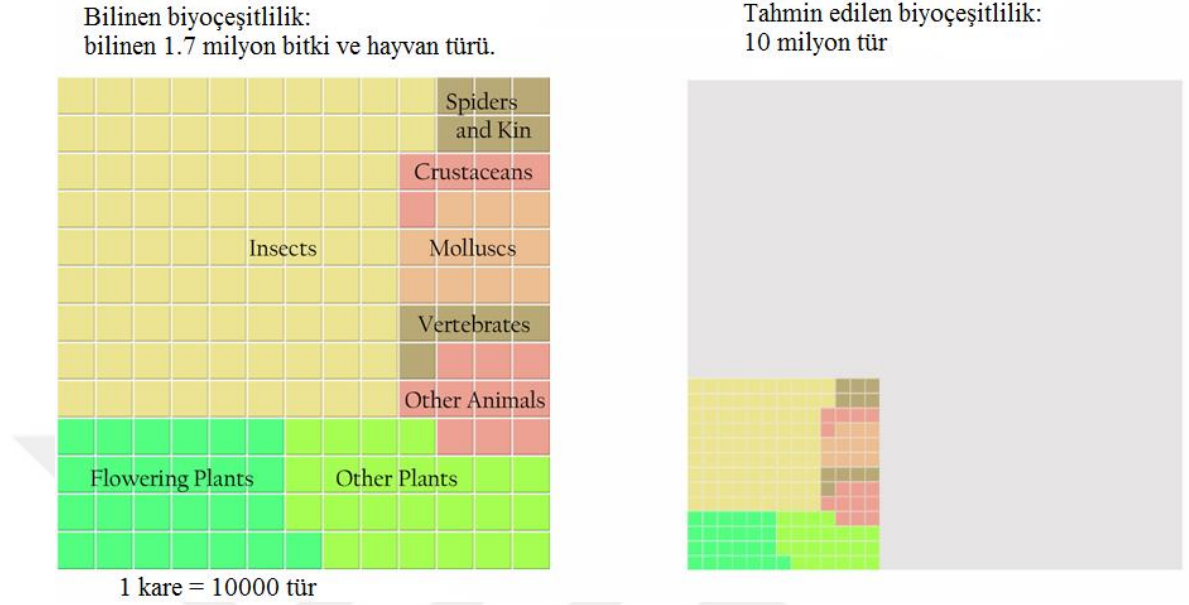


1. GİRİŞ

Morfoloji ve biyokimyasal tanı tekniklerine ilaveten moleküler tanı tekniklerinin kullanımının yaygınlaşması, taksonomik araştırmalarda türlerin tanımlanmasında yeni bakış açıları getirmiştir. Taksonominin yalnızca morfolojik esaslar üzerinden yapılması türlerin doğru teşhislerinin güvenilirliğini azaltmaktadır. Bazı türlerin fenotiplerine bakılarak birbirlerinden ayrılamaması, ikiz türlerin varlığı ya da eşeysel dimorfizm, türlerin teşhisinde pek çok yanlışlıklara yol açmaktadır. Bu yüzden türlerin teşhisinde moleküler yöntemlerin kullanılması çok önemlidir. Bugün pek çok ülke moleküler sistematüğini bir gen kütüphanesi oluşturmak için kullanmaktadır.

Hayvan ve bitki aleminde bugün toplam 1.7 milyon türün varlığı bilinmektedir. Bu sayının gelecekte 10 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu türlerin teşhisleri için daha kesin sonuç veren yeni yöntemlerin kullanılması gereklidir (Godfray 2002; Blaxter 2003) (Şekil 1.1).

Son zamanlarda böcek moleküler sistematüğü tür teşhisinde DNA'dan yararlanılmaktadır. Bu anlamda mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nüklear DNA (rDNA)'nın dizilenmiş bölgeleri türe spesifik karakterler taşımaktadır. Böcek moleküler sistematüğünün genel olarak, daha düşük taksonomik seviyelerdeki (tür, alt tür ve tür grupları) akrabalıkların çözülmesinde daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Özellikle tür seviyesinde önemli ölçüde belirteçlerin geliştirilmesi, bu başarıyı sağlamaktadır. Son beş yılda moleküler teknikler kullanılarak yapılan sistematik çalışmalarda önemli aşamalar kaydedilmiştir. Dünyada bu çalışmaların öncülüğünü merkezi Kanada'da bulunan Guelph Üniversitesi'ne bağlı "Canadian Barcode of Life Network Biodiversity" Enstitüsü yapmıştır. Bu kurumdan Hebert *et al.* (2003a, 2003b) tarafından yapılan çalışmalarda, kısa standartlaştırılmış genomik bölgeler (DNA Barcodes) kullanılarak hayvan türlerinin morfolojik olarak birbirinden ayrılabilceğı ortaya konmuş ve DNA barkodlama yöntemiyle ökaryotik canlıların birbirlerinden tür düzeyinde ayrılabilceğı ilk defa sunulmuştur. Bu yöntem, standart kısa gen bölgelerinden faydalanılarak türlerin birbirinden ayrılması ilkesine dayanmaktadır.



Şekil 1.1. Canlıların biyoçeşitliliği (Godfray 2002; Blaxter 2003)

Bu konuda dünyada yapılan son çalışmalarda sadece canlıların birbirlerinden ayrılması değil, aynı zamanda moleküler olarak tanımlanmış türler için bir elektronik kütüphane oluşturma ve elde edilen nükleik asitlerin en iyi şekilde saklanması ve korunması hususuna da odaklanılmıştır (Hebert *et al.* 2003a, 2003b; Hajibabaei *et al.* 2006a, 2006b). Son zamanlarda, böcek moleküler sistematğinde böceklerin mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nüklear DNA'sı kullanılmaktadır. Nüklear DNA çalışmalarında en fazla sekansı çıkarılmış genler ise 18s rDNA, 28s rDNA, SSU ve LSU genleridir. Mitokondriyal DNA bu tezin konusu olduğu için detaylı şekilde ayrıca anlatılacaktır.

Moleküler belirteçler, farklı organizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin yeniden düzenlenmesi açısından önemlidir. Bu yöntemler, Kamberiyen radyasyonu esnasında bu tür ayrışmaları önemli sorularını çözmesinin ötesinde, morfoloji vasıtasıyla verilen bilgiyi genişletmeye bir fırsat sağlar. Son bir kaç yıl içinde mevcut moleküler veriler artmıştır. Böyle iyi bir işaretleyiciye örnek, mitokondriyal genomdur ki farklı taksonomik düzeylerde filogenetik bilgi içerir. Hayvan mitokondriyal DNA'sı bir kaç özelliğe sahip olması nedeniyle moleküler taksonomide cazip olmuştur. Hücre

içerisinde çok fazla kopyasının olması, haploid özellik göstermesi, rekombinasyona uğramaması, anasal kalıtım ve yüksek bir mutasyon oranına sahip olması mitokondriyal DNA'nın önemli özelliklerindendir (Ballard and Whitlock 2004; Ballard and Rand 2005).

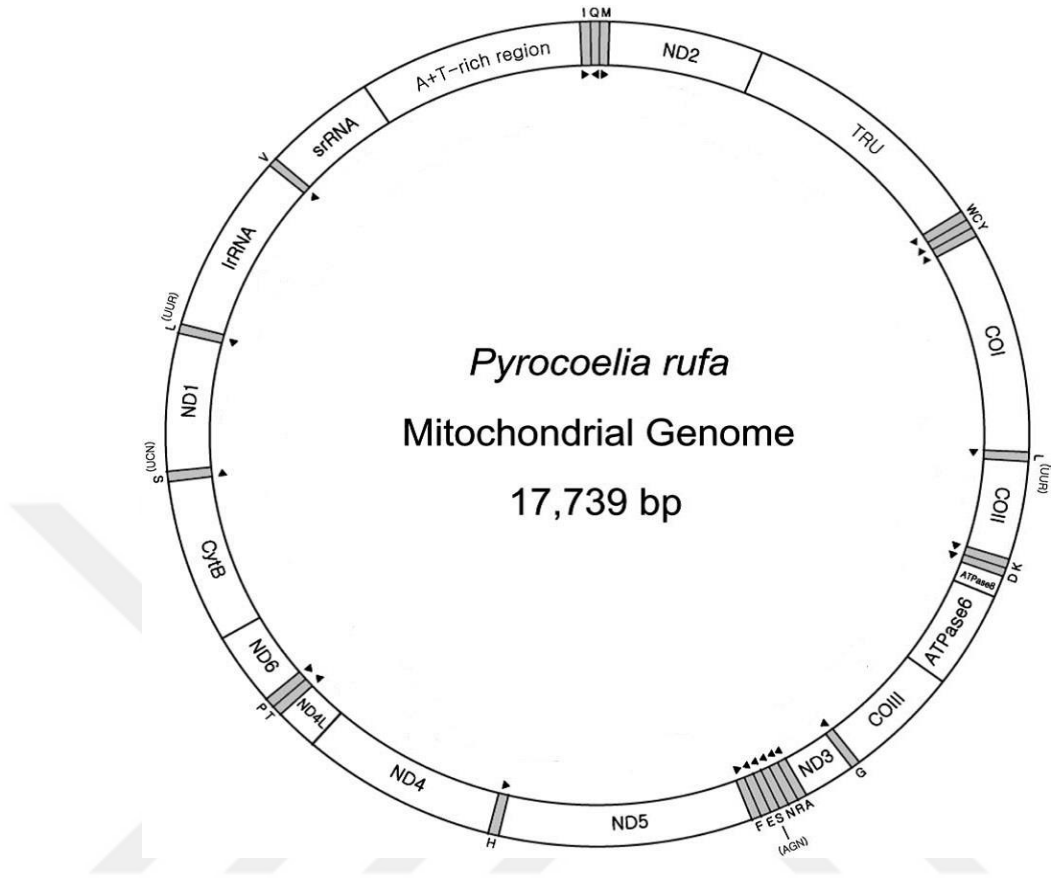
Günümüzde sulak alanları koruma projeleri ve çalışmaları önemli olduğu için su böceklerinin stoklarının hazırlanması ve çeşitliliklerinin değerlendirilmesi esastır (Fauziah 2009).

Bu tezde mitokondriyal DNA, sitokrom oksidaz c alt ünite I dizilerinin kullanımıyla, Türkiye'de yayılış gösteren Helophoridae, Hydrochidae ve Hydrophilidae familyalarının moleküler karakterizasyonu araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Hayvanlarda Mitokondriyal Genom

Metazoa'larda mitokondriyal DNA (mt DNA) iki sarmal, yuvarlak ve yaklaşık 14-39 Kb büyüklüktedir. 13 mRNA (COI, II ve III, Cytb, ND1-6, ND4L, ATP6 ve ATP8), 22 tRNA ve 2 rRNA (16S ve 12S rRNA) kodlayan gene sahiptir (Wolstenholme 1992) (Şekil 2.1). Genellikle bu genomda Adenin ve Timin bakımından zengin bir bölge vardır ve bu bölge omurgalılarda mtDNA'nın replikasyon başlangıcı olarak tanımlanmaktadır (Brown 1985). *Drosophila* türlerinde mtDNA'nın her iki sarmalının replikasyon noktası da bu bölgedir (Fauron and Wolstenholme 1980; Clary and Wolstenholme 1985). Bu bölge farklı canlılarda, genomun uzunluk değişikliklerine neden olmaktadır (Inohira *et al.* 1997). Böceklerde tam mitokondriyal nükleotid sekansları 19 türde elde edilmiştir ve bunlardan 2'si Coleoptera takımına aittir. Halbuki Gen Banka'sında binlerce böceğin mitokondrisinden alınan bazı gen parçalarının sekansı bulunmaktadır ve değişik bölgelerin sekans değişiklikleri, populasyonların genetik yapısında veya farklı böcek türlerinin evrimsel ilişkilerinde önemli bilgiler taşımaktadır (Zhang *et al.* 1995; Besansky *et al.* 1997; Kim *et al.* 2000; Bae *et al.* 2001).



Şekil 2.1. *Pyrocoelia rufa* (Coleoptera) mitokondriyal genom

Tür bazında filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde mitokondriyal DNA verileri son zamanlarda en yaygın kullanılan verilerdir. DNA sarmalının her iki yanında genler kompakt olarak dağılmıştır. Ökaryotlarda mitokondriyal DNA'daki mutasyon oranları değişkendir. Mitokondride bazı bölgeler hızla değişirken, bazı bölgeler son derece korunmuştur. İşte bu farklı bölgeler farklı taksonomik seviyelerin analizine imkân verir (Simon *et al.* 1994). Böceklerde mitokondriyal DNA çalışmalarında en fazla sekansı çıkarılmış genler sitokrom oksidaz I, II ve III, 12S ve 16S rDNA genleridir. Bu çalışmalar arasında sitokrom oksidaz II'nin çok fazla böcek takımı arasında sekansı çıkarılmış hemen hemen tüm takımlarda homolog sekanslar elde edilmiştir. Sitokrom oksidaz I'de yine farklı böcek gruplarında çalışılmış, ancak uzunluğundan dolayı spesifik olan bölge çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir. Diğer gen bölgeleri böceklerle yapılan çalışmaların sadece bir kaçında yer almaktadır.

Behura 2006'ya göre, mitokondriyal DNA markırlarının popüler olmasının nedenleri şunlardır:

1. Her bir hücrede çok sayıda mitokondri bulunur. Dolayısıyla mitokondriyal DNA çok fazladır ve elde edilmesi çok kolaydır.
2. Mitokondriyal DNA'nın amplifikasyonu uygun olmayan koşullarda saklanmış örneklerde bile kolaydır.
3. Mitokondriyal DNA diğerlerine göre daha kısadır ve mutageniktir.
4. Mitokondriyal DNA genleri dışı tarafından aktarılan genlerdir.

2.2. Sitokrom Oksidaz I Gen

Hebert *et al.* 2003b hayvanların barkodlanması için uygun bir dizi olarak mitokondriyal gendeki sitokrom oksidaz c altünite I (COI)'in kullanımını teklif etmiştir. Sitokrom c oksidaz, oksidatif fosforilasyonda en sondaki enzimdir. Bu enzim oksijenin suya indirgenmesini sağlar ve reaksiyonda tüketilen her hangi bir proton için protonların fazlasını zardan dışarıya pompalar. Böyle bir elektrokimyasal eğimin sonucunda, ATP sentezlenir. Sitokrom oksidaz I (COI) geninin 648-bp bölgesi, hayvanlar aleminin üyeleri için primer barkod dizilim formu olarak kabul edilmektedir (Hebert *et al.* 2003a; Savolainen *et al.* 2003).

2.3. Coleoptera Takımı

Dünyada 360 000 civarında türü tanımlanmış olan Coleoptera takımının yaklaşık olarak 70 000'i Türkiye'de yaşamaktadır. Holometabol başkalaşım gösteren bu takımın, hayat aşamaları yumurta- larva- pupa ve ergin şeklindedir. İki çift kanada sahip olduğu varsayılan Coleoptera takımına ait türlerin, zamanla ön kanatlarının uçma yetisini kaybederek “elitra” yı oluşturduğu ve arka kanatların uçma işlevlerini koruyarak, ön kanatlar tarafından korunduğu kabul edilmektedir (Gillott 2005; Jäch and Balke 2008).

Sucul kınkanatlılar herhangi bir su kültesi veya sulak alanlardaki biyolojik içeriğin çok önemli bir unsurudur. Sucul böcekler çeşitli gruplara sahiptir ve biyo gösterge olarak habitatın yaşı, kalitesi ve özelliklerini yansıtır (Bilton 2009). Bu nedenle bu böcekler ekolojik çeşitlilik ve habitat özelliklerinin bir göstergesidir (Foster 1987; Eyre and Foster 1989; Foster *et al.* 1990; Ribera and Foster 1993; Fernandez *et al.* 2004). Çünkü bunlar takson seçiminde genel olarak kabul edilen indikatörlerin en uygunu olarak kabul edilirler (Pearson 1994). Geçici ve kalıcı durgun sular bu grup hayvanların en önemli habitatlarıdır. Günümüzde bu hassas ekosistemler yoğun antropojenik etkiler nedeniyle tehdit altındadır (Schneider-Jacoby and Ern 1993; Valladares *et al.* 2002; Celik *et al.* 2005). Birçok tür 20. yüzyılın ortalarından beri önemli ölçüde dramatik bir azalma göstermiştir. Özellikle ötrofikasyonla sulak alanların kuruması, kirlilik ve tarımsal faaliyetlerde artış da bu duruma sebep olmuştur (Bilton 2009).

Jäch ve Balke (2008) yaklaşık olarak 18,000 türün sucul böcek türü olduğunu tahmin etmiş ve bunların %70'ini tanımlanmıştır. Yaklaşık 30 familya suculların temsilcisidir ve bunların 25'inin sucul olduğu kesinleşmiştir. Bunlardan en yaygın tahminler şu şekildedir: Dytiscidae 3,908 tür ve yaklaşık 5,000 türün hayatta olma ihtimali, Hydraenidae (1,380/2,500), Hydrophilidae (1,800/2,320), Elmidae (1,330/1,850), Scirtidae (900/1,700) ve Gyrinidae (750/1,000). Palaearctic zoocoğrafik bölgesi tanımlanmış 3,350 tür ve tahmini olarak yaklaşık 3,900 türüyle en çok tür zenginliğine sahip olan bölgedir, bunu takiben Neotropical (2,510/3,900), Afrotropical (2,700/3,750), Oriental (2,200/3,580) ve Australian (1,300/2,100) bölgeleri gelmektedir. Tür çeşitliliği bakımından en fakir bölge, Nearctic (1,420/1,550) bölgesidir.

Günümüzde bilim insanları hayatta olan su böceklerini 4 alt takıma ayırmışlardır: Adephaga (yaklaşık 35,000 tür) Archostemata (yaklaşık 35 tür) Myxophaga (yaklaşık 65 tür) ve Polyphaga (yaklaşık 315,000 tür) (Arnett and Thomas 2000; Arnett *et al.* 2002). Yaşamakta olan böcekler için yüksek düzeyde en son sınıflandırılmada 16 üst familya ve 168 familya tanımlanmıştır (Lawrence and Newton 1995; Beutel and Leschen 2005).

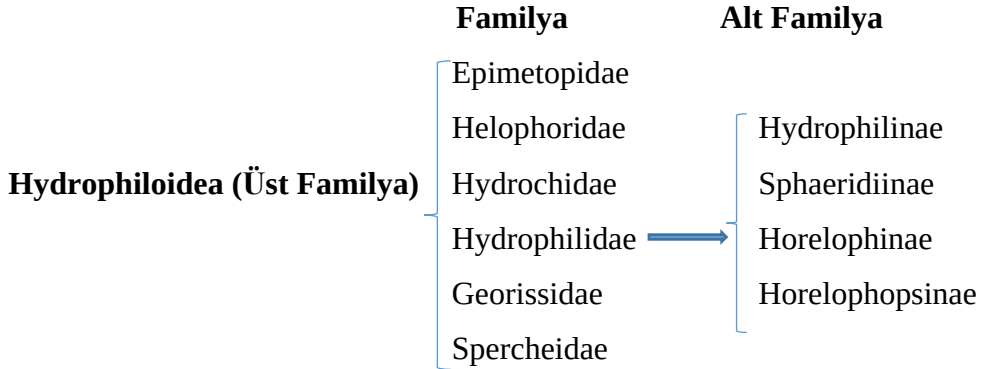
Hydrophiloidea üst familyası, Polyphaga alt takımına aittir (Lawrence and Newton 1995; Hansen 1991, 1995). Bu tezde çalışılan familyalar Hydrophiloidea içinde yer almaktadır.

2.4. Hydrophiloidea Üst Familya

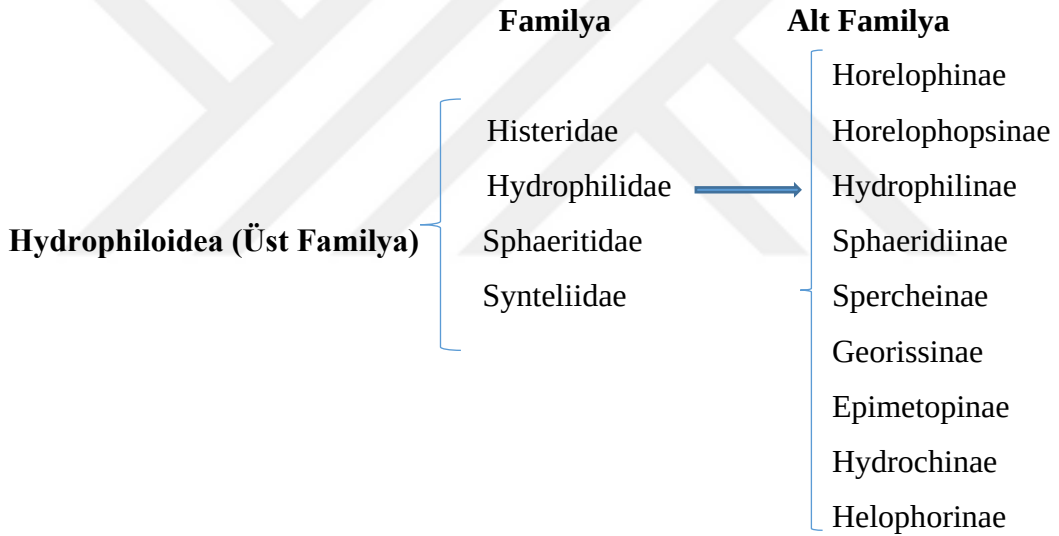
Hydrophiloidea dünya çapında yayılış gösteren geniş bir gruptur. 475 cins ve 6600 tanımlanmış tür içeren bu grup üç karasal familya (Synteliidae, Sphaeritidae ve Histeridae) ve en önemli sucul olarak tanınan Hydrophilidae familyasını içerir (Lawrence and Newton 1995; Archangelsky *et al.* 2005). Hydrophiloidea başka bir sınıflanmada üst familya olarak (Crowson 1981; Hansen 1991, 1997a, 1999c; Lawrence 1991) 6 familyayı (Helophoridae, Hydrochidae, Epimetopidae, Georissidae, Spercheidae ve Hydrophilidae) içerir. Archangelsky *et al.* (2005) sınıflandırmalarının devamında Hydrophilidae familyasını 9 alt familyaya ayırmıştır. Hansen (1991)'in familyaları, Horelophinae, Horelophopsinae, Hydrophilinae ve Sphaeridiinae bu 9 alt familyalarını içermektedir. Yukarıda belirtilen sınıflandırmalar, aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.2). Hydrophiloidea morfoloji ve taksonomi olarak en iyi araştırılan Coleoptera gruplarından birisidir (Richmond 1920; Böving and Henriksen 1938; Hansen 1987, 1991, 1995, 1997a, 1999b, 1999c; Archangelsky 1997, 1998, 2001, 2002a, 2002b; Beutel 1994; Beutel and Komarek 2004; Komarek 2004, 2006, 2007; Komarek and Beutel 2007). Buna rağmen Hydrophiloidea filogenisi hâlâ tartışmalıdır (Hansen 1991, 1997a; Archangelsky 2004; Korte *et al.* 2004; Archangelsky *et al.* 2005; Bernhard *et al.* 2006).

Hydrophiloidea içindeki filogenetik ilişkiler yıllardır tartışma konusu olmuş, sucul ve karasal yaşam arasındaki yinelenen değişiklikleri iyi anlaşılmamıştır. Son yıllarda Coleoptera takımı ve Hydrophiloidea üst familyasının taksonomi ve filogenisiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Çizelge 2.1). Çizelgede görüldüğü gibi, larva ve ergin böceklerin morfolojik özellikleri, nüklear ve mitokondriyal genlere dayanarak, moleküler karakterler, morfoloji ve moleküler karakterler birlikte esas olarak kullanılmıştır.

Hansen 1991'e göre sınıflandırma:



Lawrence and Newton 1995 ve Archangelsky *et al.* 2005'e göre sınıflandırma:



Şekil 2.2. Hansen (1991), Lawrence and Newton (1995) ve Archangelsky *et al.* (2005)'e göre filogenetik sınıflandırma

Çizelge 2.1. Coleoptera ve Hydrophiloidea üzerinde yapılan çalışmalar

Whiting <i>et al.</i>	1997	Holometabolous Insect (involves aquatic insects)	Molecular and morphology	18S and 28S
Caterino <i>et al.</i>	2002	Coleoptera(include aquatic and terrestrial families)	Molecular	18s rDNA
Korte <i>et al.</i>	2004	Staphyliniform(involves aquatic families)	Molecular	18S and 28S rDNA

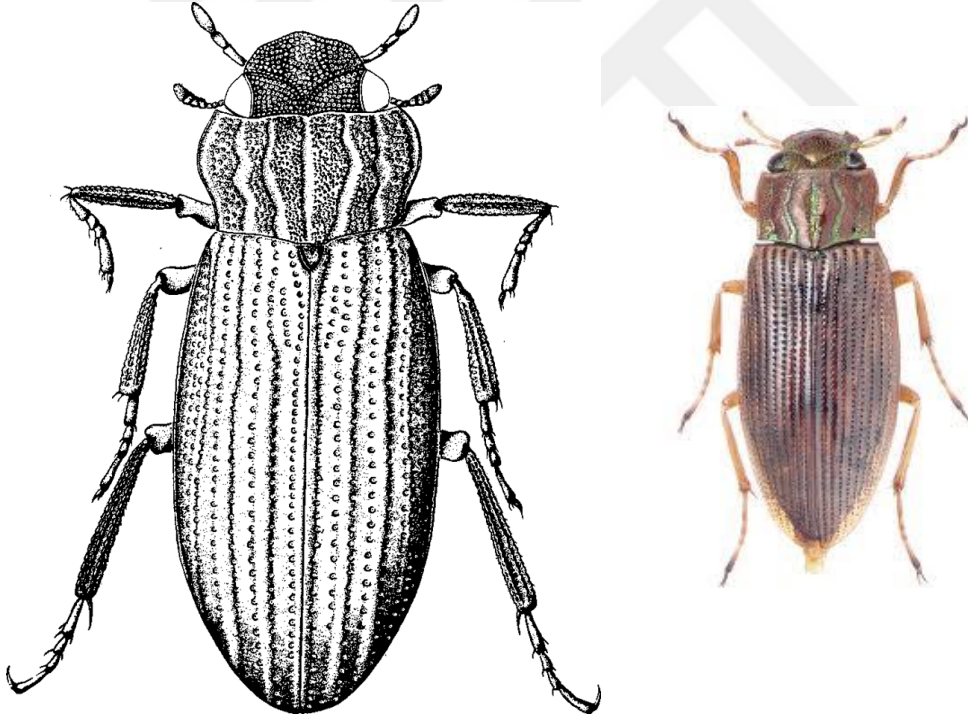
Çizelge 2.1. (devam)

Caterino <i>et al.</i>	2005	Staphyliniformia(Hydrophiloidea and Staphylinoidea)	Molecular and morphology	18S rRNA
Bernhard <i>et al.</i>	2006	Hydrophiloidea	Molecular	SSU rDNA and LSU rDNA, 12S rDNA, 16S rDNA, COI, COII
Çiampor and Ribera	2006	Elminae(Coleoptera)	Molecular and morphology	18S rRNA and (ribosomal unit + tRNA ^{Leu} + 5' end of the NADH dehydrogenase1) cytochrome b and COI
Hayashi and Sota	2008	Coleoptera: Psephenidae	Molecular and morphology	COI
Bernhard <i>et al.</i>	2009	Hydrophiloidea	molecular data and morphological characters of adults and immature stages	Nuclear SSU and LSU mitochondrial rrnS, rrnL, cox1 and cox2 genes.
Hayashi and Sota	2010	Coleoptera: Elmidae	Molecular and morphology	cox1
Mađarić <i>et al.</i>	2013	Hydrophilidae	Molecular	28S rRNA, 18S rRNA, 16S rRNA, 12S rRNA, COI and COII
Short and Fik'a c'ek	2013	Hydrophilidae	Molecular	COI , COII and 16S 18S, 28S and arginine kinase

2.5. Helophoridae Familyası

Helophorus, Helophoridae ailesinin tek cinsidir. Yaklaşık 200 türü tanımlanmıştır (Angus 1992) ve bunlardan 30'u Avrupa'da bulunur. Helophoridae, Palaearktik bölgede çok çeşitlenmiştir (>150 spp.). 40 türü Kuzey Amerika ve 4 tür Ethiopian ve Oriental

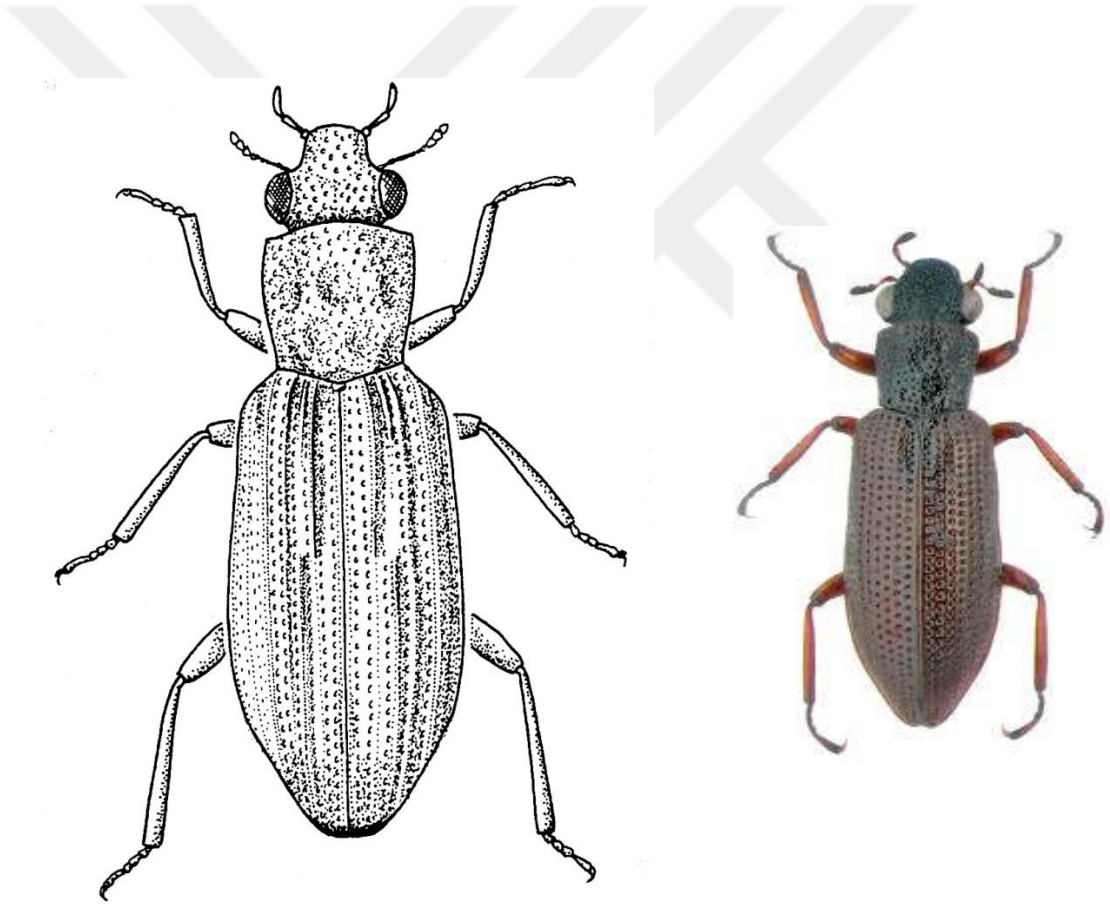
bölgelerde tanınmıştır (Angus 1992). En göze çarpan özelliği pronotumları üzerinde bulunan ve sayıları beş olan yarık dizisidir ki Almanca bir kelimedden "Furchenwasserkäfer" alınmıştır (Şekil 2.3). Çok sayıda türe sahip olmalarına rağmen, ergin morfolojisi açısından son derecede benzerlik gösterdiğinden tür teşhisi oldukça zordur (Angus 1992). Vücut boyutları 2-8 mm arasındadır. Erginleri sucul veya yarı sucul olmalarına rağmen *Empleurus* alt cinsinin bir kaç türü istisna olarak karasaldır. Ergin Helophorid diğer sucul Hydrophiloid'ler gibi, antenlerini yardımcı solunum organı olarak kullanır ve havayı vücudun karın kısmı tarafında plastron gibi depolar (Klausnitzer 1996). Bu böcekler çok kötü yüzücüdür veya hiç yüzme yetenekleri yoktur. Su habitatlarının altındaki maddelerde veya bitkilerin batık parçaları üzerinde hareket ederler. Yayılışlarında uçuşma özelliğini kullanırlar.



Şekil 2.3. Helophoridae'nin genel vücut şekli, üstten (Pirisinu 1981)

2.6. Hydrochidae Familyası

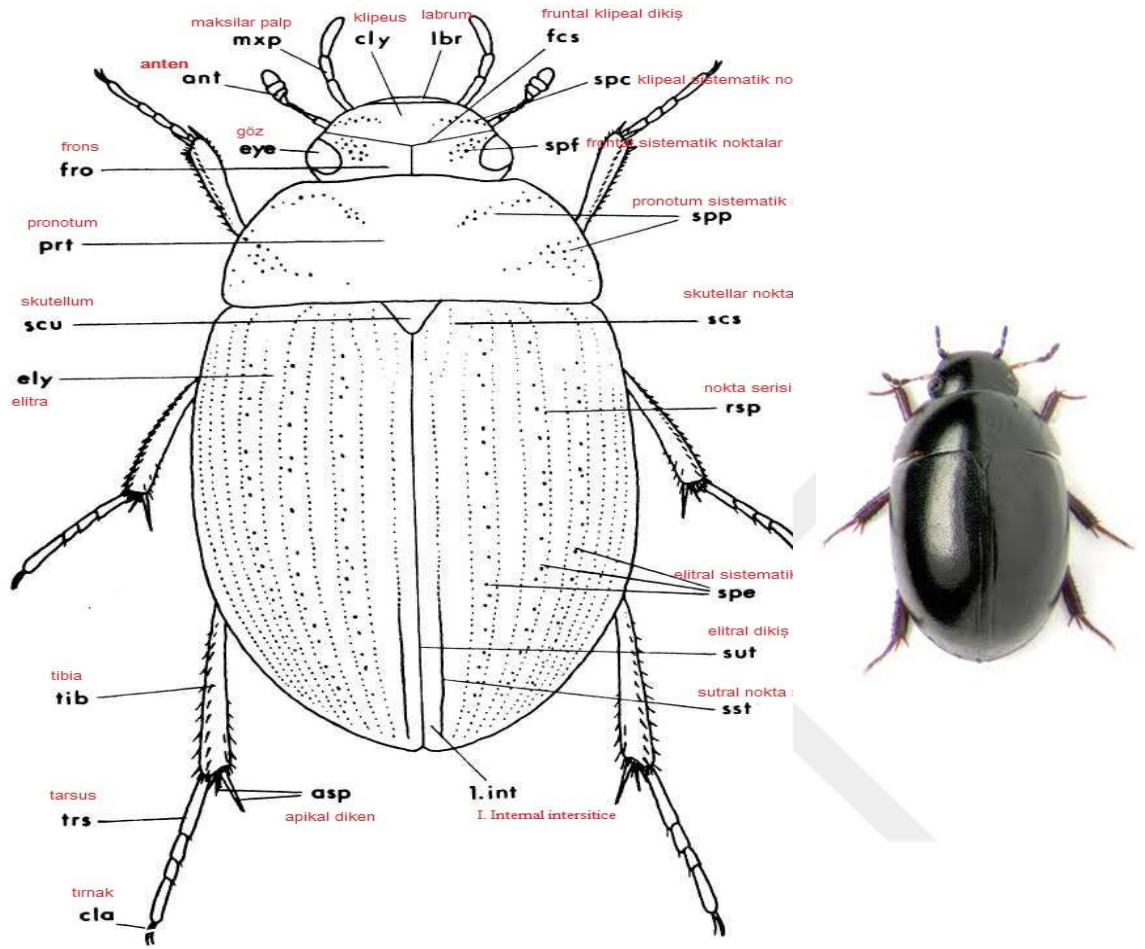
Hydrochidae sadece bir cinsi ve toplam 87 türü içeren, bütün zoocoğrafik bölgelerde yayılış gösteren bir familyadır. Vücudun boyuna uzaması, yedi segmentli antene sahip olmaları ve pronotumları üzerinde çöküntülerin bulunması karakteristik özelliklerindendir (Angus 1977; Hansen 1987, 1999a; Hebauer and Klausnitzer 1998; Valladares *et al.* 1999) (Şekil 2.4). Türkiye’de sadece dört türü bilinen bu familyanın, Avrupa’dan ise yedi türü bilinmektedir (Hansen 1991; Hebauer 1994; İncekara 2004a, 2004b).



Şekil 2.4. Hydrochidae'nin genel vücut şekli, üstten (Angus 1977)

2.7. Hydrophilidae Familyası

Hydrophilidae tüm dünya üzerine yayılmış 172 cins ve 2716 tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde bulunan türlerinin daha çok Asya faunası ile benzerlik gösterdiği (Kosswing 1995) ve boylarının 1-60 mm arasında değiştiği, sucul, yarı sucul ve karasal formlarının bulunduğu, sucul olanların genelde her türlü tatlı sularda yaşadıkları, diğer familyalardan; antenlerinin son üç segmentinin genişlemiş ve kıllı olması, karın bölgelerinde beş adet segment bulunması ile ayırt edildikleri, *Berosus* gibi bazı cinslerin iyi yüzücü oldukları, su bitkileri, yosunlar ve bitkisel döküntüler ile beslendikleri, balıklar ve su kuşları için besin değeri taşıdıkları, göllerde, küçük birikintilerde ve hızlı akan suların sığ kesimlerinde bulundukları, yarı sucul olanların suya yakın kısımlardaki toprakların içerisinde veya çürümeye başlamış bitki, saman gibi döküntülerin altında bulundukları, karasal olanlarının ise inek, keçi v.s. gibi omurgalı hayvanların dışkıları içinde veya altında, bitkisel çürümenin çok olduğu yerlerde, hatta kuş yuvalarında bile (*Cercyon*) bulunabildikleri (Spangler 1982; Hansen 1987, 1991, 1999a, 2004; Hebauer 2002); milimetrik elek, atrap ve ışık tuzakları gibi aletlerle yakalandıkları (Hilsenhoff 1985, 1991) genelde parlak siyah, kahverengi veya sarımsı renkte oldukları kaydedilmektedir (Hansen 1987, 1991; Angus 1992; Oliva 1993). Hydrophilidae familyasının dünyada Horelophinae, Horelophopsinae, Hydrophilinae ve Sphaeridiinae olmak üzere toplam dört altfamilyası bulunmaktadır. Ancak, Palearktik bölgeden sadece Hydrophilinae ve Sphaeridiinae altfamilyaları bilinmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hydrophilidae'nin genel vücut şekli, üstten (Hansen 1991)

Bu çalışmada morfolojik tür tayini yapılan 3 familyaya ait bireylerin moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışılan Türlerin Hazırlanması

Böcek numuneleri; Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Sistematiği Laboratuvarı'nda koruma altına alınmış ve morfolojik tür tayini de Hansen (1991, 1997a ve 1999c)'e dayanarak teşhis edilmiş müze örneklerinden temin edildi. Moleküler çalışmalar, her türe ait 3'er örnek üzerinden yürütüldü.

Kullanılan böcek türleri:

Helophoridae:

Helophorus abeillei (Guillebeau 1896)

H. daedalus (Orchymont 1932)

H. faustianus (Sharp 1916)

H. fulgidicollis (Motschulsky 1860)

H. griseus (Herbst 1793)

H. helenae (Angus 1998)

H. lewisi (Angus 1985)

H. montenegrinus (Kuwert 1885)

H. nubilus (Fabricius 1777)

H. pallidipennis (Mulsant and Wachanru 1852)

H. paraminutus (Angus 1986)

H. terminassiana (Angus 1984)

Hydrochidae:

Hydrochus ignicollis (Motschulsky 1860)

H. nitidicollis (Mulsant 1844)

Hydrophilidae:*Anacaena limbata* (Fabricius 1792)*A. lutescens* (Stephens 1829)*A. rufipes* (Guillebeau 1896)*Berosus byzantinus* (Ganglbauer 1904)*B. fulvus* (Kuwert 1888)*B. guttalis* (Rey 1883)*Chaetarthria seminulum* (Herbst 1797)*Chasmogenus livornicus* (Kuwert 1890)*Cymbiodyta marginella* (Fabricius 1792)*Enochrus bicolor* (Fabricius 1792)*E. fuscipennis* (Thomson 1884)*Helochares lividus* (Forster 1771)*H. obscurus* (O.F.Muller 1776)*Hydrochara caraboides* (Linnaeus 1758)*Hydrophilus aterrimus* (Eschscholtz 1822)*Laccobius obscuratus* (Rottenberg 1874)*L. syriacus* (Guillebeau 1896)*Paracymus aeneus* (Germar 1824)*P. chalceolus* (Solsky 1874)**3.2. Moleküler Çalışmalar**

Temel olarak böceklerin filogenisinde mitokondrial DNA sitokrom oksidaz I gen lokasyonu kullanıldı. Bu amaçta Lizis, DNA izolasyonu, PCR ve jele yükleme aşamaları, takip edildi. DNA izolasyonu Qiagen protokolüne dayanarak yürütüldü.

3.2.1. Lizis

Lizis işlemi için, 2 ml'lik ependorf tüp içerisine 180 µl Lizis buffer (buffer ATL) ve 20 µl Proteinase K eklendi. Sonra bu karışım içerisine böcek bacakları (tercihen arka

femur, 0,5 mm den küçük böcekler için vücudun tamamı) ilave edildi (Şekil 3.1). Tüp etiketlenip materyal kaydı yapılarak 56°C'deki inkubatör içerisinde en az 16 saat bekletildi (Şekil 3. 2). Lizis buffer böceklerin kuru iç dokularını parçalayıp, kitinli dış iskeleti yumuşatmaktadır. Arka bacağı kullanmak ise simbiyotik kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Elde edilen DNA oranı kesinlikle taze toplanan örneklerle göre düşüktür. Bu nedenle yıkama bufferi (elution buffer) standart şekilde protokolde uygulanmaktadır. Kullandığımız doku miktarı da elde edilen DNA'yı etkilemektedir. Bu problemi gidermek için, Qiagen protokolü 50 mg'den fazla doku kullanmayı önermektedir (Crane 2011). Buffer ATL'nin içinde SDS ve EDTA maddeleri bulunur. SDS membranların eritilmesi ve proteinlerin denatürasyonunda kullanılır, EDTA ise enzim tespitine ve kalsiyum gibi iyonların ayrılmasına neden olur. Proteinase K, glikoproteinleri parçalar ve RNase ve DNase enzimlerini inaktif hale getirir.



Şekil 3.1. Lizis aşama



Şekil 3.2. İnkübasyon

3.2.2. DNA izolasyonu

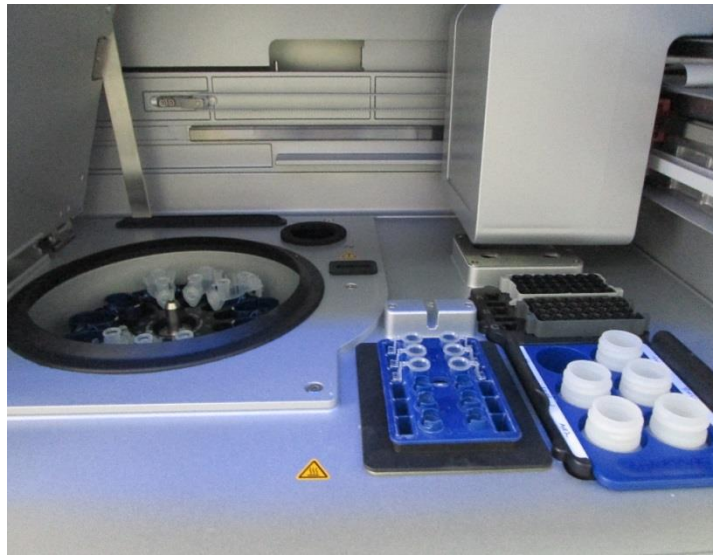
DNA izolasyonunda farklı yöntemler değişik etkilere sebep olur (Waldschmidt 1997; Chen *et al.* 2008). Tercih edilen yöntemde, elde edilen DNA miktarının fazla, DNA bozulması ve masraflar oranı, çalışma süresi ve reaksiyonda oluşan zararlı atık maddelerin düşük olması beklenmektedir. Chen *et al.* (2010)'a göre DNA izolasyonunda 5 farklı yöntem kullanmıştır. SDS (sodium dodecyl sulfate), CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), DNAzol®, Puregene® Kit ve DNeasy®. Bu çalışmada DNeasy en uygun yöntem olarak seçildi. Deneyler Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kiti kullanıldı.

Lizis edilmiş tüpler 1500 rpm devirde 15 saniye santrifüj edildi. Sonra DNA izolasyonunda kitler ve Qiagen robot (Şekil 3.3) protokolu takip edildi. İzole edilmiş DNA -20°C'de kullanılmak üzere soğutucuda saklandı. Qiagen kit içinde bulunan 4 buffer (Buffer AE, Buffer AL, Buffer AW1 ve Buffer AW2) bu aşamada kullanıldı. Buffer AL de buffer ATL gibi lizis bufferdir. Bu buffer lizis aşamasını sonlandırır ve

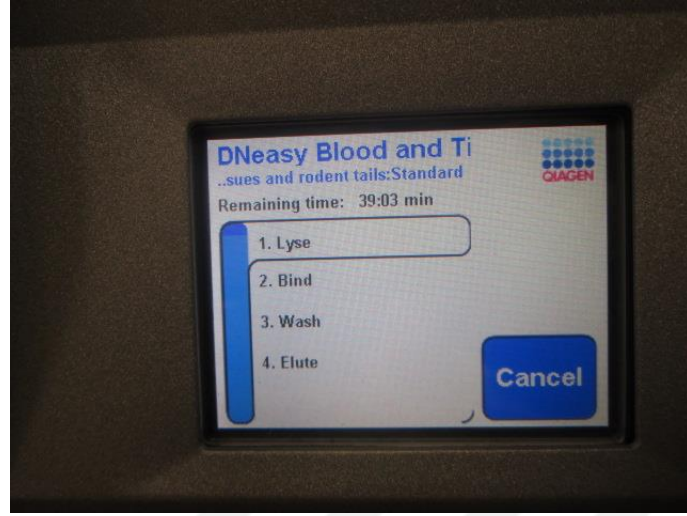
DNA'nın spin columnunda silika membrana yapışmasına yardımcı olur (Crane 2011). Guanidinium chlorid içeren AW1 buffer, proteinleri bozup, hücre ve çekirdek membranını parçalar. Etanol içeren buffer AW2 sütundaki tuzu kaldırır ve DNA'nın saf hale getirilmesini sağlar. Lizis edilmiş plateler ve bufferlerin robot içinde nasıl yerleştiği ve DNA izolasyonunun aşamaları Şekil 3.4 ve 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Qiagen robot



Şekil 3.4. Lizis edilmiş plateler ve bufferlerin robot içinde nasıl yerleşmeleri



Şekil 3.5. DNA izolasyonunda robota uygulanan aşamalar

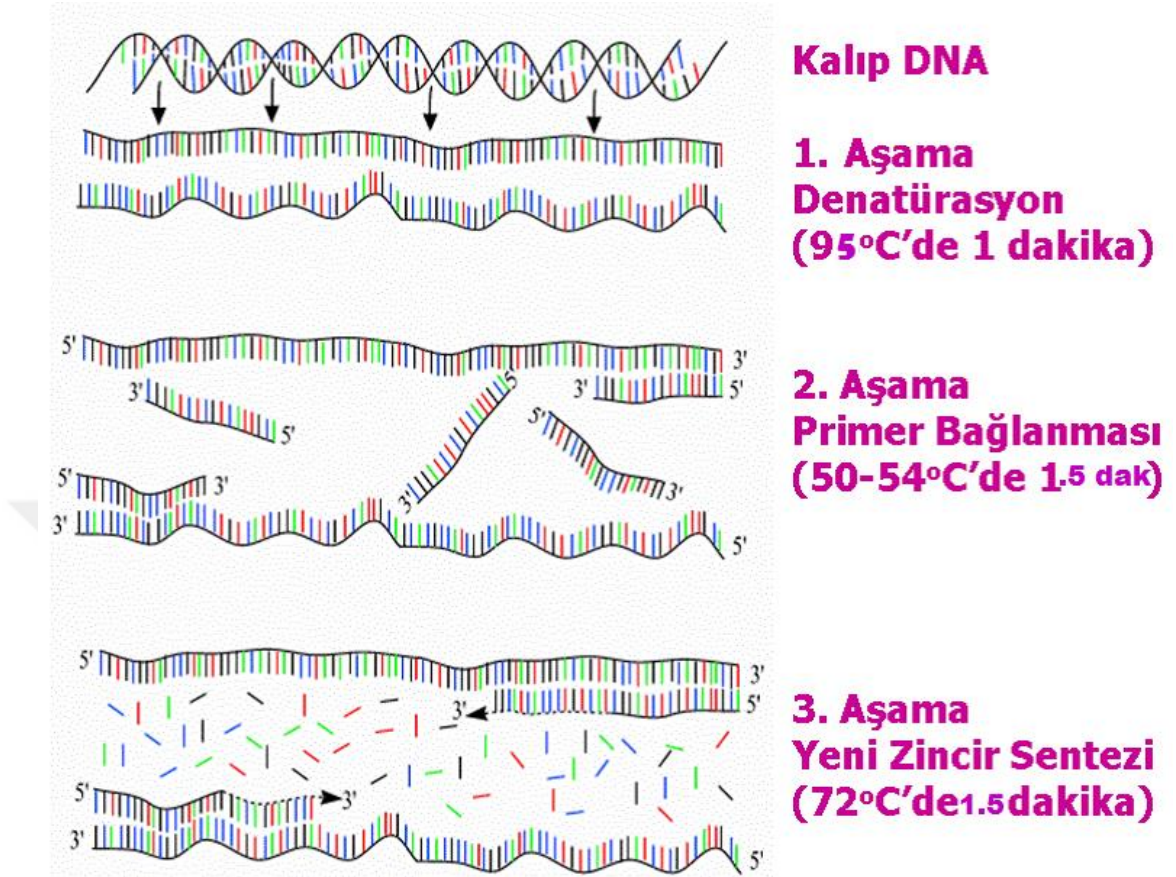
3.2.3. PCR

1986 yılında geliştirilen PCR yöntemi DNA moleküllerindeki istenilen gen bölgesinin canlı hücre içine sokulmadan yalıtılıp çoğaltılmasına olanak sağlar. Genomdan seçilen küçük miktardaki bir gen bölgesinin bile milyonlarca kopyası bu yöntemle yapılabilir. Bunun için sadece bu dizinin, en azından bir kısmının önceden biliniyor olması gerekmektedir. PCR ürünü DNA'ların klonlamasının yanı sıra dizi analizi, hastalık tanısı, genetik tarama gibi çeşitli amaçlar için de kullanılabilir. PCR, rekombinant DNA teknolojilerinin etkinliğini ve gücünü arttırmış, hatta bazı yöntemlerin yerini almıştır. PCR reaksiyonunda 3 temel basamak vardır. Bunlar:

1) Denatürasyon (Denaturation)

2) Bağlanma (Annealing)

3) Uzama (Extension) aşamalarıdır. PCR aşamaları Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.6. PCR aşamaları

Böceklerde genel bir primer olan LEPF1 (ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG) ve LEPR1 (TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA) (Hebert *et al.* 2003a, 2003b) kullanılarak PCR plateleri hazırlandı. PCR platelerin hazırlanmasında, her örnek için; 10.5 μL PCR master MIX içerisine 2 μL izole edilmiş DNA materyali konuldu. Platelerin ağızları alüminyum tabaka ile kapatılıp ısı makinasında preslendi. Bu plateler CO1 Fast Thermocycler (96-13 0C) programına uygun olarak bir saat 50 dakika PCR edildi (Şekil 3.7). CO1 için PCR şartlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Bir reaksiyon için PCR MIX hazırlanması:

10% trehalose 6.25 μL

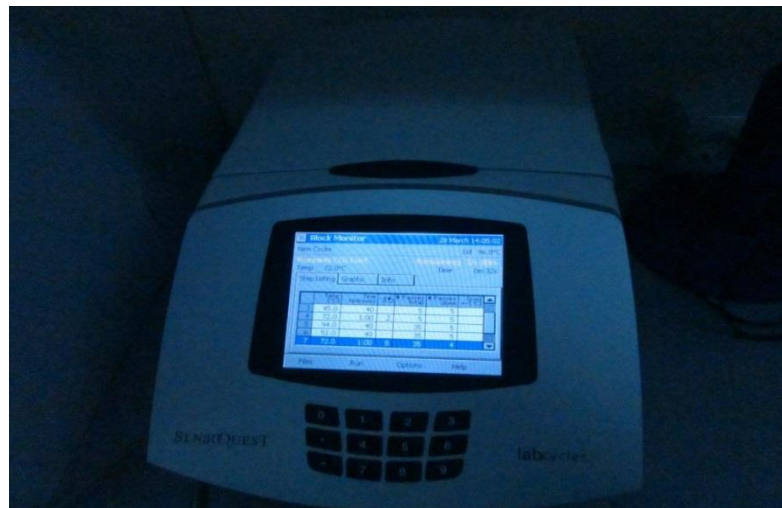
ddH₂O 2 μL

10Xbuffer 1.25 μL

50mM MgCl₂ 0.625 µL
 10 µM F primer 0.125 µL
 10 µM R primer 0.125 µL
 10mM dNTPs 0.0625 µL
 Taq polymerase(5U/ µL) 0.06
 Total hacim 10.5 µL.

Çizelge 3.1. CO1 için PCR şartlar

Sıcaklık	Zaman	Devre	Aşama
95°C	5min	-	Başlatma
95°C	1min	40	Denatürasyon
50°C	1.5min	40	Bağlanma
72°C	1.5min	40	Uzama
72°C	10min	-	Son Uzama



Şekil 3.7. PCR cihazı

3.2.4. Jele yükleme

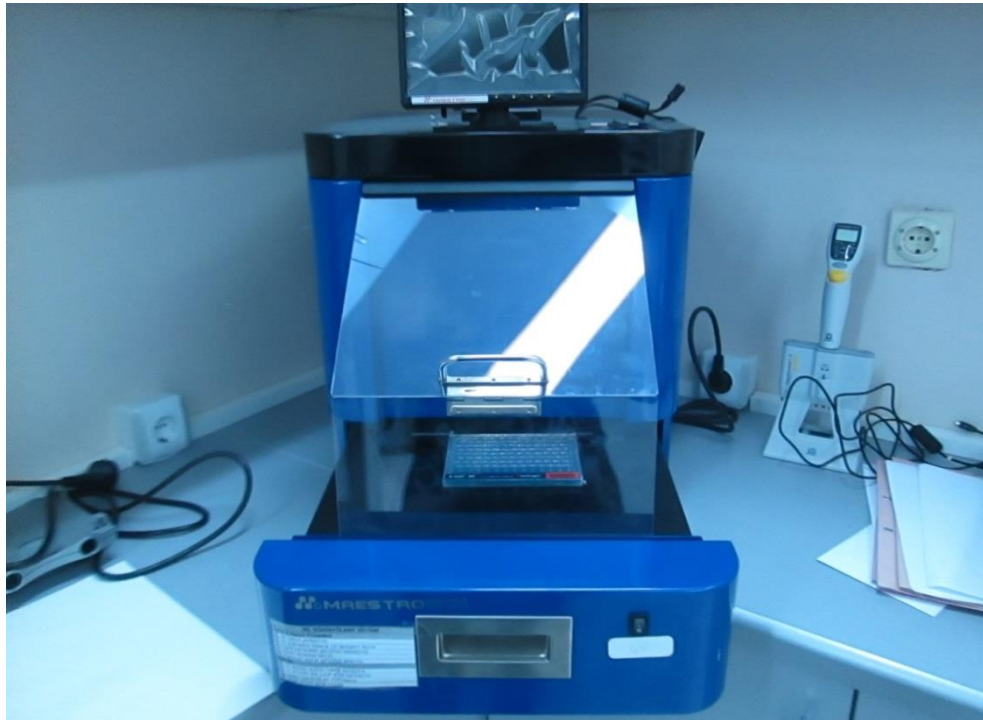
PCR edilmiş plateler önce 1000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildikten sonra İnvitrogen etidyum bromid içerikli agaroz jele yüklendi (şekil 3.8). Bunun için jelin her kuyucuğuna 14 µl embriyo transfer su yüklendikten sonra 3 µl amplifiye DNA aktarıldı. Jeller 4 dakika İnvitrogen tabelada (şekil 3.9) elektroforez edildikten sonra UV görüntüleme sistemine (şekil 3.10) konularak DNA bantları fotoğraflanıp kontrol edildi.



şekil 3.8. İnvitrogen etidyum bromid içerikli agaroz jel



Şekil 3.9. İnvitrogen tabela



Şekil 3.10. UV görüntüleme sistemi

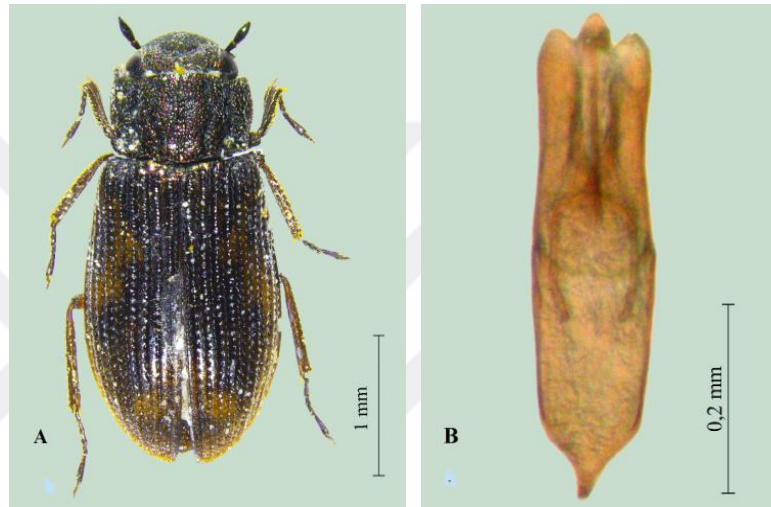
3.2.5. DNA gen dizilimi sonuçlarının değerlendirilmesi

UV görüntüleme sisteminde net DNA bantlar görüldü. Sekans işlemleri hizmet alımı yoluyla yapıldı. Elde edilen Thrace file'ler CodonCode Aligner 3.7.1 programında düzenlendikten sonra genetik varyasyonlar UPGMA dendogramları “Molecular Evolutionary Genetics Analizis” (Mega 5.2) programı ile görüntülenerek baz dizilimleri Fasta formatı haline getirilip Kümeleme analizler yapıldı. Elde edilen dizilimler National Center for Biotechnology Information de (NCBI) blast edilip türlerin kontrolü yapıldı.

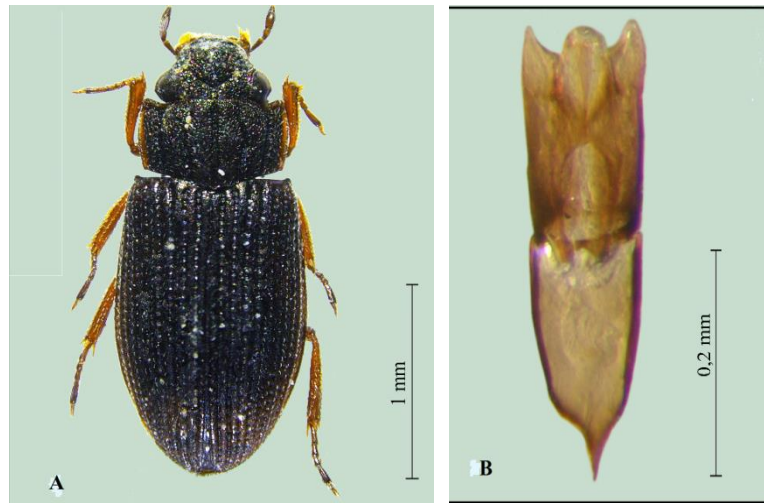


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu grup böceklerin morfolojik tür tayininde en güvenilir karakter Aedeagofor olduğundan, çalışılan türlerin Aedeagoforları genel vücut şekliyle birlikte sunulmuştur (Şekiller 4.1- 4.33).



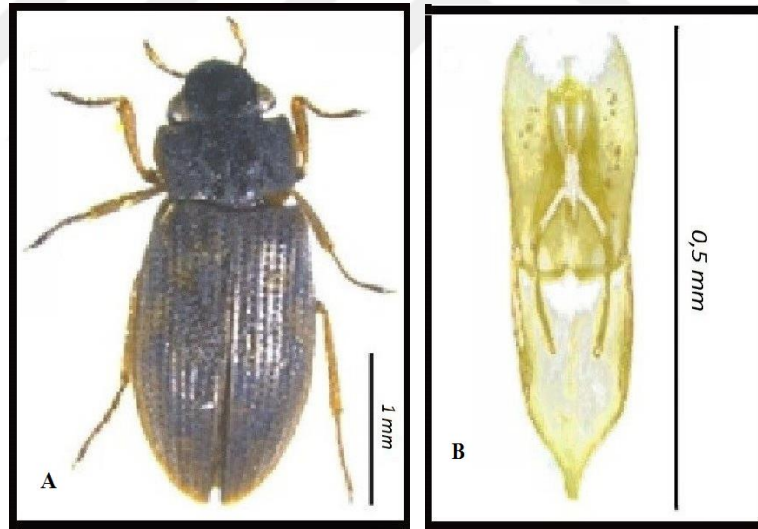
Şekil 4.1. A: *Helophorus abeillei*, B: erkek genital organ



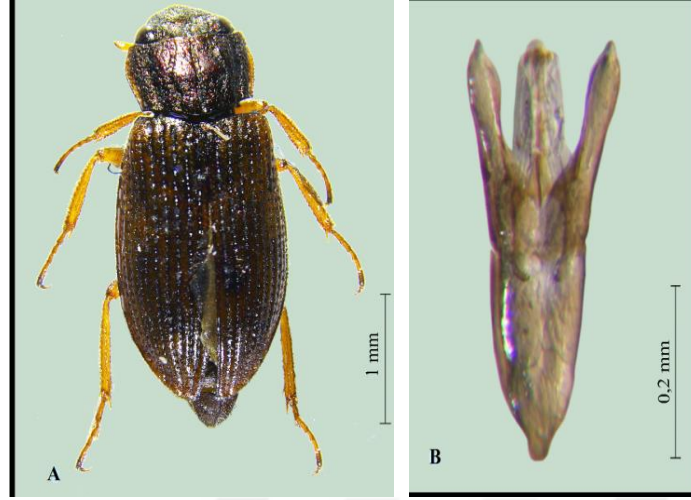
Şekil 4.2. A: *Helophorus daedalus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.3. A: *Helophorus faustianus*, B: erkek genital organ



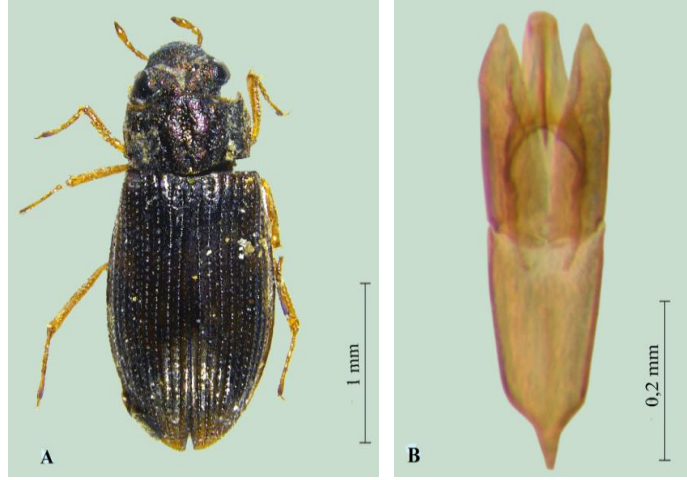
Şekil 4.4. A: *Helophorus fulgidicollis*, B: erkek genital organ



Şekil 4.5. A: *Helophorus griseus*, B: erkek genital organ



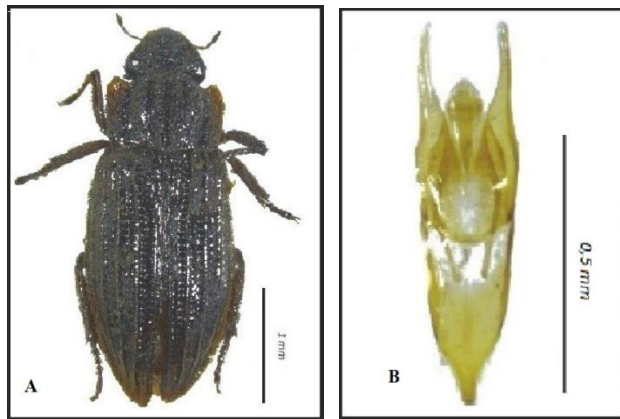
Şekil 4.6. A: *Helophorus helenae*, B: erkek genital organ



Şekil 4.7. A: *Helophorus lewisi*, B: erkek genital organ



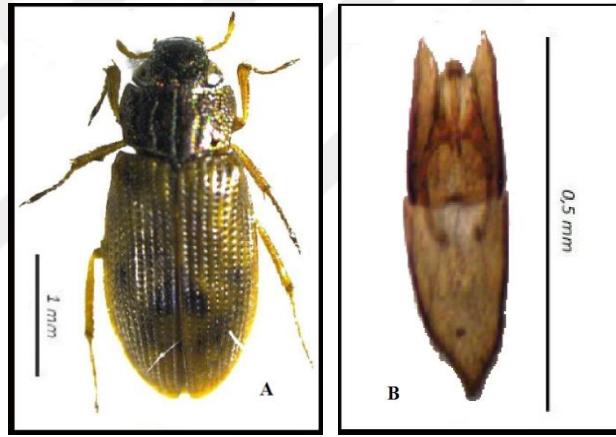
Şekil 4.8. A: *Helophorus montenegrinus*, B: erkek genital organ.



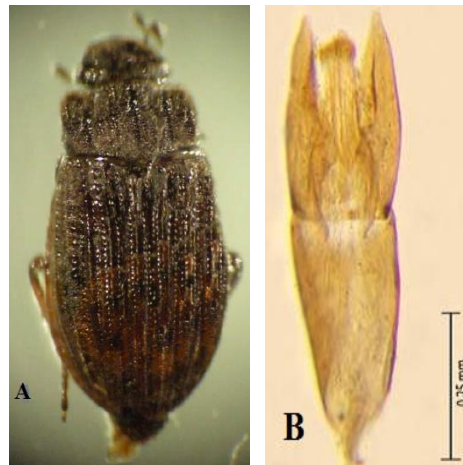
Şekil 4.9. A: *Helophorus nubilus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.10. A: *Helophorus pallidipennis*, B: erkek genital organ



Şekil 4.11. A: *Helophorus paraminutus*, B: erkek genital organ



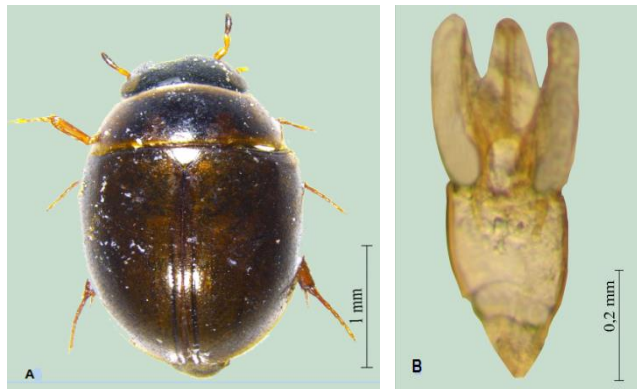
Şekil 4.12. A: *Helophorus terminassianae*, B: erkek genital organ



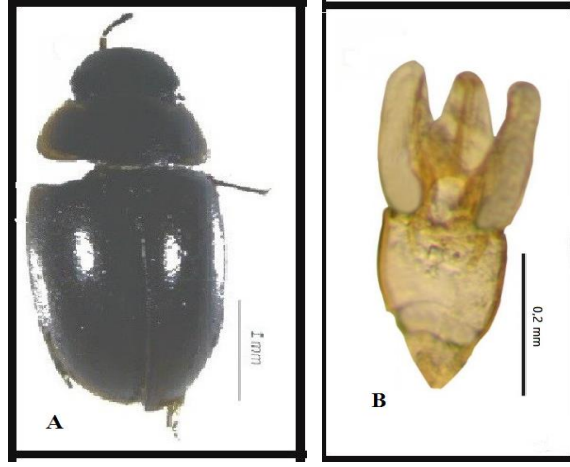
Şekil 4.13. A: *Hydrochus ignicollis*, B: erkek genital organ



Şekil 4.14. A: *Hydrochus nitidicollis*, B: erkek genital organ



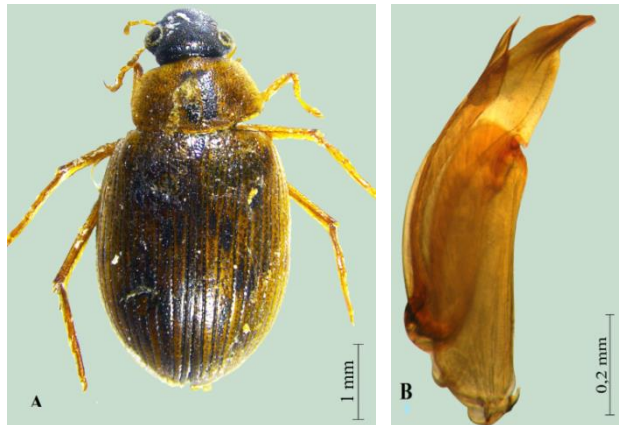
Şekil 4.15. A: *Anacaena limbata*, B: erkek genital organ



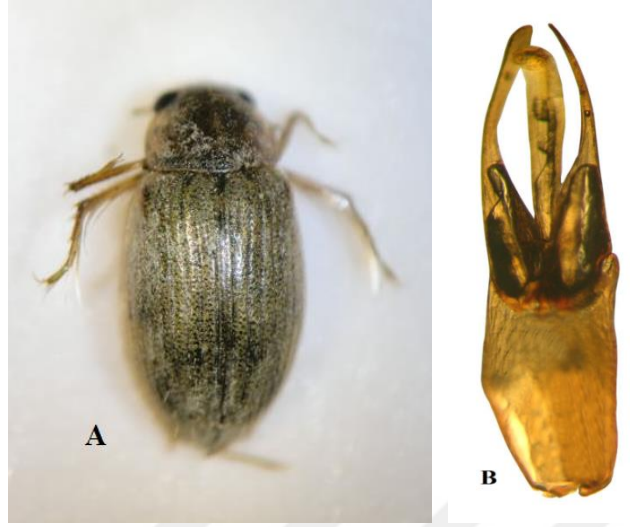
Şekil 4.16. A: *Anacaena lutescens*, B: erkek genital organ



Şekil 4.17. A: *Anacaena rufipes*, B: erkek genital organ



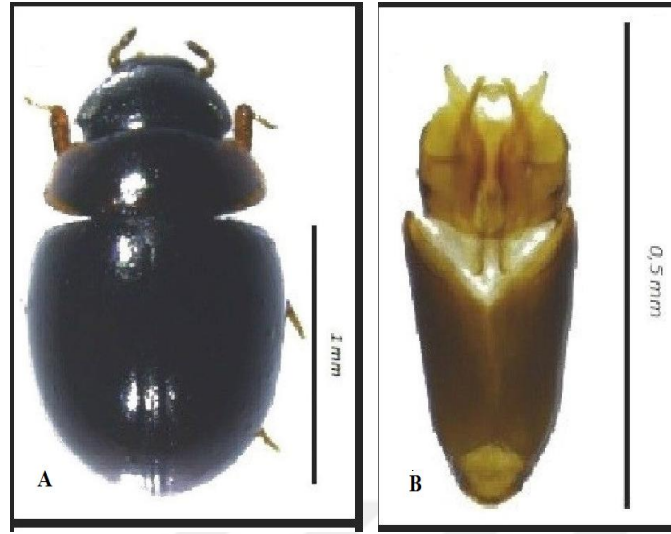
Şekil 4.18. A: *Berosus byzantinus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.19. A: *Berosus fulvus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.20. A: *Berosus guttalis*, B: erkek genital organ



Şekil 4.21. A: *Chaeterthria seminulum*, B: erkek genital organ



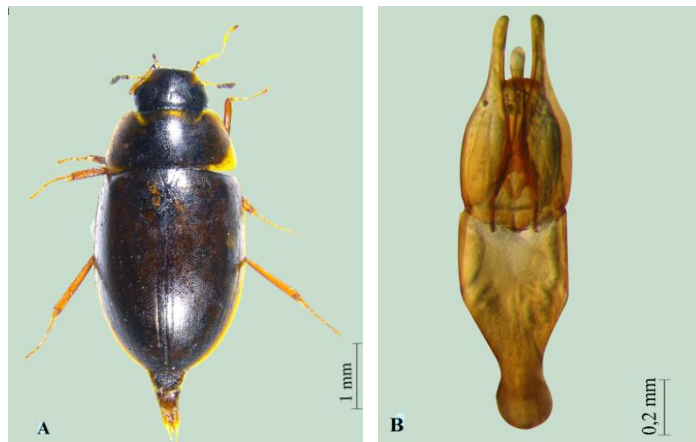
Şekil 4.22. A: *Chasmogenus livornicus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.23. A: *Cymbiodyta marginella*, B: erkek genital organ



Şekil 4.24. A: *Enochrus bicolor*, B: erkek genital organ



Şekil 4.25. A: *Enochrus fuscipennis*, B: erkek genital organ



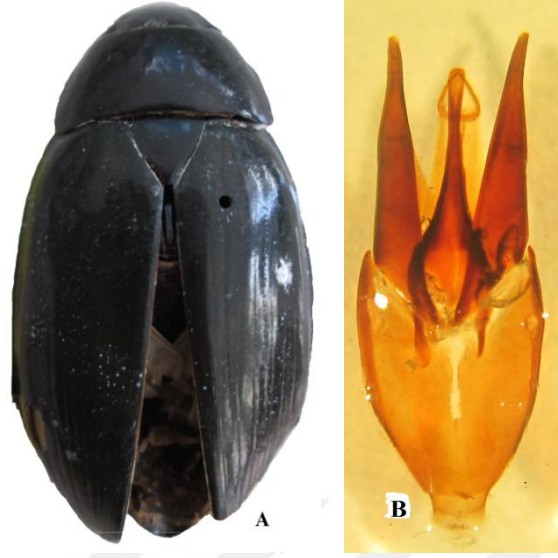
Şekil 4.26. A: *Helochaeres lividus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.27. A: *Helochaeres obscurus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.28. A: *Hydrochara caraboides*, B: erkek genital organ



Şekil 4.29. A: *Hydrophilus aterrimus*, B: erkek genital organ



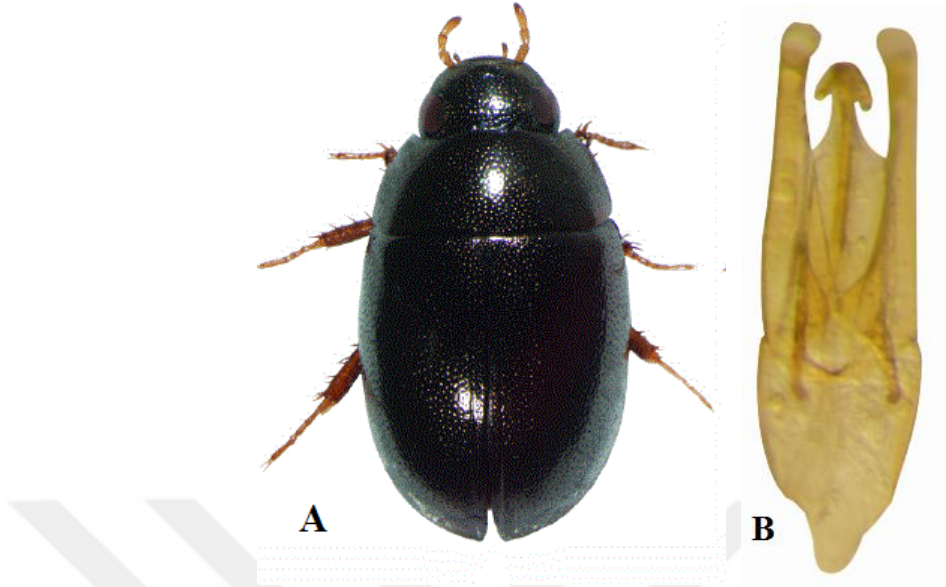
Şekil 4.30. A: *Laccobius obscuratus*, B: erkek genital organ



Şekil 4.31. A: *Laccobius syriacus*, B: erkek genital organ

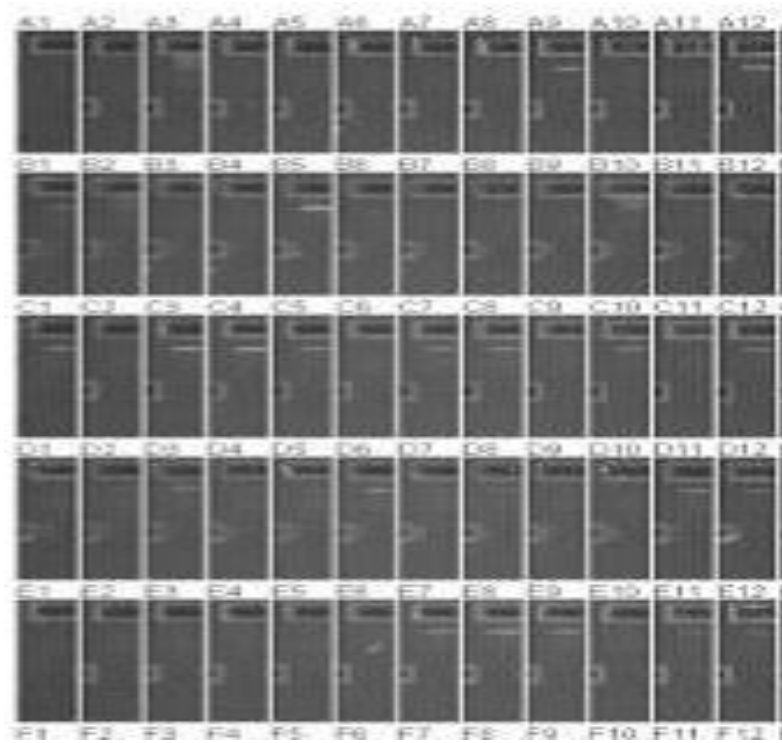


Şekil 4.32. A: *Paracymus aeneus*, B: erkek genital organ



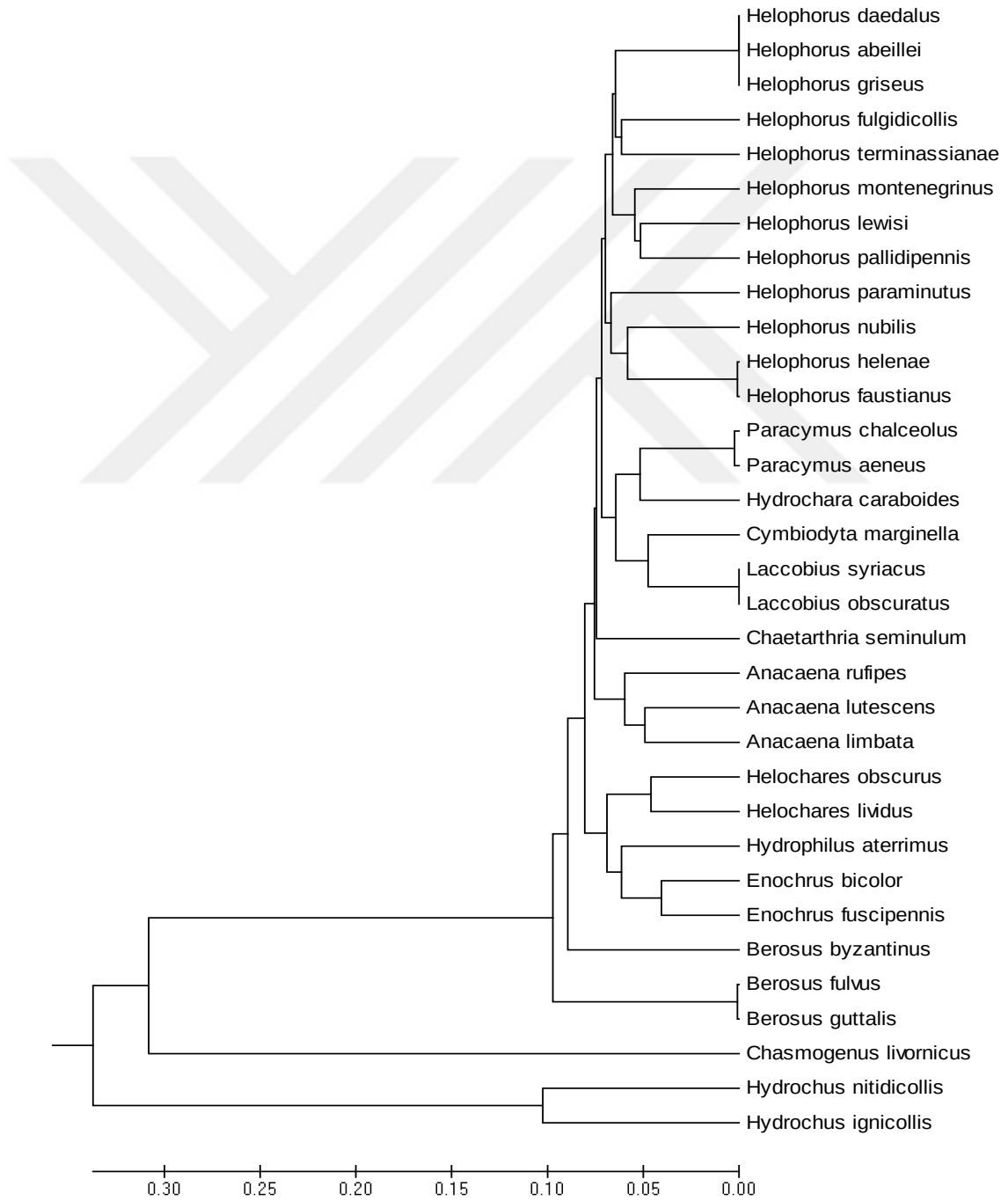
Şekil 4.33. A: *Paracymus chalceolus*, B: erkek genital organ

UV görüntüleme sisteminde net DNA bantlar görüldü. Bazı türlere ait jel görüntüleri Şekil 4.34'de verilmiştir.



Şekil 4.34. Türler için jel görüntüleri

Yapılan çalışmalar sonucunda önceden teşhisleri yapılmış 33 türe ait 99 böcek numunesinin sekansları elde edilerek türlerin soy ağaçları verilmiştir (Şekil 4.35). Ayrıca A+T oranı (Şekil 4.36) ve kodon poz isyon oranları (Çizelge 4.1) da gösterilmektedir.



Şekil 4.35. Türlerin soy ağacı

Domain: Data																				
	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
Hydrophilus aterrimus	35.9	19.3	27.2	17.5	657.0	32	23.9	22.1	22.5	222.0	46	18.3	22.9	12.4	218.0	30	15.7	36.9	17.5	217.0
Enochrus bicolor	35.6	18.8	28.3	17.3	658.0	32	23.4	21.6	23.0	222.0	47	16.4	25.6	11.0	219.0	28	16.6	37.8	18.0	217.0
Enochrus fuscipennis	36.1	18.1	29.7	16.1	657.0	32	23.4	22.5	22.1	222.0	45	17.9	28.0	9.2	218.0	31	12.9	38.7	17.1	217.0
Berosus fulvus	33.7	21.1	26.6	18.5	658.0	30	25.7	22.1	22.5	222.0	40	21.0	26.5	12.3	219.0	31	16.6	31.3	20.7	217.0
Paracymus chalceolus	37.1	16.1	31.5	15.3	658.0	34	21.6	23.0	21.6	222.0	45	16.4	31.5	7.3	219.0	33	10.1	40.1	17.1	217.0
Helophorus fulgidicollis	35.1	17.9	29.5	17.5	658.0	35	20.7	22.1	22.5	222.0	39	20.1	28.8	12.3	219.0	32	12.9	37.8	17.5	217.0
Chaetarthria seminulum	37.4	17.6	28.9	16.1	658.0	32	23.4	23.0	22.1	222.0	46	17.4	28.3	8.2	219.0	35	12.0	35.5	18.0	217.0
Berosus guttalis	33.9	21.0	26.4	18.7	658.0	30	25.7	22.1	22.5	222.0	41	20.5	26.0	12.8	219.0	31	16.6	31.3	20.7	217.0
Helophorus griseus	35.3	18.2	30.2	16.3	658.0	33	21.6	23.0	22.1	222.0	42	19.2	29.7	8.7	219.0	30	13.8	38.2	18.0	217.0
Laccobius syriacus	37.8	16.4	29.5	16.3	658.0	33	23.0	22.1	22.1	222.0	43	17.8	29.2	9.6	219.0	37	8.3	37.3	17.1	217.0
Helophorus daedalus	35.3	18.2	30.2	16.3	658.0	33	21.6	23.0	22.1	222.0	42	19.2	29.7	8.7	219.0	30	13.8	38.2	18.0	217.0
Paracymus aeneus	36.9	16.3	31.5	15.3	658.0	34	21.6	23.0	21.6	222.0	44	16.9	31.5	7.3	219.0	33	10.1	40.1	17.1	217.0
Cymbiodyta marginella	37.4	16.3	29.9	16.4	658.0	33	21.6	22.5	22.5	222.0	42	17.4	30.6	9.6	219.0	36	9.7	36.9	17.1	217.0
Helophorus helenae	35.9	18.1	29.2	16.9	658.0	33	22.1	21.6	23.0	222.0	43	17.4	30.6	9.1	219.0	31	14.7	35.5	18.4	217.0
Helophorus faustianus	35.7	18.2	29.2	16.9	658.0	33	22.1	21.6	23.0	222.0	42	17.8	30.6	9.1	219.0	31	14.7	35.5	18.4	217.0
Hydrochus nitidicollis	39.1	15.3	31.2	14.3	823.0	37	19.3	26.3	17.5	274.0	43	15.2	31.4	10.5	277.0	38	11.4	36.0	15.1	272.0
Helophorus abeillei	35.3	18.2	30.2	16.3	658.0	33	21.6	23.0	22.1	222.0	42	19.2	29.7	8.7	219.0	30	13.8	38.2	18.0	217.0
Helophorus lewisi	36.6	18.0	28.7	16.7	628.0	31	23.0	23.5	22.1	213.0	41	20.2	27.9	11.1	208.0	38	10.6	34.8	16.9	207.0
Anacaena lutescens	37.7	17.2	28.7	16.4	658.0	34	21.6	22.1	22.5	222.0	47	18.3	24.7	9.6	219.0	32	11.5	39.6	17.1	217.0
Helochares obscurus	36.6	18.1	28.7	16.6	658.0	33	23.0	21.2	22.5	222.0	44	18.3	27.4	10.0	219.0	32	12.9	37.8	17.1	217.0
Helophorus paraminutus	36.9	17.8	29.0	16.3	658.0	34	22.5	21.6	21.6	222.0	43	18.7	29.7	8.7	219.0	34	12.0	35.9	18.4	217.0
Helophorus pallidipennis	36.3	17.5	31.6	14.7	510.0	32	25.6	22.1	20.3	172.0	43	17.2	32.0	7.7	169.0	34	9.5	40.8	16.0	169.0
Laccobius obscuratus	37.8	16.4	29.5	16.3	658.0	33	23.0	22.1	22.1	222.0	43	17.8	29.2	9.6	219.0	37	8.3	37.3	17.1	217.0
Helophorus montenegrinus	35.9	18.4	29.0	16.7	658.0	32	22.5	23.0	22.1	222.0	41	19.2	31.1	8.7	219.0	34	13.4	33.2	19.4	217.0
Helochares lividus	35.8	18.4	29.5	16.3	657.0	33	23.0	21.6	22.1	222.0	44	17.4	30.3	8.7	218.0	30	14.7	36.9	18.0	217.0
Chasmogenus livornicus	36.1	16.7	34.8	12.4	748.0	36	20.1	28.1	16.1	249.0	37	15.9	36.7	10.8	251.0	36	14.1	39.5	10.5	248.0
Hydrochus ignicollis	34.6	18.9	30.4	16.1	820.0	34	21.2	26.7	17.9	273.0	38	17.1	32.7	12.0	275.0	32	18.4	31.6	18.4	272.0
Helophorus nubilis	35.9	16.7	29.9	17.5	658.0	34	22.1	21.6	22.5	222.0	41	18.3	29.7	11.4	219.0	33	9.7	38.7	18.4	217.0
Helophorus terminassianae	35.7	18.4	29.5	16.4	658.0	34	22.1	22.1	22.1	222.0	40	19.6	31.5	9.1	219.0	34	13.4	35.0	18.0	217.0
Anacaena limbata	37.5	16.3	29.8	16.3	624.0	34	22.2	22.2	21.2	212.0	45	15.0	30.4	9.2	207.0	33	11.7	37.1	18.5	205.0
Hydrochara caraboides	36.6	17.6	30.1	15.7	658.0	31	23.4	23.9	21.6	222.0	44	18.7	28.3	9.1	219.0	35	10.6	38.2	16.1	217.0
Anacaena rufipes	38.4	15.4	29.9	16.3	656.0	35	20.7	22.1	22.1	222.0	48	14.7	27.2	10.1	217.0	32	10.6	40.6	16.6	217.0
Berosus byzantinus	35.3	19.8	29.2	15.8	658.0	32	23.4	22.5	21.6	222.0	43	20.5	27.9	8.2	219.0	30	15.2	37.3	17.5	217.0
Avg.	36.3	17.8	29.6	16.3	664.1	33	22.4	22.8	21.6	223.8	43	18.0	29.4	9.8	221.1	33	12.8	36.9	17.5	219.2

Şekil 4.36. A+T oranı

Çizelge 4.1 aşağıdaki bilgilere dayanarak oluşturulmuştur.

title: Fasta file

Ntaxa: 33

Description: Analizis

Analizis ----- Distance Estimation

Scope ----- Pairs of taxa

Estimate Variance: Variance Estimation Method

Substitutions Type ----- Nucleotide

Model/Method ----- Maximum Composite Likelihood

Substitutions to Include -----: Transitions + Transversions

Rates among Sites ----- Uniform rates

Pattern among Lineages ----- Same (Homogeneous)

Gaps/Missing Data Treatment ----- Complete deletion

Codons Included ----- 1st+2nd+3rd+Non-Coding

No. of Sites : 499

[1] *#Hydrophilus aterrimus*

[2] *#Enochrus bicolor*

[3] *#Enochrus fuscipennis*

[4] *#Berosus fulvus*

[5] *#Paracymus chalceolus*

[6] *#Helophorus fulgidicollis*

[7] *#Chaetarthria seminulum*

[8] *#Berosus guttalis*

[9] *#Helophorus griseus*

[10] *#Laccobius syriacus*

[11] *#Helophorus daedalus*

[12] *#Paracymus aeneus*

[13] *#Cymbiodyta marginella*

[14] *#Helophorus helenae*

[15] *#Helophorus faustianus*

[16] *#Hydrochus nitidicollis*

[17] *#Helophorus abeillei*

[18] *#Helophorus lewisi*

[19] *#Anacaena lutescens*

[20] *#Helochara obscurus*

[21] *#Helophorus paraminutus*

[22] *#Helophorus pallidipennis*

[23] *#Laccobius obscuratus*

[24] *#Helophorus montenegrinus*

- [25] #*Helochares lividus*
 [26] #*Chasmogenus livornicus*
 [27] #*Hydrochus ignicollis*
 [28] #*Helophorus nubilus*
 [29] #*Helophorus terminassianae*
 [30] #*Anacaena limbata*
 [31] #*Hydrochara caraboides*
 [32] #*Anacaena rufipes*
 [33] #*Berosus byzantinus*

Çizelge 4.1. Kodon pozisyon oranları

[1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33]

[1]

[2] 0.074

[3] 0.403 0.186

[4] 0.363 0.441 1.104

[5] 1.134 0.735 0.206 2.210

[6] 0.339 0.096 0.130 0.681 0.487

[7] 0.403 0.230 0.022 1.253 0.206 0.230

[8] 0.379 0.471 1.168 0.002 2.299 0.727 1.315

[9] 0.607 0.283 0.052 1.176 0.194 0.098 0.134 1.248

[10] 0.687 0.527 0.242 1.910 0.251 0.559 0.136 1.964 0.435

[11] 0.607 0.283 0.052 1.176 0.194 0.098 0.134 1.248 0.000 0.435

[12] 1.088 0.691 0.180 2.114 0.002 0.443 0.190 2.202 0.160 0.267 0.160

[13] 0.651 0.387 0.094 1.641 0.094 0.291 0.068 1.703 0.166 0.076 0.166 0.094

[14] 0.218 0.054 0.046 0.772 0.391 0.054 0.080 0.818 0.110 0.313 0.110 0.359 0.164

[15] 0.206 0.044 0.054 0.709 0.427 0.044 0.098 0.756 0.110 0.363 0.110 0.391 0.198 0.002

[16] 1.060 0.884 0.469 2.539 0.327 0.908 0.315 2.599 0.697 0.046 0.697 0.361 0.194 0.595 0.663

[17] 0.607 0.283 0.052 1.176 0.194 0.098 0.134 1.248 0.000 0.435 0.000 0.160 0.166 0.110 0.110 0.697

[18] 0.194 0.094 0.074 0.924 0.407 0.174 0.052 0.966 0.218 0.180 0.218 0.387 0.136 0.036 0.050 0.407 0.218

[19] 0.293 0.154 0.054 1.108 0.297 0.194 0.026 1.156 0.186 0.118 0.186 0.283 0.074 0.050 0.070 0.311 0.186 0.010

[20] 0.244 0.074 0.026 0.804 0.361 0.066 0.062 0.856 0.086 0.323 0.086 0.327 0.166 0.006 0.006 0.603 0.086 0.046 0.056

Çizelge 4.1. (devam)

[21]	0.375	0.204	0.014	1.174	0.226	0.204	0.002	1.236	0.118	0.170	0.118	0.206	0.086	0.066	0.080	0.367	0.118	0.050	0.030	0.046												
[22]	0.876	0.471	0.122	1.525	0.126	0.198	0.212	1.607	0.026	0.485	0.026	0.098	0.184	0.228	0.234	0.711	0.026	0.353	0.291	0.198	0.202											
[23]	0.687	0.527	0.242	1.910	0.251	0.559	0.136	1.964	0.435	0.002	0.435	0.267	0.076	0.313	0.363	0.046	0.435	0.180	0.118	0.323	0.170	0.485										
[24]	0.206	0.058	0.038	0.743	0.411	0.074	0.072	0.794	0.110	0.345	0.110	0.375	0.196	0.008	0.006	0.635	0.110	0.044	0.062	0.002	0.054	0.236	0.345									
[25]	0.439	0.186	0.094	0.792	0.435	0.074	0.200	0.858	0.054	0.633	0.054	0.383	0.341	0.104	0.086	0.980	0.054	0.236	0.246	0.074	0.166	0.140	0.633	0.080								
[26]	3.050	2.291	1.325	3.814	0.842	1.609	1.509	3.970	0.984	1.978	0.984	0.808	1.421	1.741	1.741	2.134	0.984	2.014	1.836	1.611	1.493	0.739	1.978	1.697	1.224							
[27]	0.090	0.020	0.178	0.405	0.760	0.116	0.234	0.443	0.267	0.611	0.267	0.707	0.447	0.074	0.056	0.988	0.267	0.130	0.194	0.074	0.200	0.459	0.611	0.054	0.134	2.146						
[28]	0.519	0.206	0.120	1.028	0.307	0.038	0.206	1.080	0.068	0.435	0.068	0.277	0.174	0.086	0.090	0.717	0.068	0.194	0.178	0.102	0.194	0.114	0.435	0.126	0.134	1.393	0.255					
[29]	0.351	0.126	0.024	0.868	0.315	0.054	0.086	0.928	0.036	0.395	0.036	0.277	0.182	0.030	0.026	0.685	0.036	0.106	0.106	0.014	0.066	0.122	0.395	0.022	0.030	1.353	0.110	0.080				
[30]	0.615	0.377	0.134	1.627	0.154	0.313	0.094	1.681	0.230	0.054	0.230	0.158	0.010	0.174	0.212	0.166	0.230	0.126	0.070	0.190	0.116	0.263	0.054	0.218	0.411	1.653	0.461	0.194	0.226			
[31]	0.679	0.387	0.040	1.553	0.066	0.251	0.050	1.629	0.068	0.198	0.068	0.052	0.050	0.154	0.174	0.357	0.068	0.174	0.114	0.126	0.054	0.078	0.198	0.154	0.194	1.048	0.387	0.168	0.104	0.102		
[32]	0.956	0.629	0.210	2.104	0.054	0.469	0.170	2.174	0.267	0.098	0.267	0.066	0.030	0.331	0.377	0.154	0.267	0.291	0.194	0.331	0.200	0.234	0.098	0.375	0.519	1.313	0.705	0.287	0.335	0.044	0.098	
[33]	0.473	0.295	0.295	0.607	0.838	0.255	0.427	0.675	0.267	1.040	0.267	0.764	0.715	0.291	0.251	1.473	0.267	0.451	0.501	0.236	0.371	0.411	1.040	0.222	0.086	1.495	0.174	0.419	0.186	0.812	0.475	0.976

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türlerden elde edilen sekanslar ilk önce CodonCode Aligner 3.7.1 programında düzenlendikten sonra genetik varyasyonlar UPGMA dendogramları “Molecular Evolutionary Genetics Analizis” (Mega 5.2) programı ile görüntülenerek baz dizilimleri Fasta File haline getirilip cluster analizler yapıldı.

UPGMA soy ağacına göre *Helophorus griseus*, *Helophorus daedalus* ve *Helophorus abeillei* aynı tür olarak belirlenmiştir. Filogenetik analizde birbirine en yakın türler *Helophorus helenae* ve *Helophorus faustianus*; *Berosus fulvus* ve *Berosus guttalis*; *Laccobius syriacus* ve *Laccobius obscuratus*; *Helophorus montenegrinus* ve *Helochares obscurus*; *Paracymus aeneus* ve *Paracymus chalceolus*; *Chaetarthria seminulum* ve *Helophorus paraminutus* (%0.002) ve en uzak türler ise *Chasmogenus livornicus* ve *Berosus guttalis* (%3.97) olduğu görülmüştür. Türler arasındaki fark çoğunlukla %0.5’den daha az olup *Chasmogenus livornicus* türü filogenetik ağaçta %3.97 kadar diğer türlerden farklı görülmektedir. Ayrıca bu türler için bütün kodon pozisyon oranları belirlenerek tabloda verilmiştir (Çizelge 4.1). Buna göre çalışılan türlerde tür sınırının %0.002- 3.97 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

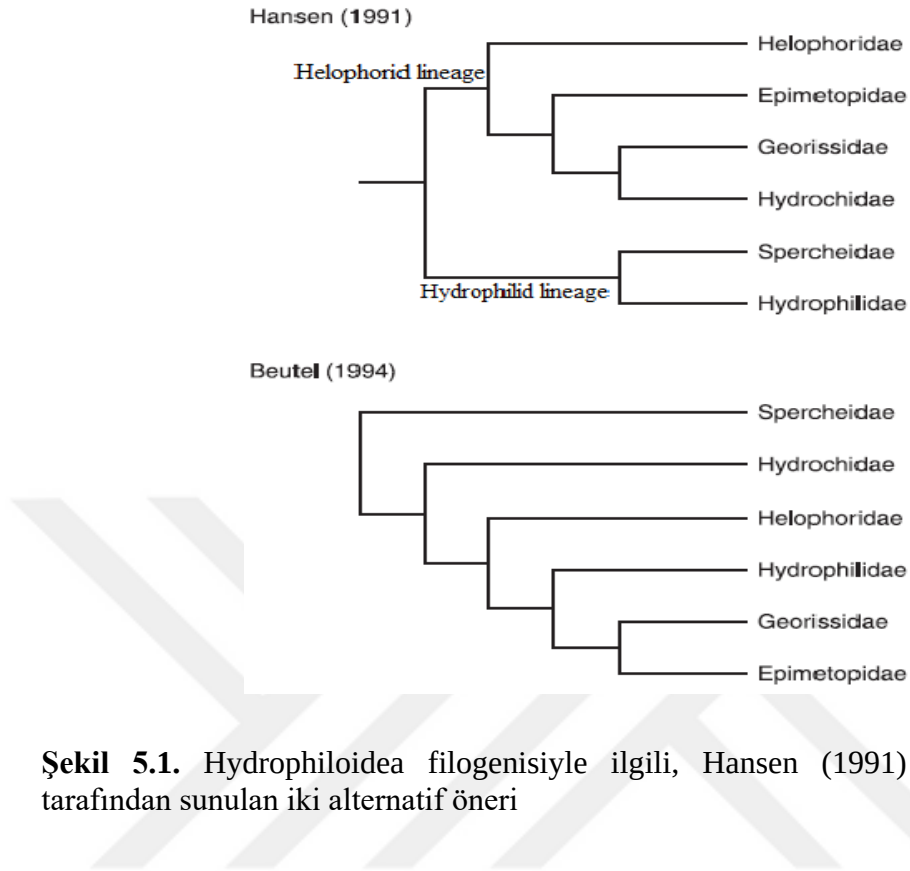
Çalışma sonucunda 99 numunenin sitokrom oksidaz I gen (COI) bölgesinde 620-658bp sekansları elde edilerek tanıları yapılmıştır. Buna göre A+T oranı 1. bölgede en yüksek olan tür *Hydrochus nitidicollis* (%59.3) ve bu bölgede en düşük orana sahip olan tür ise *Berosus fulvus* ve *Berosus guttalis* (%52.1) olarak tespit edilmiştir. 2. bölgede ise A+T oranı en yüksek olan tür *Paracymus chalceolus* (%76.5) en düşük tür ise *Berosus fulvus* (%66.5) dur. 3. bölgedeki A+T oranına bakıldığında en yüksek tür *Chasmogenus livornicus* (%75.5) en düşük olan tür ise *Berosus fulvus* ve *Berosus guttalis* (%62.3) dir. Bu üç bölgenin ortalamaları dikkate alındığında en yüksek A+T oranı *Chasmogenus livornicus* (%70.9), en düşük A+T oranı ise *Berosus fulvus* ve *Berosus guttalis* (%60.3) dir (Şekil 4.36). Çalışmadan elde edilen sonuçlarda görüldüğü gibi zayıf hidrojen bağı ile birbirine bağlanan A=T’in yüksek yüzdelerde olması Helophoridae, Hydrochidae ve

Hydrophilidae familyaları türlerinin ayrılmasında sitokrom oksidaz I (COI) bölgesinin oldukça elverişli olduğunu göstermektedir.

Bernhard *et al.* (2006)'da 2 nüklear (SSUrDNA ve LSUrDNA) ve 4 mitokondriyal gen (12SrDNA, 16SrDNA, COI, COII) kullanılmış, tüm araştırdıkları mitokondriyal genlerde, A+T oranı yüksek seviyede tespit edilmiştir (ortalama %71.9). Yalnız COI'daysa A+T oranı %68.4 tür. Bizim çalışmamızda COI genomdaki çalıştığımız 3 bölgede, en yüksek A+T oranı ortalama %70.9 dur. Dolayısıyla bu açıdan sonuçlarımız Bernhard *et al.* (2006)'ın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan Clary & Wolstenholme (1985) ve Simon *et al.* (1994) başka böceklerde A+T baz oranının mitokondriyal genomda yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

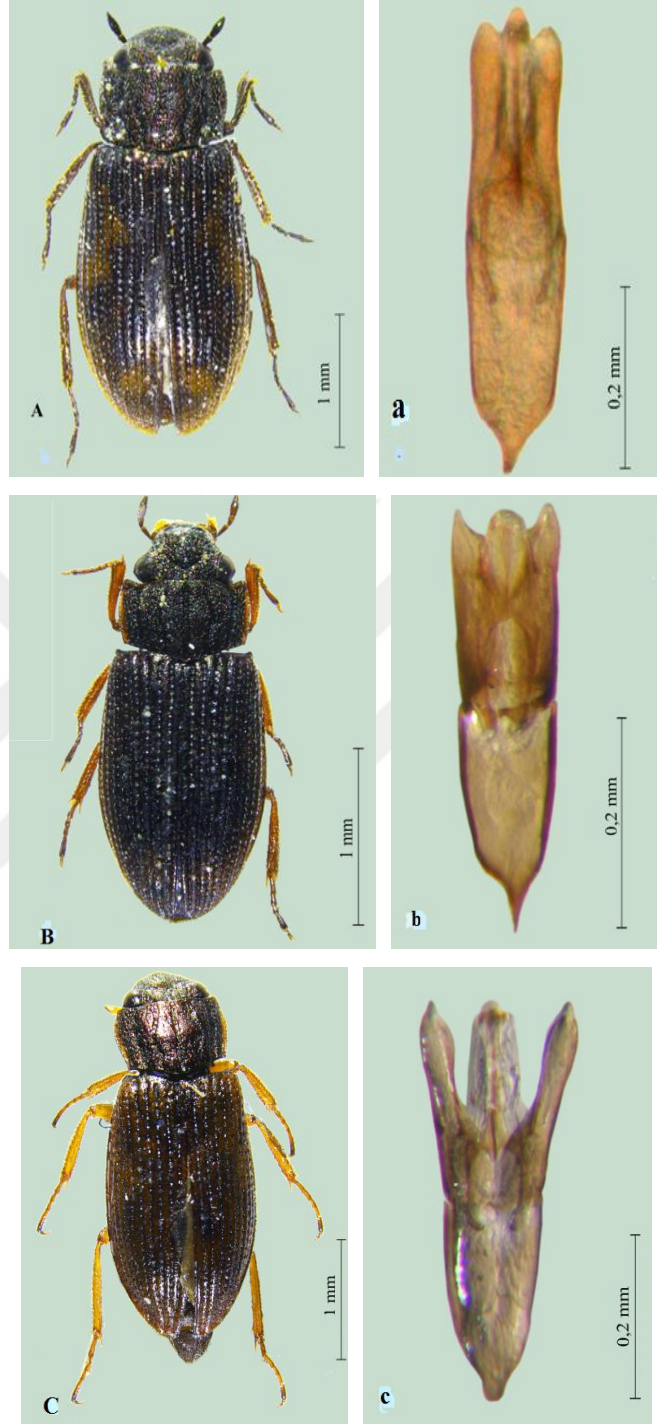
Hansen (1991, 1997a) ve Beutel & Komarek (2004), morfolojik karakterlere dayanarak Hydrophiloidea'nın monofiletik olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaları Hansen (1991) ergin böcekler, Beutel (1994) ise larvalar üzerinde yapmışlardır. Hansen'in yaptığı kladogramda 2 farklı hat bulunmaktadır: Helophorid ve Hydrophilid (Şekil 5.1). Şekilde görüldüğü gibi Helophoridae ve Hydrochidae "Helophorid" hatta, Hydrophilidae ise başka hatta yer almaktadır. Bu tezde elde edilen kladogram, Beutel (1994)'e daha yakın bulunmaktadır.

Bernhard *et al.* (2009)'da Hydrophiloidea üzerinde yeni bir çalışma yaptığında bu üst familya ve Helophoridae familyasının monofiletik olduğunu belirtmektedir. Bizim yaptığımız çalışmanın soy ağacında görüldüğü üzere Helophoridae familyasının ve Hydrophiloidea üst familyasının monofiletik olduğu belirlendi. Bernhard *et.al* (2009)'a göre Hydrochidae, Hydrophiloidea'nın diğer familyalarıyla sister grup oluşturmaktadır. Bu çalışmada aynı sonuçlar tespit edildi.



Şekil 5.1. Hydrophiloidea filogenisiyle ilgili, Hansen (1991) ve Beutel (1994) tarafından sunulan iki alternatif öneri

Çalışmalarımız sonucunda çizdiğimiz soy ağacına göre (Şekil 4.35) *Helophorus griseus*, *Helophorus daedalus* ve *Helophorus abeillei* aynı tür olarak belirlenmiştir. Bu türlerin dış morfolojileri birbirine oldukça benzer olup (Şekil 5.2), ayırt edilmeleri oldukça güçtür. Diğer taraftan *Helophorus griseus* ve *Helophorus abeillei* türlerinin genital yapıları da birbirine oldukça benzerdir. Bu nedenle klasik yöntemle (morfolojik tür tayini) yapılan tür teşhisinin hatalı olabileceği düşünülmektedir. Aynı riskin, kendine özgü genital organ şekli nedeniyle *H. daedalus* için geçerli olmadığı değerlendirilmektedir. Bu nedenle söz konusu üç tür ile ilgili aynı çalışmayı, farklı müzelerdeki tür numuneleri ile tekrarlananın yararlı olacağı kanaatindeyiz.



Şekil 5.2. A: *Helophorus abeillei*, B: *Helophorus daedalus*, C: *Helophorus griseus*
a: *H. abeillei*; b: *H. daedalus*; c: *H. griseus* erkek genital organ

Bilindiği üzere, filogenetik analizlerde sadece bir gene dayanarak cins ve cinsten yukarı taksonların arasındaki ilişkileri kolayca çözebilir. Ama genelde cinsten aşağı taksonlarda bu durum aynı oranda işlevsel değildir (Madaric' *et al.* 2013). Bu nedenle

bir kaç genin birlikte kullanması veya morfolojik karakterlerin ve moleküler özelliklerin aynı zamanda kullanılması daha mantıklı ve elverişli sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Angus R. B. 1977. A re-evaluation of the Taxonomy and Distribution of the Some European Species of *Hydrochus* Leach (Coleoptera: Hydrophilidae). *Entomologist's Mon. Mag.* 112: 177-201.
- Angus R. B. 1992. *Insecta: Coleoptera: Hydrophilidae: Helophorinae*. 148 pp. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Archangelsky M. 1997. Studies on the biology, ecology and systematics of the immature stages of New World Hydrophiloidea (Coleoptera: Staphyliniformia) . *Bulletin of the Ohio Biological Survey (NS)* 12: i – ix , 1–207.
- Archangelsky M. 1998. Phylogeny of Hydrophiloidea (Coleoptera: Staphyliniformia) using characters from adults' preimaginal stages. *Systematic Entomology*, 23, 9–24.
- Archangelsky M. 2001. A new Neotropical species of *Spercheus* Kugelann, and its larval stages (Coleoptera, Hydrophiloidea: Spercheidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36, 199–204.
- Archangelsky M. 2002a. Immature stages of Neotropical *Enochrus* (Coleoptera: Hydrophilidae): *E. (Methydus) lampros* Knisch, 1924 and *E. (Hugoscottia) tremolerasi* Knisch, 1922 . *Aquatic Insects* 24 : 41 – 52.
- Archangelsky M. 2002b. Immature stages of Neotropical *Berosus* (Coleoptera, Hydrophilidae): *B. toxacanthus* Oliva, 1989, *B. coptogonus* Jensen-Haarup, 1910, *B. cornicinus* Knisch, 1922 and *B. auriceps* Boheman, 1859 . *Tijdschrift voor Entomologie* 145: 19 – 28 .
- Archangelsky M. 2004. Higher level phylogeny of Hydrophilinae (Coleoptera: Hydrophilidae) based on larval, pupal and adult characters. *Systematic Entomology*, 29, 188–214.
- Archangelsky M., Beutel R. G. & Komarek A. 2005. 10. Hydrophiloidea. Introduction, Phylogeny. 10.1. Hydrophilidae. In R. G. Beutel & R. A. B. Leschen (Eds) *Handbook of Zoology, Vol. IV Arthropoda: Insecta. Part 38. Coleoptera, Vol. 1: Morphology and Systematics Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga (partim)*. Berlin, New York: Walter De Gruyter.
- Arnett R. H. and Thomas Jr. M. C. 2000. *American Beetles, Vol. 1*. (CRC Press, Boca Raton).
- Arnett R. H. , Thomas Jr. M. C., Skelley P. E. and Frank J. H. 2002. *American Beetles. Vol. 2*. (CRC Press, Boca Raton).
- Bae J.S., Kim I., Kim S.R., Jin B.R., Sohn H.D., 2001. Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. *Appl. Entomol. Zool.* 36, 451–457.
- Ballard J.W.O. and Rand DM. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu Rev Ecol Syst*, 36: 621-642.
- Ballard J.W.O. and Whitlock MC. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol*, 13: 729-744.
- Behura K. S. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15, 3087-3113.

- Bernhard D., Schmidt C., Korte A., Fritzsche G. & Beutel R.G. 2006. From terrestrial to aquatic habitats and back again – molecular insights into the evolution and phylogeny of Hydrophiloidea (Coleoptera) using multigene analyses . *Zoologica Scripta* 35 : 597 – 306 .
- Bernhard D., Ribera I., Komarek A. and Beutel R. G. 2009. Phylogenetic analysis of Hydrophiloidea (Coleoptera: Polyphaga) based on molecular data and morphological characters of adults and immature stages. *Insect Systematics & Evolution* 40: 3–41.
- Besansky N.J., Lehmann T., Fahey G.T., Fontenille D., Braack L.E.O., Hawley W.A., Collins F.H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics* 147, 1817–1828.
- Beutel R.G. & Komarek A. 2004. Comparative study of thoracic structures of adults of Hydrophiloidea and Histeroidea with phylogenetic implications (Coleoptera, Polyphaga). *Organisms Diversity and Evolution* 4 : 1 – 34 .
- Beutel R.G. & Leschen R.A.B. 2005. Phylogenetic analysis of Staphyliniformia (Coleoptera) based on characters of larvae and adults . *Systematic Entomology* 30 : 510 – 548 .
- Beutel R.G. 1994. Phylogenetic analysis of Hydrophiloidea based on characters of the head of adults and larvae (Coleoptera: Staphyliniformia). *Koleopterologische Rundschau* 64 : 103 – 131 .
- Bilton V. 2009. Report of Aquatic Coleoptera Conservation Trust, I:\print\David Bilton.
- Blaxter M. 2003. Counting angels with DNA. *Nature*, 421, 122–124.
- Boving A.G. & Henriksen K.L. 1938. The developmental stages of the Danish Hydrophilidae (Ins., Coleoptera) . *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening Kobenhavn* 102 : 27 – 162 .
- Brown W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), *Molecular Evolution Genetics*. Plenum, New York, pp. 95–130.
- Caterino M. S., Hunt T. and Vogler A. P. 2005. On the constitution and phylogeny of Staphyliniformia (Insecta: Coleoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 655–672.
- Caterino M. S., Shull V. L., Hammond P. M. and Vogler P. 2002. The basal phylogeny of the Coleoptera based on 18S rDNA sequences. *Zoologica Scripta* 31: 41–49.
- Celik T., Zelnik I., Babij V., Vres B., Pirnat A., Seliskar A. and Drovenik B. 2005. Inventarizacija kalov in lokev na Krasu ter njihov pomen za biotsko raznovrstnost. In: *Vodain zivljenje v kamniti SAZU*, Ljubljana, pp: 72-82.
- Chen H., Rangasamy M., Tan S. Y., Wang H. and Siegfried B. D. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE* 5(8): e11963.
- Chen M., Zhu Y., Tao J., Luo Y. 2008. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. *For Study China* 10: 189–192.
- Clary D.O., Wolstenholme D. R. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22, 252–271.

- Crane S. 2011. DNA Extraction From Archival Museum Insect Specimens. Modified from Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kit, Designed for digestion of intact, whole beetle heads and prothorax.
- Crowson R.A. 1981. The Biology of Coleoptera. John Murray , London , 802 pp.
- Çiampor J. F. and Ribera I. 2006. Description of the larva and its phylogenetic relation to *Graphelmis* (Coleoptera: Elmidae: Elminae). European Journal of Entomology 103: 627–636.
- Eyre M.D. and Foster G.N. 1989. A comparison of aquatic Heteroptera and Coleoptera communities as a basis for environmental and conservation assessments in statistic water sites. J. Appl. Entomol. 108: 355-362.
- Fauron C.M.R. and Wolstenholmn D. R. 1980. Extensive diversity among *Drosophila* species with respect to nucleotide sequences within the adenine+thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules. Nucleic Acids Res. 8, 2439–2452.
- Fauziah A. 2009. Diversity and New records of coleopteran water beetles (Dytiscidae Hydrophilidae) in Kenyir water Catchment of Terengganu, Malaysia, International J. Zoological, Res. 5: 1-8.
- Fernandez S., Abellan D.P., Velasco J. and Millan A. 2004. Selecting areas to protect the biodiversity of aquatic ecosystems in semiarid Mediterranean region using water beetle. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 14: 465-479.
- Foster G.N. 1987. The use of Coleoptera Records in Assessing the Conservation Status of Wetlands. In: The Use of Invertebrates in Site Assessment for Conservation Newcastle upon Tyne, Luff, M.L. (Ed.). University of Newcastle upon Tyne, UK. pp: 8-17.
- Foster G.N., Foster A.P., Eyre M.D. and Bilton B.T. 1990. Classification of water beetle assemblages in arable fenland and ranking of sites in relation to conservation value. Freshwater Biol., 22: 343-354.
- Gillott C. 2005. Coleoptera, Entomology 3rd ed., Springer-Verlag, The Netherlands, 305-326.
- Godfray H. C. J. 2002. Challenges for taxonomy. Nature 417, 17–19.
- Hajibabaei M., Janzen D.H., Burns J.M., Hallwachs W. and Hebert P.D.N. 2006a. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 968– 971.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C. and Hickey D.A. 2006b. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. Genome, 49, 851–854.
- Hansen M. 1987. The Hydrophilidae (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. Fauna Entomologica Scandinavica, 18: 1-253.
- Hansen M. 1991. The Hydrophiloid Beetles. Phylogeny, Classification and a Revision of the Genera (Coleoptera, Hydrophiloidea), Biologiske Skrifter 40. The Royal Danish Academy of Science and Letters, 368 pp.
- Hansen M. 1995. Evolution and classification of the Hydrophiloidea – a systematic review . In Pakaluk, J. & Ślipiński, S.A. (Eds) Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera. Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson Muzeum Instytut Zoologii PAN , Warsaw , pp. 321 – 353 .
- Hansen M. 1997a. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetle families . Biologiske Skrifter 48 : 1 – 339.

- Hansen M. 1999b. World Catalogue of Insects. Hydrophiloidea (Coleoptera). Aps. Stenstrup, Apollo Books, Copenhagen, Vol. 2, 416pp.
- Hansen M. 1999a. Fifteen new genera of Hydrophilidae (Coleoptera), with remarks on the generic classification of the family. Entomologica Scandinavica 30 : 121 – 172.
- Hansen M. 1999c. World Catalogue of Insects, Volume 2: Hydrophiloidea (Coleoptera). Apollo Books, Stenstrup, 416 pp.
- Hansen M. 2004. *Family Hydrophilidae*. in Löbl, I., Smetana, A., catalogue of palaearctic coleoptera volume 2. Hydrophilidae-Histeroidea-Staphylinoidea, Apollo Books, Stenstrup. Pp: 24.
- Hayashi M. and Sota T. 2008. Discrimination of two Japanese water pennies, *Eubrianax granicollis* Lewis and *E. ramicornis* Kiesenwetter (Coleoptera: Psephenidae), based on laboratory rearing and molecular taxonomy. Entomological Science 11: 349–357.
- Hayashi M. and Sota T. 2010. Identification of elmids larvae (Coleoptera: Elmidae) from Sanin District of Honshu, Japan, based on mitochondrial DNA sequences. Entomological Science 13: 417–424.
- Hebauer F. 1994. The Hydrophilidae of Israel and Sinai (Coleoptera, Hydrophilidae), Zoology in the Middle East, 10, 74-137.
- Hebauer F. 2002. New Hydrophilidae of the old world (Coleoptera, Hydrophilidae), Acta Coleopterologica, 18 (3), 3-24.
- Hebauer F. and Klausnitzer B. 1998. Süßwasserfauna von Mitteleuropa 20/7,8,9,10 Insecta: Coleoptera: Hydrophiloidea (Exkl. Helophorus), Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag. Pp: 134.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. And De Waard J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Phil. Trans. Roy. Soc., Ser. B. 270: 313–321.
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S. and De Waard J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Phil. Trans. Roy. Soc., Ser. B. 270: S96–S99.
- Hilsenhoff W. L. 1985. Techniques for collecting water beetles from lentic habitats, Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 137, 8-11.
- Hilsenhoff W. L. 1991. Comparison of bottle traps with A D-Frame net for collecting adults and larvae of Dytiscidae and Hydrophilidae (Coleoptera), The Coleopterists Bulletin, 45 (2), 143-146.
- Inohira K., Hara T., Matsuura E.T. 1997. Nucleotide sequence divergence in the A+T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. Mol. Biol. Evol. 14, 814–822.
- İncekara Ü. 2004a. Erzincan İli Hydrophilidae, Helophoridae ve Hydrochidae (Coleoptera) türleri üzerine sistematik araştırmalar, (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi.
- İncekara Ü., Mart A., Erman O. 2004b. Two new records of Hydrochidae (Coleoptera) species from Turkey, with some ecological notes, Turk J. Zool. 28, 213-216.
- Jäch M.A. and Balke M. 2008. Global diversity of water beetles (Coleoptera) in freshwater. Hydrobiologia, 595, 419-442.
- Kim I., Bae J.S., Sohn H.D., Kang P.D., Ryu K.S., Sohn B.H., Jeong W.B., Jin B.R. 2000. Genetic homogeneity in the domestic silkworm, *Bombyx mori*, and

- phylogenetic relationship between *B. mori* and the wild silkworm moth, *B. mandarina*, using mitochondrial COI gene sequences. *Int. J. Indust. Entomol.* 1, 9–17.
- Klausnitzer B. 1996. Käfer in und am Wasser. Westarp, Wissenschaften, Magdeburg.
- Komarek A. & Beutel R.G. 2007. Phylogenetic analysis of Anacaenini (Coleoptera: Hydrophilidae: Hydrophilinae) based on morphological characters of adults. *Systematic Entomology* 32 : 205 – 226 .
- Komarek A. 2004. Taxonomic revision of *Anacaena* Thomson, 1859. I. Afrotropical species (Coleoptera: Hydrophilidae) . *Koleopterologische Rundschau* 74 : 303 – 350 .
- Komarek A. 2006. Taxonomic revision of *Anacaena* Thomson, 1859 III. The Indian Subcontinent (Coleoptera: Hydrophilidae) . *Koleopterologische Rundschau* 76 : 283 – 314 .
- Komarek A. 2007. Taxonomic revision of *Anacaena* Thomson, 1859. IV. Australia (Coleoptera: Hydrophilidae) . *Koleopterologische Rundschau* 77 : 147 – 170 .
- Komarek A. and Beutel R.G. 2007. Phylogenetic analysis of Anacaenini (Coleoptera: Hydrophilidae: Hydrophilinae) based on morphological characters of adults. *Systematic Entomology* 32 : 205 – 226.
- Korte A., Ribera I., Beutel R.G. & Bernhard D. 2004. Interrelationships of Staphyliniform groups inferred from 18S and 28S rDNA sequences, with special emphasis on Hydrophiloidea (Coleoptera, Staphyliniformia) *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 42 : 281 – 288 .
- Kosswig C. 1995. Zoogeography of the near east, *Systematic Zoology*, 4 (1-4), 48-96.
- Lawrence J.F. 1991. Classification . In Stehr, F. W. (Ed.) *Immature Insects* , Vol. II . Kendall/Hunt, Dubuque, IA, pp. 182 – 184.
- Lawrence J.F. and Newton A.F. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). In Pakaluk, J. & Ślipiński, S.A. (Eds) *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warsaw, pp. 634 – 797.
- Madarić B. B., Stanković V. M., Čorak M, Ugarković D. and Komarek A. 2013. Contribution to molecular systematics of water scavenger beetles (Hydrophilidae, Coleoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 51: 165–171.
- Oliva A., 1993. Some types of *Berosus* (Coleoptera, Hydrophilidae) kept in the collections of the Institut royal des sciences naturelles de Belgique, *Bull. Annls Soc. R. belge Ent.*, 129, 183-230.
- Pearson D.L. 1994. Selecting indicator taxa for quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 345: 75-79.
- Pirsinu Q. 1981. Palpicorini (Coleoptera, Hydraenidae, Helophoridae, Hydrophilidae, Sperchidae, Hydrochidae, Spheridiidae). *Guide per il Riconoscimento delle Specie Animali delle Acque Interne Italiane*, 13: 1-97.
- Ribera I. and Foster G.N. 1993. Uso de los Coleopteros acuaticos como indicadores biológicos (Coleoptera). *Elytron*, 4: 61-75
- Richmond A. 1920. Studies on the Biology of the Aquatic Hydrophilidae . *Bulletin of the American Museum of Natural History* 17 : 1 – 93 .

- Savolainen V. and Chase M. W. 2003. A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends Genet.* 19: 717–724.
- Schneider-Jacoby M. and Ern H. 1993. Park prirode Lonjsko Polje. Raznolikost uvjetovana poplavljanjem. Hrvatsko ekološko društvo, Zagreb, pp: 135.
- Short A. E. Z. and Fikáček M. 2013. Molecular phylogeny, evolution and classification of the Hydrophilidae (Coleoptera). *Systematic Entomology* 38: 723–752.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. and Flok P. 1994. Evolution, weighing, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Spangler P.J. 1982. *Coleoptera*, San Diego University, San Diego, California. Pp: 29.
- Valladares L. F., Diaz A. J. and Delgado A. J. 1999. *Hydrochus ibericus* sp.n. (Coleoptera: Hydrochidae) from the Iberian Peninsula. *Aquatic Insects*, 21 (2): 81-87.
- Valladares L.F., Garrido J. and Garcia C. 2002. The assemblages of aquatic Coleoptera from shallow lakes in the northern Iberian Meseta: Influence of environmental variables. *European J. Entomol.*, 99: 289-298.
- Waldschmidt AM. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz J Genet* 20: 421– 423.
- Whiting M. F., Carpenter J. C., Wheeler Q. D. and Wheeler W. C. 1997. The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* 46: 1–68.
- Wolstenholme D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141, 173–216.
- Zhang D.X., Szymura J.M., Hewitt G.M. 1995. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 40, 382–391.

ÖZGEÇMİŞ

21.09.1982 tarihinde İran/Naghadeh'de doğdu. 1988–1995 yıllarında Haddad İlkokulu'nda ilköğrenimini, 1996–1999 yıllarında 17 Shahrivar lisesinde ortaöğrenimini tamamladı. 2000–2003 eğitim-öğretim yılında İran/ Urmia Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne yerleşti ve 2003 yılında bu Bölümden mezun oldu. 2004'te aynı üniversite'de Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladı. Halen Urmia PNU Üniversitesi'de sözleşmeli öğretim üyesi olarak çalışmaktadır.

