

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BALMUMU GÜVELERİ VE PARAZİTOİDLERİNİN
MİTOKONDRIYAL COI GEN BÖLGESİ TEMELLİ
FİLOGENETİK ANALİZİ**

BUSE NOGAYLAR

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALMUMU GÜVELERİ VE PARAZİTOİDLERİNİN
MİTOKONDRIYAL COI GEN BÖLGESİ TEMELLİ
FİLOGENETİK ANALİZİ

BUSE NOGAYLAR

Dr. Öğt. Üyesi Fevzi UÇKAN
Danışman, Kocaeli Üniversitesi
Dr. Öğt. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi
Dr. Öğt. Üyesi Osman İBİŞ
Jüri Üyesi, Erciyes Üniversitesi

F. Uçkan
.....
Sevgi Türker Kaya
.....
Osman İbiş
.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 25.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bal mumu güvelerinin ve onların parazitoidlerinin COI gen bölgesine dayalı filogenetik analizlerinin yapılması ve incelenmesi amaçlanmıştır.

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerim boyunca bana derin bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren ve tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını eksik etmeyen Dr. Öğr. Üyesi Fevzi Uçkan'a,

Tez çalışmam boyunca bana materyal metod önerileriyle ışık tutan Arş. Gör. Havva Kübra Soydabaş'a,

Tez çalışmamda kullandığım *Habrobracon hebetor* türünün toplanmasında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Gör. Adnan SARIKAYA'ya,

Bütün eğitim öğretim hayatım boyunca, benden desteklerini esirgemeyen biricik babam ve anneme teşekkürlerimi sunarım.

Haziran - 2018

Buse NOGAYLAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Galleriinae Alt Ailesi ve <i>Gallerina mellonella</i>	6
1.2. Galleriinae Alt Ailesi ve <i>Achroia grisella</i>	8
1.2.1. Galleriinae alt aile teşhis anahtarı	10
1.3. Ichneumoninae Alt Ailesi ve <i>Pimpla turionellae</i>	10
1.4. Braconinae Alt Ailesi ve <i>Habrobracon hebetor</i>	132
1.4.1. Braconinae alt aile teşhis anahtarı	143
1.5. Microgasterinae Alt Ailesi ve <i>Apanteles galleriae</i>	155
1.5.1. Microgasterinae alt aile teşhis anahtarı.....	177
1.6. DNA Barkodlama, Mitokondriyal DNA ve COI Gen Bölgesi.....	18
1.7. Filogenetik Analiz	211
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	233
2.1. Numunelerin Hazırlanışı	233
2.1.1. Gen bankası verilerinin hazırlanışı.....	233
2.2. DNA İzolasyonu.....	26
2.2.1. DNA'sının saflaştırılması	26
2.2.2. DNA miktarının ölçülmesi	27
2.3. DNA Amplifikasyonu	27
2.3.1. Amplifiye DNA'nın görüntülenmesi	29
2.4. COI Gen Bölgesi Veri Analizleri	30
2.4.1. Balmumu güveleri ve parazitoidlerinin filogenetik analizi.....	30
2.4.2. COI gen bölgesinin genetik çeşitlilik analizleri	31
2.4.3. COI gen bölgesi baz değişim modelinin belirlenmesi	32
2.4.4. COI gen bölgesi haplotiplerinin genetik uzaklık analizi.....	32
2.4.5. COI gen bölgesinin neighbor joining analizi	32
2.4.6. COI gen bölgesinin maksimum likelihood analizi.....	32
2.4.7. COI gen bölgesinin minimum evolution analizi	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. Balmumu Güvesi ve Parazitoidlerinin DNA Dizi Analizleri.....	34
3.1.1. Total mtDNA.....	34
3.1.2. COI gen bölgeleri	34
3.2. Balmumu Güvelerinin Genetik Analizi.....	35
3.2.1. Galleriinae alt ailesinin filogenetik analizi.....	35
3.2.2. <i>Galleriae</i> Cinsi ve <i>G. mellonella</i> türünün filogenetik analizi	41
3.2.3. <i>Achroia</i> Cinsi ve <i>A. grisella</i> türünün filogenetik analizi.....	45

3.3. Balmumu Güvelerinin Parazitoidlerinin Genetik Analizi	49
3.3.1. Apocrita alt takımının filogenetik analizi.....	49
3.3.2. Pimpliinae alt ailesinin filogenetik analizi	53
3.3.3. Pimpla cinsinin filogenetik analizi	56
3.3.4. <i>P. turionella</i> türünün filogenetik analizi	59
3.3.5. Braconinae alt ailesinin filogenetik analizi	63
3.3.6. <i>Habrobracon</i> cinsinin filogenetik analizi	68
3.3.7. Microgastriinae alt ailesinin filogenetik analizi	73
3.3.8. <i>Apanteles</i> cinsinin filogenetik analizi	78
3.3.9. <i>A. galleriae</i> türünün filogenetik analizi.....	88
4. TARTIŞMA	91
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	94
KAYNAKLAR	97
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	103
ÖZGEÇMİŞ	104



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Jel elektroforezi görüntüsü.....	35
Şekil 3.2.	Galleriinae alt ailesine ait örneklerin Maksimum Likelihood ağacı.	37
Şekil 3.3.	Galleriinae alt ailesinin türlerine ait Neighbor Joining ağacı	39
Şekil 3.4.	Galleriinae alt ailesinin Minimum Evolution (ME) ağacı	41
Şekil 3.5.	<i>G. mellonella</i> türüne ait haplotiplerin Maksimum Likelihood analizi ağacı.....	44
Şekil 3.6.	<i>G. mellonella</i> türüne ait Neighbor Joining (NJ) ağacı	44
Şekil 3.7.	<i>G. mellonella</i> türünün Minimum Evrim ağacı.....	45
Şekil 3.8.	<i>A. grisella</i> türüne ait Maksimum Likelihood ağacı	48
Şekil 3.9.	<i>A. grisella</i> türüne ait Neighbor Joining (NJ) ağacı	48
Şekil 3.10.	<i>A. grisella</i> türünün Evrim ağacı	49
Şekil 3.11.	Apocrita alt takımına ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı.....	50
Şekil 3.12.	Apocrita alt takımının Neighbor joining (NJ) ağacı	51
Şekil 3.13.	Apocrita alt takımının Minimum Evolution (ME) ağacı	52
Şekil 3.14.	Pimplinae alt ailesine ait Maksimum Likelihood ağacı.....	54
Şekil 3.15.	Pimplinae alt ailesine ait Neighbor Joining ağacı.....	55
Şekil 3.16.	Pimplinae alt ailesine ait Minimum Evolution ağacı.....	56
Şekil 3.17.	<i>Pimpla</i> cinsine ait Maksimum Likelihood ağacı	57
Şekil 3.18.	<i>Pimpla</i> cinsine ait Neighbor Joining ağacı	58
Şekil 3.19.	<i>Pimpla</i> cinsine ait Minimum Evolution ağacı	59
Şekil 3.20.	<i>P. turionellae</i> türünün Maksimum Likelihood ağacı.....	61
Şekil 3.21.	<i>P. turionella</i> türünün Neighbor-Joining ağacı	62
Şekil 3.22.	<i>P. turionella</i> türünün Minimum Evolution ağacı.....	63
Şekil 3.23.	Braconina alt ailesinin Maksimum Likelihood ağacı	64
Şekil 3.24.	Braconina alt ailesinin Neighbor-Joining ağacı.....	66
Şekil 3.25.	Braconina alt ailesinin Minimum Evolution ağacı	68
Şekil 3.26.	<i>H. hebetor</i> türünün Maksimum Likelihood ağacı.....	71
Şekil 3.27.	<i>H. hebetor</i> türünün Neighbor-Joining ağacı	72
Şekil 3.28.	<i>H. hebetor</i> türünün Minimum Evolution ağacı.....	73
Şekil 3.29.	Microgastriinae alt ailesine ait Maksimum Likelihood ağacı.....	75
Şekil 3.30.	Microgastriinae alt ailesine ait Neighbor Joining ağacı.....	76
Şekil 3.31.	Microgastriinae alt ailesine ait Minimum Evrim ağacı.....	78
Şekil 3.32.	<i>Apanteles</i> cinsinin Maksimum Likelihood ağacı.....	81
Şekil 3.33.	<i>Apanteles</i> cinsinin Neighbor Joining ağacı.....	84
Şekil 3.34.	<i>Apanteles</i> cinsinin Minimum Evolution ağacı.....	87
Şekil 3.35.	<i>A. galleriae</i> türünün Maksimum Likelihood ağacı.....	89
Şekil 3.36.	<i>A. galleriae</i> 'ye ait Neighbor-Joining ağacı.....	90
Şekil 3.37.	<i>A. galleriae</i> 'ye ait çıkartılan Minimum Evolution ağacı	90

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Gen Bankası'ndan indirilen <i>P. turionellae</i> türünün COI gen bölgesi verileri (658bç)	23
Tablo 2.2.	Gen Bankası'ndan elde edilen <i>A. grisella</i> türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç)	24
Tablo 2.3.	Gen Bankası'ndan indirilen <i>G. mellonella</i> türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç)	25
Tablo 2.4.	Gen Bankası'ndan indirilen <i>A. grisella</i> türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç)	26
Tablo 2.5.	BOLD'dan indirilen <i>H. hebetor</i> türünün COI gen bölgesi verileri (648bç)	26
Tablo 2.6.	Mitokondriyal DNA COI gen bölgesinin dizi analizinde kullanılacak evrensel primerleri (Folmer, 1994).....	28
Tablo 2.7.	Mitokondriyal COI gen bölgesinin evrensel HCO2198 ve LCO1490 primer çiftleri için PZR döngü programı	28
Tablo 2.8.	Tür düzeyinde filogenetik analizlerde kullanılacak dış gruplar.....	31
Tablo 3.1.	<i>G. mellonella</i> için Tajima Nötralite Testinin sonuçları	42
Tablo 3.2.	<i>G. mellonella</i> türünün genetik uzaklık değerleri (%'lik)	43
Tablo 3.3.	<i>A. grisella</i> türü için Tajima Nötralite Testinin sonuçları	46
Tablo 3.4.	<i>A. grisella</i> türünün genetik uzaklık değerleri (%'lik).....	47
Tablo 3.5.	<i>P. turionella</i> türünün genetik uzaklık değerleri (%'lik).....	60
Tablo 3.6.	<i>H. hebetor</i> haplotiplerinin Tajima Nötralite Testi sonuçları.....	60
Tablo 3.7.	<i>H. hebetor</i> türlerinin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değerleri (%'lik)	69
Tablo 3.8.	<i>A. galleriae</i> türü için Tajima Nötralite Testinin sonuçları.....	70
Tablo 3.9.	<i>A. galleriae</i> türünün genetik uzaklık değerleri (%'lik)	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece santigrad
µl	: Mikrolitre
%	: Yüzdellik

Kısaltmalar

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
bç	: Baz Çifti
C	: Sitozin
CAN	: Kanada
COI	: Sitokrom C Oksidaz Alt Birim I
dH ₂ O	: Distile Su
dNTP	: Deoksiribonükleozit Trifosfat
G	: Guanin
m	: Metre
MEGA	: Moleküler Evrimsel Genetik Analizler
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mM	: Milimolar
mt	: Mitokondri
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
n	: Örnek Sayısı
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NZ	: Yeni Zellanda
RLFP	: Sınırlı Parça Uzunluk Polmorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
T	: Timin
TR	: Türkiye

BALMUMU GÜVELERİ VE PARAZİTOİDLERİNİN MİTOKONDRIYAL COI GEN BÖLGESİ TEMELLİ FİLOGENETİK ANALİZİ

ÖZET

Böcek çeşitliliğinin önemli bir kısmını kapsayan Hymenopterler, Lepidopter kelebekleri ile parazitoid-konak ilişkisi içindedirler. Geniş bir çeşitliliğe sahip olan böceklerin, filogenilerinin çalışılması, taksonomik açıdan bu canlıların yanlış tanımlanmalarını, karmaşık ve eksik gruplanmalarının önüne geçmektedir. Çalışmamızda Lepidopteran büyük ve küçük balmumu güveleri ve onların Hymenopteran parazitoidlerinin (*Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Apanteles galleriae*, *Pimpla turionellae* ve *Habrabracon hebetor*) mitokondriyal COI gen bölgesi temelli filogenileri incelendi. Bu 5 türün COI gen bölgeleri tür düzeyinde elde edildi. Diğer taksonomik kategoriler için Gen Bankası'ndan elde edilen COI gen bölgeleri kullanıldı. Tür içinde DNA izolasyonunu takiben haplotip ve filogenetik analizleri, tür dışında ise sadece filogenetik analizleri yapıldı. Tür içi analizlerde, *G. mellonella*'nın en yakın akrabası Kanada-GU091133.1, *A. grisella*'nın en yakın akrabası Finlandiya-KX041272.1, *P. turionellae*'nin en yakın akrabası Kanada-KR791223.1, *A. galleriae*'nin en yakın akrabası Yeni Zelanda-JQ853455.1 ve *H. hebetor*'un en yakın akrabası Kanada-KR890305.1 olarak tespit edildi. Cins düzeyinde yapılan filogenetik analizlerde *Pimpla* cinsi içerisinde *P. turionellae* türüne en yakın tür *P. pedalis* olarak bulundu; *Apanteles* cinsi içerisinde *A. galleriae* W'a en yakın tür *A. rolandovegai* olarak tespit edildi. Bütün analizler incelendiğinde, konaklar ve onların parazitoidlerinin kendi içlerinde yakın gruplanmalar yaptığı tespit edildi. Filongenetik analizler incelendiğinde parazitoidler ve onların konaklarının kendi içlerinde birbirleriyle benzer monofilatik gruplanmalar yaptıkları gözlemlendi. Sonuçlarımızın balmumu güveleri ve onların parazitoidlerinin gelecekte yapılacak filogenetik çalışmalarına ışık tutması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: COI, Filogeni, Konak, Parazitoid

PHYLOGENETIC ANALYSIS BASED ON MITOCHONDRIAL COI GEN REGION OF WAX MOTH AND THEIR PARASITIDS

ABSTRACT

Hymenopteras, which cover a significant part of the insect variety have in parasitoid-host relationship with Lepidoptera butterflies. The study of phylogenies of insects, which have a wide variety, leads to complex and incomplete groupings of taxonomically incorrect identification of these organisms. In our study, mitochondrial COI gene based phylogenies of Lepidopteran large and small waxy worms and their Hymenopteran parasitoids (*Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Apanteles galleriae*, *Pimpla turionellae* and *Habrabracon hebetor*) were examined. These 5 species were obtained at the species level of the COI gene regions. For other taxonomic categories, the COI gene regions obtained from the GenBank were used. DNA isolation of the species followed by haplotype and phylogenetic analysis, and species except phylogenetic analysis. DNA isolation of the species followed by haplotype and phylogenetic analysis, and species followed phylogenetic analysis. Nearest relative of *G. mellonella* in species analysis Canada-GU091133.1, nearest relative of *A. grisella* Finland-KX041272.1, closest relative of *P. turionellae* Canada-KR791223.1, closest relative of *A. galleriae* New Zealand The closest relative of JQ853455.1 and *H. Hebetor* was identified as Canada-KR890305.1. In phylogenetic analyzes performed at the genus level, *P. pedalis* was found as the closest species to *P. turionellae* in the genus *Pimpla*; Within the *Apanteles* genus, *A. galleriae* W. was identified as the closest species *A. rolandoveggoi*. When all the analyzes were examined, it was found that the hosts and their parasitoids clustered closely within themselves. When the phylogenetic analyzes were examined, it was observed that the parasites and their hosts had similar monophyletic groupings within themselves. It is expected that our results will shed light on the future waxwork and their phylogenetic studies of their parasitoids.

Keywords: Host, Parasitoid, Phylogeny, COI

GİRİŞ

Dünya biyoçeşitliliğinin yarısından fazlasını böcekler oluşturmaktadır ve Lepidopteran kelebekler bu böcek çeşitliliğinin dörtte birini içermektedir (Condamine ve diğ., 2016; Tank ve diğ., 2015; Toussaint ve diğ., 2015; Wahlberg diğ., 2013). Lepidoptera neredeyse tamamen çiçekli bitkilerle paralel olarak evrimleşmiştir. Henüz kökeni hakkında geniş bir bilgi olmamasına karşın, 200 milyon yıldan uzun bir süre önce Geç Triyas'daki kardeş gruplarından ayrıldığı dair veriler mevcuttur (Misof ve diğ., 2014). Oldukça uzun bir süre boyunca, Angiospermeler ve karasal ekosistemler tam olarak ayrılamamış olup, yaklaşık 100 milyon yıl önce (Kretase döneminde) belirgin bir şekilde ayrıldıkları düşünülmektedir. Böcek çeşitliliğinin yine çok büyük bir kısmını kapsayan Hymenoptera, Lepidopter kelebekleri ile parazitoid-konak ilişkisi içindedir. Karmaşık bir geçmişi ve oldukça geniş bir tür yelpazesine sahip olan bu iki böcek grubunun filogenisinin araştırılması bir hayli zordur. Günümüzde böceklerin filogenilerinin çalışılması ile, taksonomik açıdan bu canlıların yanlış tanımlanmalarını, karmaşık ve eksik gruplanmalarının önüne geçilmektedir.

Parazitoidler ve onların konaklarının genetik yapılarını kıyaslamak son zamanların en çok ilgi çekici konusu haline gelmiştir (Klassen, 1992; Hoberg ve diğ., 1997; Paterson ve Gray, 1997). Birbirleriyle etkileşen türlerin filogenileri, tekrarlanan kovaryasyonlardan dolayı neredeyse oldukça uyumludur (Hafner ve diğ., 1994; Moran ve Baumann, 1994; Page ve diğ., 1998). Filogenetik uyumların kalktığı durumlarda bu canlıların makroevrimsel süreçte yok olduğu düşünülmektedir (Barker, 1991; Hoberg ve diğ., 1997). Bu olaylar, parazitlerin konağa olan özgülüğünü ve popülasyon genetiğini pekiştiren parazit yayılımları gibi engelleri basit ekolojik yöntemler tarafından yönetebilir. Mikroevrimsel yaklaşımları takip eden ekolojik faktörler, uzun dönemde makroevrimsel süreçte bu ilişkilerden sorumlu olabilir (Clayton ve diğ., 2003). Ne yazık ki, çok az sayıda çalışma, tek bir konak-parazitoid sistemindeki mikro ve makroevrimsel yankılarını araştırmıştır (Clayton ve diğ., 2003).

Oldukça geniş bir tür yelpazesine sahip olan böcek türleri için sadece morfolojik olarak teşhis yeterli olmamaktadır. Arıcılara önemli ekonomik neden olan kovan zararlıları, büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella*, küçük balmumu güvesi *Achroia grisella* ve onların parazitodileri olan *Pimpla turionellae*, *Apanteles galleriae* ve *Habrobracon hebetor* türlerinin mitokondriyal COI gen bölgesi kullanılarak genetik çeşitliliğini ve filogenetiğini araştırmak için bu türlerin kendi içlerinde ve birbirleri arasında morfolojik olarak eşleştirilen tür, cins ve alt Aileleri içerisindeki konumları, Türkiye örneklerinin Dünya ile karşılaştırılması ve köken aldıkları yerler hakkında bilgi edinilmesi amaçlandı.

Bu çalışmada 5 türün Türkiye'de ilk kez moleküler taksonomik yöntemler kullanılarak teşhisi yapıldı ve filogenileri incelendi. Yapılan bu çalışmayla, bu canlıların filogenetik analizlerine ve moleküler taksonomilerinin araştırılmasına katkı sağlanması amaçlandı. Bölüm 1'de bu canlıların yaşam koşulları ve özellikleri, önemleri, biyolojik kontrole sağladıkları yararları ve çalışmada kullanılan yöntemler hakkında bilgi verildi. Bölüm 2'de bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, materyal ve yöntemden bahsedildi. Bölüm 3'de elde edilen bulgular gösterildi. Bölüm 4'te elde edilen sonuçlar ve bu canlılar ile daha sonra yapılacak olan filogenetik çalışmalara yardımcı olacak noktalar açıklandı.

1. GENEL BİLGİLER

Böceklerin evrimsel süreçte ortaya çıkması yaklaşık 390 milyon yıl önce Kambriyen patlamasının ardından başlamıştır. Yapılan son araştırmalar, böcek tür sayısının yaklaşık 5.6 milyon kadar olduğu tahmin edilmektedir (Farrel ve diğ., 1992). Ancak bu tahminler belirsizdir, çünkü taksonomik çalışmalar yetersizdir ve sadece belirli taksonlar üzerinde sınırlı kalmaktadır. Böceklerin filogenisinin çalışılmasıyla bu sınırlandırmaları ortadan kaldırmaya yardımcı olacağı düşünülmektedir (Farrel ve diğ., 1992).

Böceklerin evrimsel geçmişi, modern ormanların ve orman ekosistemlerinin, önemli böcek-otobur baskısı altında ortaya çıktığını ve evrimleştiğini göstermektedir (Farrel ve diğ., 1992). Uzun süredir devam eden ekolojik birliklerinden dolayı, çoğu böcekler konaklarıyla uyumlu bir şekilde yaşarlar. Bununla birlikte birkaç tür, ekolojik ve ekonomik kayıplara sebep olan patlamalarıyla bilinmektedir. Yaşanmış örnekleriyle birlikte ele alındığında ormanların doğal ekosistemlerinin bozulmasında ana ajandırlar. Örneği, Kuzey Amerika'da böcekler ve patojenlerden etkilenen orman alanı, yangınlardan etkilenen alanların yaklaşık 45 katıdır ve 5 kat daha fazla ekonomik kayıplara sebep olmuştur (Dale ve diğ., 2001). Ölü ağaçlar olası bir yangın felaketinde sönmük ateş için yakıt olarak kullanıldığından, yangınların oluşumunda böcekler ve patojenler önemli bir rol oynamaktadır (Bergeron ve Leduc, 1998). Böcek salgınları, besin maddesi döngüsü, karbon tutumu ve biyoçeşitlilik üzerinde de ciddi olumsuz etkiler sebep olabilmektedir (Lambardero, 2000).

Başta insan faaliyetleri sebebiyle olmak üzere, biyoçeşitlilik kaybı önemli bir çevre konusudur (Birleşmiş Milletler, 1992; Balmford ve Bond, 2005). Ormansızlaşma, orman parçalanması, azalan yaşam alanı kalitesi ve iklim değişikliğinin etkileri nedeniyle (Saunders ve diğ., 1991; Lindenmayer ve Franklin, 2002; Brook ve diğ., 2003) ormanlardaki biyoçeşitlilik kaybının bilinen karasal bitki ve hayvanları etkilediği görülmektedir (Hassan ve diğ., 2005).

Biyoeeitlilięin korunması konusundaki kaygıların yanısıra, nesli tükennemekte olan türlerin yok olması, ekosistemlerin işleyişı açısından zararlı etkilere sebep olabilir (Hooper ve diğ., 2005). Ekosistem süreçlerinde yer alan çok sayıdaki türün ve bunların etkileşimlerinin karmaşıklığı genel bir sonuca ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Bu yüzden de ekosistem işleyişinin, hem tür zenginliği hem de bütün böcek çeşitliliği için bilinmesi önemlidir (Hooper ve diğ., 2005). Böcek saldırıları, tarımsal yani ekonomik kayıpların yanı sıra, orman ekosistemlerinin de büyük ölçüde etkilenmesine neden olmaktadır.

Çoğu araştırmacı üretici seviyesine odaklanmış ve ekosistemleri iyi temsil eden çoklu trofik seviyeler arasındaki etkileşimlere çok az dikkat etmiştir (Balvanera ve diğ., 2006). Bu durum oldukça önemlidir, çünkü tüketici düzeyindeki çeşitlilik birincil üretimle olumlu ya da olumsuz şekilde ilişkilendirilebilir ve bu da multitrofik ekosistemlerin biyoeeitlilik kaybına neden olur (Hooper ve diğ., 2005). Daha iyi kaynak kullanımı, çeşitli bitki ve hayvan topluluklarının verimliliğini arttıran temel bir itici güç olarak düşünülür (Tilman, 1996; Loreau ve diğ., 2001).

Bazı orman zararlısı böceklerin aktiviteleri nedeniyle bunların ekonomik olarak kontrol edilmeleri çok önemlidir. Bunların kontrol edilmeleri için doğru bir şekilde tanımlanmaları esastır. Bu böceklerin tanımlanmaları geçmişte morfolojik tanımlamayla yapılmasına karşın, artık günümüzde DNA Barkodlama tekniğiyle genetik olarak yapılmaktadır.

Böcek zararlıları dünya tarım endüstrisi için oldukça endişe verici bir konudur ve bu canlıların 10.000'den fazlası böcek zararlısı olarak bilinmektedir. Bazı zamanlarda böceklerden kaynaklı tarımda kayıplar %60-70'i bulabilmektedir ve bu durumda oldukça büyük ekonomik kayıplar gerçekleşmektedir. Bunların önüne geçmek için daha önceleri pestisitler gibi böcek öldürücü ilaçlar kullanılmıştır. Bu pestisitlerin araştırılması ve geliştirilmesi sonucunda zararlı böceklere karşı ürünlerin korunmasında birçok kimyasalıda beraberinde gelmiştir. Bu kimyasallar kullanıldığında çevreye ayırım yapmadan zarar verdiği için, ciddi bir çevre problemiyle karşı karşıya kalınmıştır (Tilman ve Mulrooney, 2000). Böcek öldürücü maddeler, sadece istenilen canlıyla kalmamakla birlikte birçok organizmayıda zehirlenmektedir (Nath ve diğ., 1997; Suh ve diğ., 2000) ve bunların kullanımı bir

konak ile doğal düşmanı arasındaki dengeyi bozarak zararlı sayısının artmasına neden olmuştur (Van Driesche ve Bellows, 1996; Tomberlin ve diğ., 2002). Bunun olması, ekosistemin dengesini bozmakla beraber, diğer canlılar içinde bazen öldürücü etkiye sebep olabilmektedir. Bu zararlı canlıların doğaya, ekosisteme, diğer canlılara zarar vermeden kontrol altına alınması gerekmektedir.

Böceklerin önemli büyüklükteki bir kısmı parazitoiddir. Askew (1971) dünya çapında 100,000'den fazla parazitoid Hymenoptera türü olduğu tahmininde bulunmuştur. Parazitoid terimini ilk kez Reuter (1913) kullanmış olmakla beraber, parazitoidleri şu özelliklere sahip olarak tanımlamıştır;

- Gelişmekte olan birey konağı yok eder.
- Yalnızca bir konakta yaşam evresini sürdürebilirler.
- Eylemleri, gerçek parazitlerden daha çok yırtıcılara benzemektedir.
- Gelişme bozukluğuna neden olmazlar.
- Sadece ergin öncesi dönemleri konaklarda geçirirler, erginleri serbest yaşar.

Parazitoid eşekarıları, yaşama şekilleri bakımından ilginçtirler. Çünkü, gelişmeleri için gerekli olan herşeyi konaktan beslenerek elde ederler. Parazitoidler genellikle yumurtalarını böceklerin içine (endoparazitoidler) ya da böcek otçullarının vücutlarının üzerine (ektoparazitoidler) koyarlar ve yavrular konağın dokularını veya hemolenflerini tüketerek gelişirler. Çoğu parazitoid, yalnızca dar bir konak türünde gelişir ve yine sadece belirli bir yaşam formuna (yumurta, larva, pupa veya yetişkin) saldırabilirler (Mopper ve Strauss, 1988).

Parazitoid türler ve bu böceklerin konağa olan bağılıkları ve konak seçimleri üzerine yazılan literatürler kapsamlı filogenetik bilgi birikimi sunmalarına karşın diğer araştırmalara kıyasla daha az sayıdadırlar (Mopper & Strauss, 1988; Via, 2001; Dres & Mallet, 2002). Larva gelişimi esnasında böcek konaklarını tüketen böcek parazitoidleri, tarım zararlılarıyla mücadele için önemlidirler (McEvoy, 1996; Strand ve Obrycki, 1996).

Hymenopteran parazitoidler, dünyadaki böceklerin yaklaşık %20'sini oluşturan, en zengin böcek gruplarından biridir ve bu orman zararlısı Lepidopter türlerinin potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak görev yapmaktadır (Kansu & Uğur, 1984;

Fisher, 1987). Ichneumonid türleri tarafından bastırılan böcek zararlıları salgınlarına ilişkin birçok örnek, bu zararlıları kontrol etmek için kullanılabilinceğini düşündürmektedir (Bartlett ve diğ., 1978). Örneğin, *P. turionellae*, Erebidae'nin bir alt ailesi olan Lymantriinae'de bulunan *Lymantria disparin*'in tipik bir doğal düşmanıdır (Burges, 1924); *P. disparis* Viereck, Erebidae'de bulunan *Ivela curipes*'in (Butler) tipik bir doğal düşmanı olarak bilinir (Choi ve diğ., 2015).

1.1. Galleriinae Alt Ailesi ve *Gallerina mellonella*

Pyraloidea'nın, Lepidoptera'da dünyanın en büyük ikinci süper ailesi olduğu ve dünya çapında 16.000'den fazla türü olduğu tahmin edilmektedir. Pyrolid tırtıllar yiyecekleri açısından çok çeşitlidirler: "Kurutulmuş veya çürüyen bitki veya hayvan maddelerini, arılardaki ve arılardaki balmumu ve yaşayan bitkileri tüketirler. Bazılarının karınca yuvalarında (bazı Galleriinae), ölçek böcekleri predatörleri (bazı Phycitinae) ve akan suyun içindeki su süpürücüleri (bazı Nymphulinae) (Solis, 1997) oldukları bilinmektedir. Piraloid tırtıllar hasara neden olan ve pirinç, şeker kamışı, mısır, domates ve daha pek çok mahsulü ekonomik olarak etkileyen zararlı böceklerdir; bazıları hububat ve meyveler gibi depolanmış ürünlerin dünyadaki zararlılarıdır (Solis, 1996).

Büyük balmumu güvesi (GWM) *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), saklama yerlerinde balmumu taraklarının en ciddi zararlısıdır ve tüm dünyada arı kovanlarında taraklar, kovan malzemeleri ve arılar için önemli kayıplara neden olabilir. Larva safhası (8-9 yaşları ile birlikte) GWM'nin tek besleme aşamasındadır (yetişkin döneminin ağız bölümleri atrofiktir) ve en yıkıcı aşamasıdır. Gelişimi sırasında bal tırağında ipekli tüneller oluşturmaktadırlar ve arı larvalarının bal, polen, balmumu, dışkıları ve kozalarını beslemektedirler. Bu peteklerin tahrip edilmesine ve daha sonra zayıflamış kolonilerin bozulmasına neden olur. Parafin güvesi tüm arılar ve arıcılık bölgelerinde bulunur, ancak sıcak bölgelerde çok hızlı yayılırken 27°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda daha aktif olmaktadır (Solis, 1996).

Büyük balmumu güvesi, tipik bir holometabolous böcektir ve dört farklı yaşam aşaması, yani yumurta, larva, pupa ve yetişkin aracılığıyla gelişmektedir. Güvenin yaşam döngüsünü tamamlaması için geçen süre, haftalarca aylara göre değişir ve

hem biyotik hem de abiyotik faktörler tarafından etkilenmektedir (Mopper ve Strauss, 1988).

Oviposition, dişilerin ortaya çıkmasından ve eşleşmesinden kısa bir süre sonra başlamaktadır. Yumurtlama sırasında, dişi güveler, yumurta algılamasını en aza indirgeyen ve larva hayatta kalma oranını arttıran, kovan içindeki küçük çatlaklar veya aralıklarda 50-150 kümelenmiş yumurta bırakırlar. Yumurtalar, larvalara açılmadan önce 3-30 gün sürmektedir. Gravid dişi güvelerin potansiyel ev sahibi olarak zayıf muadillerine karşı güçlü kolonileri tercih ettiği bilinmektedir. Larvalar bal, polen ve yumurta beslerken agrega ve yamyamlık sergilerler (yalnızca gıda yetersizliği durumunda). Larva, bal, balmumu ve tahıl ürünlerinden oluşan suni diyetle korunabilir. İlkbahar döneminde daha geç yaştan çok yoğun beslenme sergilerler. Larva 8-10 yumurta atma aşamasına girer ve ipek ipliklerini tüm evrelerde döndürür ancak sadece son instar bir koza döndürür. Larva, pupaya başlamadan 28 gün ila 6 ay önce geçmektedir. Pupal aşaması da 1-9 hafta sürer. *G. melonella* yılda 4-6 kuşak arasında geçmektedir. Büyük balmumu güvesi, bir yumurta, larva veya pupa olarak üreme döngüsü geçirir (Solis, 1996).

G. melonella, larvalarının tahrip edici beslenme alışkanlığı nedeniyle arılar ürünlerinin en önemli zararlılarından biri olarak düşünülür. Larvalar polen, bal, mum, çörek arı balı pupal derileri ve yumurta besler, tarakta tüneller oluşturur ve çerçeveye kitleler ağlar bırakırlar. Zararlar, larvalar altıgen hücre duvarları vasıtasıyla ipek astarlı tüneller oluşturdukları ve tarak yüzeyinin üzerinde oluştuğunda meydana gelir. Larvalar tarafından hücre kapaklarında yapılan tünel ve delikler, balın sızdırıldığı delikleri oluşturur. İpeksi iplikler ortaya çıkan arılarla dolaşır ve sonuçta açlıktan ölürlür. Dahası, büyük balmumu güvesinin larvaları tarafından büyük ölçekte kolonilerin istila edilmesi sıklıkla koloni kaybına neden olur, göçebe olur ve göç eden arı sürülerinin boyutlarında azalmaya neden olurlar (Solis, 1996).

Gelişim aşamalarının morfolojisi incelendiğinde; Güve yumurtalarının ortalama uzunluğu 0.478 mm ve genişliği 0.394 mm'dir. Yumurta kaba bir doku veren dağınık dalgalı çizgilerle sfero şeklindedir. Yumurtanın rengi pembe, krem beyazdan beyaza kadar değişir ve bu renk değişikliklerini yönlendiren mekanizmalar hakkında az

miktarda bilgi bulunmaktadır. Larvasının ise 1-3 mm uzunluğunda ve çapı 0.12-0.15 mm olmaktadır. Yavrudan önce, geç instar larva boyu 25-30 mm ve çapı 5-7 mm olmaktadır. Larval evrede, cinsiyete özgü dış morfolojik karakterlerin bulunmaması nedeniyle erkek ve dişi diye cinsiyetini belirlemek mümkün değildir. Larva, her başarılı molta birlikte yetişen karanlık olmasına rağmen, sklerozlaşmış vücut parçalarına sahip krem beyaz renktedir. Baş, iyi gelişmiş üç apikal dişten oluşur; ancak alt apikal dişleri yoktur. Apikal dişlerin uyarlanabilir bir avantaj sağlaması ve böylece larvaların yıkıcı niteliklerine katkıda bulunması mümkündür. Balmumu güvesinin pupa ortalama boyu 12-20 mm ve çapı 5-7 mm'dir. Dişi pupa normalde erkeklerden daha uzundur. Pupa obtect tipindedir ve tüm ekstremiteleri ecdison sırasında üretilen bir salgı ile vücuda yapıştırılmıştır. Pupa'nın başlangıcında pupa beyazdan sarıya kadar renklidir ancak yavaş yavaş kahverengiye dönüşür ve daha sonra koyu kahverengiye dönüşür. Cinsiyet dimorfizması pupada tıpkı yetişkin aşamada olduğu gibi bulunur. Dişi pupa sekizinci abdominal segmentinde bursa copulatrix için bir diyaframı temsil eden bir klonal sternuma sahiptir, erkek bunlardan yoksun iken bunun yerine dokuzuncu karın bölgesinin ventral tarafında küçük bir çift dış yuvarlak kulpuna sahiptir (Solis, 1996).

Sistematikteki yeri,

- Alem: Animalia
- Şube: Arthropoda
- Sınıf: Insecta
- Takım: Lepidoptera
- Aile: Pyralidae
- Alt Aile: Galleriinae
- Cins: *Galleria*, Fabricius, 1798
- Tür: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

1.2. Galleriinae Alt Ailesi ve *Achroia grisella*

Lepidoptera'ya ait küçük balmumu güvesi olan *A. grisella*, büyük balmumu güvesi *G. melonella* ile aynı aileye ait kozmopolit bir parazitoiddir. Dünya üzerindeki yayılımları Şekil 1'de gösterilmiştir. Küçük balmumu güvesinin larvaları arı kovanları üzerinde beslenir, balmumu tarakları ve tarım zararlısıdır. *A. grisella*,

batıdaki balarısı *Apis mellifera*'nın zorunlu simbiyontudur. Yetişkin güveler, eğer gıda kaynakları hala mevcutsa, doğumdaki koloni çevresinde kalırlar ve erkekler koloni içerisinde veya yakınında küçük leksler halinde bulunurlar (Greenfield ve Coffelt, 1983).

Güve larvaları petek, depolanmış organik materyal ve azalan ya da ölmekte olan arı kolonilerinde ve azalan sayıda işçi arı kolonisinde beslenirler (Künike, 1930; Milum, 1940). Erişkin bireyler beslenmez ve 7 ila 14 gün arasında yaşayıp, bu zaman diliminde sadece üreme ile ilgilenirler. Bu yüzden larval dönemde beslenme çok önemlidir. Çiftleşme seramonileri diğer pyralidlerin aksine feromonlar yerine ses dalgaları kullanmaları yüzünden farklıdır. Erkekler dişileri çekmek için kanatları sayesinde ultrasonik sinyaller üretirler. Dişilerin erkekleri seçtiği ve öncelikle üç sinyal karakterini değerlendirdiği bilinir: Sinyal hızı (SR), ses yüksekliği (pik amplitüd; PA) ve asenkron aralıktır (AI). Şarkının frekans spektrumu yaklaşık 80 ve 100 kHz'de zirveye sahiptir. İlk zirve erkek büyüklüğüne göre belirgin olarak değişir, daha büyük erkekler daha düşük bir frekans zirvesi üretir. İkinci pik, erkeklerin yaşıyla ilişkilidir; 1 günlük erkeklerde daha düşük frekanslı ikinci pikli şarkılar üretilmektedir. Böylece, daha az mumlu kelebeklerin ultrasonik şarkısı, daha önce bildirilenlerden daha karmaşıktır ve dişiler için potansiyel olarak önemli ipuçları sağlayabilir. Bu şekilde dişisini etkileyen bir erkek çiftleşmeyi gerçekleştirir. *A. grisella* dişileri nadiren çiftleşirler (Greenfield ve Coffelt, 1983), cazibe derecesi bir erkeğin üreme başarısının yanı sıra çiftleşme başarısının güvenilir bir öngörücüsü olabilir. *A. grisella* kolonisi, ağustos ve ekim ayları arasında maksimum bireye sahip olmaktadır. Çekici erkekler daha iyi durumdadırlar: daha büyüktürler, gelişmek için daha fazla zaman harcamazlar, daha uzun süre hayatta kalırlar ve geceleri (genellikle 6-10 saat) şarkı söylemek için daha fazla zaman harcarlar (Jennions ve diğ., 2001).

Sistematikteki yeri,

- Alem: Animalia
- Şube: Arthropoda
- Sınıf: Insecta
- Takım: Lepidoptera
- Aile: Pyralidae
- AltAile: Galleriinae

- Cins: *Achroia*
- Tür: *Achroia grisella* (Fabricius, 1974)

1.2.1. Galleriinae alt aile teşhis anahtarı

A8 üzerinde seta SD1'in etrafında sklerotize halka (bazı fizitinlerde eksik); A grubundaki L grubunda üç (bazen iki) setae (kıl).

Mezarotoksit, mezoraks, metatoraks veya A1 üzerinde seta SD1 etrafında halka.

A1'in seta SD1 çevresindeki sklerotize halka görülür.

1.3. Ichneumoninae Alt Ailesi ve *Pimpla turionellae*

Coloptera'ya ait türlerin daha fazla tanımlanmış olması gerçeğine kıyasla, Hymenoptera'nın tüm böcek türlerinin muhtemelen en zengini olduğu ve bu türlerin sayısının yarım milyondan fazla olduğu tahmin edilmektedir (Gaston ve Gauld, 1993). En büyük Hymenopteran ailesi Ichneumonidae'dir ve genellikle 42 tane genel alt aile ve 21.433'den fazla tanımlanan tür bulundurur (Yu ve diğ., 2005). Tür sayısını, Townes (1969) yaklaşık olarak 60.000 türe (Gauld, 1991) ulaştığını belirtmiştir. Tropik araştırmalarda geniş bir örnekleme yapıldığı için tür sayıları küçümsenmiştir (Gaston ve Gauld, 1992; Hanson ve Gauld, 1995; Saaksjarvi ve diğ., 2004). Ichneumonidae böcek parazitoidlerinin en büyük gruplarından biridir ve çok çeşitli böcek konaklarına saldıran ve birçok davranışsal adaptasyona sahip birçok tür içerir. Bu özellikler birçok orman böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde önem kazanmaktadır.

Ichneumonidler kozmopolittir ve çoğu eklem bacaklıların parazitoidleri, başta diğer böcekler ve daha az sayıda örümcek ve birkaç başka gruptan oluşur (Austin, 1985; Finch, 2005). Ichneumonidler biyolojileri çok değişkendir ve tam parazitoid oluşları temsil edilmekle birlikte, bütün Ichneumonidler konaklarını öldürürler.

Birçok Ichneumonidae ailesine ait *Pimpla* cinsinin türlerinin erkek örnekleri, antenli flagellumun bazı bölümlerinin latent kısmında özel oluşumlara (tiroidler) sahiptir. Tiroidler, bayraklı segment yüzeyinin yükseltilmiş bölümlerini temsil eder ve en çok uzatılmış oval biçimleri vardır. Çoğu Ichneumonidae türünde, erkek örneklerin

güvenilir tanımlanması genellikle zordur. Tiroidlerin varlığı veya yokluğu, sayısı, konumu, şekli ve yapısı, erkeklerin belirlenmesindeki güçlükleri önemli ölçüde azaltabilir. Şimdiye kadar, 39 (Yu ve Horstmann, 1997) alt ailesinin sekizinde tiroidler bildirilmiş ve taksonomik önemi yaygın olarak kabul edilmiştir (Richards, 1956; Townes, 1969, 1983; Frıllı, 1974; Kolarov, 1986).

Böceklerin tür zenginliğinin çoğunluğu tropikal alanlara yoğunlaşmıştır, ancak Ichneumonidae'lerin tropikallere kıyasla ılımlı bölgelerde yoğunlaştıkları düşünülmektedir. Ichneumonoidlerde, Pimplinae ve Cryptinae gibi pupal parazitoidler tropiklerde en fazla türe dağılımına sahiptir (Gauld, 1991).

Pimpla cinsi, dünyada 203 tür içeren nispeten büyük bir Ichneumonoid cinsidir. Bu cinslerin üyeleri Doğu Palaearktik bölgede 36 tür içerir. Çin ve Rusya'da toplamda 25 tür kaydedilmiştir, Japonya'da ise 16 tür kaydedilmiştir (Yu ve diğ., 2012). Larva içine yumurtlama, öncü pupa ve pupayı meydana getirir (Iwata, 1966).

Parazitoidler zararlı böceklerin çoğaltılmasının kontrolü için önemlidir. Ichneumonoid türleri tarafından bastırılan birçok örnek, zararlıları kontrol etmek için kullanılabilirliği düşünülmektedir (Bartlett ve diğ., 1978). *Pimpla*, Erebidae'nin bir alt ailesi olan Lymantriinae'de bulunan *Lymantria dispar*'in tipik bir doğal düşmanıdır (Burgesi, 1924); *P. disparis* Viereck, Erebidae'de bulunan *Ivela curipes*'in (Butler) tipik bir doğal düşmanı olarak bilinir (Choi ve diğ., 2015).

P. turionellae (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae), çeşitli lepidopter türlerinin pupa hücrelerinde olgunlaşmamış aşamalarını geçiren bir endoparazitir. Yumurta atımı sırasında bu zararlı pupal konukçulara zehir enjekte eder. Bu kompleks sıvı toksik özelliklere sahiptir. Aynı zamanda konukçunun bağışıklık sisteminin bastırılmasına dahil edilebilmektedir. Birçok lepidopter zararlıda potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak görev yapmaktadır (Kansu ve Uğur, 1984; Fisher, 1987). Yetişkin arılar doğadaki bitki nektarları ve konak pupaları üzerinde beslenirler. İdiobiont olan bu türün en bol olduğu zaman Haziran ve Temmuz ayları arasındadır.

Dişi parazitoidler, larvaların neden olduğu substratın titreşimini algılayabilir, bunun için genellikle ön veya arka bacaklarında genişleyen subgeneral organlar bulunur (Vilhelmsen ve diğ., 2001; Otten ve diğ., 2003). Temporal bölge olan bu

parazitoidlerin çalışılması göstermiştir ki; çevresel etkileşimleri ses ve sıcaklığa bağlıdır. Orta ve çok uzun ovipositorlara ek olarak, bunlar terminal antennal segmentin ucundaki çekiç benzeri yapıları ve büyük, titreşimi algılayan bir subgenel organı çevreleyen büyütülmüş bir ön tibi içerir. Bu özelliklerin son ikisi, avcılarının büyük olasılıkla ev sahiplerini bulmak için titreşimli sondaj denilen bir ekolokasyon biçimini kullandıklarını belirtmektedir (Henaut ve Guerdoux, 1982; Henaut, 1990; Wäckers ve diğ., 1998; Meyhöfer & Casas, 1999; Otten ve diğ., 2000; Vilhelmsen ve diğ., 2001).

Sistematikteki yeri;

- Alem: Animalia
- Şube: Arthropoda
- Sınıf: Insecta
- Takım: Hymenoptera
- Üst Aile: Ichneumonoidea
- Aile: Ichneumonidae
- Alt Aile: Pimplinae
- Cins: *Pimpla*
- Tür: *Pimpla turionellae* (Linnaeus, 1758)
- Sinonimi *Coccygomimus turionellae*'dir.

1.3.1. Ichneumoninae alt aile teşhis anahtarı

Gauld ve Bolton (1988) ve Goulet ve Huber (1993)'e göre Ichneumoninae alt Ailesi için teşhis anahtarı:

Mevcut ön kanat damarı 2m-cu'dur. Enine rugan içermeyen mesoscutum bulunur.

Tergitin salyangozu, tergitin ortasında veya ön yarısında, eğer ortasından biraz sonra tergitin derin glifimayla (uzun, çukur benzeri yapılar) yanal olarak; Sternit 1'in sclerotize edilmiş kısmı genellikle tergastın ortasından öteye uzanmaz, eğer ortanın ötesine uzanıyorsa spiracle tergitin orta uzunluğundadır; Metasomal segment 1 ya apikal olarak ya da daha paralel olarak genişler.

Erkek veya dişide, yumurta ovipositorunda asılı kalmaz.

Genellikle 16'dan fazla olan, 13'den fazla flagellomer içeren anten; Labrum belirgin şekilde klipe altına maruz kalırsa, daha sonra 16'dan fazla flagellomer içeren anten; Bir veya iki büllerin ile ön kanat ven 2m-cu'dur.

Hind ve orta tibialar her biri iki mahmuzada sahiptir.

Mezurlurulsuz mesopleuron veya mesopleuronun uzunluğunun üçte birinden daha kısa bir sternalusu bulunur.

Biloblu flanştan yoksun pronotum; Antenler medialde genişleme yok. Dişi, daha çok ovipositorlu, her zaman alt ve üst supapları görülebilir.

Varsa, ön kanat areolet, düzensiz eşkenar petiolat (anteriora saplanır), üçgen veya beşgen; Tergite, derin glymmae iledir ya da glymmae'sizdir.

Ovipositor kılıfları projeksiyon yapmayan veya inceltici, esnek görümlü; Uzun boylu, genellikle gizlenmiş, parameresli erkekler; Tarsal pençeler sıklıkla pektinate olmaz. Daha sonra soluk turuncu-kırmızı noktural türler yüzden zayıf bir oluk ile ayrılmış, glymmae bazal, birbirinden sadece yarı saydam bir bölüm ile ayrılmış ve ovipositor metasomal apeksin ötesine çıkıntı yapmaz.

Clypeus yüzden ayrı değildir, tüm yüzey hafifçe dışa veya kabaran bir yüzey oluşturmaktadır. Tüm yüzey üzerinde belirgin, uzun setae bulunan gözler; Loblu kadın tarsal pençelidir.

1.4. Braconinae Alt Ailesi ve *Habrobracon hebetor*

Braconinae alt Ailesi, Hymenoptera takımına ait Braconidae (*A. galleria*'nın da dahil olduğu aile) Ailesine ait bir alt ailedir. Çok geniş, çok çeşitli ve kozmopolit bir alt Ailedir. Barındırdığı türlerin birçoğunda eşek arıları üreme davranışı için antero-lateral bir koku bezlerine sahiptir. Brakoninler, esas olarak Colepter ve Lepidopter larvalarının tek hücreli ya da toplu ektoparazitoidleridir. Bununla birlikte, özellikle Braconini'den olan bazı cins ve türler, saklı difterostik, simfit ve muhtemelen safra oluşturan homopterous larvalara sahiptir (Chadwick & Nikitin, 1976). Parazitoid eşek arılarının kümelendiği alt aile, bu çalışmada kullanılan *H. hebetor* türünü bünyesinde barındırır.

H. hebetor, Braconinae alt ailesine mensup olan, pyralid güvelerinin ektoparazitoid parazitoidi olan bir böcek türüdür (Keever ve diğ., 1986; Press ve diğ., 1982; Scholler ve Prozell, 2001). Bilinen konakları arasında *Plodia interpunctella*'nın larva safhası, Büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) Hint yemek kurdu, kuru meyve güvesi (*Cadra calidella*), Akdeniz fıstığı güvesi ve badem güvesinin geç larva safhası bulunmaktadır. *H. hebetor* uzun geçmişten bu güne biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Ullyett, 1945; Press ve diğ., 1974, 1982; Cline, 1989; Cline ve diğerleri, 1984; Cline and Press, 1990; Brower and Press, 1990). Bu arılar, güve larvalarının kan proteinlerini hızlıca yok eden bağırsak enzimlerine sahiptirler. Yaşam döngüleri, optimum 30°C'de larvadan erişkin bir birey oluşumuna kadar 13 gün sürmektedir. Erişkin bir dişi yaklaşık 100 yumurta üretir ve 23 gün kadar yaşar. Parazitoidin yaşam döngüsü kısa larva ve uzun pupa evresi olarak karakterize edilir.

Sistematikteki yeri,

- Alem: Animalia
- Şube: Arthropoda
- Sınıf: Insecta
- Takım: Hymenoptera
- Aile: Braconidae
- Alt Aile : Braconinae
- Cins: *Habrobracon*
- Tür: *Habrobracon hebetor*

1.4.1. Braconinae Alt Aile Teşhis Anahtarı

Gauld ve Bolton (1988) ve Goulet ve Huber (1993)'e göre Braconinae alt ailesi için teşhis anahtarı: Mandibular içeri doğru ve kavisli, uçlarına dokunulduğu zaman kapanıyor ve 1 veya 2 diş bulunur.

İlk metasomal tergite, belirgin olarak propordumun dorsal seviyesinin altında ve arka coxae'ye yakın olan propodeumda medio-posterior veya ventral olarak yerleşmiştir.

Ön kanatta marjinal hücre daha geniş; olağanüstü derecede dar ise o zaman nispeten kısa; sonra ön kanadın damar tıkanıklığı mevcutsa, ön kanadın damarı (varsa) 1-M damara paralel veya posteriyor.

Hipoklipal depresyon, derin ve geniş ve kısmen üst mandibular taban kısımlarının üstündeki belirgin ventral kenar boşluğunun ortası; Hipoklusal depresyonun dibi, içbükey labrum ve genellikle klibe çöktüğü bir bölümden oluşur; Ön tarsal kesitleri neredeyse her zaman ince oluyor.

Propleuronun posterior flanşı: ilk metasomal tergit, düzleştirilmiş yanal parçalar veya ikinci tergite taşınmaz bağlanmış tergit; yanal olarak bulunmayan pre- pektif karina.

Hind simplarsus, aşağıdaki parçaların kombine uzunluğundan daha kısadır; oksipital karina yok; damar m-cu olmadan arka kanat veya eskimiş ve düz; 5 segmentli maksiller palp.

Genellikle tamamen düz olan geniş bir çöküntüsüz mesopleuron; Damarın uzunluğu 1-M arka kanadın en az 1.5 kez damar M + CU'dur ve temelde genişlemiştir; Klikozun ventral kısmı deprese, hipoklipal depresyonun dorsal kısmını oluşturur.

1.5. Microgastrinae Alt Ailesi ve *Apanteles galleriae*

Braconidae Ailesi, yaklaşık 18.000 geçerli tür ile böceklerin en zengin ailelerinden birini teşkil etmektedir (Yu ve diğ., 2006). Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ve Homoptera gibi büyük böcek gruplarında yaygın olarak bulunan çok zararlı böceklerin önemli doğal düşmanlarını içerir (Shaw ve Huddleston, 1991; Wharton, 1993; Wharton ve diğerleri, 1997).

Mikrogastrinae (Hymenoptera: Braconidae), larva Lepidoptera'nın zorunlu endoparazitoid olan koinobiont parazitik arılardan oluşan bir hiperdiveri alt ailesidir. Geçmişte geleneksel olarak Braconidae'nin yüksek sınıflandırması yetişkin morfolojisinde, kanatların durumuna, boyutuna vs bakılarak yapılmaktaydı ancak günümüzde artık morfolojik bulguların yanısıra moleküler bulgular karşılaştırılarak tür teşhisleri yapılmaktadır.

Günümüzde Microgastrinae, BOLD'daki en geniş coğrafik ve taksonomik kapsamlı DNA barkodlama veritabanı sahip parazit Hymenoptera grubudur. DNA barkodlama yöntemiyle, son 8 yılda 20 000'den fazla numuneden üretildi ve 50 cins (toplamın %90'ı) ve 75 ülkeden temsil edildi.

Microgastrinae alt ailesi, yaklaşık 1.500 tanımlanmış tür ile Braconidae'nin (Whitfield ve Mason, 1994; Whitfield, 1997; Dowton ve diğerleri, 1998) mikrogastroid topluluğuna aittir (Shenefelt, 1972, 1973; Mason, 1981). Microgastrinae alt ailesinin tüm üyeleri lepidopteran larvalarının koinobiont endoparazitoidleridir. Yumurtalar konak larvalara konur, yalnız veya yeşillik içinde gelişirler, daha sonra yavru larva aşamasından pupaya başlamak üzere ortaya çıkarlar. Microgastrine'ye mensup eşekarıları, Lepidopteran güvelerin parazitoidlerinin büyük bir grubunu içermektedir. Bu grubun yüzü aşkın türü, dünyadaki çeşitli ekonomik açıdan önemli zararlılara karşı biyolojik mücadele programında başarıyla kullanılmıştır (Austin ve Dangerfield, 1992, 1993; Whitfield, 1997). Mikrogastrin parazitoidlerin böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde büyük önemi olmasına rağmen, biyolojik mücadelede kullanımı, bu grupta güvenilir taksonomik çalışmalar bulunmaması nedeniyle büyük ölçüde engellenmektedir. Parazitoidlerin, konakçılarının ve parazitoidlerin saldırdığı safhanın doğru şekilde tanımlanmasının, herhangi bir biyolojik kontrol programı için başarı olması esastır. Parazitoidlerin ve konakçı türlerinin yanlış tanımlanması ve parazitoidlerin durumu hakkındaki bilgisizlik daha sık olarak, biyolojik kontrol programının başarısız olmasına, diğer bir deyişle para kaybına ve işgücü israfına yol açar.

Sistematikteki yeri:

- Alem: Animalia
- Şube: Arthropoda
- Sınıf: Insecta
- Takım: Hymenoptera
- Aile: Braconidae
- Alt Aile: Microgastrinae
- Cins: *Apantales*
- Tür: *Apantales galleria*

A. galleriae Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) koinobiont, larva endoparazitoididir. Bu konakçı türünün tırtılları, arı kovanlarında zararlıdır, çünkü bunlar polenle beslenirler ve genellikle tarakları yok eder. *A. galleriae* yetişkinleri doğada bal, meyve nektarı ve konak larvasıyla beslenirler. Bu nedenle, yetişkin avlar,

bu zararlılara karşı kullanılan ve petek, meyve ağaçları ve konak larvaları üzerinde biriken böcek öldürücü artıklarına maruz kalabilir.

1.5.1. Microgastrinae alt aile teşhis anahtarı

Gauld ve Bolton (1988) ve Goulet ve Huber (1993)'e göre Microgastrinae alt Ailesi için teşhis anahtarı: Kanatlar mevcut ve indirgenmemiştir. Ön kanatta ven 2m-cu bulunmaz. Tergitler 2 ve 3, iki çift spiracles taşıyan bir syntergite (görünen ikinci tergitte) oluşturarak kaynaşmıştır; Ön kanat genellikle ilk damar ve ilk damar içi hücreler ile damar Rs + M ile ayrılır.

Altçeneleri kapalı ve 1 ya da 2 diş zaman bunların uçları dokunarak, içe doğru kavisli. İlk metasomal tergitte, belirgin olarak propordumun dorsal seviyesinin altında ve arka coxae'ye yakın olarak propodeumda medio-posterior veya ventral olarak sokulmuştur; Birinci ve ikinci tergites sahip Cheloninae, dışında postpectal karina yoktur, hareket edemez şekilde.

Ön kanatta marijinal hücre daha geniş; Olağandışı derecede dar ise o zaman karşılaştırmalı olarak kısa; daha sonra ön kanadın damar tıkanıklığı mevcutsa, ön kanadın damarı (varsa) 1-M damara paralel veya posteriyor; Damar Arka kanadın 2CU si Sigalphinae haricinde hemen hemen daima mevcut değildir. Hypclypal depresyon genellikle yoktur; Mevcutsa, daha sonra sığ, dar ve orta-ventral maruz kalça mandibular bazların üst seviyesine yakındır; Labrum düz ve clypeusun ventral kısmı mevcutsa hipoklip depresyonunun bir parçası değildir; Ön tarsal segmentleri kısaltılabilir.

Zayıf olarak sklerozan epipleuronunda (latero-tergit) ilk metasomal tergitin spiragaları; Kısa metasom; Oksipital karina yok; Ön kanadın damarı SRI büyük ölçüde skleksizdir.

Ön kanadın ven 3-SR damarından daha kısa veya damar r-m yok; 14 veya 18'e sabitlenmiş anten segmentlerinin sayısı; 5 segmentli maksiller palp; Damar 2r-m genellikle arka kanadadır; Damar SRI neredeyse daima düz veya hafifçe ön kanat marjı yönünde eğilir, ancak zaman zaman az eğri; Posterior skutlar depresyonu yok.

18 segmentli antenler; Damar 2-SR ön kanadın damarına bağlı; Posterior olarak şiddetle daraltılmış olsa dahi, ilk tergit farklılığının notum şekli; Scutellar sulkus az çok gelişmiştir.

1.6. DNA Barkodlama, Mitokondriyal DNA ve COI Gen Bölgesi

Ekolojinin, evrim biyolojisinin, tarımın ve ekonomi alanlarında biyoçeşitlilik hakkında ilgi arttıkça, diğerlerinin yanı sıra türlerin tam olarak belirlenmesi de giderek daha önem kazanmıştır. Bununla birlikte birçok biyolojik araştırmada, tür tayinlerine bağlı olarak taksonomi uzmanları yetersiz gelmeye başlamıştır. Sonuç olarak, uzmanların dışında da tanımlama yöntemleri gerekmektedir. Sürdürülebilir taksonları tanımlama kabiliyetinin DNA Barkodlama yöntemi kullanılarak devam ettirileceğine inanıyoruz. Mitokondriyal gen olan sitokrom c oksidaz I'in (COI), hayvanlar için küresel bir biyo-tanımlama sisteminin çekirdeğini oluşturabileceği keşfedilmiştir ve bu tam olarak geliştirildiğinde, bir COI tanımlama sistemi mevcut tür tayini için güvenilir, uygun maliyetli ve erişilebilir bir çözüm sağlayacaktır.

Yaşamın çeşitliliği tüm biyolojik çalışmalarla desteklenmesinin yanısıra ağır bir yüküdür. Morfolojik tanımlama sadece belirli bir yaşam aşaması veya cinsiyeti için genellikle etkili olduğundan yetersizdir. Morfoloji temelli tanımlama sistemlerinde ve oldukça azalan taksonomist sayısından doğan kısıtlamalar, taksonu tanımlamaya yönelik yeni bir yaklaşım gerektirdiğini bildirmektedir. Bununla birlikte, morfolojik tanımlamada ortaya çıkan sorunlar bütün türlere yansımaktadır. Hataya yer vermemek adına DNA barkodlama gibi yeni yöntemler kullanılmalı ve geliştirilmelidir.

'DNA barkodlama, kısa, standart gen bölgelerini iç tür etiketi olarak kullanarak hızlı ve doğru tanımlamalar yapılması için tasarlanmış yeni bir sistemdir' (Hebert ve Gregory, 2005). Moleküler karakterizasyon ve DNA barkodlama, bilinmeyen türlerinde dahil olduğu, türleri tanımlamak için bir böcek DNA'sı içinde kısa bir genetik işaretleyici kullanılan moleküler taksonomik bir metoddur.

DNA barkodlamanın dayandığı desteklerden biri, türler arasındaki genetik çeşitliliğin türler içindeki varyasyondan daha büyük olmasıdır (Hajibabaei ve diğ., 2007). Mitokondriyal sitokrom c oksidaz altbirim I'in 5 'ucuna karşılık gelen 658 bp'lik tek

bir dizi, tüm canlı organizmalar için standart, evrensel bir işaretleyici olarak kullanılır (Hebert ve diğ., 2003; Ratnasingham & Hebert, 2007, Strutzenberger ve diğ., 2010).

Moleküler sistematik, biyolojide en hızlı büyüyen alanlardan birisidir ve moleküler karakter gelişim modelleri konusundaki anlayışımız nispeten yüzeyseldir. Moleküler verilerin analizi, bir tür içinde nüfus yapısını inceleyen derin filogenetik ilişkileri (Blair ve Hedsen, 2005; Regier ve diğ., 2005) anlamak için önemlidir.

Bazı araştırmacılar, DNA dizilimini taksonomik karakter ve tanımlamalar için merkezi bir kriter olarak benimseyen bir kavram olan 'DNA Taksonomisi'ni öngörmüş ve standart bir DNA analizi yöntemi olarak DNA barkodları kullanılmasını önermişlerdir (Blaxter, 2003; Tautz ve diğ., 2003; Vogler ve Monaghan, 2007).

DNA barkodlama, organizmaları belli bir türe ait olarak tanımlamak için mitokondriyal genomun (sitokrom c oksidaz 1 (COI)) 648bp'lik bir bölgesini kullanır (Hebert ve diğ., 2003). 2003 yılında DNA barkodlamanın kurucusu olan Paul Hebert, taksonomistler tarafından tanımlanmış olan türlerin genlerine bağlı olarak yeniden halka açık bir şekilde kütüphaneleştirilmesini önerdi. Barkod kütüphanesinin amacı tür tanımlanmasında kullanılacak yeni bir anahtar sağlamak ve bilinmeyen bir örneğin gen bölgesine bakılarak tür tanımını mümkün kılmaktır. Bunun aksi olarakta, bu örneğin COI sekansı hiçbir örneğe uyuşmuyorsa, bu canlının yeni bir tür olduğu önerilebilir: 'Yeni karşılanan türler, varolan üyelerin genetik açıdan farklılıklarıyla yeni tür oluşumunun sinyallerini verecektir' (Hebert ve diğ., 2003). Örneğin, Madagaskar'daki karınca türlerinin çeşitliliği, toplanan barkodların kütüphane referans koduna göre hizalayarak değerlendirilmiştir (Smith ve diğ., 2005). Türler arası uzaklık ne kadar fazlaysa mtDNA sekans farkında o kadar çok olması beklenir.

En azından başlangıç hipotezi buydu. Ondan sonra, taksonomistlerin yaptığı çalışmalarla, her türde benzersiz DNA barkodlarına sahip olduğunu ortaya çıkartmışlardır. Bunlara örnekler arasında amfibianlar (Vences ve diğ., 2005), bitkiler (Kress ve diğ., 2005), deniz anemonları, mercanlar ve bazı denizaneleri bulunmaktadır (Hebert ve diğ., 2003).

DNA barkodlama, revizyon çalışmalarında bir araç olarak kullanılmaktadır. Ancak fonksiyonel sınırlandırmalar, eşit olmayan ikamet kalıpları ve heterojen evrimsel hızlar, potansiyel olarak türlerin sınırlandırılması için COI'in yararlılığını etkileyebilir. COI-II genleri, serpiştirilmiş, yüksek derecede muhafaza edilen membrana bağlı bölgelerden ve değişken dış bükey halkalardan oluşur (Saraste, 1990; Lunt ve diğ., 1996). COI moleküler evriminin önceki incelemeleri, bu yapıların, özellikle membrana bağlı bölgelerde, bu genin mutasyon hızında fonksiyonel kısıtlamalara yol açtığını göstermiştir (Saraste, 1990; Lunk ve diğ., 1996; Caterino ve Sperling, 1999).

DNA değişme kalıpları, filogenetik ilişkileri ve popülasyon yapısını şekillendirmede önemli bir rol oynayabilir ve taksonun giderek farklılaşmasıyla birlikte bağımsız soylar ve değişimi arasındaki farklılıkları gösterebilir (Galtier ve diğ., 2006).

Moleküler biyoloji ve moleküler araçların gelişmesiyle birlikte, böceklerde dahil olmak üzere yaşam formlarının belirlenmesi hızlı, hassas ve kolay hale gelmiştir. DNA barkodlamanın kullanılması hızlı sonuç vermesinden kaynaklanmaktadır.

Böceklerde mitokondrial DNA çalışmalarında en fazla DNA dizisi çıkartılmış bölgeler sitokrom oksidaz 1 ve 2, 12S ve 16S genleridir (Caterino ve diğ., 2000; Hebert ve diğ., 2003; Shokalla ve diğ., 2011). Behura ve diğ., (2000)'ne göre DNA markörlerinin kullanılmasının yarar sağlayan sebepler şunlardır; Hücrelerde birçok mitokondri bulunur ve dolayısıyla mitokondriyal DNA elde etmesi kolaydır, mitokondriyal DNA'nın amplifikasyonu uygun olmayan koşullarda saklanmış örneklerde bile kolaydır, mitokondriyal DNA diğerlerine göre daha küçüktür ve hızlı evrimsel gelişme gösterir, mitokondriyal DNA genleri anneden aktarılır ve daha evrimseldir (Hurst & Jiggins, 2005).

Mitokondriyal genomun sitokrom c oksidaz altbirimi 1 (COI) bölgesi, hayvan türlerinin büyük çoğunluğunun spesifik tanımlanmasına izin verecek şekildedir (Kochzius ve diğ., 2008; Kochzius ve diğ., 2010). Takson teşhisindeki genomik yaklaşımlar, organizmaları tanımlamak için DNA dizileri arasındaki çeşitliliği kullanmaktadır (Kurtzman, 1994; Wilson, 1995).

Geçmişteki filogenetik çalışmalarda genellikle ribozomal (12S, 16S) DNA'yı kodlayan mitokondriyal genlere odaklanılmıştır, ancak geniş taksonomik analizlerde kullanılmaları dizilim hizalamalarını büyük ölçüde karmaşıklaştıran ekleme ve silme prevelansı ile sınırlandırılmıştır (Dogle ve Gaut, 2000). Hayvan mitekondri genomundaki 13 protein kodlayan genler daha iyi hedeflerdir. Çünkü, indiller nadirdirler ve çoğu okuma çerçevesinde sadece bir değişime neden olurlar.

COI'in diğer mitokondriyal genlerden daha geniş bir dizi filogenetik sinyali olduğu görülmektedir. Diğer protein kodlayıcı genlerle ortak olarak, çünkü konum nükleotidleri, 12S veya 16S rDNA'nınkinden yaklaşık üç misli daha fazla bir moleküler evrim oranına yol açan yüksek bir baz yer değiştirmesi sıklığı göstermektedir (Knowlton & Weight, 1998).

1.7. Filogenetik Analiz

Evrimsel senaryoları zamanla kalibre edilmiş filogenetik ağaçlarda sıklıkla evrimsel yaş tahminlerine yani moleküler saat hesaplamalarına dayanır. Birçok böcek grubunda olduğu gibi fosiller yoksa, bu tahminleri elde etmek için standart bir moleküler değişim hızı uygulanabilir. Böcek mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) için, moleküler evrimin en yaygın şekilde bildirilen oranı, 300 ila 3.250.000 yıl önce değişen soy serileri yaş tahminlerini sağlayan bir dizi çalışmaya dayanan Brower (1994) kalibrasyonudur.

Moleküler saat hipotezi, evrimsel farklılığı gidermek ve çözmek için kullanılan modern moleküler filogenetik yaklaşımın temelini oluşturmaktadır. Büyük araştırmalar memelilerin yaşlarına (Hedges ve diğ., 1996) ve kuşlara yönelik tahminleri içermektedir. Bununla birlikte, çoğu genetik belirteç için, soylar arasındaki hız heterojenizasyonunun neden olduğu bir moleküler saatten sapmalar görülmektedir (Hedges ve diğ., 2000). Bununla birlikte, moleküler saat hesaplamalarına yönelik yeni yaklaşımlar, küresel bir filogeni içerisinde herhangi bir sayıda yerel moleküler saati varsayarak sağlam zamansal yeniden yapılandırma elde etme potansiyelini sağlamaktadır (Yoder ve Yang, 2000). Moleküler saati rahatlatmak için daha deterministik yaklaşımlar, bir dal uzunluğu boyunca nükleotid ikamesinin log normal veya Poisson dağılımlarına yaklaştığı varsayımına dayanmaktadır. Bu moleküler saatlerin nasıl bir araya geldiğini gösteren varsayımlar

farklıdır; birinci yaklaşım, evrimsel oranlarla yakın ilişki içindeki soylar arasında genellikle "otokorelasyon" olarak adlandırılan bir korelasyon olduğu varsaymakta (Sanderson, 1997; Thorne, Kishino ve Painter, 1998) ve ikinci yaklaşım ise, bu oranların bir filogenetik ağacın herhangi bir yerinde değişmesine izin vermektedir (Huelsenbeck, Larget ve Swofford, 2000). Moleküler tarihlere yönelik daha önceki bir yaklaşım, iki küme testi olarak da bilinen göreceli oran testi (Li ve Tanimura, 1987) kullanılarak tanımlanan bir moleküler saat "omurgasından" sapmış soyların seçici olarak çıkarılmasını içermektedir (Takezaki, Rzhetsky ve Nei, 1995).



2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Numunelerin Hazırlanışı

Prof. Dr. Ahmet BEYARSLAN tarafından teşhis edilen *P. turionella*, *G. mellonella* Wilkinson, *A. galleriae* ve *A. grisella* türleri Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Anabilim dalı Hayvan Fizyolojisi laboratuvarında kültüre alınmış olduğu için laboratuvarından temin edildi. *H. hebetor* türü, Dr. Öğr. Gör. Adnan SARIKAYA tarafından Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi çevresinden toplandı ve teşhisini Prof. Dr. Ahmet BEYARSLAN yaptı.

P. turionella, *G. mellonella*, *A. grisella* türlerinin mitokondrice zengin dokularından (bacak, toraks ve üst karın bölgesi), *H. hebetor*'un tüm vücut bölgesi kullanılarak, DNA izolasyonu yapılmak üzere 0.5-20mg örnekler Sartorius TE214s manual hassas terazisinde tartıldı, ardından daha önceden içlerine 3ml çapında tungsten bilye atılarak 121°C'de Hirayama Autoclave HG80 otoklavda steril edilmiş 2ml'lik ependorf mikrosantrifüj tüplerine alındı.

2.1.1. Gen Bankası Verilerinin Hazırlanışı

Dünya üzerinde, kullandığımız 5 türün farklı araştırmacılar tarafından elde edilen ve kullanıma uygun halde olan COI dizileri, Gen Bankası ve BOLD'dan indirilerek bu çalışmada dahil edildi. Bu veriler, parazitoid böceklerin (*P. turionella*, *A. galleriae* ve *H. hebetor*) ve bunların konakları olan büyük ve küçük balmumu güvelerinin tür bazında Dünya üzerindeki dağılımını incelemek için hazırlandı ve kullanılacak tür sekansları Tablo 2.1-5'te verildi.

Tablo 2. 1. Gen Bankası'ndan indirilen *P. turionella* türünün COI gen bölgesi verileri (658bç)

Sıra	GenBank Erişim Numarası	Lokalite ve Numune Kodu	Referans
1	KR791223.1	Kanada, GMGRE2494-13	HEBERT, Paul DN ve diğ., 2016

Tablo 2. 2. Gen Bankası'ndan elde edilen *A. grisella* türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç)

Sıra	GenBank Erişim Numarası	Lokalite ve Numune Kodu	Referans
1	KX044795.1	Almanya, BBLOD869-11	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
2	KX044795.1	Almanya, CGUKB627	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
3	KX044795.1	Almanya, CGUKV974-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
4	KX044795.1	Almanya, FBLMT937-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
5	KX044795.1	Almanya, GWORL570-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
6	KX044795.1	Almanya, FBLMT791-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
7	KX044795.1	Almanya, LEATJ145-15	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
8	KX041272.1	Finlandiya, LEFIK808-10	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
9	GU089346.1	Amerika Birleşik Devletleri, LGSMB113-04	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2010
10	KX041272.1	Finlandiya, LGSMB113-04	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
11	KF397988.1	Avustralya, LNAUT1354-14	Hebert, Paul DN ve diğ., 2013
12	KF397988.1	Avustralya, LNAUT1901-14	Hebert, Paul DN ve diğ., 2013
13	KF397988.1	Avustralya, LNAUU239-15	Hebert, Paul DN ve diğ., 2013
14	KF397988.1	Avustralya, LNAUU240-15	Hebert, Paul DN ve diğ., 2013
15	KX040021.1	Almanya, LOCBF2481-13	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
16	KX044795.1	Finlandiya, LPOKA560-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
17	KX044795.1	Finlandiya, ODOPE483-11	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
18	KX044795.1	Finlandiya, ODOPE858-11	Mutanen, Marko ve diğ., 2016

Tablo 2. 3. Gen Bankası'ndan indirilen *G. mellonella* türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç).

Sıra	GenBank Erişim Numarası	Lokalite ve Numune Kodu	Referans
1	GU688828.1	Avustralya, ANICC285-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
2	GU688828.1	Avustralya, ANICQ097-11	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
3	GU688828.1	Avustralya, ANICQ098-11	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
4	KX044004.1	Bileşik Krallık, CGUKA499-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
5	KX044004.1	Bileşik Krallık, CGUKA877-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
6	KX044004.1	Bileşik Krallık, CGUKB558-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
7	KX044004.1	Bileşik Krallık, CGUKC228-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
8	GU688828.1	Avustralya, LNSWF103-06	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
9	GU688828.1	Avustralya, LOCBE119-06	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
10	GU688828.1	Avustralya, LOCBE117-06	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
11	GU688828.1	Avustralya, LOCBE120-06	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
12	GU688828.1	Avustralya, LOCBF2650-13	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
13	GU688828.1	Avustralya, LOCBF2668-13	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
14	GU688828.1	Avustralya, LPOKA257-08	Mutanen, Marko ve arkadaşları, 2016
15	GU688828.1	Avustralya, LPOKA669-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
16	GU688828.1	Avustralya, LSUSA163-06	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
17	KF491749.1	Amerika Birleşik Devletleri, LTOLB170-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
18	KF491749.1	Amerika Birleşik Devletleri, LTOLB171-09	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
19	KX041116.1	Almanya, ODOPE862-11	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
20	KX041116.1	Almanya, ODOPE863-11	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
21	KX040593.1	Almanya, PHLCD2942-12	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
22	GU091133.1	Canada, XAD334-04	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
23	GU091133.1	Canada, XAG708-05	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016

Tablo 2. 4. Gen Bankası'ndan indirilen *A. grisella* türüne ait COI gen bölgesi verileri (658bç)

Sıra	GenBank Erişim Numarası	Lokalite ve Numune Kodu	Referans
1	JQ853455.1	Yeni Zellanda, NZMG201-11	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
2	JQ853455.1	Yeni Zellanda, NZMG202-11	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016
3	JQ853455.1	Yeni Zellanda, NZMG203-11	Hebert, Paul DN, ve diğ., 2016

Tablo 2. 5. BOLD'dan indirilen *H. hebetor* türünün COI gen bölgesi verileri (648bç)

Sıra	GenBank Erişim Numarası	Lokalite ve Numune Kodu	Referans
1	KT966696.1	Fransa, AGIRI291-17	HEBERT, Paul DN ve diğ., 2016
2	KR890305.1	Kanada, GBAHB1156-14	HEBERT, Paul DN ve diğ., 2016
3	KT966696.1	Fransa, GBMIN73841-17	HEBERT, Paul DN ve diğ., 2016

2.2. DNA İzolasyonu

İzolasyon öncesinde örnekler, üzerinde toz vb varsa temizlenmesi için ddH₂O kullanılarak temizlendi. Dondurulmuş örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.

2.2.1. DNA'sının Saflaştırılması

DNA izolasyonu için 'Dneasy Blood & Tissue Qiagen Kit' kullanıldı. Kit kullanımı esnasında kullanılacak 1000 µL ve 100 µL'lik mikropipetler ve steril pipet uçları kullanıma hazır bir hale getirildi. (Kit Katalog nu: 69504-69506) Hazırlanan numunelerin üstüne 180µL Buffer ATL ve onunda üstüne 20µL proteinaz K eklenecek vorteksle karıştırılıp, 20sn 15 hertz'de Tissuelyser LT Qiagen'e konuldu ardından 5'er saniye 3 tekrar şeklinde örnekler 3000 rpm'de vorteks yardımıyla

homojen haline getirildi ve lizinin gerekleŒmesi iin Eppendorf® Thermomixer Compact'da 56°C 450 rpm'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

Tüp iindeki liziz olmuş DNA ürünü, doku ile karŒık sıvıdan titizlikle dokuyu almadan mikropipetle saflaŒtırma iin 2ml'lik saflaŒtırma tüplerine alındı. Hazırlanan numuneler sırasıyla izolasyon iin Œu iŒlemlere tabi tutuldu:

- Vorteks yardımıyla homojen haline getirilmesini takiben 200µL Buffer AL ekleyip 56°C'de 10 dk inkübasyona konuldu.
- 200µL etanolü (96-100%) ekleyip tekrardan vorteks yardımıyla homojen haline getirildi.
- Pipet iindeki karıŒım DNeasy kitin iindeki 2ml'lik tüplere aktarıldı ve kolon iindeki süzölsün diye ≥ 6000 (8000rpm)'de 1dk santrifüj edildi.
- Spin kolonu yeni 2ml'lik koleksiyon tüpüne aktarıldı ve üstüne 50µL Buffer AW1 eklenerek 1 dakika ≥ 6000 xg'de santrifüj yardımıyla dibe öktüröldü.
- Spin kolonu yeni koleksiyon tüpüne aktarıp üzerine 500µL Buffer AW2 eklendi ve 3 dakika 20.000xg (14.000rpm)'de santrifüj edildi.
- Spin kolonu 1.5-2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Spin kolon membrana 200µL Buffer AE eklenerek DNA'yı kolondan uzaklaŒtırmak iin oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe ederek, 1 dakika ≥ 6000 (8000rpm)'de santrifüj edildi.
- DNA verimini arttırmak iin son aŒama tekrarlanarak DNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

DNA saflaŒtırma iŒlemi, 5 tür iin 5er kere tekrarlandı. Aralarından DNA saflığı bakımından en iyi olanları sekansa gönderilmek üzere PZR iŒlemine tabi tutuldu.

2.2.2. DNA Miktarının Ölölmesi

Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'ndan alınan 4 türden ve Yalova'an toplanan bir türden elde edilen ve BMG Labtech Spectrostar Nano ile saflaŒtırılan DNA miktarları Polimeraz Zincir Reaksiyonu öncesi uygunluk bakımından kontrol iin ölçöldü.

2.3. DNA Amplifikasyonu

Ekstratlar sonrasında standart protokolleri takiben 5' ucuna yakın 658 bplik COI gen bölgesi evrensel HCO2198 ve LCO1490 primer çiftleri kullanılarak, PZR amplifikasyonuna tabi tutuldu (Tablo 2.6'da gösterildi). DNA izolasyonu uygun saflık ve miktarda DNA izole edilmiş örnekler CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System'de, NEB ddmastermix DNA Markers & Ladders Products kullanılarak, mastermix çözeltisi hazırlanarak PZR için hazır hale getirildi.

Tablo 2. 6. Mitekondriyal DNA COI gen bölgesinin dizi analizinde kullanılacak evrensel primerleri (Folmer, 1994)

Primer	Baz Dizisi	Kaynak
LCO1490 (ileri)	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer ve diğ., 1994
HCO2198 (geri)	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer ve diğ., 1994

PZR C1000™ Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için PZR'da kullanılacak primerler (Macrogen) sentezletildi.

Tablo 2. 7. Mitokondriyal COI gen bölgesinin evrensel HCO2198 ve LCO1490 primer çiftleri için PZR döngü programı

İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	2 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	5
Primer Bağlanması (Annealing)	51	1 dakika	5
Uzama	72	1 dakika	5
Denatürasyon	94	30 saniye	30
Primer Bağlanması (Annealing)	51	1 dakika	30
Uzama	72	1 dakika	30
Sonlanma	72	10 dakika	1

PZR, C1000TM Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirildi ve primerlerin çoğaltılmasında kullanılan döngüler Tablo 2.7'de verildi. PZR reaksiyonu 95'de 2 dakika ön denatürasyon 1 döngü 95' de 30 sn 5 döngü denatürasyon, 51 'de 1 dakika bağlama 5 döngü, 72'de 1 dakika uzama, 94'de 30 saniye 30 döngü denatürasyon, 51'de 1 dakika 30 döngü tekrardan primere bağlanma, 72°Cde 1 dakika 30 döngü uzama ve 72'de 10 dakika 1 döngü olacak şekilde yapıldı. PZR'de kullanılacak her ürün için 12.5µl ddmaster mix, 1µl reverse primer, 1µl forward primer, 1µl template DNA son hacim 25µl olacak şekilde ddH₂O eklenerek tamamlandı (Folmer ve diğ., 1994).

2.3.1. Amplifiye DNA'nın Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi yöntemiyle, elde edilen DNA'nın miktarı ve saflığı kontrol edilmek amacıyla %1'lik jel üzerinde yürütüldü.

PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi için: %1 agar olacak şekilde TAE 1X tamponla jel hazırlandı. Jel hazırlanırken bir erlen içerisine 1.5 gram agaroz konuldu ve üzerine 150ml 1X TAE (Trisma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA çözeltisi) eklendi. Jel mikrodalga fırında 3 dakika ısıtıldıktan sonra, oda sıcaklığında 55°Cye kadar soğumaya bırakıldı. Ardından 8.5µl Red Safe eklendi. Ardından Manyetik karıştırıcıda 55°Cde karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra, tepsiye dökülüp, tarak yerleştirildikten sonra (içinde kabarcık oluşmamasına dikkat edilmeli) tamamen katılaşıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi. DNA ürünleri, BioLabs'ın Gel Loading Dye, Purple (6x) kullanılarak karıştırıldıktan sonra, tarak çıkartılarak oluşan jel kuyucuklarına her bir örnekten 10 µl alınarak pipet yardımıyla yüklendi.

Kuyucuklardan ilkinde negatif kontrol (DNA yerine dH₂O) konuldu. Ardından sırasıyla 5 türün PZR ürünleri konuldu. DNA örnekleri 100 Volt'ta, 60 dk yürütüldü. DNA'nın yürütülmesi tamamlandığında, jel UV transillüminatör cihazı kullanılarak görüntülendi.

PCR ürünlerinin saflaştırılması ve Sanger dizileme metoduna göre hem ileri hemde geri olmak üzere çift yönlü dizilenmesi için BMLabosis Macrogen Hollanda Labrotuarı'ndan hizmet alındı. Dizileme sonuçları NCBI Blast aracından kontrol edilerek ilgili genlere ve türlere olan yakınlıkları % olarak belirlendi.

2.4. COI Gen Bölgesi Veri Analizleri

Her bir örnek için DNA dizi analizinden elde edilen sekanslar Sequencher versiyon 5.2.4. (Genes Codes Corporation) kullanılarak hizalandı ve düzenlendi. PZR'den elde edilen numunelerin hepsinin ham sekansları her baz için tek tek kontrol edildi. Örneklere ait ileri ve geri yöndeki DNA dizi verileri seçilerek 'De Novo Assemble' komutuyla baz dizileri en uygun şekilde alt alta gelecek şekilde düzenlendi. Kullanılmayacak derecede kirliliğe sahip olan sekanslar manuel olarak ayıklandı.

Düzenlenen nükleotid dizileri BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) yöntemiyle, GenBank ve BOLD'da bulunan sekanslarla kontrol edilerek aynı türlere olan yakınlıkları belirlendi. Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi laboratuvarında kültüre alınmış ve Yalova'dan toplanmış 5 türün örneklerinden alınan nükleotid dizileri, BOLD (<http://www.boldsystems.org>) ve NCBI'dan (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) alınan aynı türe ait bireylerin nükleotid dizileri kullanılarak karşılaştırıldı. Her bir örnek için bu işlemler tekrarlandı.

Her bir örneğin ayıklanma ve kontrol edilmesinden sonra MEGA7 (Tamura ve diğ., 2011) programı kullanılarak, elde edilen nükleotid sekansları ilk olarak amino asit sekanslarına çevrilip, kodonlarının ilk ve ikinci bazlarının protein sentezini etkileyip etkilemedikleri kontrol edildi. Dizilerde ortak olmayan bölgeler düzeltilip, geriye sadece ortak dizileri (consensus) bırakılacak şekilde (her örnek 658bç olacak şekilde) düzenlendi ve ardından her bir örnek grubu için 'Multiple Alignment' seçeneklerinden olan 'Align by ClustalW' algoritmasını kullanılarak ayrı ayrı diziler hizalanıp birleştirildi. Birleştirme işleminden sonra manuel olarak kontrol edildi. Aynı uzunluğa (658bç) getirilen diziler diğer programlarla da açılması ve okunabilmesi için FASTA ve NEXUS formatlarında kaydedildi.

2.4.1. Balmumu güveleri ve parazitoidlerinin filogenetik analizi

Filogenetik analizler için öncelikle Kocaeli Üniversitesi Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarından alınan örneklerle, Yalova'dan toplanan örneklerin, GenBank ve BOLD'dan indirilen verileriyle, her bir takson için ayrı ayrı DNA dizi analizi setleri oluşturulmuştur. Oluşturulan her bir takson seti için haplotip sayısını belirlemede DNAsP Beta Version 6.10.04 (Rozas ve diğ., 2017) adlı program kullanıldı.

Veri seti olarak, bu çalışmada tespit edilen haplotipler ve GenBank ve BOLD Taxonomy'den elde edilen bütün Mitokondriyal Sitokrom C Oksidaz I dizileri, her bir takson grubu için ayrı ayrı bir araya getirilerek tüm taksonlar için DNA veri setleri oluşturuldu. Bu çalışmada kullanılan örnekler ve GenBank'sında bulunan Dünyanın değişik coğrafik bölgelerinden alınan örnekler kullanılarak her bir taksonun filogenetik analizinde bu veri setleri kullanıldı.

Elde edilen COI dizi setlerinin filogenetik analizleri, MEGA7 programında Maksimum Parsimoni (MP) ve Uzaklık (Distans) tabanlı yöntemlerden olan Neighbor Joining (Komşu Birleştirme) (NJ) ve Maksimum Likelihood metodu kullanılarak yapıldı. Kullanılan metodlarda evrimsel ağaçların akrabalık derecelerinin hangi oranda desteklendiğini saptamak için her bir metotta 10,000 bootstrap analiz yapıldı.

Tablo 2. 8. Tür düzeyinde filogenetik analizlerde kullanılacak dış gruplar

Tür İsmi	Kullanılacak Dış Grup Tür	BOLD Erişim Numarası	Referans
<i>Galleria mellonella</i>	<i>Achroia grisella</i>	KX044795.1	Mutanen, Marko ve diğ., 2016
<i>Achroia grisella</i>	<i>Galleria mellonella</i>	GU688828.1	Hebert, Paul DN ve diğ., 2013
<i>Pimpla turionella</i>	<i>Pimpla pedalis</i>	KR809366.1	Hebert ve diğ., 2016
<i>Apanteles galleriae</i>	<i>Apanteles sergiocascentei</i>	KF462034.1	HEBERT, Paul DN, ve diğ., 2016
<i>Habrobracon hebetor</i>	<i>Simplibracon sp.</i>	JF963837.1	HEBERT, Paul DN ve diğ., 2016

2.4.2. COI gen bölgesinin genetik çeşitlilik analizleri

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan örneklerden oluşan taksonların elde edilen haplotip veri setleri, DNaSP Beta Version 6.10.04 programı kullanılarak, monomorfik ve polimorfik bölgeler, haplotip çeşitliliği parsimoni olarak bilgi içeren bölgeler ve nükleotid çeşitliliği ayrı ayrı hesaplandı. Haplotiplerin baz kompozisyonlarının (en uzak ve en yakın) hesaplanması için MEGA7'de 'P-distance' analizi yapıldı.

2.4.3. COI gen bölgesi baz değişim modelinin belirlenmesi

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan örneklerin mitokondriyal Sitokrom C Oksidaz I gen bölgesi dizilerinden oluşturulan setlerin Maksimum Likelihood analizi için MEGA7 programında 'Models' seçeneğinden, 'Find best DNA/Protein Models (ML)' kullanılarak belirlendi. Bunun dışında, Neighbor Joining, Minimum Evolution ve Maksimum Parsimoni ağaçlarını oluşturmak için de Kimura-2 Parametre (K2P) modeli kullanıldı.

2.4.4. COI gen bölgesi haplotiplerinin genetik uzaklık analizi

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan örneklerin mitokondriyal COI gen bölgesi haplotiplerinin genetik uzaklık analizi için MEGA7 programında 'Distance' seçeneğini kullanarak 'Compute Pairwise Distance' analizi yapıldı. Burada Kimura-2Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanılarak hesaplanmalar yapıldı.

2.4.5. COI gen bölgesinin neighbor jonining analizi

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan her bir örneğin mitokondriyal COI gen bölgesinin Neighbor Joining analizi için, MEGA7 programında 'phylogeny' seçeneğinden Kimura-2Parametre (K2P) modeli kullanılarak NJ analizi yapılmış ve bu analizde soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini belirtmek için tür ve cins düzeylerinde 10,000 bootstrap ve alt Aile ve alt takım düzeylerinde ise 1,000 bootstrap ile analizleri yapıldı.

2.4.6. COI gen bölgesinin maksimum likelihood analizi

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan örneklerin mitokondriyal COI gen bölgesinin Olasılık (Maksimum Likelihood) analizi, MEGA7 programında daha önceden 'Find Best Models' seçeneğiyle uygun baz modeli belirlendikten sonra, buradan çıkan en uygun modelle 'Phylogeny' seçeneğinden Maksimum Likelihood Ağacı analizi yapıldı. Maksimum Likelihood (ML) ağacında takson setlerinin desteklenme oranını belirlemek için tür ve cins düzeylerinde 10,000 bootstrap ve alt Aile ve alt takım düzeylerinde ise 1,000 bootstrap ile analizleri yapıldı.

2.4.7. COI gen bölgesinin minimum evolution analizi

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan her bir örneğin mitokondriyal COI gen bölgesinin Neighbor Joining analizi için, MEGA7 programında 'Phylogeny' seçeneğinden Minimum Evolution (ME) seçilerek tür ve cins düzeylerinde 10,000 bootstrap ve alt Aile ve alt takım düzeylerinde ise 1,000 bootstrap ile analizleri yapıldı.



3. BULGULAR

3.1. Balmumu Güvesi ve Prazitoidlerinin DNA Dizi Analizleri

KÜHFLab'dan alınan örnekler ve Gen Bankası'ndan alınan örneklerin mitokondrial sitokrom c oksidaz I DNA dizi analizi için gerekli olan mevcut DNA, örneklerin mitekondrice zengin dokularından elde edildi. Mevcut DNAlar kullanılarak hedeflenen mitokondriyal sitokrom c oksidaz I gen bölgeleri PZR ile çoğaltılması yapıldı.

3.1.1. Total mtDNA

Parazitoid ve güve örneklerinin dokularından elde edilen genomik DNA'lar, BMG Labtech Spectrostar Nano Spektrofotometre cihazında, ölçüldü ve DNA miktarlarının saflık ve miktarları belirlendi.

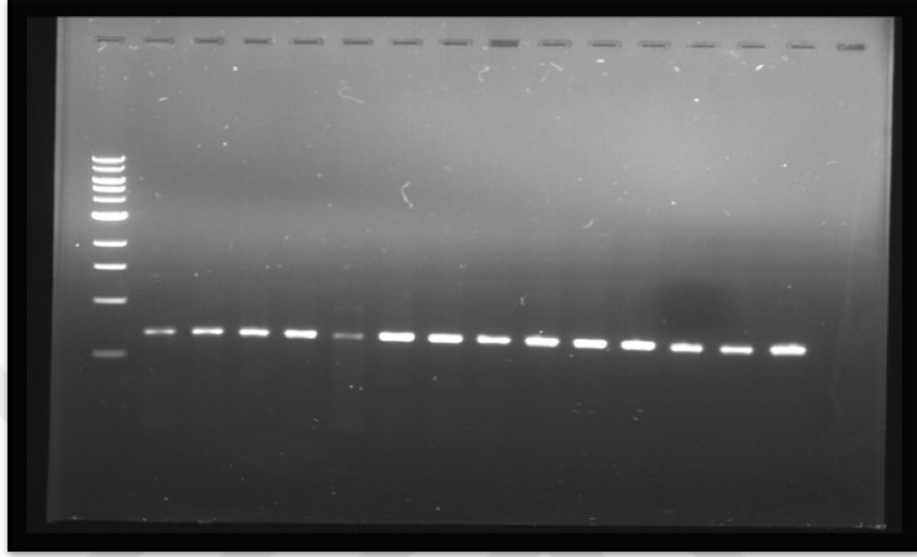
5 örnekten 5er kere 260/230nm, 260/230nm ve dsDNA (ng, µL) ölçüldü. 260/230nm ölçüm değeri 1,86-2 arasında olan ve 260/280nm ölçüm değeri 2-2,2 olan örnekler PZR işlemine tabi tutuldu. B grubu örneklerinden *A. grisella* ve *H. hebetor* uygun bulundu, E grubunda ise sadece *A. galleria* PZR işlemine uygun bulunmadı ve kullanılmadı.

3.1.2. COI Gen Bölgeleri

Mevcut Genomik DNA'lar, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I bölgesinin spesifik primer çiftleri ile çoğaltılması sonucunda elde edilen PZR ürünleri, kalite ve büyüklük kontrolü için %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Mitokondriyal sitokrom c oksidaz I gen bölgesinin tamamı (658bp) evrensel primer çiftleri kullanılarak PZR'de çoğaltıldı (Şekil 3.1). Çoğaltılan gen bölgelerinin beklenen büyüklükte olup olmadığı agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Jelde istenilen bantın olup olmadığı, istenmeyen boyutlarda bant olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. *P. turionella*, *G. mellonella*, *A. grisella*, *A. galleria* ve *H. hebetor* türlerine ait sitokrom c oksidaz I geni için LCO1490 ve HCO2198

evrensel primerleri kullanılarak oluşturulan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (İlk kuyucuk negatif kontrol, ardından sırasıyla *P. turionella*, *A. grisella*, *A. galleria* ve *G. mellonella*'dan 3'er örnek ve son iki kuyucukta *H. hebetor*) (658 baz çifti uzunluğunda) Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3. 1. Jel elektroforezi görüntüsü

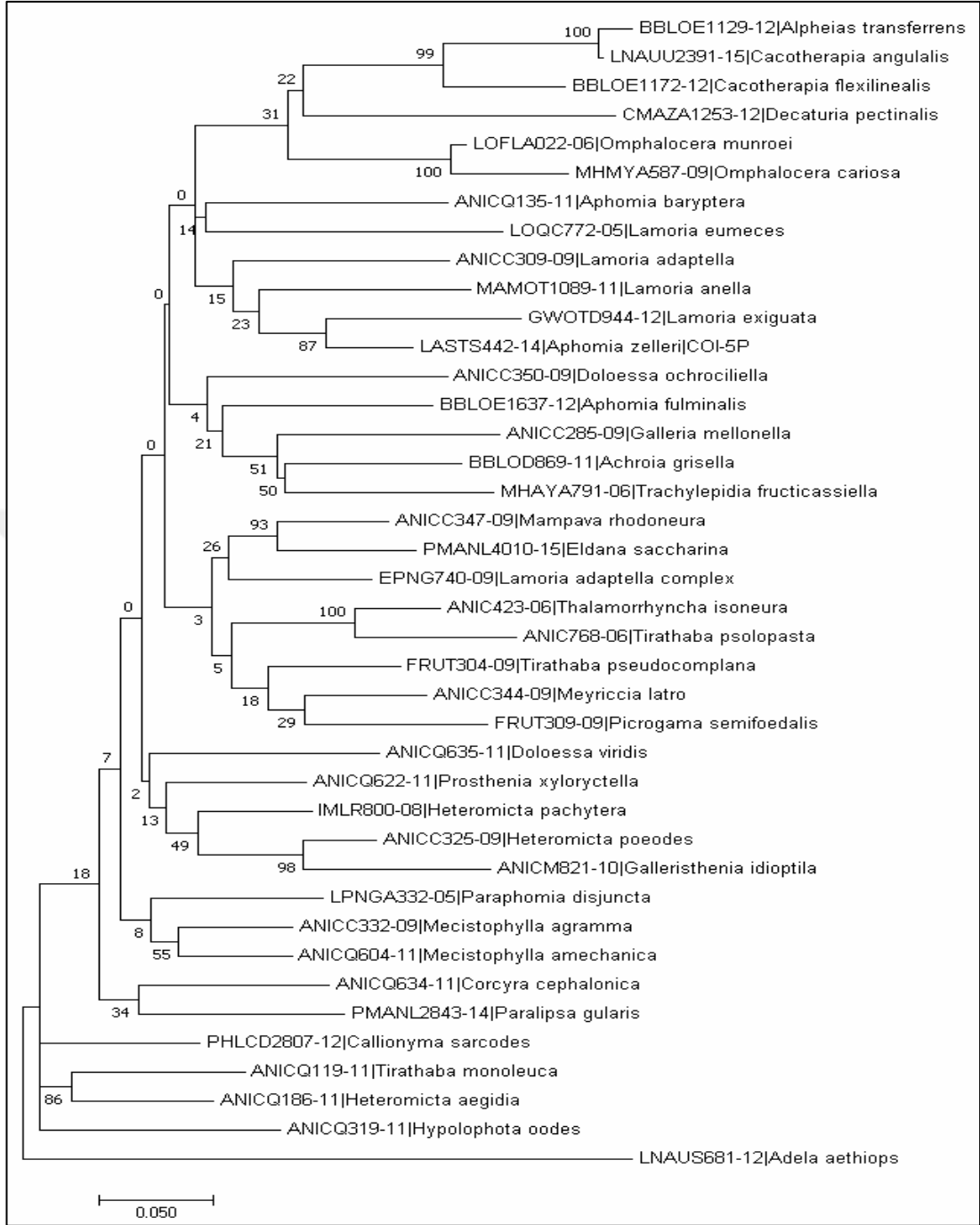
3.2. Balmumu Güvelerinin Genetik Analizi

Bu çalışmada Galleriinae alt ailesine ait KÜHFLab'dan daha önceden kültüre alınmış olan iki türün, BLAST analizi yapıldı ve bu ikisinin Gen Bankası (NCBI) verilerine göre küçük balmumu güvesi olan *A. grisella* ve büyük balmumu güvesi olan *G. mellonella* oldukları tespit edildi (%99.6 oranında). BLAST analizinin ardından ikisine ait örneklerin hepsi tek tek düzenlendi ve hizalandı.

3.2.1. Galleriinae alt ailesinin filogenetik analizi

Galleriinae alt ailesine cinslerin birer türlerinden oluşan veri seti (40 nükleotid dizisi, 658 baz uzunluğunda) Maksimum Likelihood analizi için MEGA7 programında 'Find Best Models' seçeneğiyle, en uygun baz değişim modeli GTR+G+I seçildi ve 1,000 bootstrap değeriyle ML ağaç analizi yapıldı. Maksimum Likelihood analizinde Kesikli Gamma dağılımı 0.3469'dir. Nükleotid frekansları A:

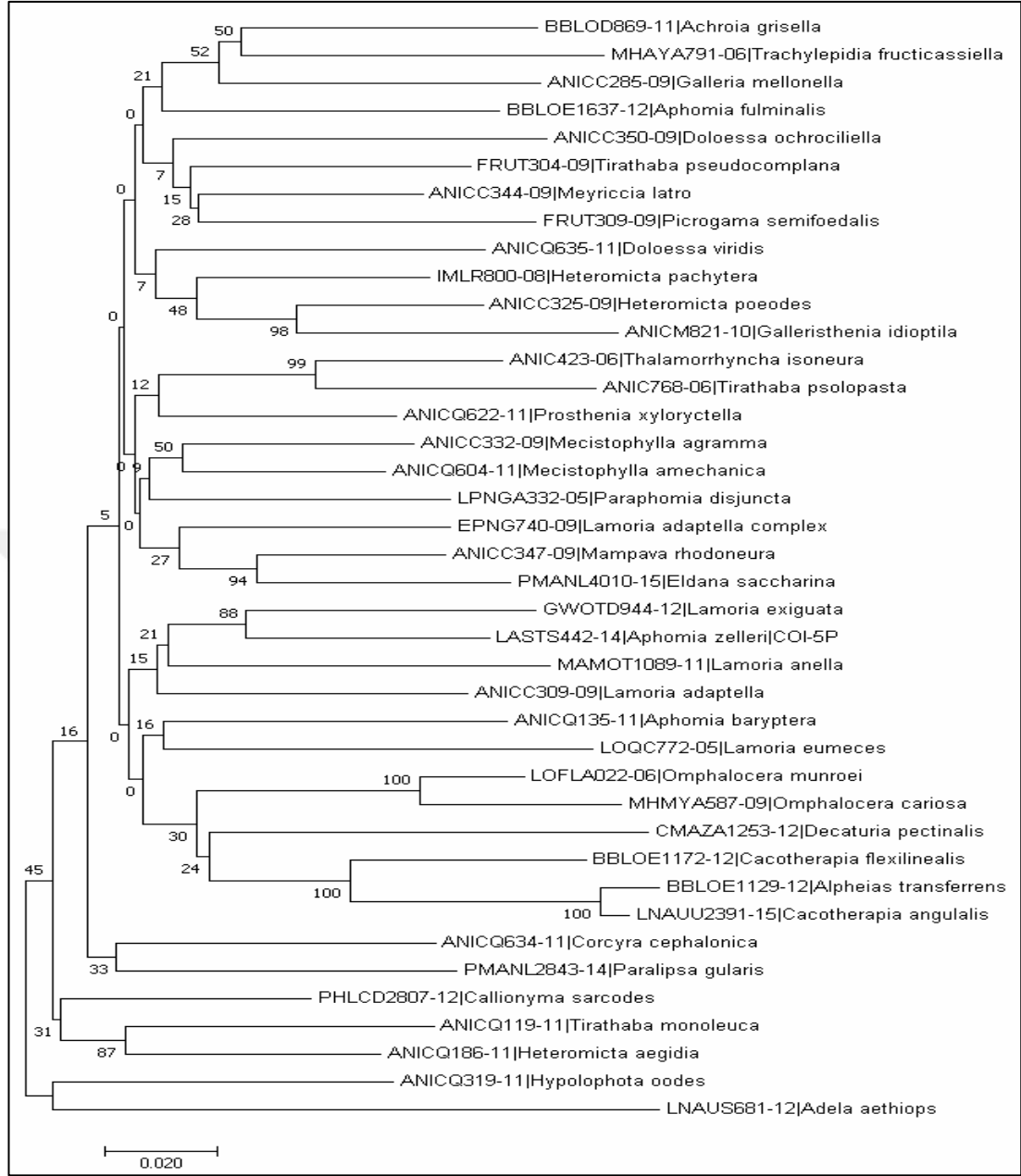
%29.33, T/U: %40.47, C: %15.60 ve G: %14.61'dir. Maksimum Likelihood analizinde en yüksek Log değeri -7484.09'di. Siteler arasındaki farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gamma dağılımı kullanıldı (5 kategori (+G, parametre:0.3710)). Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan pozisyonlar dahil edildi. Boşluk ve eksik veri içerecek tüm pozisyonlar elendi. Maksimum Likelihood analizi sonucunda ağaç üzerinde; %100 bs desteklenmesiyle *Alpheias transferrens* ve *Cacotherapia angulalis*, bunlarla %99 ile *Cacotherapia flexilinealis*, %22 ile *Decaturia pectinalis*; %100 ile *Omphalocera munroei* ve *Omphalocera cariosa*; %14 ile *Aphomia baryptera* ve *Lamoria eumeces*; %87 ile *Aphomia zelleri* ve *Lamoria exiguata*, bunlarla %23 ile *Lamoria anella*, %25 ile *Lamoria anella*; %50 ile *Trachylepidia fructicassiella* ve *Achroia grisella*, bunlarla *Galleria mellonella*, %21 ile *Aphomia fulminalis* ve *Doloessa ochrociliella*; %29 ile *Meyriccia Latro* ve *Picrogama semifoedalis*, bunlarla %18 ile *Tirathaba pseudocomplana*; %100 ile *Tirathaba psolopasta* ve *Thalamorrhyncha isoneura*; %93 ile *Mampava rhodoneura* ve *Eldana saccharina*, bunlarla %26 ile *Lamoria adaptella complex*; %98 ile *Galleristhenia idioptila* ve *Heteromicta poeodes*, bunlarla %49 ile *Heteromicta pachytera*, %13 ile *Prosthenia xyloryctella* ve %2 ile *Doloessa viridis*; %34 ile *Paralipsa gularis* ve *Corcyra cephalonica*; %55 ile *Mecistophylla amechanica* ve *Mecistophylla agramma*, %8 ile *Paraphomia disjuncta*; %86 ile *Hypolophota oodes* ve *Heteromicta aegidia*, bunlarla %86 ile *Tirathaba monoleuca* ve *Callionyma sarcodes* desteklenerek gruplandı (Şekil 3.2'de gösterildi).



Şekil 3. 2. Galleriinae alt ailesine ait örneklerin Maksimum Likelihood ağacı

Galleriinae alt ailesine cinslerin birer türlerinden oluşan veri seti (40 nükleotid dizisi, 658 bç uzunluğunda) MEGA7 prgramına aktatıldı ve baz değişim modeli olarak Kimura-2Parametre'si kullanılarak 1,000 bootstrap desteğiyle Neighbor Joining (NJ) analizi yapıldı. Ön yükleme ağaçlarının ilişkili dallardaki bootstrap destekleri yanlarında yazmaktadır. ME ağacı, 1 arama yüzeyine yakın Çevresel Değişim (CNI) algoritması kullanılarak arandı. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi.

Boşlukları ve eksik verileri içeren tüm pozisyonlar elendi. Dal uzunluğunun toplamı: 2.30471982'dir. Neighbor Joining analizi sonucunda ağaç üzerinde; %50 ile *A. grisella* ve *T. fructicassiella*, bunlarla %52 ile *G. mellonella*, %21 ile *A. fulminalis*; %28 ile *M. Latro* ve *P. semifoedalis*, bunlarla %18 ile *T. pseudocomplana* ve %7 ile *Doloessa ochrociliella*; %98 ile *G. idioptila* ve *H. poeodes*, bunlarla %49 ile *H. pachytera* ve %7 ile *Doloessa viridis*; %99 ile *T. psolopasta* ve *T. isoneura*, bunlarla %12 ile *P. xyloryctella*; %50 ile *M. amechanica* ve *M. agramma*, %9 ile *P. disjuncta*; %94 ile *M. rhodoneura* ve *E. saccharina*, bunlarla %27 ile *L. adaptella complex*; %88 ile *A. zelleri* ve *L. exiguata*, bunlarla %21 ile *L. anella*, %15 ile *L. anella*; %16 ile *A. baryptera* ve *L. eumeces*; %100 ile *O. munroei* ve *O. cariosa*; %24 ile *D. pectinalis* ve *C. flexilinealis*; %100 ile *A. transferrens* ve *C. angulalis*; %33 ile *P. gularis* ve *C. cephalonica*; %87 ile *H. oodes* ve *H. aegidia*, bunlarla %31 ile *T. monoleuca* ve *C. sarcodes* desteklenerek gruplandı. Maksimum Likelihood ve Neighbor Joining analizleri birbiriyle benzerlik gösterdi (Şekil 3.3'de gösterildi).

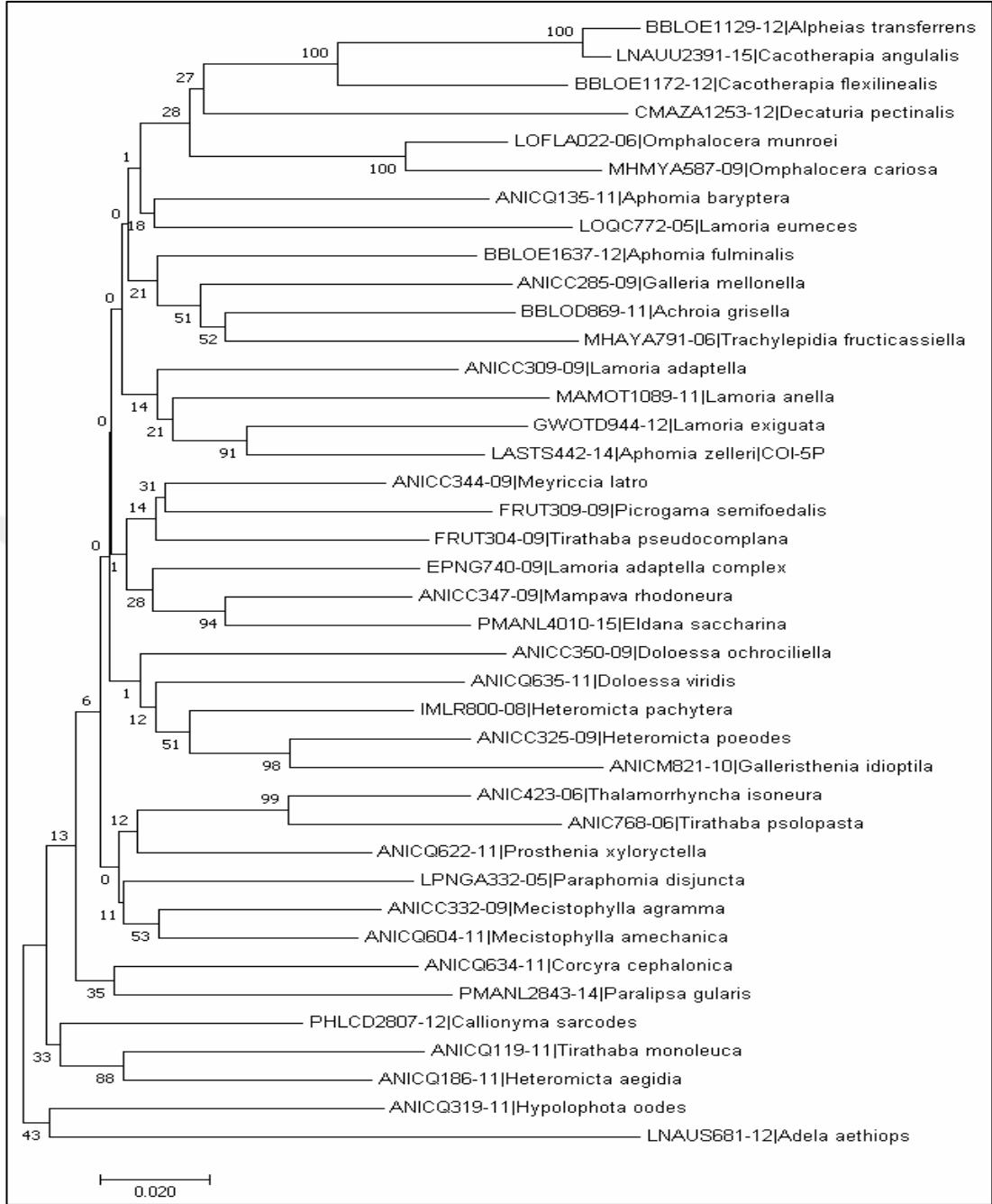


Şekil 3. 3. Galleriinae alt ailesinin türlerine ait Neighbor Joining ağacı

Galleriinae alt ailesine cinslerin birer türlerinden oluşan veri seti (40 nükleotid dizisi, 658bp uzunluğunda) K2P (Kimura-2Parametere) baz değişim modeli ile, MEGA7 programında 1,000 bootstrap desteklenmesiyle Minimum Evolution (ME) analizine tabi tutuldu. Dal uzunluğu: 2.29957387 olarak hesaplandı. ME ağacı Close-Neighbor-Interchange (CNI) algoritması kullanılarak oluşturuldu. Kodon pozisyonları 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeleri içerdi. Minimum Evolution analizi sonucunda ağaç üzerinde; %100 ile *A. transferrens* ve *C. angulalis*, bunlarla %27 ile *D. pectinalis* ve *C. flexilinealis*; %100 ile *O. munroei* ve *O. cariosa*; %18 ile *A.*

baryptera ve *L. eumeces*; %52 ile *A. grisella* ve *T. fructicassiella*, bunlarla %52 ile *G. mellonella*, %21 ile *A. fulminalis*; %91 ile *A. zelleri* ve *L. exiguata*, bunlarla %21 ile *L. anella*, %14 ile *L. anella*; %31 ile *M. Latro* ve *P. semifoedalis*, bunlarla %14 ile *T. pseudocomplana*; %94 ile *M.rhodoneura* ve *E. saccharina*, bunlarla %28 ile *L. adaptella complex*; %98 ile *G.idioptila* ve *H. poeodes*, bunlarla %49 ile *H. pachytera*, %12 ile *D. viridis* ve %1 ile *D. ochrociliella*; %99 ile *T. psolopasta* ve *T. isoneura*, bunlarla %12 ile *P. xyloryctella*; %53 ile *M. amechanica* ve *M. agramma*, %11 ile *P. disjuncta*; %35 ile *P.gularis* ve *C. cephalonica*; %8 ile *H. oodes* ve *H. aegidia*, bunlarla %43 ile *T. monoleuca* ve *C. sarcodes* desteklenerek gruplandı. ME ağacı, ML ve NJ ağaçlarıyla benzerlik gösterdi (Şekil 3.4'te gösterildi).





Şekil 3. 4. Galleriinae alt ailesinin Minimum Evolution (ME) ağacı

3.2.2. Galleriae cinsi ve *G. mellonella* türünün filogenetik analizi

Galleriinae alt ailesine dahil olan *Galleria* cinsinin filogenetik analizleri için KÜHFLab'dan alınan *G. mellonella* türünün dahil olduğu cins basamağı analizleri için, hayvan fizyolojisi laboratuvarından *G. mellonella* türü alındı ve Gen Bankası'ndan aynı cins'e ait farklı türler araştırıldı. Gen Bankası'nda *G. mellonella*

türünden başka *Galleriae* cinsine ait tür bulunmadığı için bu cins basamağının analizleri atlanıldı.

KÜHFL'dan ve Gen Bankasından alınan *G. mellonella* türüne ait örneklerden oluşan 658bç uzunluğa sahip veri seti DnSP6 programı ile açıldı ve 27 örnek için haplotip sayısı 6 olarak tespit edildi. Haplotip çeşitliliği (HD, Haplotip Diversity) 0.7521, Eta (mutasyonların mevcut sayısı) 12, haplotip çeşitliliğinin varyansı (Variance of Haplotype Diversity) 0.00283, standart sapması (Standard Deviation of Haplotip Diversity) 0.053 ve nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity, π , π) 0.00329 olarak hesaplandı. Haplotip çeşitliliği, 1'e ne kadar yakınsa o kadar farklı haplotipe sahip olduğu ve genetik çeşitliliğinin fazla olduğu anlamına gelmektedir. *G. mellonella* türüne ait veri setinin 658bç'lik COI haplotipleri MEGA7 programında Tajima Nötralite Testine (Tajima's Neutrality Test) tabi tutuldu. Tajima testi sonuçları Tablo 3.3'de verildi. Bu analiz 6 haplotipe ait nükleotid sekansı içerdi. Kodon pozisyonları 1.+2.+3.+Kodlanmayan bölgeleri içerdi. Evrimsel analizleri MEGA7'de (Kumar S., 2016; Stecher G. ve Tamura K., 2016) yapıldı.

Tespit edilen *G. mellonella* haplotiplerle oluşturulan 658 bç uzunluğundaki veri setinin analizi sonucunda 646 nükleotid merkezinde benzerlik tespit edilirken (monomorfik bölge) ve 12 nükleotidde varyasyon (polimorfik bölge) tespit edildi. Bu pozisyonlardan 3 nükleotid pozisyonu Singleton değişken bölgeydi (singleton variable sites) (101, 160, 200), 9 tanesi parsimoni bilgilendirici bölgeydi (Bölge pozisyonları: 49, 88, 106, 400,433, 445, 463, 550, 616). *G. mellonella* türüne ait 6 haplotip içeren 658bç'lik veri setinin baz kompozisyonları A: %29,2, T(U): %40,9, G: %14,3 ve C: %15,7 olarak bulundu. Haplotip örneklerinin G-C oranı, T-A oranına göre daha az bulundu ve bu değer düşük olması pseudogenden ziyade mitokondriyal gen içerdiğini desteklemektedir.

Tablo 3. 1. *G. mellonella* için Tajima Nötralite Testinin sonuçları

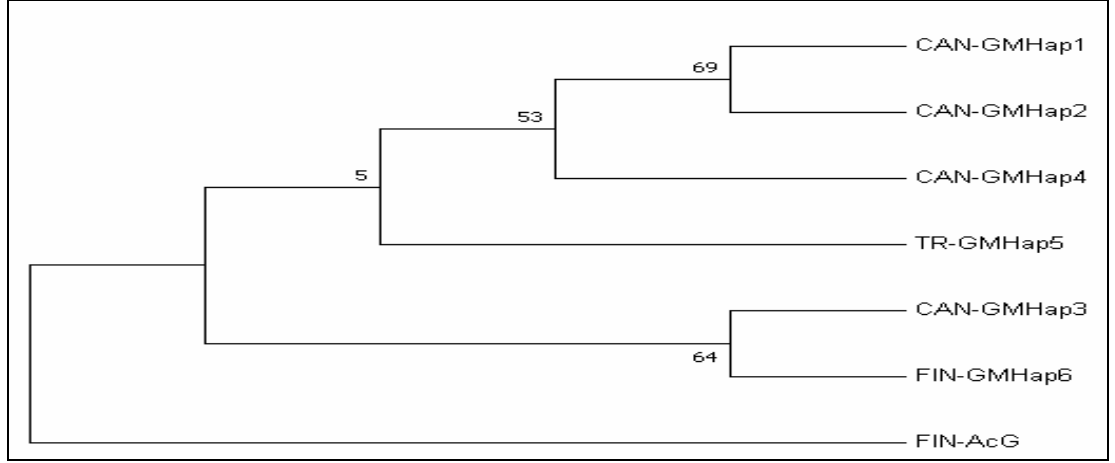
m	S	P_s	θ	π	D
6	12	0,018237	0,007987	0,006788	-0,93072

Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen *G. mellonella* örneklerden oluşan tür setinde her bir mitokondriyal dizi için BLAST analizi yapıldı ve her bir dizinin *G. mellonella* olduğu tespit edildi. Bu veri setlerinin her bir dizisi MEGA7 programında tek tek açıldı ve üst üste çakışan pikler bulunduran örnekler analizden çıkartıldı. *G. mellonella* türüne ait örneklerin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değeri MEGA7 programı ve Kimura2-Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanılarak incelendi. Tablo incelendiğinde, *G. mellonella* haplotiplerinin tür içi en küçük genetik uzaklık değeri %0,2, CAN-GMHap1 ile CAN-GMHap4 ve CAN-GMHap1 ile CAN-GMHap6 arasında olduğu görüldü. En büyük uzaklık değeri %1,7 ile CAN-GMHap1 ile TR-GMHap5 arasında görüldü. Tür içi haplotiplerin arasındaki genetik uzaklık ortalaması d:0,007 (Toplam ortalama mesafe) bulundu.

G. mellonella türüne ait Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen 658 baz çifti uzunluğunda 9 haplotipin MEGA7 programında 'Find best models' seçeneği kullanılarak en uygun Maksimum Likelihood analizi için baz değişim modeli T92+G seçildi ve 10,000 bootstrap ML ağacı çıkartıldı. *G. mellonella* türüne ait örnekleri tek bir grup altında toplandı ve dış grup olarak kullanılan *A. grisella* ayrı olarak gruplandı. Kodon pozisyonları dahil olanlar 1+2+3+kodlanmayan pozisyonlar dahil edildi. Analiz 7 nükleotid sekansı içermekteydi. Analiz 7 nükleotid sekansı içermekteydi ve boşluklar analiz esnasında elendi. Analizde %69 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle CAN-GMHap1 ve CAN-GMHap2, bunlarla %53 ile CAN-GMHap4 ve %5 ile TR-GMHap5; %64 ile CAN-GMHap3 ile FIN-GMHap6 desteklendi.

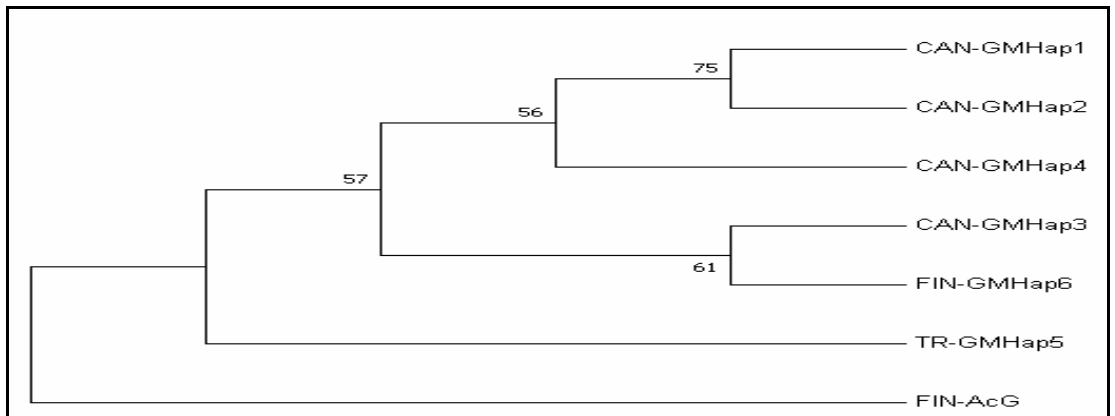
Tablo 3. 2. *G. mellonella* türünün genetik uzaklık değerleri (%lik)

	1	2	3	4	5	6
CAN-GMHap1	*					
CAN-GMHap2	0,3	*				
CAN-GMHap3	0,3	0,6	*			
CAN-GMHap4	0,2	0,5	0,2	*		
TR-GMHap5	2,4	1,7	1,1	1,2	*	
CAN-GMHap6	0,5	0,8	0,2	0,3	1,2	*



Şekil 3. 5. *G. mellonella* türüne ait haplotiplerin Maksimum Likelihood analizi ağacı

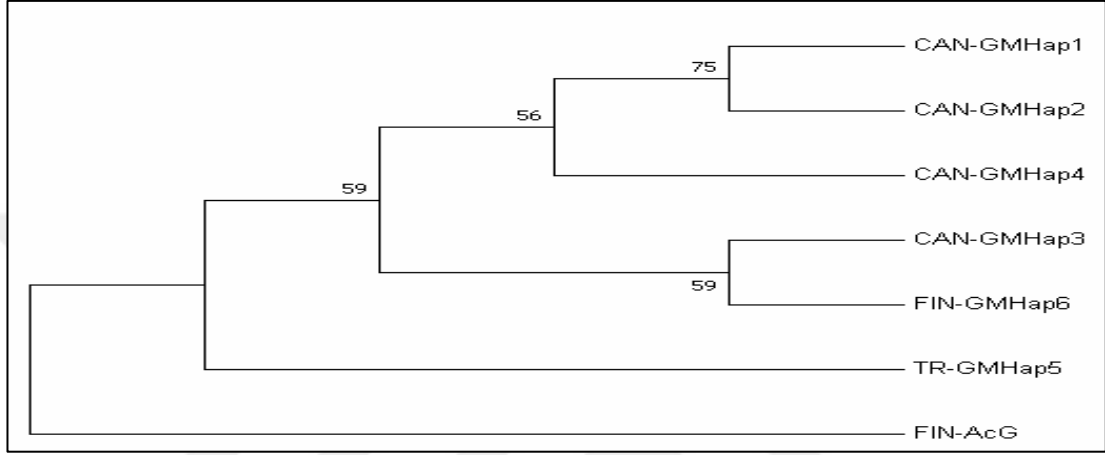
G. mellonella türüne ait haplotipler MEGA7 programına aktarıldı ve tespit edilen 658 bazlık 9 haplotip, dış grup olarak *A. grisella* türü kullanılarak, Neighbor Joining (NJ) analizine tabi tutuldu. *A. Grisella* haplotiplerinin NJ analizlerinde Kimura 2-Parametre (K2P) baz değişim modeli 10,000 bootstrap baz alınarak kullanıldı. Gamma yayılımı logaritması kullanıldı. Analiz 7 nükleotid sekansı içerdi. Dal uzunluğu 0.13631549'dir. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Tür içi haplotipler %61 bootstrap oranıyla Maksimum Likelihood ve Neighbor Joining ağaçları karşılaştırıldıklarında birbirlerine benzedikleri görüldü. Analizde %75 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle CAN-GMHap1 ve CAN-GMHap2, bunlarla %56 ile CAN-GMHap4; %61 ile CAN-GMHap3 ile FIN-GMHap6, bunlarla %57 ile TR-GMHap5 desteklendi.



Şekil 3. 6. *G. mellonella* türüne ait Neighbor Joining (NJ) ağacı

G. mellonella türlerinin haplotipleri, dış grup *A. grisella* kullanılarak, nihai veri setinde 658 baz pozisyonu olup, 10,000 bootstrap desteklenmesiyle MEGA7

programında Evrimsel Tarih (Minimum Evolution) (ME) analizi yapıldı. Evrimsel uzaklıklar Kimura-2Parametre'siyle hesaplandı Şekildeki ağaçta gösterildi. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. ME ağacı, ML ve NJ ağacı benzerlik gösterdi. Analizde %75 bootstrap desteklenmesiyle CAN-GMHap1 ve CAN-GMHap2, bunlarla %56 ile CAN-GMHap4; %59 ile ile CAN-GMHap3 ile FIN-GMHap6, bunlarla %59 ile TR-GMHap5 desteklendi.



Şekil 3. 7. *G. mellonella* türünün Minimum Evrim ağacı

3.2.3. *Achroia* cinsi ve *A. grisella* türünün filogenetik analizi

Galleriinae alt ailesine dahil olan *Achroia* cinsinin filogenetik analizleri için KÜHFL'dan alınan *A. grisella* türünün dahil olduğu analizler için, *Achroia* cinsine ait *A. grisella* türü dışındaki türler Gen Bankası'nda araştırıldı. Ancak Gen Bankası'nda *A. grisella* türünden başka *Achroia* cinsine ait tür bulunmadığı için bu cins basamağının analizleri atlanıldı.

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *A. grisella* örneklerden oluşan tür setinde her bir mitokondriyal dizi için BLAST analizi yapıldı ve her bir dizinin *A. Grisella* olduğu tespit edildi. Bu veri setlerinin her bir dizisi MEGA7 programında tek tek açıldı ve üst üste çakışan pikler bulduran örnekler analizden çıkartıldı (TR örneklerinden LCO1490_F10 analizden çıkartıldı). Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen *A. grisella* örneklerden oluşan tür seti DnSP6 programı ile açıldı ve 658bp uzunluğa sahip 20 örnek için haplotip sayısı 9 tespit edildi, Haplotip çeşitliliği (HD, Haplotip Diversity) 0,8842, haplotip çeşitliliğinin varyansı (Variance of Haplotype Diversity) 0,00244, standart sapması (Standard Deviation of Haplotype Diversity)

0,049 ve nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity, P_i , π) 0.00931 olarak hesaplandı. Bütün *A. grisella* örneklerinin 658 baz çifti uzunluğundaki sitokrom c oksidaz alt birim I'in veri setleri MEGA7 programı ile Tajima Nötralite Testine (Tajima's Neutrality Test) tabi tutuldu. Tajima Testi Sonuçları Tablo 3.5'te verilmiştir. Bu analizde 9 haplotipe ait nükleotid sekansı kullanıldı. Kodon pozisyonları 1.+2.+3.+Kodlanmayan bölgeleri içermektedir. Evrimsel analizleri MEGA7'de (Kumar S., Stecher G. ve Tamura K., 2016) yapıldı.

Tablo 3. 3. *A. grisella* türü için Tajima Nötralite Testinin sonuçları

m	S	P_s	θ	π	D
9	27	0,041033	0,01598	0,013931	-0,385836

Tespit edilen haplotiplerle oluşturulan 658 bç uzunluğundaki veri setinin analizi sonucunda 631 nükleotid merkezinde benzerlik tespit edilirken (monomorfik bölge) ve 27 nükleotid pozisyonunda varyasyon (polimorfik bölge) tespit edilmiştir. Bu pozisyonlardan 2 tanesi Singleton değişken bölge (singleton variable sites) (Bölge pozisyonları: 217, 550), 24 tanesi parsimoni bilgilendirici bölgeydi (Bölge pozisyonları: 106, 115, 235, 247, 271, 287, 325, 343, 364, 400, 415, 500, 547, 574, 581, 595, 604, 616, 619, 625, 634, 646, 652, 653). Bu veri setinin Gamma yayılımı 0,05000, Log Likelihood algoritması -1013,114 civarında seyretti ve baz kompozisyonu A:%30,65, T/U: %39,89, C:%15,40 ve G:%14,07 şeklinde tespit edildi.

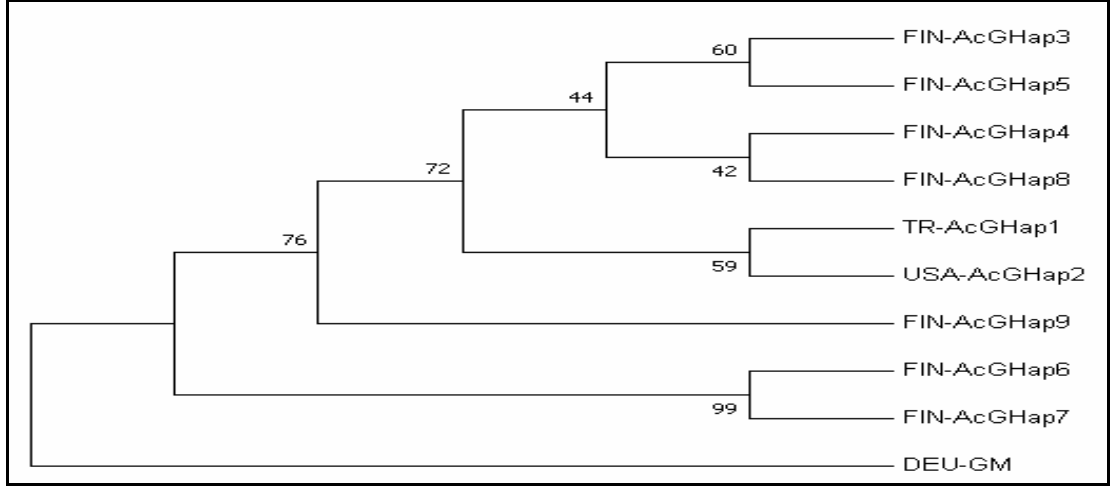
Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen *A. grisella* türüne ait örneklerini içeren örneklerle dış grup (evrimsel olarak en yakın türle birlikte) belirlenerek MEGA7 programına aktarıldı ve Find Best Model (ML) seçeneği kullanılarak BIC (Bayesian Information Criterion) ve AICc (Akaike Information Criterion) kriterlerine göre tespit edildi. Dış grup türü olarak *G. mellonella* kullanıldı. *A. grisella* türüne ait örneklerin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değeri MEGA7 programı ve Kimura2-Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanılarak incelendi. Tablo incelendiğinde, *A. grisella* haplotiplerinin tür içi en küçük genetik uzaklık değeri %0,2, FIN-AcGHap3 ile FIN-AcGHap4 arasında olduğu görüldü. En büyük uzaklık değeri %2,5 ile FIN-AcGHap4 ile FIN-AcGHap7 arasında görüldü. Tür içi

haplotiplerin arasındaki genetik uzaklık ortalaması d: 1.4 (Toplam ortalama mesafe) bulundu.

Tablo 3. 4. *A. grisella* türünün genetik uzaklık değerleri (%lik)

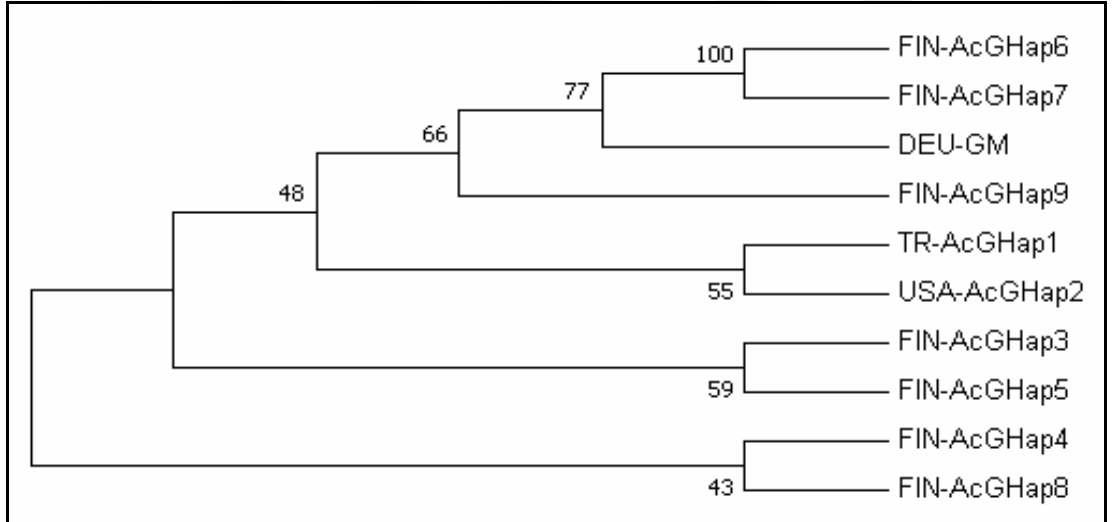
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.FIN-AcGHap3	*								
2.FIN-AcGHap4	0,2	*							
3.FIN-AcGHap5	0,2	0,3	*						
4.FIN-AcGHap6	2,5	2,3	2,3	*					
5.FIN-AcGHap7	2,3	2,2	2,2	0,2	*				
6.FIN-AcGHap8	0,3	0,2	0,5	2,5	2,3	*			
7.FIN-AcGHap9	1,9	1,7	2,0	3,3	3,1	1,9	*		
8.TR-AcGHap1	0,3	0,2	0,5	2,5	2,3	0,3	1,9	*	
9.USA-AcGHap2	0,5	0,3	0,6	2,6	2,5	0,5	2,0	0,2	*

A. grisella türünün haplotiplerinin Maksimum Likelihood (Olasılık, ML) analizi, 10,000 bootstrap kullanılarak, MEGA7'de, dış grup *G. mellonella* türü ile birlikte yapıldı. Maksimum likelihood analizinin ağacı en iyi baz değişim analizi modeli bulundu ve belirlenen T92 baz değişim modeli ile en yüksek bootstrap değerli ağaç elde edildi. Analiz sonucu elde edilen ağaç Şekil 3.10'da gösterildi. Bu veri setinin baz kompozisyonu A: %30,61, T/U: %39,98, C: %15,32 ve G: %14,09 şeklinde tespit edildi. Maksimum Log Likelihood değeri-1013.127 değerinde devam etmiştir. Elde edilen G oranının düşük olması, fonksiyonel pseudogenin olmayıp elde edilen genin mitokondriyal gen olduğunun göstergesidir. Kodon pozisyonları dahil olanlar 1+ 2+ 3+ kodlanmayan pozisyonlardı. Analiz 10 nükleotid sekansı içermektedir. Boşluk ve eksik veri içerek tüm pozisyonlar elendi. ML analizinde gamma dağılımı kullanıldı ve G:0,1916'dı. Bu analiz 10 nükleotid sekansı ve 658 baz çifti içerdi. Analiz sonucu çıkan ML ağacı Şekil 3.10'da gösterildi.



Şekil 3. 8. *A. grisella* türüne ait Maksimum Likelihood ağacı

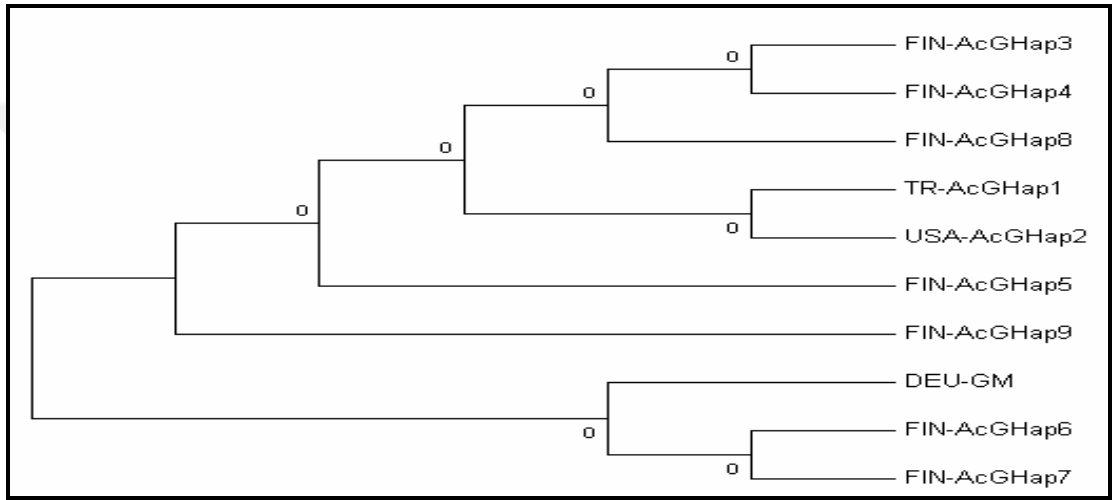
Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen *A. grisella* türüne ait haplotipler MEGA7 programına aktarıldı ve tespit edilen 9 haplotip dış grup olarak *G. mellonella* türü kullanılarak, Neighbor Joining (NJ) analizine tabi tutuldu. *A. grisella* haplotiplerinin NJ analizlerinde Kimura 2-Parametre (K2P) baz değişim modeli 10,000 bootstrap baz alınarak kullanıldı. Analiz 10 nükleotid sekansı içermektedir.



Şekil 3. 9. *A. grisella* türüne ait Neighbor Joining (NJ) ağacı

Gen Bankası ve KÜHFL'dan elde edilen *A. grisella* türlerinin ve dış grup olarak *G. mellonella* kullanılan haplotiplerinin evrimsel yakınlıklarını ölçmek için Minimum Evrim metodu kullanıldı. Dal uzunluğu 0,05359480 toplamı ile en uygun ağaç gösterildi. İlişkilendirilmiş taksonların birlikte bootstrap testinde bir araya getirildiği çoğaltma ağaçlarının yüzdesi dalların yanında gösterildi. Ağaç, filogenetik ağacı

çıkarmak için kullanılan evrimsel uzaklıklarla aynı birimlerdeki dal uzunluklarıyla ölçeklendirilir. Evrimsel uzaklıklar, Maksimum Bileşik Olabilirlik yöntemi kullanılarak hesaplandı ve site başına baz yer değiştirmelerinin birimi cinsindendi. ME ağacı, 1'lik bir arama seviyesinde Yakın Çevresi Değiştirme (CNI) algoritması kullanılarak arandı. Komşu katılım algoritması ilk ağacı oluşturmak için kullanıldı. Analiz 10 nükleotid sekansı içermekteydi. Boşlukları ve eksik verileri içeren tüm pozisyonlar elendi. Nihai veri setinde toplam 658 pozisyon bulunmaktaydı. Evrimsel analizler MEGA7'de gerçekleştirildi.



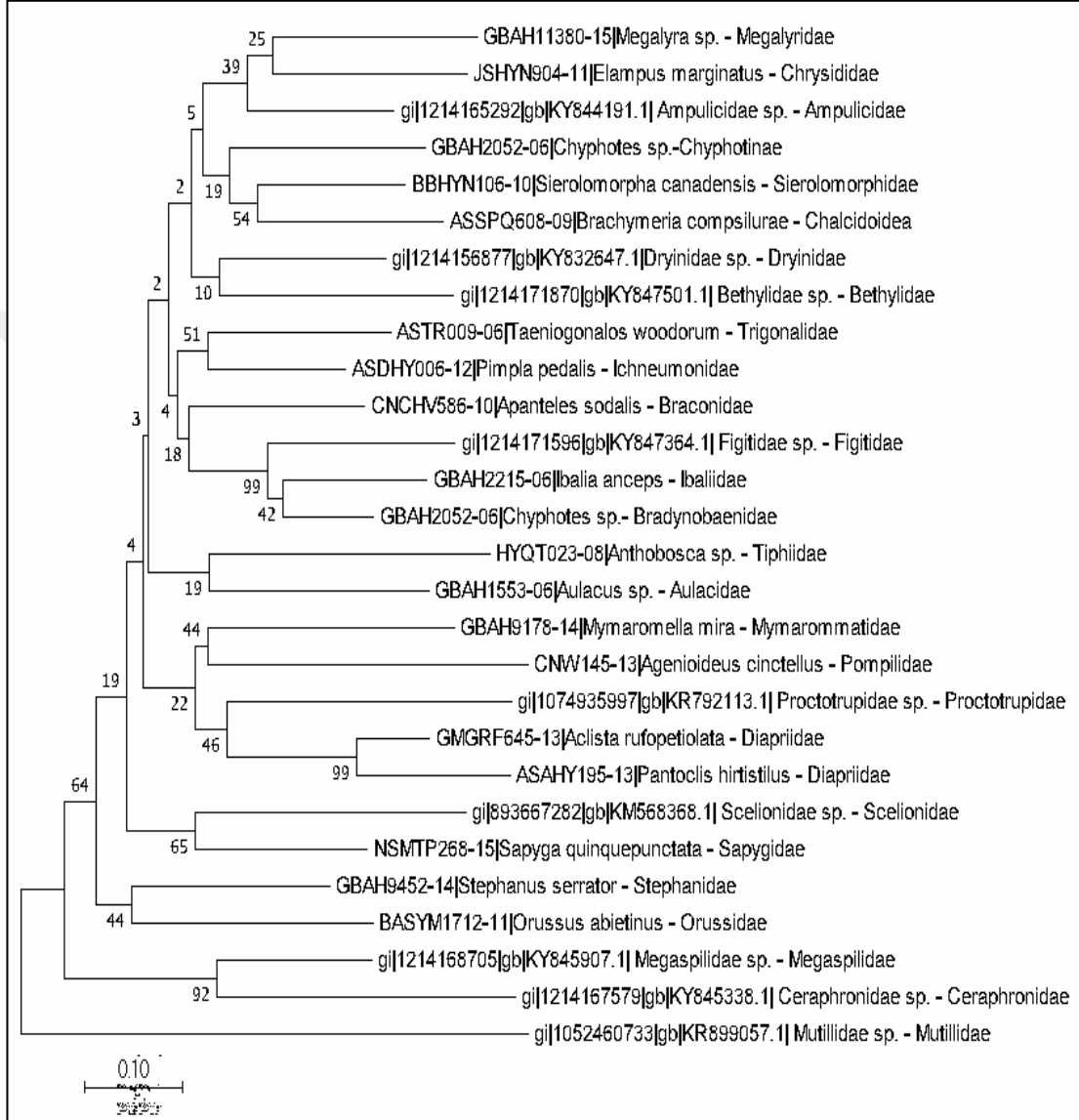
Şekil 3. 10. *A. grisella* türünün Evrim ağacı

3.3. Balmumu Güvelerinin Parazitoidlerinin Genetik Analizi

3.3.1. Apocrita alt takımının filogenetik analizi

Apocrita Alt Takımına ait Gen Bankası'ndan indirilen türlerin mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I gen bölgelerinden oluşan veri seti için en uygun baz modelinin belirlenmesi, MEGA7 programında 'Find Best Models' seçeneğiyle yapıldı. Yapılan analizin sonucunda en uygun baz modeli GTR+G+I olarak belirlendi ve 1,000 bootstrap değerinde yapıldı. 28 Ailedan birer örnekle gösterilen ML ağacı Şekil 3.14'de gösterildi. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Analizin sonucunda sırasıyla bootstrap destekleri: %25 ile Megalyridae ve Chrysididae, bunlarla %39 ile Ampulicidae; %54 ile Sierolomorphidae ve Chalcidoidea, bunlarla %19 ile Chyphotinae; %10 ile Drynidae ve Bethylidae; %51 ile Ichneumonidae ve Braconidae; %42 ile Iballidae ve Bradymobaenidae, bunlarla %99 ile Figitidae; %19 ile Tiphiiidae ve Aucidae; %44 ile Myrnaronmatidae ve

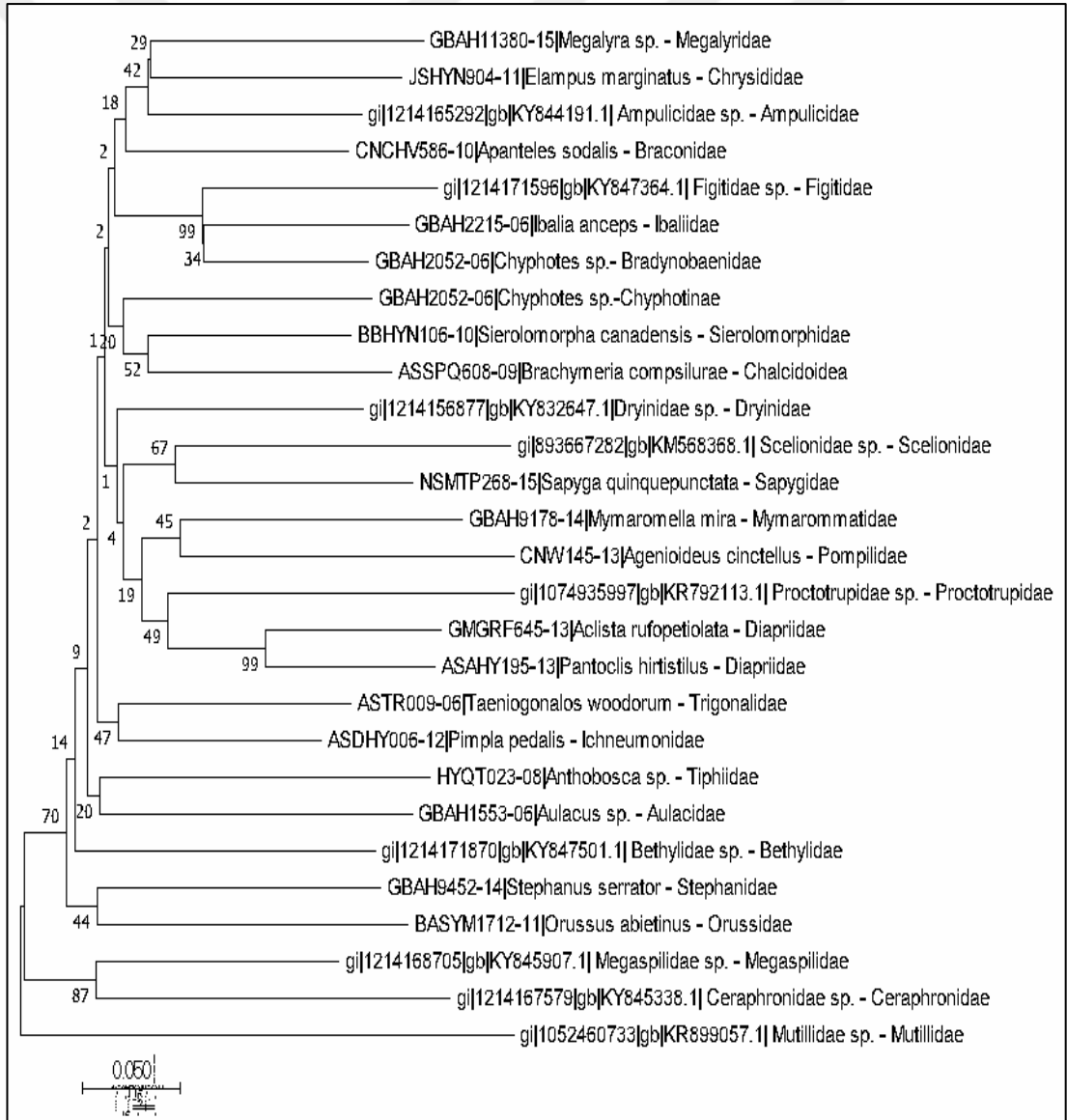
Pompiliidae; %46 ile Diapriidae (aynı türden iki örnek analizinin sonucunu desteklemek için kullanıldı ve bu iki örnek %99 oranında birleşti) ve Proctotrupidae; %65 ile Sapygidae ve Scelionidae; %44 ile Stephanidae ve Orussidae; %92 ile Megaspilidae ve Ceraphronidae desteklendi (Şekil 3.14'te gösterildi).



Şekil 3. 11. Apocrita Alt Takımına ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı

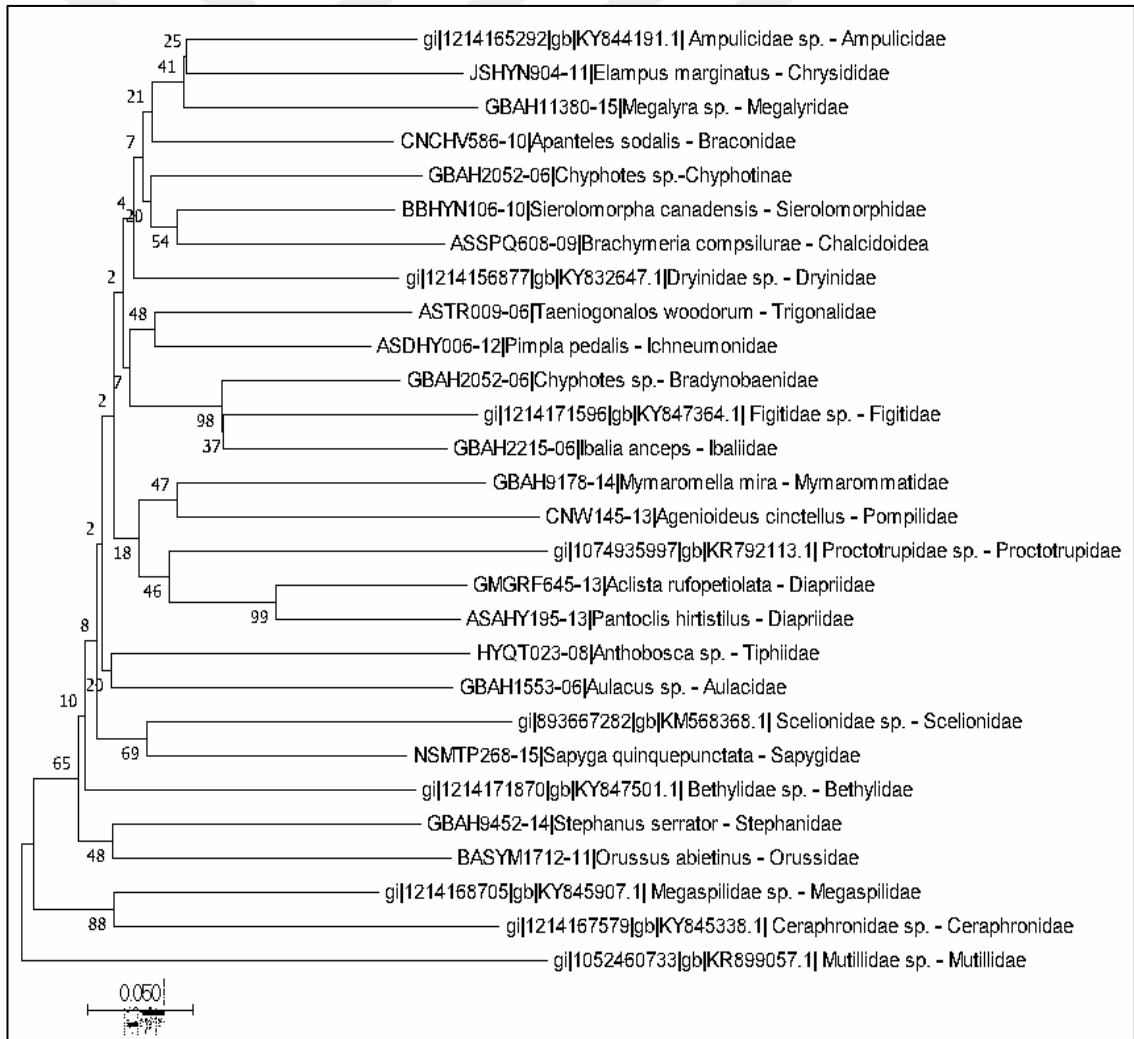
Apocrita alt takımının Gen Bankası'ndan elde edilen 28 Ailesi, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I gen bölgeleri analize dahil edildi ve analizler MEGA7 programında yapıldı. Neighbor Joining ağacının çıkartılması için, Kimura-2Parametre (K2P) baz değişim modeli ve 1,000 bootstrap kullanıldı. 28 Ailenin örnekleri Şekil 3.15'de gösterildi. Dal uzunluğu 4,18105601'dir. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Analizin sonucunda sırasıyla bootstrap

destekleri: %29 ile Megalyridae ve Chrysididae, bunlarla %42 ile Ampulicidae ve bunlarla %18 ile Braconidae; %34 ile Ibalidae ve Bradynobaenidae, bunlarla %99 oranında Figitidae; %52 ile Chalcidoidea ve Sierolomorphidae, bunlarla %20 ile Chyphinae; %46 ile Diapriidae (aynı türden iki örnek analizin sonucunu desteklemek için kullanıldı ve bu iki örnek %99 oranında birleşti) ve Proctotrupidae; %45 ile Pompilidae ve ile Myrmaronmatidae; %67 ile Sapygidae ve Scelionidae, bunlarla %4 ile Drynidae; %47 ile Ichneumonidae ve Trigonalidae; %20 ile Tiphidae ve Aulacidae; %44 ile Stephanidae ve Orussidae; %87 ile Megaspiliidae ve Ceraphronidae desteklendi. Apocrita örneklerinin NJ ağacı ML ağacıyla benzerlik gösterdi (Şekil 3.15'te gösterildi).



Şekil 3. 12. Apocrita alt takımının Neighbor joining (NJ) ağacı

Apocrita alt türüne ait Ailelerin örneklerinden oluşturulan mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I'in veri seti, MEGA7 programında ve 1,000 bootstrap değerinde yapıldı. ME ağacı için Kimura-2Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanıldı. Delesyon ve elesyonlar elendi ve analize dahil edilmedi. Neighbor-Joining algoritması kullanılarak oluşturuldu. Analize 1.+2.+3.+ kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Analizin sonucunda sırasıyla bootstrap destekleri: %25 ile Ampulicidae ve Chrysididae, bunlarla %41 ile Megalyridae ve bunlarla %21 ile Braconidae; %54 ile Chalcidoidea ve Sierolomorphidae, bunlarla %20 ile Chyphonidae ve bu dalla %14 ile Dryinidae; %48 ile Trygonidae ve Ichneumonidae; %37 ile Figitidae ve Ibalidae, bunlarla %98 ile Bradynobaenidae; %47 ile Myrmaromatidae ve Pompilidae; %46 ile Proctotrupidae ve Diapriidae (aynı türden iki örnek analizin sonucunu desteklemek için kullanıldı ve bu iki örnek %99 oranında birleşti); %20 ile Tiphidae ve Aulacidae; %69 ile Scelionidae ve Sapygidae ve bu dalla Bethylidae; %48 ile Stephanidae ve Orussidae; %88 ile Megaspilidae ve Ceraphronidae desteklendi. ME ağacı, ML ve NJ ağacıyla benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.16'te gösterildi).

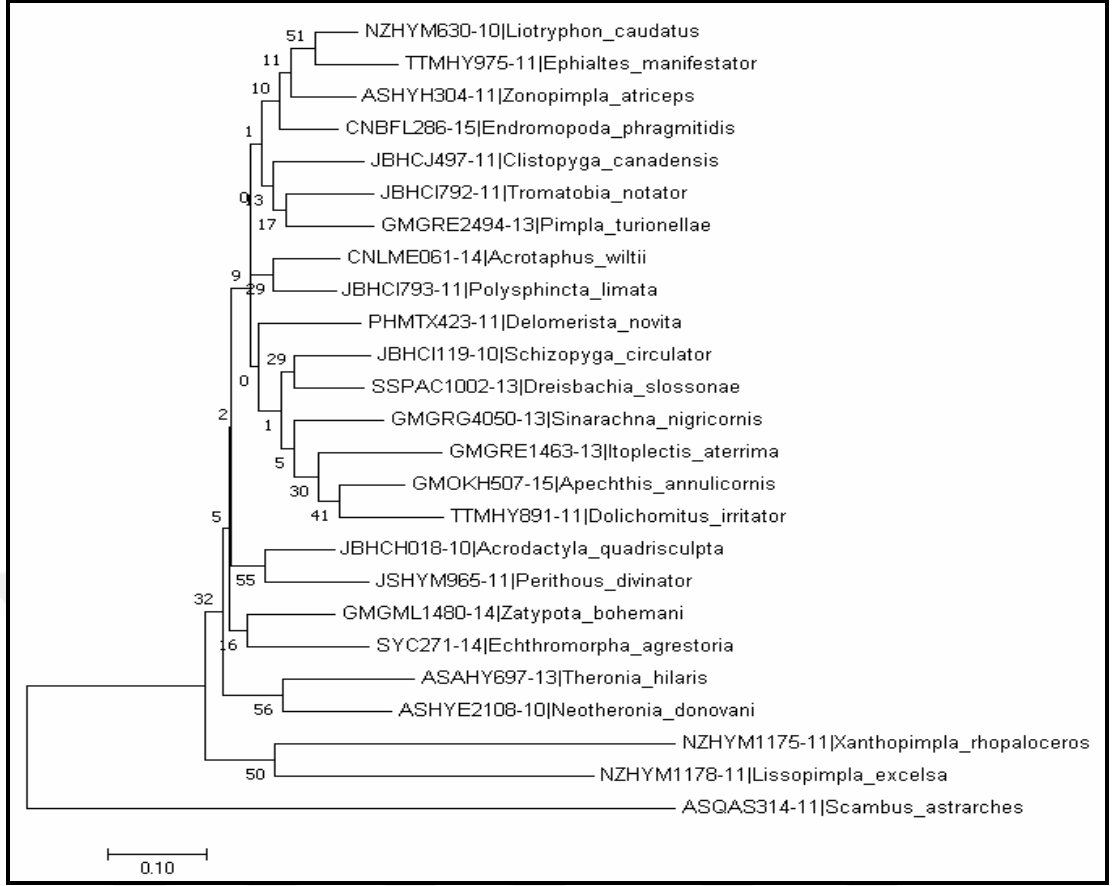


Şekil 3. 13. Apocrita alt takımının Minimum Evolution (ME) ağacı

3.3.2. Pimplinae alt ailesinin filogenetik analizi

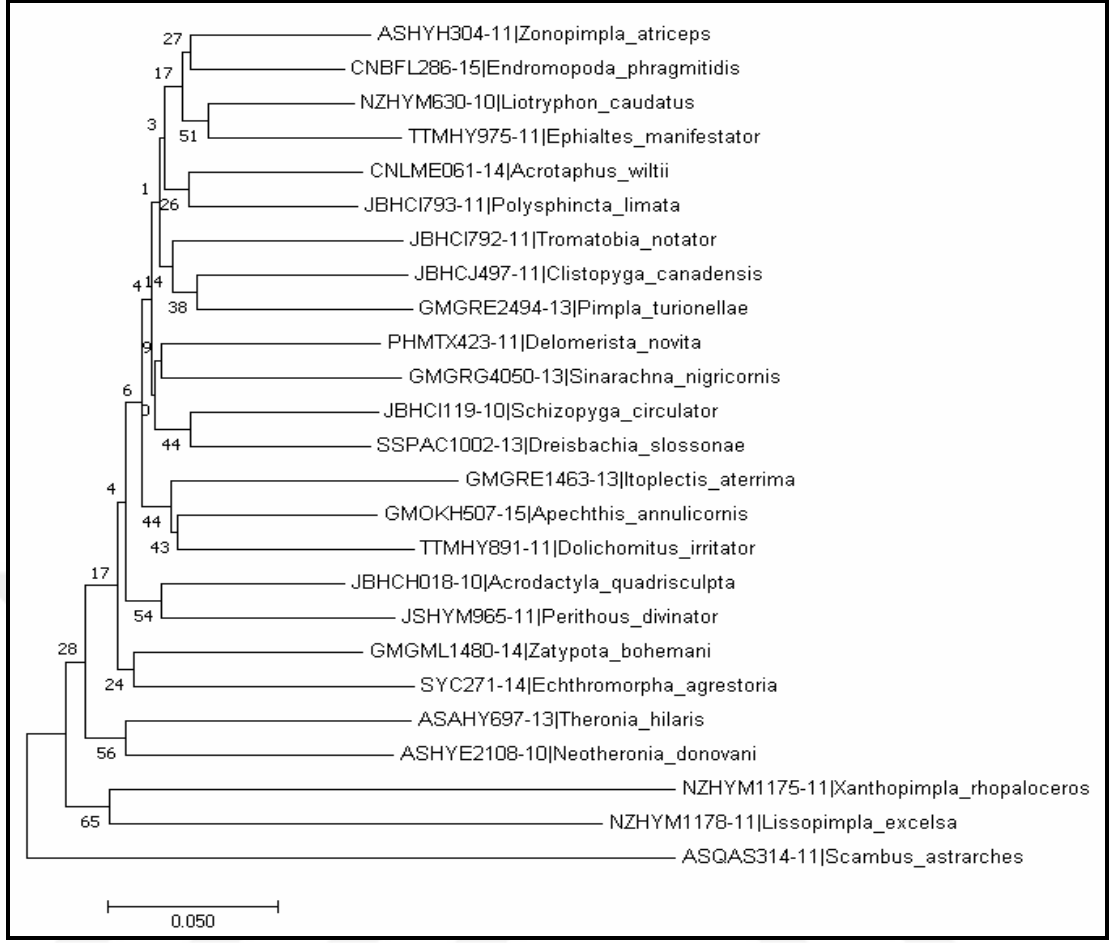
P. turionellae türünün dahil olduğu, Pimplinae alt ailesine ait her bir cinsten (tür örneği seçilerek) Gen Bankası'ndan eksik veri ya da pseudogen içerme riski olmayan örnekler tek tek alındı. Elde edilen bu türler MEGA7 programına aktarıldı ve 'Find best models' seçeneği seçilerek, Maksimum Likelihood analizi için en uygun baz modeli GTR+G+I seçildi ve 1,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. Maksimum Parsimoni, Neighbor Joining ve Minimum Evolution analizleri Kimura-2Parametre'si kullanılarak yapıldı. Eksik veri ya da hatalı veri içeren cinslere ait türler analize dahil edilmedi. Analizde dış grup olarak *Scambus* cinsinin *S. astrarches* türü kullanıldı.

Gen Bankası'ndan elde edilen örneklerin Maksimum Likelihood (ML) analizi için GTR+G seçildi ve 1,000 bootstrap kullanıldı. Analizler MEGA7 programı kullanılarak yapıldı. En yüksek log olasılığı olan ağaç (-6337,62) gösterildi. Maksimum Bileşik Olabilirlik (MLC) yaklaşımı kullanılarak Komşu-katılma ve BioNJ algoritmaları kullanılarak üstün log olasılık değeri belirlendi. Gamma dağılımı kullanıldı (5 kategori (+ G, parametre=0.2694)). Ağaç, alan başına ikame sayısı ile ölçülen dal uzunluklarına göre ölçeklendirilir. Analiz 25 nükleotid sekansı içermekteydi. Boşluklar ve eksik veriler analize dahil edilmedi. Analizde 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeleri dahil edildi. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %51 ile *Liotryphon caudatus* ve *Ephialtes manifestator*, bunlarla %11 ile *Zonopimpla atriceps* ve %10 ile *Endromopoda phragmitidis*; %17 ile *Tromatobia notator* ve *Pimpla turionellae*, bunlarla %3 ile *Clistopyga canadensis*; %9 ile *Acrotaphus wiltii* ve *Polysphincta limata*; %29 ile *Schizopyga circulator* ve *Dreisbachia slossonae*, bunlarla %29 ile *Delomerista novita*; %41 ile *Apenchithis annulicornis* ve *Dolichomitus irritator*, bunlarla %30 ile *Itoplectis aterrima* ve %5 ile *Sinarachna nigricornis*; %55 ile *Acrodactyla quadrisculpta* ve *Perithous divinator*; %6 ile *Zatypota bohemani* ve *Echtmomorpha agrestoria*; %56 ile *Theronia hilaris* ve *Neotheronia donovani*; %50 ile *Xanthopimpla rhopaloceros* ve *Lissopimpla excelsa* destekledi (Şekil 3.18'te gösterildi).



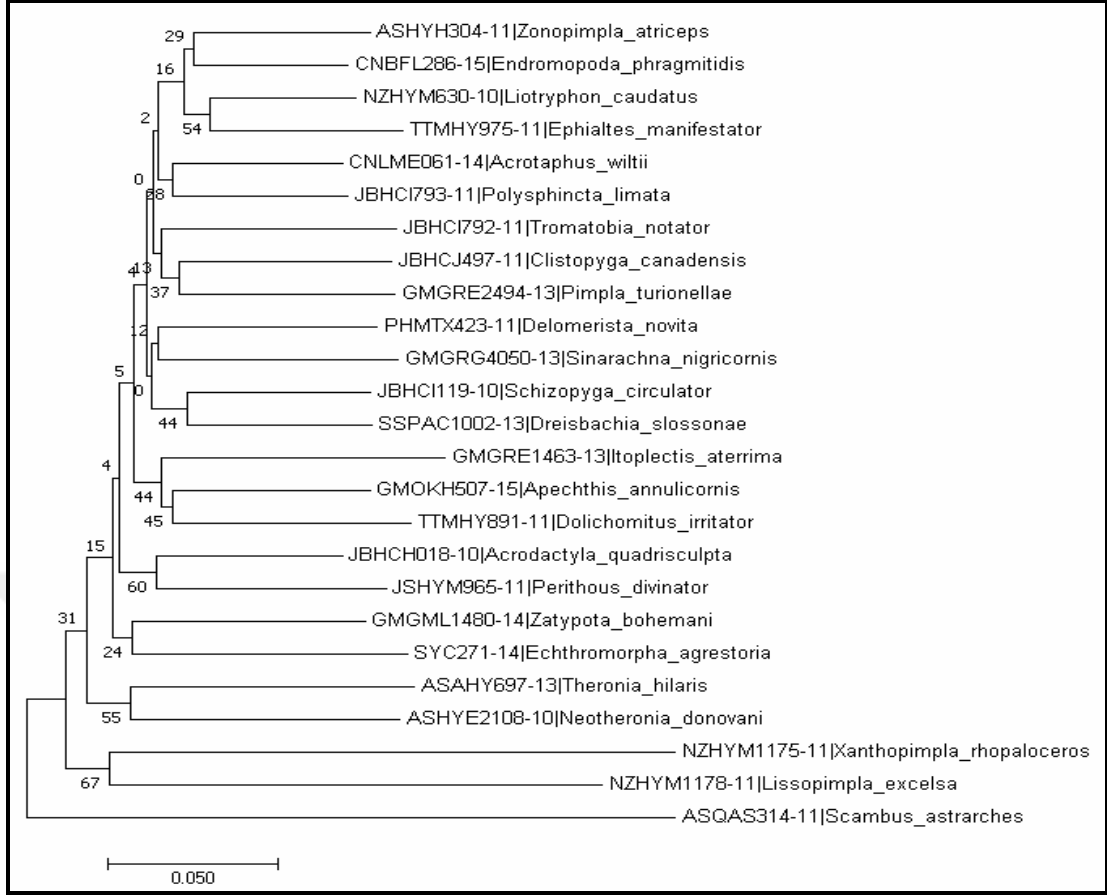
Şekil 3. 14. Pimplinae alt ailesine ait Maksimum Likelihood ağacı

Gen Bankası'ndan elde edilen Pimplinae alt ailesine ait örneklerin MEGA7 programında Neighbor-Joining analizi, baz değişim modeli Kimura-2Parametre (1,000 bootstrap) kullanılarak yapıldı. Analizler MEGA7 programı kullanılarak yapıldı. Oluşturulan ağacın dal uzunluğu 2.01530857'dir. Analize 25 nükleotid (658bç) sekansı dahil edildi. Analizde 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %27 ile *Z. atriceps* ve *E. phragmitidis*; %51 ile *L. caudatus* ve *E. manifestator*; %26 ile *A. wiltii* ile *P. limata*; %38 ile *P. turionellae* ve *C. canadensis*, bunlarla %14 ile *T. notator*; %44 ile *D. novita* ve *S. nigricornis*; %43 ile *A. annulicornis* ve *D. irritator*, bunlarla %44 ile *I. aterrima*; *A. quadrisculpta* ve *P. divinator*; %24 ile *Z. bohemani* ve *Echthromorpha agrestoria*; %54 ile *S. circulator* ve *D. slossonae*, %65 ile *T. hilaris* ve *N. donovani*; %50 ile *X. rhopaloceros* ve *L. excelsa* destekledi. NJ ve ML ağaçları birbirleriyle benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.19).



Şekil 3. 15. Pimplinae alt ailesine ait Neighbor Joining ağacı

Gen Bankası'ndan elde edilen Pimplinae alt ailesine ait örneklerin MEGA7 programında Minimum Evolution analizi, baz değişim modeli Kimura-2Parametre (1,000 bootstrap) kullanılarak yapıldı. Analizler MEGA7 programı kullanılarak yapıldı. Dal uzunluğunun toplamı 2,01488908'dır. ME ağacının oluşturulmasında Yakın Çevre Değişim (CNI) algoritması kullanıldı ve analize 25 nükleotid (658bç) sekansı dahil edildi. Analize 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %29 ile *Z. atriceps* ve *E. phragmitidis*; %54 ile *L. caudatus* ve *E. manifestator*; %68 ile *A. wiltii* ile *P. limata*; %37 ile *P. turionellae* ve *C. canadensis*, bunlarla %14 ile *T. notator*; %44 ile *D. novita* ve *S. nigricornis*; %44 ile *S. circulator* ve *D. slossonae*; %45 ile *A. annulicornis* ve *D. irritator*, bunlarla %44 ile *I. aterrima*; %60 ile *A. quadrisculpta* ve *P. divinator*; %24 ile *Z. bohemani* ve *E. agrestoria*; %55 ile *T. hilaris* ve *N. donovani*; %67 ile *X. rhopaloceros* ve *L. excelsa* destekledi. ME ağacı, ML ve NJ ağaçlarıyla benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.20)



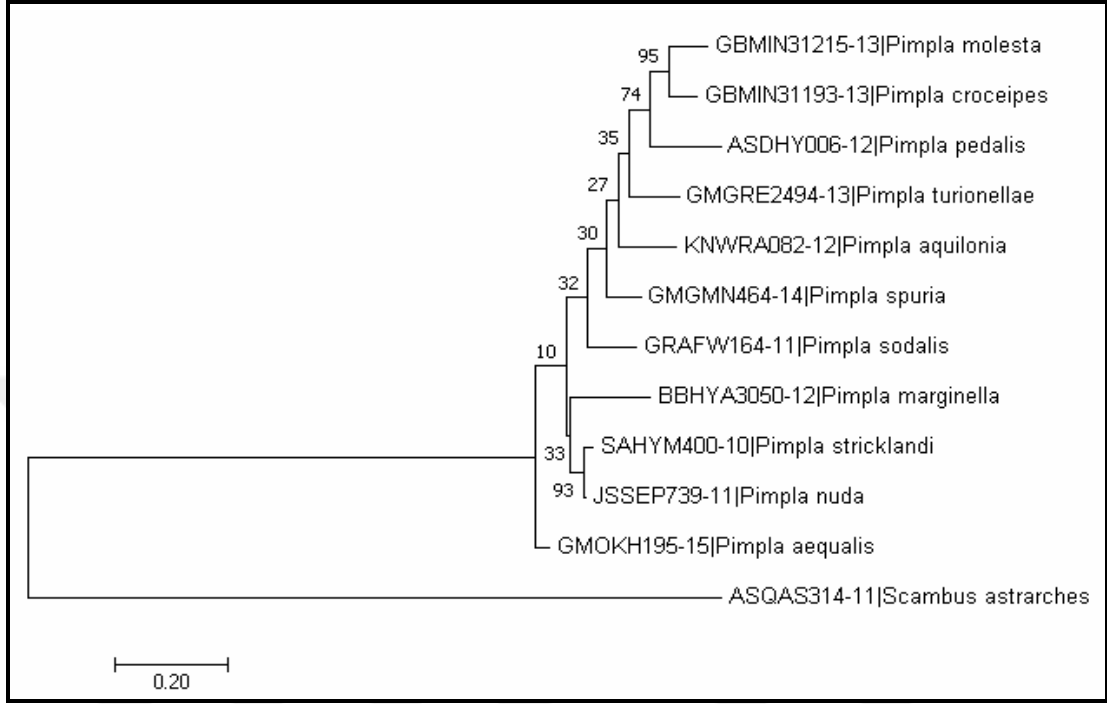
Şekil 3. 16. Pimplinae alt ailesine ait Minimum Evolution ağacı

3.3.3. *Pimpla* cinsinin filogenetik analizi

Bu çalışmada kullanılan *P. turionella*'nın *Pimpla* cinsi düzeyinde Maksimum Likelihood, Minimum Evolution ve Neighbor Joining ağaçlarının çıkartılması ile cins düzeyinde en yakın ve en uzak türleri belirlendi ve *P. turionella*'nın tür analizlerinde kullanılacak dış grup olarak *P. pedalis* seçildi.

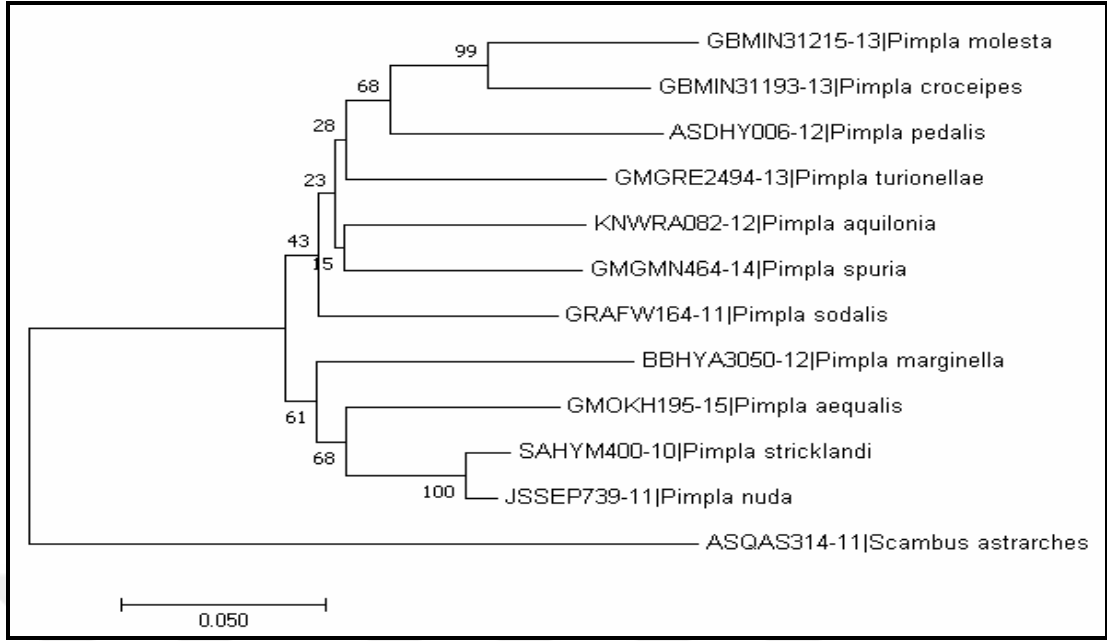
Pimpla cinsine ait türler BLAST analizinin ardından, MEGA7 programında 'Find Best Models' seçeneğiyle en uygun baz değişim modeli GTR+G olarak seçildi ve Maksimum Likelihood analizi 10,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. Önyükleme testinde ilişkili taksonların birlikte kümelendiği dalların %'likleri üstlerinde gösterildi. Maksimum Bileşik Olabilirlik (MVL) yaklaşımı kullanıldı. Komşu-Katılma ve BioNJ algoritmalarını uygulanarak log olasılık değeri otomatik olarak elde edildi (-3167,58 kütle olasılığı). Mevcut veri kümesinde 658 baz çifti uzunluğunda 12 nükleotid dizisi kullanıldı. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %95 ile *Pimpla molesta* ve *Pimpla croceps*, bunlarla sırasıyla %74 ile *Pimpla pedalis*, %35

ile *Pimpla turionellae*, %27 ile *Pimpla aquilonia*, %30 ile *Pimpla spuria*, %32 ile *Pimpla sodalis* ve bu dalla %93 ile *Pimpla stricklandi* ve *Pimpla nuda*, bunlarla %33 ile *Pimpla marginella* ve %10 ile *Pimpla aequalis* desteklendi (Şekil 3.22).



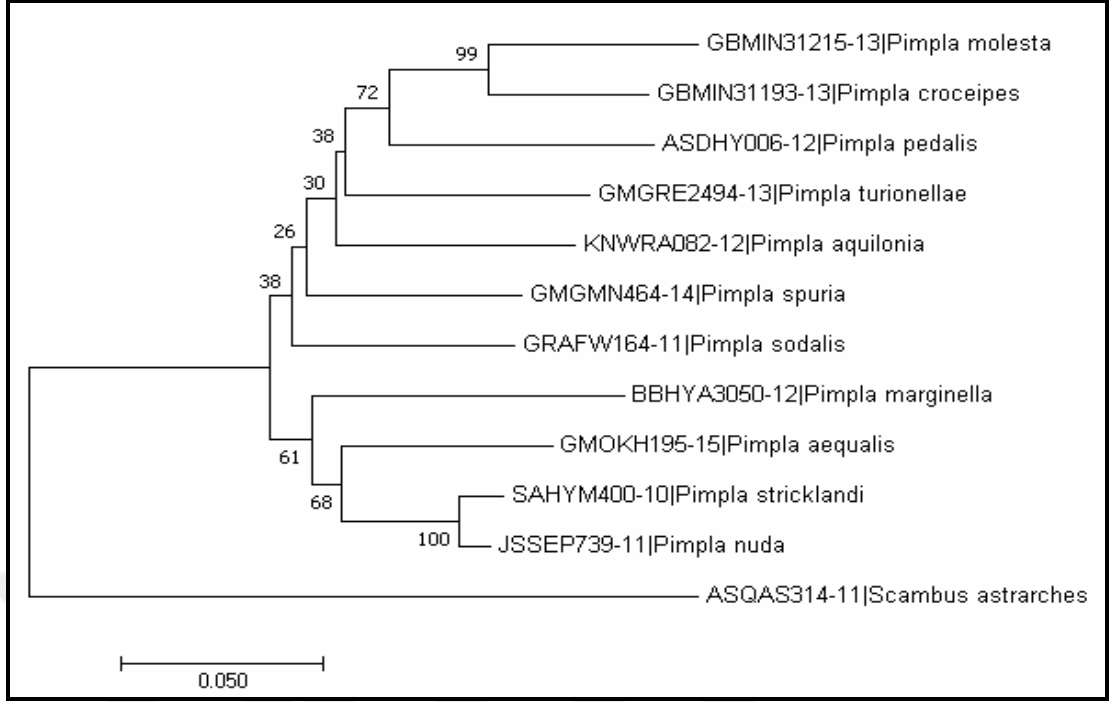
Şekil 3. 17. *Pimpla* cinsine ait Maksimum Likelihood ağacı

Pimpla cinsine ait türler (12 nükleotid dizisi) ML analizinden sonra, MEGA7 programında 10,000 bootstrap desteğiyle ve Kimura-2Parametre baz değişim modeli Neighbor Joining analizi yapıldı. Evrimsel Tarih, Neighbor Joining (Komşu Birleştirme) metodu kullanılarak çıkartıldı. İlişkilendirilmiş taksonların birlikte önyükleme testinde kümelendiği çoğaltma ağaçlarının yüzdesi dalların üstünde gösterildi. Dal uzunluğu=0.86200788 toplamı ile en uygun ağaç gösterildi. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %99 ile *P. molesta* ve *P. croceipes*, bununla %68 ile *Pimpla pedalis*, %28 ile *Pimpla turionellae*; %15 ile *P. aquilonia* ve *P. spuria*, bu grupta %43 ile *P. sodalis*; %100 ile *P. stricklandi* ve *P. nuda*, bunlarla %61 ile *P. marginella* ve %68 ile *P. aequalis* desteklendi. ML ve NJ ağaçları birbirleriyle benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.23).



Şekil 3. 18. *Pimpla* cinsine ait Neighbor Joining ağacı

Pimpla cinsine ait örneklerin mitokondriyal COI gen dizisi verileri, BLAST analiziyle doğrulandıktan sonra, MEGA7 programına aktarıldı ve 10,000 bootstrap desteklenmesiyle Kimura-2Parametre (K2P) baz dizi modeli kullanılarak analize tabi tutuldu. Evrimsel tarih Minimum Evrim Metodu (Minimum Evolution) kullanılarak çıkartıldı. %50'den daha az önyükleme replikasyonunda çoğaltılan bölümlere karşılık gelenler çökertildi. İlişkilendirilmiş taksonların birlikte önyükleme yüzdesi dalların yanında gösterildi. ME ağacı, 1 arama düzeyine Yakın Çevresi Değişim (CNI) algoritması kullanılarak yapıldı. Evrimsel analizlerde 658baz çifti uzunluğunda 12 nükleotid sekansı bulunmaktadır. Dal uzunluğu=0.85506886 toplamı ile en uygun ağaç gösterildi. Analizin sonucunda türlerin desteklenme oranları: %99 ile *P. molesta* ve *P. croceipes*, bununla %72 ile *P. pedalis*, %38 ile *P. turionellae*; %30 ile *P. aquilonia*, %26 ile *P. spuria* ve bu grupta %38 ile *P. sodalis*; %100 ile *P. stricklandi* ve *P. nuda*, bunlarla %61 ile *P. marginella* ve %68 ile *P. aequalis* desteklendi. NJ, ML ve ME ağaçları birbiriyle benzer bulundu (Şekil 3.24).



Şekil 3. 19. *Pimpla* cinsine ait Minimum Evolution ağacı

3.3.4. *P. turionella* türünün filogenetik analizi

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *P. turionella* örneklerinden oluşan tür setinde her bir mitokondriyal dizi için BLAST analizi yapıldı ve örneklerin *P. turionelle* olduğu tespit edildi. Bu veri setlerinin her bir dizisi MEGA7 programında tek tek açıldı ve üst üste çakışan pikler bulduran örnekler analizden çıkartıldı (TR örneklerinden HC02198_E10 ve LC01496_E9 örnekleri analizden çıkartıldı).

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *P. turionella* örneklerinden oluşan tür seti DnSP programına aktarıldı ve 658 baz çifti uzunluğuna sahip 7 nükleotid sekansından 5 haplotip bulundu. Haplotip çeşitliliği (HD, Haplotip Diversity) 0,952, haplotip çeşitliliğinin varyansı (Variance of Haplotype Diversity) 0,00912, standart sapması (Standard Deviation of Haplotype Diversity) 0,096 ve nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity, P_i , π) 0,00217 olarak hesaplandı. G+C konsantrasyonu 0.256 olarak hesaplandı.

Bütün *P. turionella* örneklerinin 658 baz çifti uzunluğundaki sitokrom c oksidaz al birim I'in veri setleri MEGA7 programı ile Tajima Nötrallite Testine (Tajima's Neutrality Test) tabi tutuldu. Tajima Testi Sonuçları Tablo 3.5'te verildi. Bu analiz 5 haplotipe ait nükleotid sekansı içermektedir. Kodon pozisyonları

1.+2.+3.+Kodlanmayan böğeleri içermekteydi. Evrimsel analizleri MEGA7’de yapıldı.

Tablo 3. 5. *P. turionellae* türü için Tajima Nötralite Testinin sonuçları

<i>m</i>	<i>S</i>	<i>Ps</i>	Θ	π	<i>D</i>
7	5	0,007599	0,003102	0,002171	-1,486140

Tespit edilen haplotiplerle oluşturulan 658 baz çifti uzunluğundaki veri setinin analizi sonucunda 658 nükleotid merkezinde benzerlik tespit edilirken (monomorfik bölge) ve 5 nükleotid pozisyonunda varyasyon (polimorfik bölge) tespit edilmiştir. Bu pozisyonlardan 5 tanesi Singleton değışken bölge (singleton variable sites) (Bölge pozisyonları: 178, 454, 500, 592, 644), parsimoni içeren böğeler yoktur. Bu veri setinin Gamma yayılımı 0,05000, Log Likelihood algoritması -1013,114 civarında seyretti ve baz kompozisyonu A: %30,65, T/U: %39,89, C: %15,40 ve G: %14,07 şeklinde tespit edildi.

Gen Bankası ve KÜHFL’den elde edilen *P. turionellae* türlerin haplotiplerini içeren türler evrimsel olarak en yakın tür olan *P. pedalis* seçilerek MEGA7 programına aktarıldı ve ‘find best models’ seçeneğİ kullanılarak BIC (Bayesian Information Criterion) ve AICc (Akaike Information Criterion) kriterlerine göre en uygun baz değışim modeli tespit edildi. *P. turionellae* türüne ait örneklerin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değeri MEGA7 programı ve Kimura2-Parametre (K2P) baz değışim modeli kullanılarak incelendi.

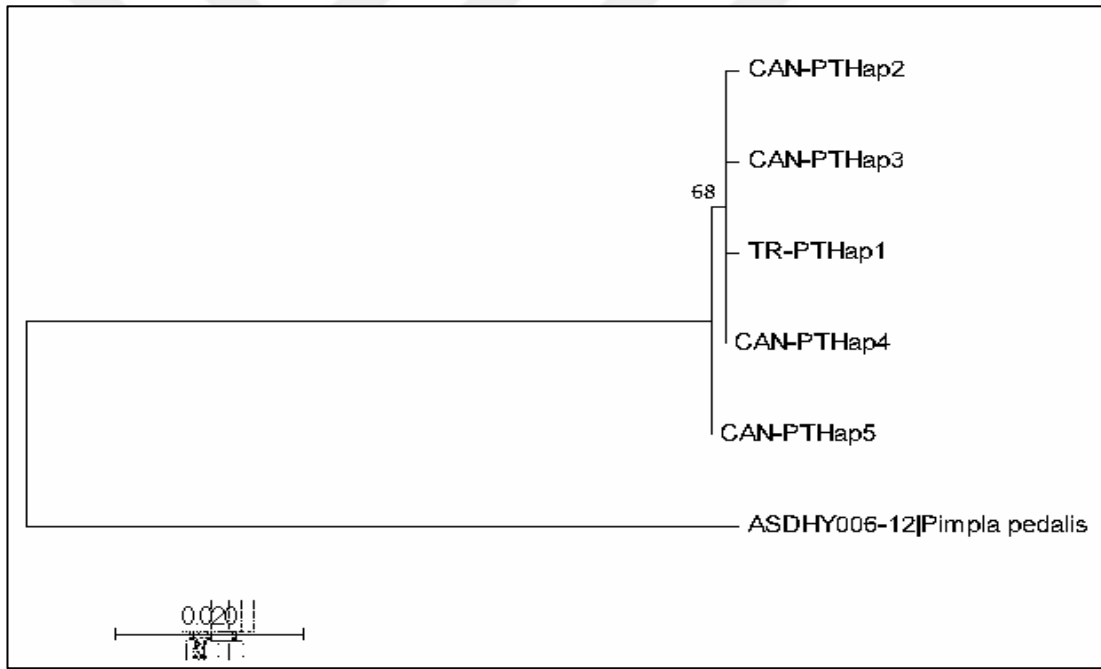
Tablo 3. 6. *P. turionella* türünün genetik uzaklık değeleri (%’lik)

	1	2	3	4	5
TR-PTHap1	*				
CAN-PTHap2	0,3	*			
CAN-PTHap3	0,3	0,3	*		
CAN-PTHap4	0,2	0,2	0,2	*	
CAN-PTHap5	0,3	0,3	0,3	0,2	*

Tablo incelendiğinde *P. turionella* haplotiplerinin tür içi en küçük uzaklık değeri %0,2 ile CAN-PTHap4 ile TR-PTHap1, CAN-PTHap4 ile CAN-PTHap2, CAN-PTHap4 ile CAN-TRHap3 ve CAN-PTHap5 ile CAN-PTHap4 arasındadır. En büyük uzaklık değeri ise, CAN-PTHap2 ile CAN-PTHap3, CAN-PTHap2 ile TR-

PTHap1 ve CAN-PTHap5 ile TR-PTHap1 harici diğer türler arasında olacak şekilde bulundu (d:0,0026).

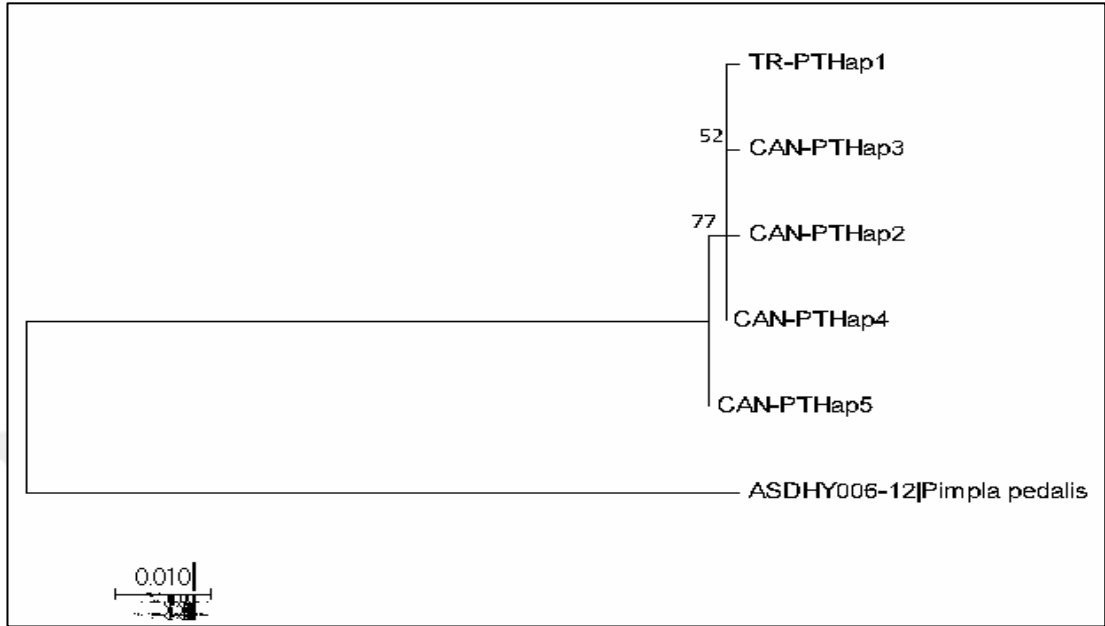
KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *P. turionella* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (658baz çifti), dış grup olarak *P. pedalis* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve T29 (Tamura-Nei model) baz değişim modeli kullanılarak Maksimum Likelihood analizine tabi tutuldu. En yüksek log değerine sahip ağacın değeri -1184,46'dır. Boşluk ve eksik veri içeren veriler elendi. Şekil 3.24'te gösterildi. Maksimum Likelihood analizinin sonucunda: %72 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle CAN-PTHap2 ve CAN-PTHap3; %68 ile TR-PTHap1 ve CAN-PTHap4 ve CAN-PTHap5 desteklenerek Şekil 3.20'de gösterildi.



Şekil 3. 20. *P. turionellae* türünün Maksimum Likelihood ağacı

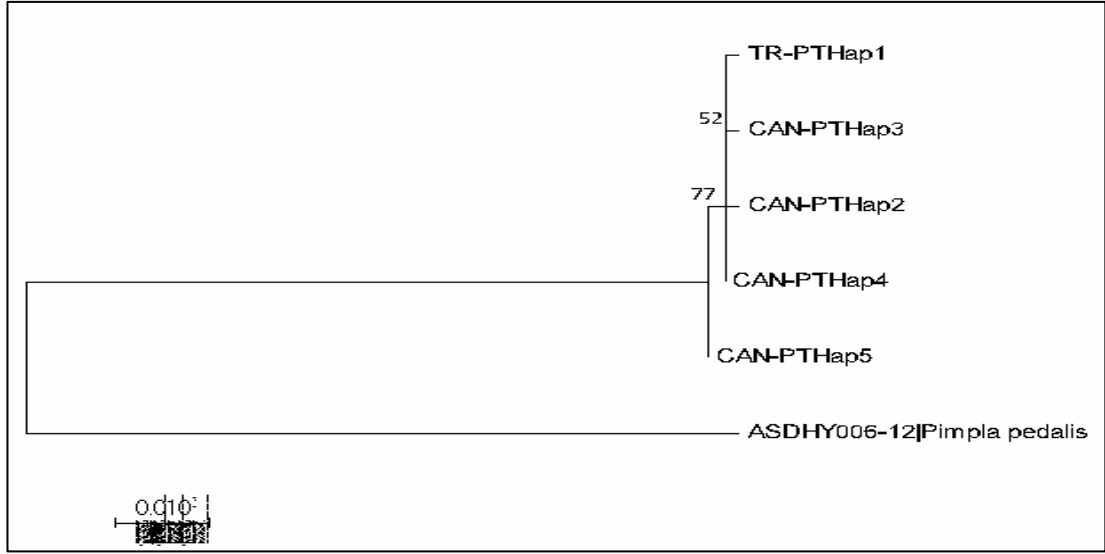
KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *P. turionellae* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (658baz çifti), dış grup olarak *P. pedalis* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek Neighbor-Joining analizine tabi tutuldu. Dal uzunluğu 0,15402856'di. ML ve NJ ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi. Neighbor-Joining analizinin sonucunda: %52 bootsrap (replikasyon) desteklenmesiyle CAN-PTHap2

ve CAN-PTHap3; %77 ile TR-PTHap1 ve CAN-PTHap4 ve CAN-PTHap5 desteklenerek Şekil 3.27'de gösterildi.



Şekil 3. 21. *P. turionella* türünün Neighbor-Joining ağacı

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *P. turionella* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (658baz çifti), dış grup olarak *P. pedalis* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek Minimum Evolution analizine tabi tutuldu. ME ağacı, Dal uzunluğu 0,15402845 olan Yakın Çevre Değişim (CNI) algoritması kullanılarak yapıldı. ME ağacı, ML ve NJ ağaçlarıyla benzerlik göstermektedir. Minimum Evolution analizinin sonucunda: %52 ile bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle TR-PTHap1 ve CAN-PTHap4, %77 ile CAN-PTHap2 ve CAN-PTHap3; ve CAN-PTHap5 desteklenerek Şekil 3.22'de gösterildi.



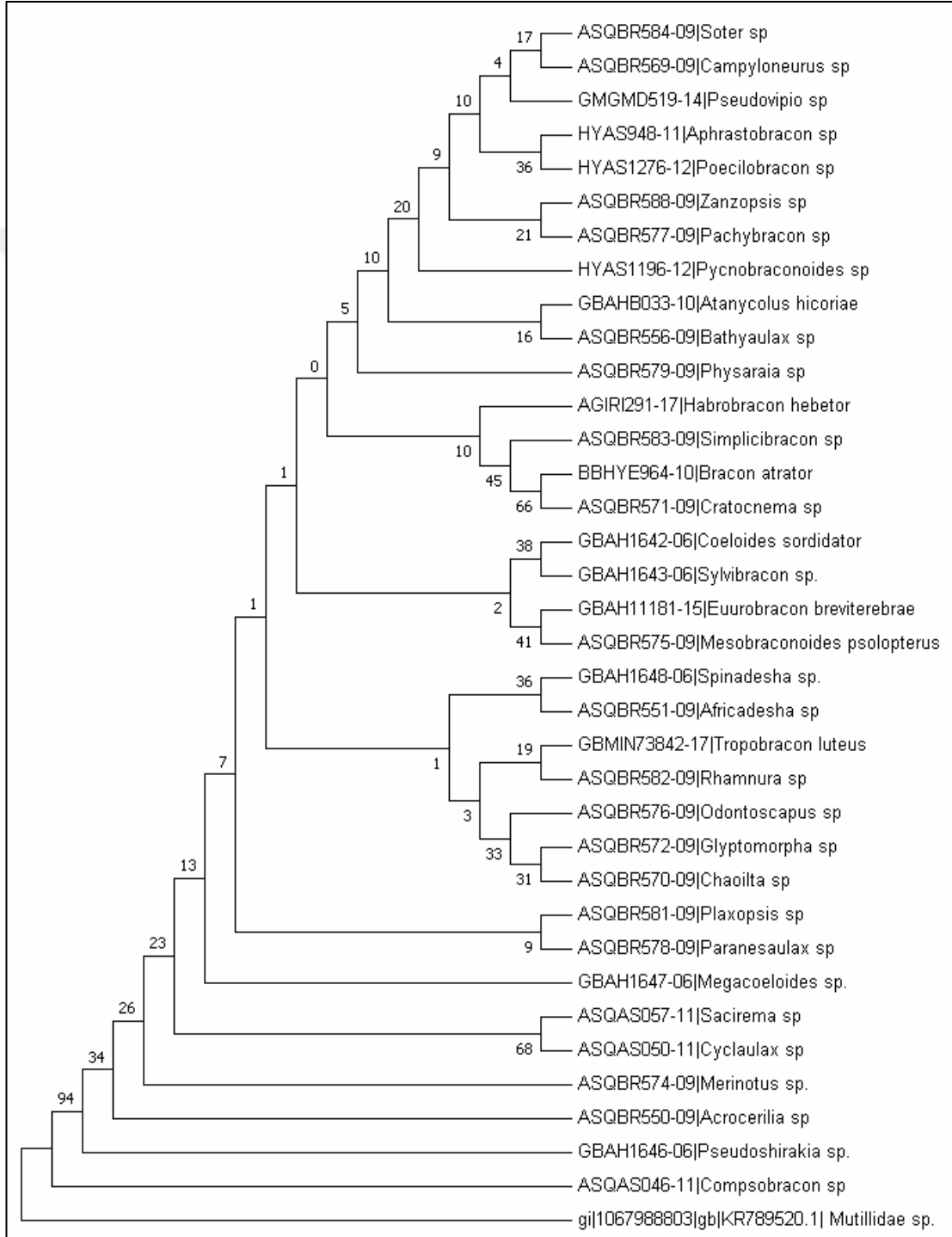
Şekil 3. 22. *P. turionella* türünün Minimum Evolution ağacı

3.3.5. Braconinae alt ailesinin filogenetik analizi

Braconinae alt ailesinin filogenetik analizleriyle *H. hebetor* türünün dahil olduğu cinse ait başka tür olmadığı için, en yakın cins *Simplibracon* cinsi olarak tespit edildi ve *H. hebetor*'un tür düzeyindeki analizlerinde dış grup olarak kullanıldı. Braconinae alt Ailesinin ML, NJ ve ME ağacı analizlerinin hepsinde *H. hebetor* türü, *Simplibracon* ve *Bracon* cinsleri ile yan yana gruplandı.

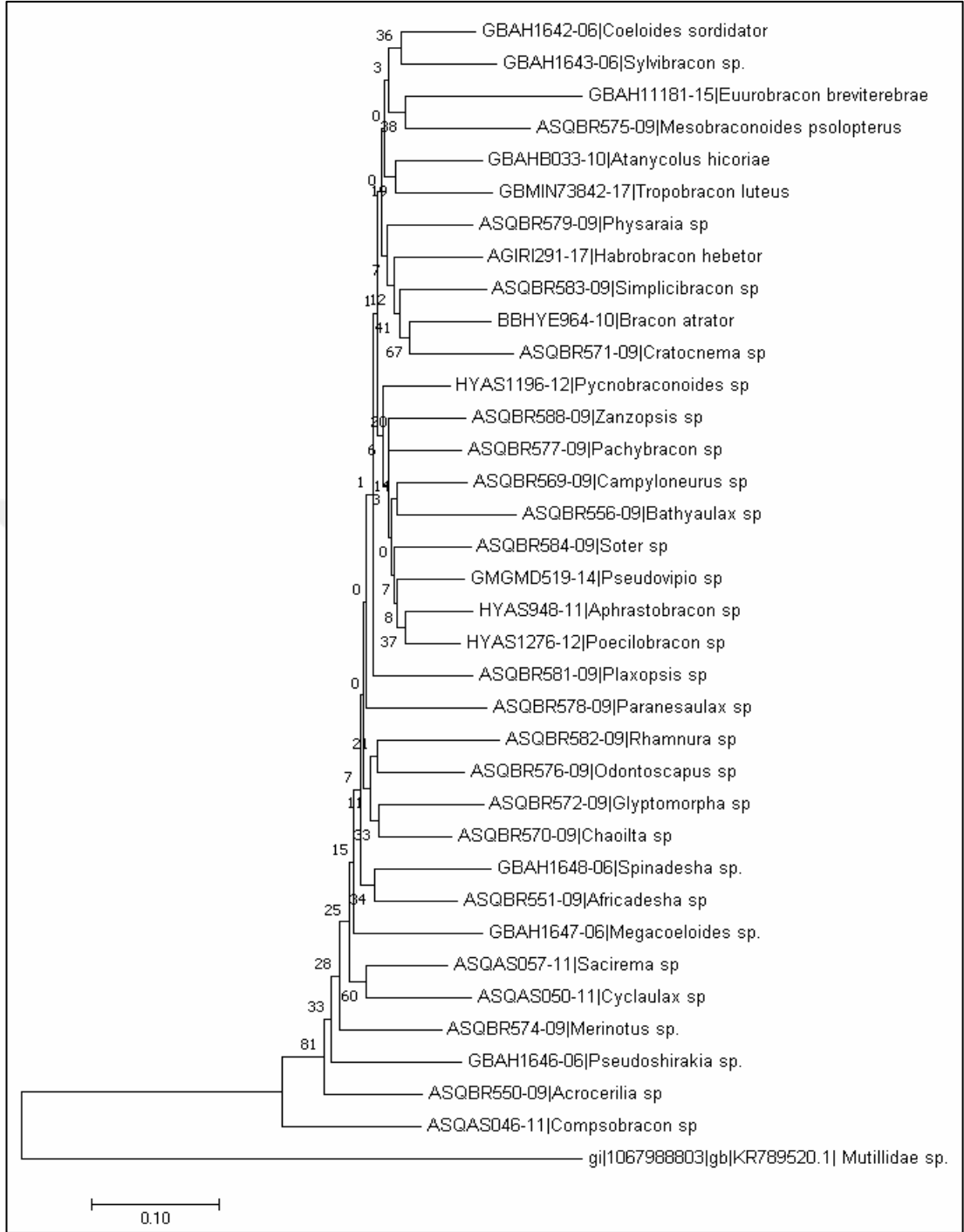
Braconinae alt ailesine ait her bir cinse ait türlerden oluşan veri seti Gen Bankası'ndan elde edildi ve MEGA7 programına aktarılarak Maksimum Likelihood analizi GTR+G+I baz değişim modeli seçilerek 1,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. ML ağacı en yüksek log değerinde yapıldı. Neighbor-Joining ve BioNJ algoritmalarıyla hesaplandı. Analize 36 nükleotid sekansı (658baz çifti) dahil edildi. Boşluklar ve eksik veriler analize dahil edilmedi. En yüksek kütle olasılığı olan ağaç (-9496,91) gösterildi. Alanlar arasında evrimsel oran farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gama dağılımı kullanıldı (5 kategori (+ G, parametre=0,5571)). Maksimum Likelihood analizinin sonucunda ağaçta: %17 bootstrap desteklenmesiyle *Soter* ve *Campyloneurus*, bunlarla %4 ile *Pseudovipio*; %36 ile *Aphastobracon* ve *Poecilobracon*; %21 ile *Zanzopsis* ve *Pachybracon*, bunlarla %20 ile *Pycnobraconoides*; %16 ile *Atanycolus* ve *Bathyaulax*, bunlarla %5 ile *Physarais*; %66 ile *Cratocnema* ve *Bracon*, bunlarla %45 ile *Simplibracon* ve %10 ile *H. hebetor*; %38 ile *Coeloides* ve *Sylvibracon*; %41 ile *Euurobracon* ve

Mesobraconoides; %36 ile *Spinadesha* ve *Africadeshai*; %19 ile *Tropobracon* ve *Rhamnura*; %31 ile *Chaoilta* ve *Glyptomorpha*, bunlarla %33 ile *Odontoscopus*; %9 ile *Plaxopsis* ve *Paranesaulax*, bunlarla %13 ile *Megacoeloides*; %68 ile *Sacirema* ve *Cyclaulax*, bunlarla %26 ile *Merinotus*, %34 ile *Acrocerilia*, %94 ile *Pseudoshirakia* ve *Compsobracon* cinsleri desteklenerek gösterildi (Şekil 3.29).



Şekil 3. 23. Braconina alt ailesinin Maksimum Likelihood ağacı

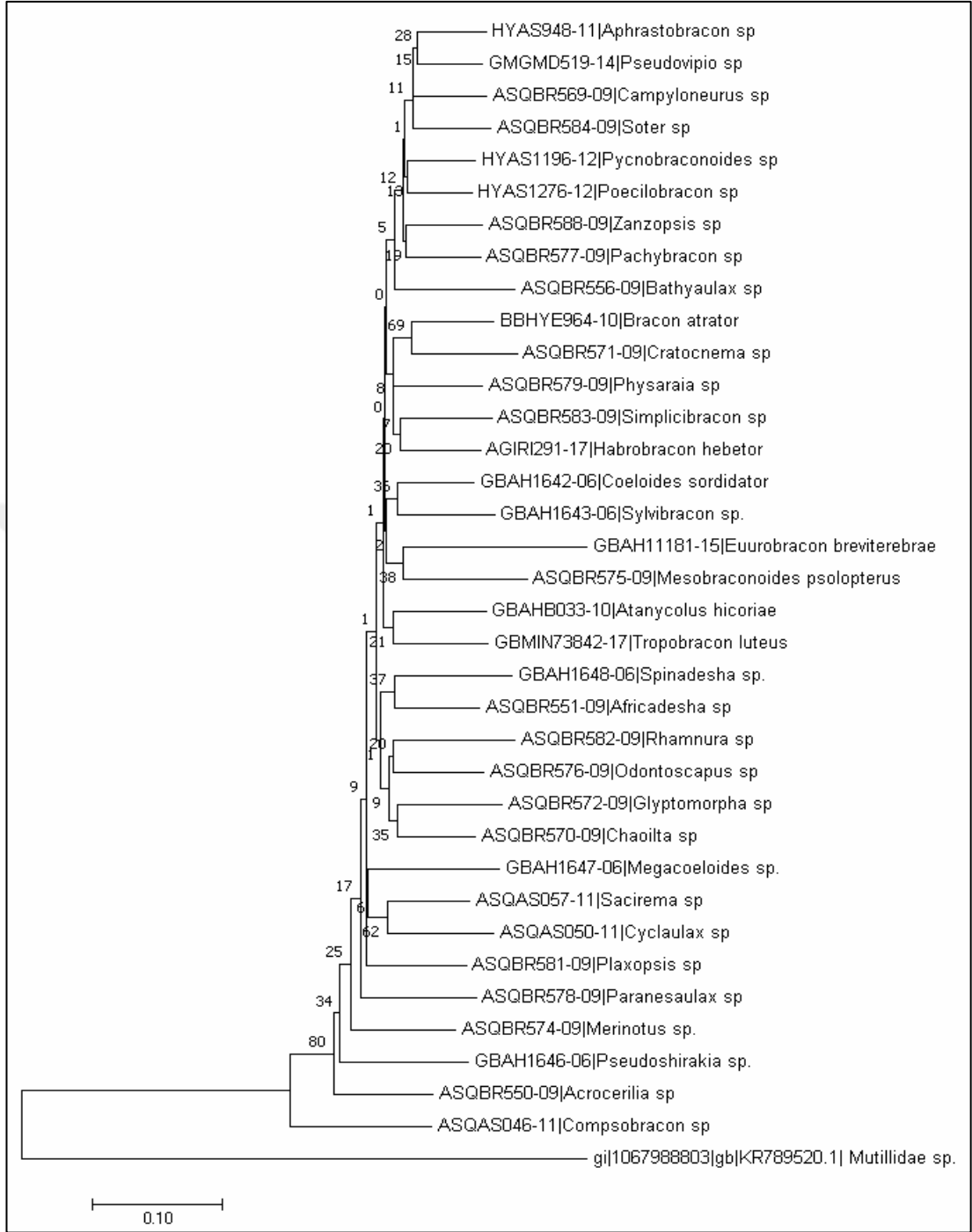
Braconinae alt ailesine ait her bir cinse ait türlerden oluşan veri seti Gen Bankası'ndan elde edildi ve MEGA7 programına aktarılarak Neighbor-Joining analizi Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek 1,000bootstrap desteğiyle yapıldı. Ağaç uzunluğu 3,47595174 olarak bulundu. Analize 36 nükleotid sekansı (658bç) dahil edildi. Boşluklar ve eksik veriler analize dahil edilmedi. 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler analize dahil edildi. Maksimum Likelihood ağacı ile Neighbor Joining ağacı benzerlik göstermektedir. Neighbor Joining analizinin sonucunda ağaçta: %36 bootstrap desteklenmesiyle *Coeloides* ve *Sylvibracon*; %38 le *Euurobracon* ve *Mesobraconoides*; %19 ile *Tropobracon* ve *Atanycolus*; %67 ile *Cratocnema* ve *Bracon*, bunlarla %41 ile *Simplibracon* ve %12 ile *H. hebetor*; %20 ile *Pycnobraconoides*, *Zanzopsis* ve *Pachybracon*; %14 ile *Campyloneurus* ve *Bathyaulax*; %7 ile *Soter* ve *Pseudovipio*; %36 ile *Aphastobracon* ve *Poecilobracon*; %3 ile *Plaxopsis* ve *Paranesaulax*; %21 ile ile *Odontoscapus* ve *Rhamnura*; %33 ile *Chaoilta* ve *Glyptomorpha*; %34 ile *Spinadesha* ve *Africadeshai*, bunlarla %13 ile *Megacoeloides*; %50 ile *Sacirema* ve *Cyclaulax*, bunlarla %28 ile *Merinotus*, %33 ile *Acrocerilia*, %81 ile *Pseudoshirakia* ve *Compsobracon* cinsleri desteklenerek gösterildi. ML ve NJ ağaçları birbiriyle benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.30).



Şekil 3. 24. Braconina alt ailesinin Neighbor-Joining ağacı

Braconinae alt ailesine ait her bir cinse ait türlerden oluşan veri seti Gen Bankası'ndan elde edildi ve MEGA7 programına aktarılarak Minimum Evolution analizi Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek 1,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. Optimal ağaç dal uzunluğu 3,46993756 bulundu. Analize 36 nükleotid sekansı (658bç) dahil edildi. Boşluklar ve eksik veriler analize dahil edilmedi.

1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler analize dahil edildi. ME ağacı, 1 nolu bir arama seviyesinde Close-Komşu-Kavşağı (CNI) algoritması kullanılarak araştırıldı. Komşu-birleşme algoritması, başlangıç ağacının üretilmesi için kullanıldı. Minimum Evolution analizinin sonucunda ağaçta: %28 bootstrap desteklenmesiyle *Aphastobracon* ve *Pseudovipio*; %11 ile *Soter* ve *Campyloneurus*; %12 ile *Pycnobraconoides* ve *Poecilobracon*; %19 ile *Zanzopsis* ve *Pachybracon*, bunlarla *Bathyaulax*; %66 ile *Cratocnema* ve *Bracon*, bunlarla %8 ile *Rhysaraia*; %20 ile *Simplibracon* ve *H. hebetor*; %36 ile *Coeloides* ve *Sylvibracon*; %38 ile *Euurobracon* ve *Mesobraconoides*; %21 ile *Atanycolus* ve *Tropobracon*; %37 ile *Spinadesha* ve *Africadeshai*; %20 ile *Rhamnura* ve *Odontoscopus*; %35 ile *Chaoilta* ve *Glyptomorpha*; *Sacirema* ve *Cyclaulax*, bunlarla %17 ile *Megacoeloides*, %62 ile *Plaxopsis*, %17 ile *Paranesaulax*, %25 ile *Merinotus*, %34 ile *Pseudoshirakia*, %80 ile *Acrocerilia* ve *Compsobracon* cinsleri desteklenerek gösterildi. ME ağacı, ML ve NJ ağaçlarıyla benzerlik göstermekteydi (Şekil 3.31).



Şekil 3. 25. Braconina alt ailesinin Minimum Evolution ağacı

3.3.6. *Habrobracon* cinsinin filogenetik analizi

Habrobracon cinsinin analizleri için, Yalova'dan toplanan *H. hebetor* türü alındı ve Gen Bankası'ndan farklı tür var mı diye araştırıldı. Ancak Gen Bankası'nda *H. hebetor* türünden başka *Habrobracon* cinsine ait tür bulunmadığı için bu cins basamağının analizleri atlandı. Bu çalışmada Yalova ve Gen Bankası'ndan elde

edilen *H. hebetor* türlerine ait 11 örneğin filogenetik analizleri yapıldı. Elde edilen türe ait diziler, BLAST analizine tabi tutuldu ve her bir örnek tek tek açılarak üst üste çakışan pik bulunduranlar elendi. Her bir 658 baz çifti uzunluktaki dizinin *H. hebetor* olduğu doğrulandı. *H. hebetor* örnekleri için tespit edilen haplotip sayısı 11, haplotip çeşitliliği (HD) 0,927, haplotip çeşitliliğinin varyansı 0,00442, haplotip çeşitliliğinin standart sapması 0,066 ve nükleotid çeşitliliği (Pi) 0,03075 bulundu.

658 baz çifti uzunluğundaki *H. hebetor* örneklerinin 11 haplotipi içinde, 616 baz çiftinde monomorfik bölgeler, 42 baz çiftinde ise polimorfik bölgeler tespit edildi. Singleton varyasyon bölgeleri 4 (25, 235, 328, 448) ve parsimoni bilgi içeren bölgeleri 38 (22, 38, 40, 88, 91, 100, 106, 118, 127, 170, 205, 217, 226, 238, 259, 274, 346, 358, 367, 369, 370, 374, 379, 400, 401, 403, 416, 424, 449, 523, 526, 536, 547, 589, 601, 628)'dir. *H. hebetor* örneklerinin haplotiplerine MEGA7 programında Tajima Nötralite Testi yapıldı. Analiz 11 nükleotid sekansı içermektedir. Kodad pozisyonları arasında 1.+2.+3.+ Kodlanmamış kodları dahil edildi. Boşlukları ve eksik verileri içeren tüm pozisyonlar elendi. Nihai veri setinde toplam 658 pozisyon vardı. Evrimsel analizler MEGA7'de yapıldı. Sonuçlar Tablo 3.7'de verildi.

Gen Bankası ve Yalova'dan toplanan *H. hebetor* türünün haplotipleri için MEGA7 programında 'Find Best Models' seçeneği kullanıldı, en uygun baz değişim modeli dış grup (evrimsel olarak en yakın türle birlikte) olarak BIC (Bayesian Information Criterion) ve AICc (Akaike Information Criterion) kriterlerine göre tespit edildi. Dış grup türü olarak *Simplibracon sp.* kullanıldı. *H. hebetor* türüne ait 6 haplotipin baz değişim modeli Kimura-2Parametre (K2P) seçilerek MEGA7 programında haplotipler arası genetik uzaklık bulundu. TR haplotip örneklerine en küçük genetik uzaklık %0,3 ile Rusya haplotipi arasında bulundu. TR haplotip örneklerine en büyük genetik uzaklık Güney Afrika haplotipi ve Hindistan haplotipleri arasında görüldü. d:0,032 olarak bulundu.

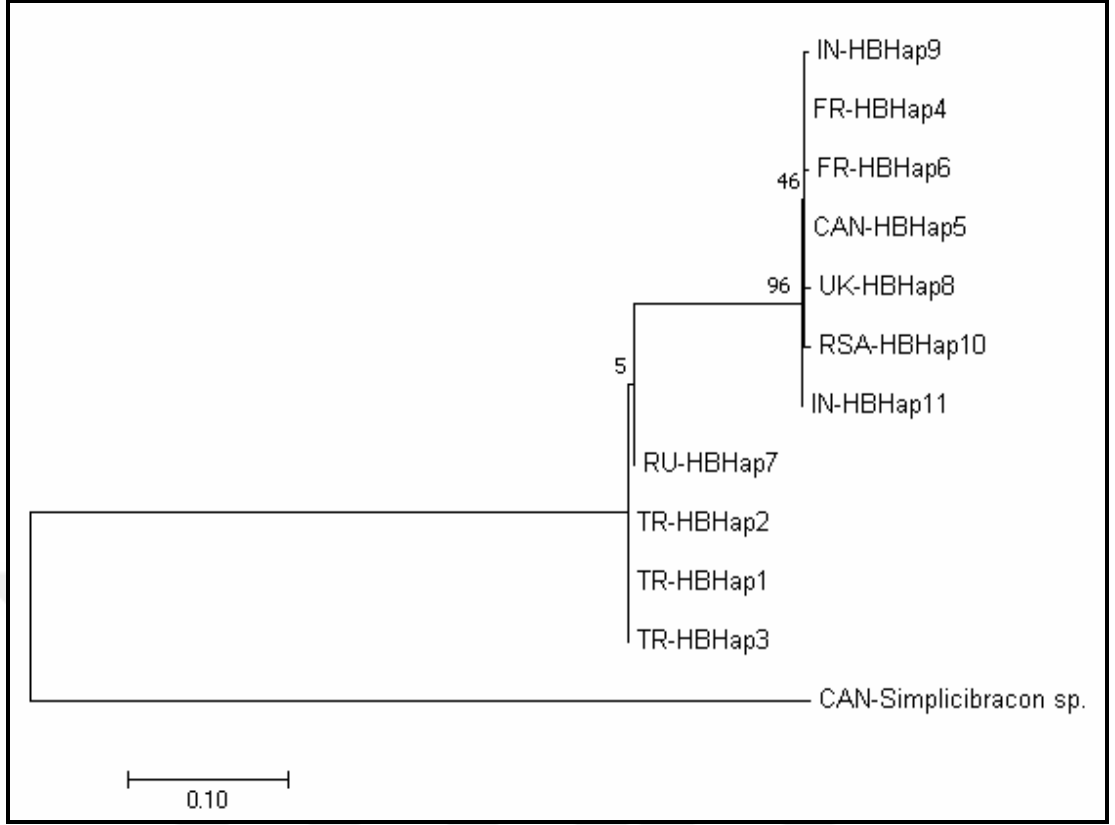
Tablo 3. 7. *H. hebetor* haplotiplerinin Tajima Nötralite Testi sonuçları

<i>m</i>	<i>S</i>	<i>Ps</i>	Θ	π	<i>D</i>
11	42	0,063830	0,021793	0,030754	1.931473

Tablo 3.8. *H. hebetor* türlerinin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değerleri (%'lik)

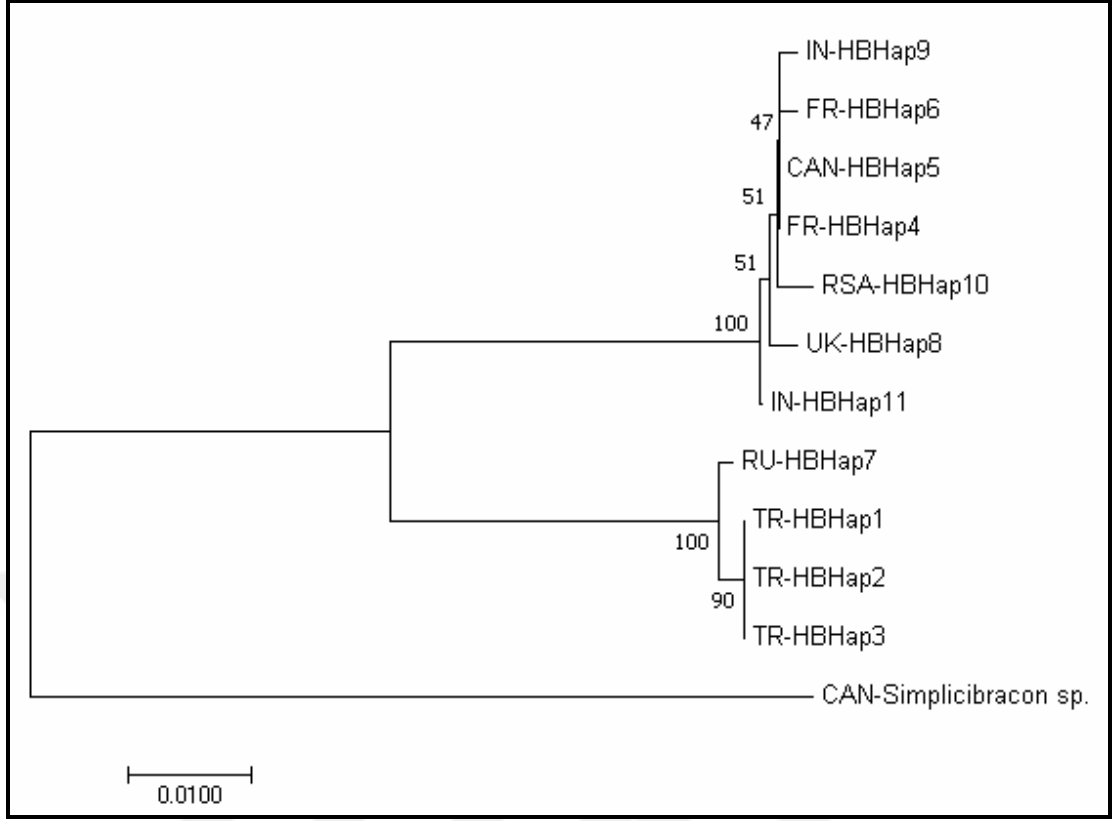
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.IN-HBHap11											
2.RSA-HBHap10	0,5										
3.IN-HBHsp9	0,3	0,5									
4.UK-HBHap8	0,5	0,6	0,5								
5.CAN-HBHap5	0,2	0,3	0,2	0,3							
6.FR-HBHap4	0,2	0,3	0,2	0,3	0						
7.FR-HBHap6	0,3	0,5	0,3	0,5	0,2	0,2					
8.RU-HBHap7	5,7	6,1	6,1	5,9	5,9	5,9	6,1				
9.TR-HBHap1	5,9	6,2	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	0,3			
10.TR-HBHap2	5,9	6,2	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	0,3	0		
11.TR-HBHap3	5,9	6,2	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	0,3	0	0	

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *H. hebetor* türünün haplotiplerinin, dış grup olarak *Simplicibracon sp* seçildi ve Maksimum Likelihood analizi yapıldı. Analizler MEGA7 programında T92+G (Tamura-Nei modeline göre) baz değişim modeli seçilerek yapıldı. En yüksek log ihtimaline (-1301,74) göre ağaç çıkartıldı. Ağaçların yüzdelikleri dalların yanlarında gösterilmiştir. Arama için Maksimum Bileşik Olabilirlik (MLC) yaklaşımı kullanıldı. Analiz 11 nükleotid (658bp uzunluğunda) sekansı içermektedir. ML analizi 10,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. ML ağacına göre %94 desteklenmesiyle TR-HBHap1 ile %88 desteklenmesiyle TR-HBHap2 ve TR-HBHap3 ile monofiletik dallanma gösterdi. Rusya ve Türkiye örnekleri birlikte dallanma gösterdi, bunların dışında kalan Hindistan, Afrika, Fransa, Kanada ve İngiltere örnekleri ise ayrı bir dalda topoloji gösterdi.



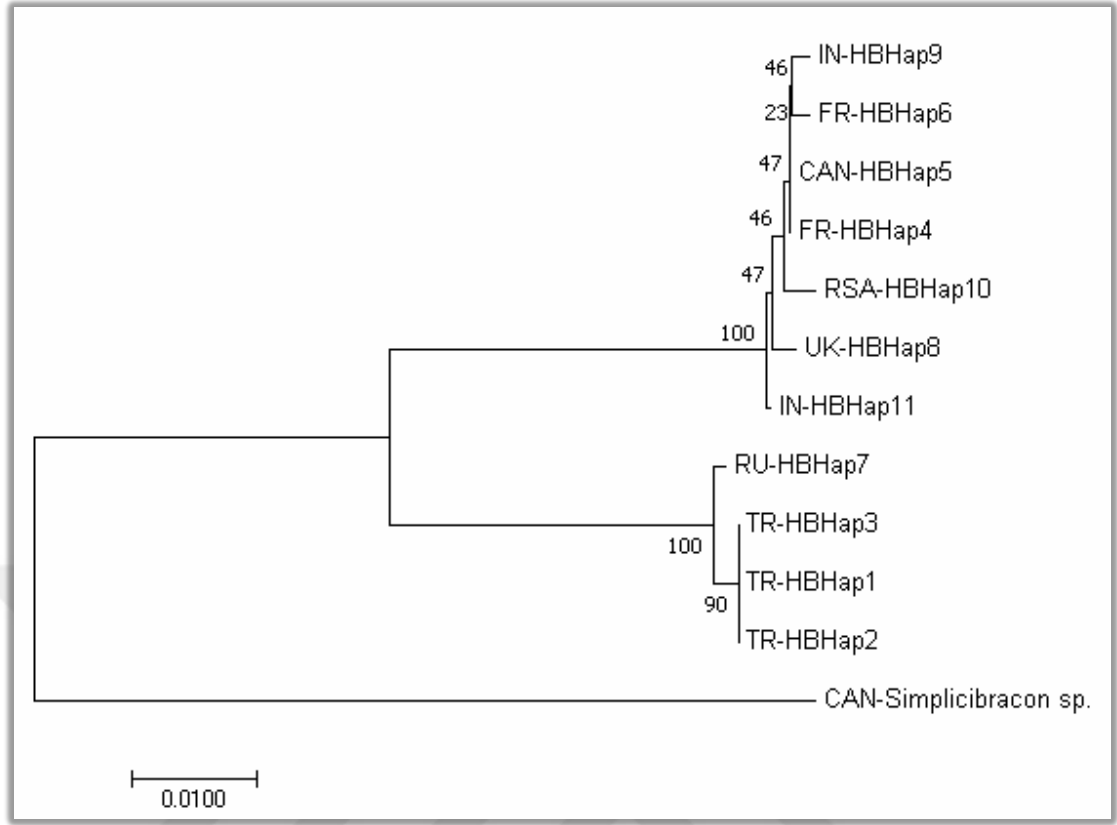
Şekil 3. 26. *H. hebetor* türünün Maksimum Likelihood ağacı

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *H. hebetor* türünün haplotiplerinin, dış grup olarak *Simplibracon sp.* seçildi ve Neighbor-Joining analizi yapıldı. Analizler MEGA7 programında Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek yapıldı. Analiz 10,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. Dal uzunluğu 0,16136904'du. Analiz 11 nükleotid sekansı (658bç) içermektedir. Türkiye örnekleri %90 bootstrap desteklenmesiyle aynı dalda dallanma gösterdi ve %100 ile Rusya haplotipi bu gruba dahil oldu. Rusya ve Türkiye örnekleri birlikte dallanma gösterdi, bunların dışında kalan Hindistan, Afrika, Fransa, Kanada ve İngiltere örnekleri ise ayrı bir dalda topoloji gösterdi. ML ve NJ ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi.



Şekil 3. 27. *H. hebetor* türünün Neighbor-Joining ağacı

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *H. hebetor* türünün haplotiplerinin, dış grup olarak *Simplibracon sp.* seçildi ve Minimum Evolution analizi yapıldı. Analizler MEGA7 programında Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek yapıldı. Analiz 10,000 bootstrap desteğiyle yapıldı. Analiz 11 nükleotid sekansı (658bç) içermektedir. Boşluklar ve eksik veriler içeren pozisyonlar elendi. Ağaç dal uzunluğu toplamı 0,15291857'dir. ME ağacı 1 arama düzeyinde Yakın Çevre Dağılımı (CIN) algoritması kullanılarak yapıldı. ME ağacı, ML ve NJ ile paralellik gösterdi.



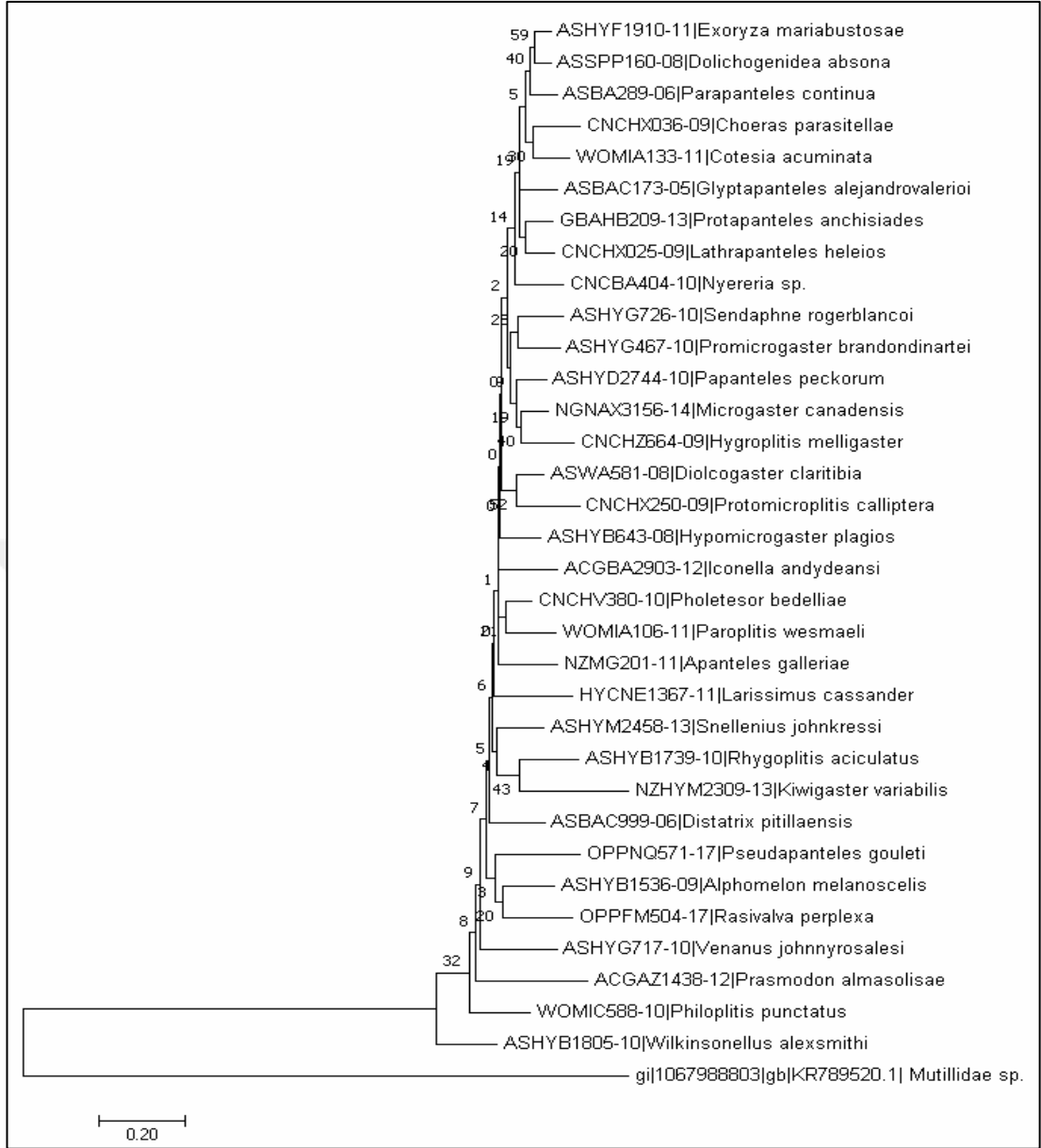
Şekil 3. 28. *H. hebetor* türünün Minimum Evolution ağacı

3.3.7. Microgastriinae alt ailesinin filogenetik analizi

KÜHFLab'dan alınan *A. galleriae* türünün dahil olduğu alt Aile Microgastriinae'nin, Gen Bankası'ndan aynı alt ailesine ait cinslerin her birinden birer örnek alındı (eksik baz dizilimi ya da mitokondriyal COI gen bölgeleri daha önce incelenmemiş türler analize dahil edilmedi). Gen Bankası'ndan alınan örneklerle *A. galleriae*'nin evrimsel uzaklıkları karşılaştırıldı. Alınan bu türler MEGA7 programında filogeni analizlerine tabi tutuldu (Bu türlere sırasıyla Maksimum Likelihood, Neighbor Joining ve Minimum Evolution analizleri yapıldı). Microgastriinae alt ailesinin analizinde kullanılan cinslerle, *Apanteles* cinsi ML, NJ ve ME analizleri sonucunda *Pholetesor*, *Paroptilis* ve *Larissimus* cinsleriyle yakın olarak gruplandı.

Microgastriinae'ye ait türlerin, BLAST analizini takiben, MEGA7 programında 'find best models' seçeneğiyle, en uygun baz değişim modeli GTR+I olarak tespit edildi. 658 baz çifti uzunluğundaki 34 nükleotid sekansı, 1,000 bootstrap desteğiyle Maksimum Likelihood (ML) (Olasılık) analizine tabi tutuldu. Çoğatma ağaçlarının yüzdeleri dalların yanında gösterildi. En yüksek log-8336,84'dir. Boşluk ve eksik

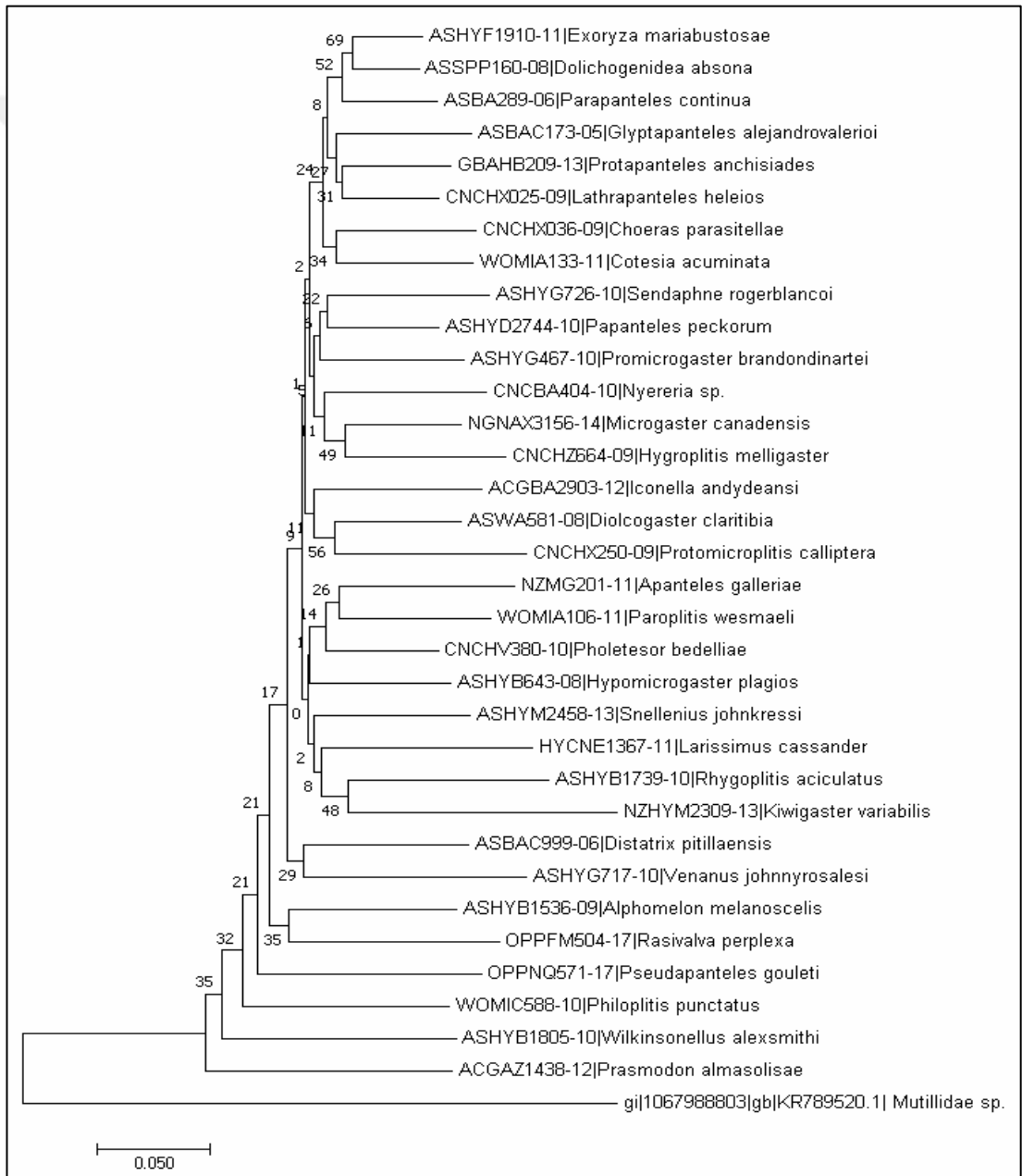
veri içeren tüm pozisyonlar elendi. Komşu Katılma ve BioNJ algoritmaları uygulanarak üstün log değeri ile otomatik olarak elde edildi. Alanlar arasında evrimsel oran farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gama dağılımı kullanıldı (5 kategori (+ G, parametre = 0,4001)). Maksimum Likelihood analizinin sonucunda ağaçta: %59 bootstrap desteklenmesiyle *Exoryza mariabustosae* ve *Dolichogenida absona*, bunlarla %40 ile *Parapanteles continua*; %30 ile *Choeras parasitellae* ve *Cotesia acuminata*, bunlarla %20 ile *Glyptanpanteles alejandrovalerioi*; %20 ile *Propanteles anchisiades* ve *Lathrapanteles heleios*, bunlarla %14 ile *Nyereria* cinsi; %25 ile *Sendaphne rogerblancoi* ve *Promicrogaster brandondinartei*; %40 ile *Hygroptilis melligaster* ve *Microgaster canadensis*, bunlarla *Papanteles peckorum*; %52 ile *Diolcogaster claritibia* ve *Protomicroplitis calliptera*, bunlarla *Hypomicrogaster plagios* ve %1 ile *Iconella andydeansi*; %23 ile *Pholetesor bedelliae* ve *Paroplitis wesmaeli*, bunlarla %21 ile *Apanteles galleriae* ve %6 ile *Larissimus cassander*; %43 ile *Phygoplitis aciculatus* ve *Kiwigaster variabilis*, bunlarla %5 ile *Snellenius johnkrressi* ve bu grupta %5 ile *Distatrix pitillaensis*; %20 ile *Rasivalva perplexa* ve *Alphomelon melanoscelis*, bunlarla %3 ile *Pseudapanteles gouleti* ve bunlarla %9 ile *Veranus johnnyrosalesi*, %8 ile *Prasmodon almasolisae*, %32 ile *Philoplitis punctatus* ve *Wilkinsonellus alexsmithi* türleri desteklenerek gruplandılar (Şekil 3.37).



Şekil 3. 29. Microgasteriinae alt ailesine ait Maksimum Likelihood ağacı

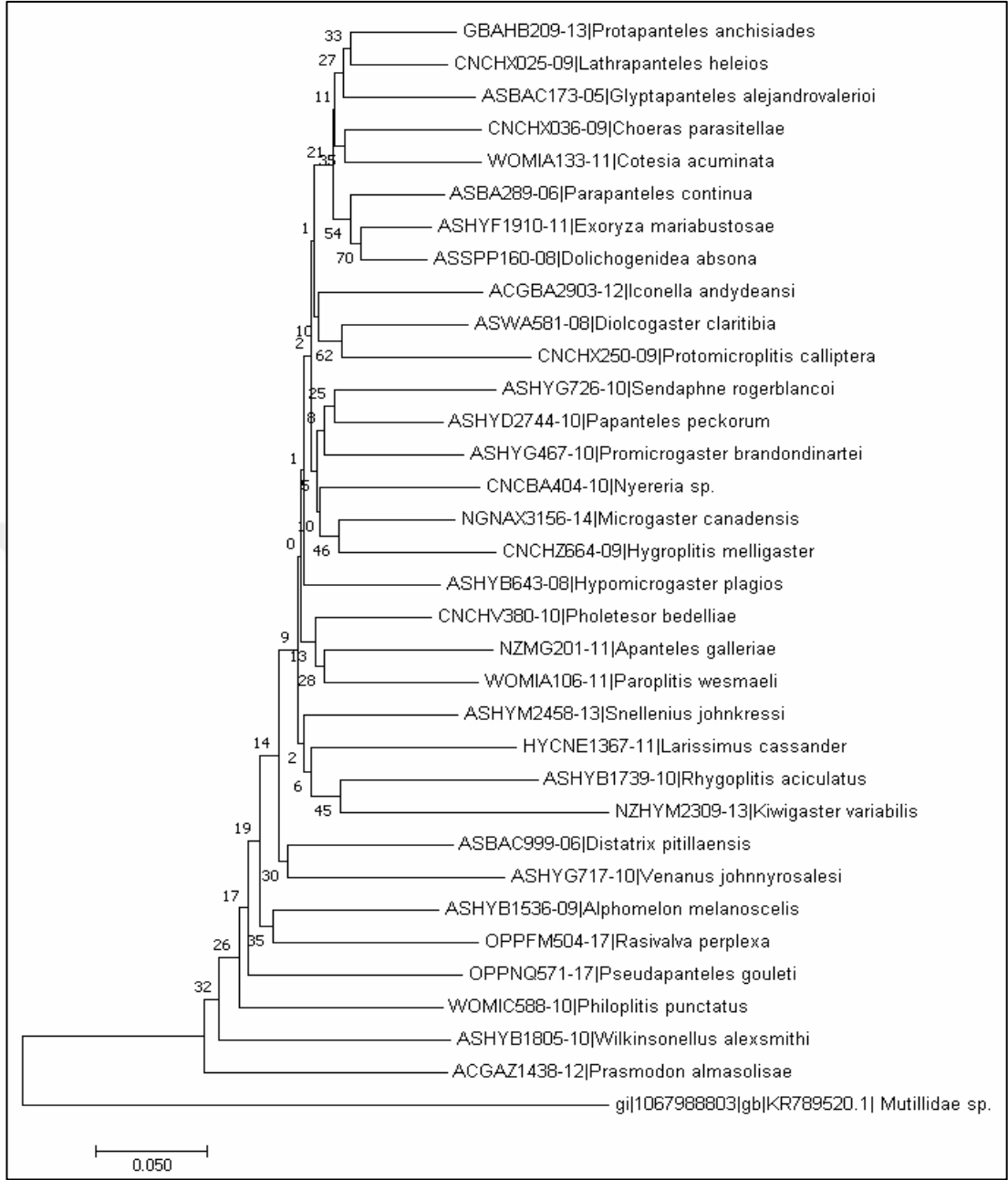
Microgasteriinae alt ailesine ait örnekler Gen Bankası'ndan her cinse bir tür olacak şekilde temin edildi ve eksik dizi bulunduranlar analize dahil edilmedi. Neighbor-Joining analizinde MEGA7 programı ve Kimura-2Parametre baz değişim modeli kullanıldı (1,000 bootstrap desteğiyle birlikte). Boşluklar ve eksik veriler içerek tüm pozisyonlar elendi. Dal uzunluğu 2,83388302 toplamı ile en uygun ağaç gösterildi. Analiz 34 nükleotit (658 bç) sekansı içermektedir. Neighbor Joining analizinin sonucunda ağaçta: %69 bootstrap desteklenmesiyle *E. mariabustosae* ve *D. absona*, bunlarla %52 ile *P. continua*; %31 ile *P. anchisiades* ve *L. heleios*, bunlarla %27 ile *G. alejandrovalerioi*; %34 ile *C. parasitellae* ve *C. acuminata*; %32 ile *S.*

rogerblancoi ve *P. peckorum*, bunlarla %6 ile *P. brandondinartei*; %49 ile *H. melligaster* ve *M. canadensis*, bunlarla %1 ile *Nyereria* cinsi; %56 ile *D. claritibia* ve *P. calliptera*, bunlarla *I. andydeansi*; %26 ile *A. galleriae* ve *P. wesmaeli*, bunlarla %14 ile *P. bedelliae* ve %1 ile *H. plagios*; %48 ile *P. aciculatus* ve *K. variabilis*, bunlarla %8 ile *S. johnkressi* ve %2 ile *L.cassander*; %29 ile *D. pitillaensis* ve *V. johnnyrosalesi*; %35 ile *R. perplexa* ve *A. melanoscelis*, bunlarla %21 ile *P. gouleti* ve *P. punctatus*, %32 ile *W. alexsmithi* ve %35 ile *P. almasolisae* türleri desteklenerek gruplandı (Şekil 3.38). ML ve NJ ağaçları benzerlik gösterdi.



Şekil 3. 30. Microgastriinae alt ailesine ait Neighbor Joining ağacı

Microgastriinae alt ailesine ait örnekler MEGA7 programında Minimum Evrim analizine (Minimum Evolution) (ME) tabi tutuldu. Analiz edilen taksonların evrimsel uzaklıklarını hesaplamak için Kimura-2Parametresi 1,000 bootstrap desteğiyle analiz edildi. Önyükleme testinde ilişkili taksonların birlikte kümelendiği ağaç dallarının yüzdeleri dalların yanında gösterilmiştir. ME ağacı, 1 tarama yüzeyine yakın Çevre Değişim (CNI) algoritması kullanılarak yapıldı. Analizde 658 baz çifti uzunluğunda 34 nükleotid kullanıldı. Şube uzunluğu 2,81983424 toplamı ile optimal ağaç gösterilmiştir. ML, NJ ve ME ağaçları birbiriyle benzerlik göstermektedir. Minimum Evolution analizinin sonucunda ağaçta: %33 bootstrap desteklenmesiyle *P. anchisiades* ve *L. heleios*, bunlarla %27 ile *G. alejandrovalerioi*; %35 ile *C. parasitellae* ve *C. acuminata*; %70 ile *E. mariabustosae* ve *D. absona*, bunlarla %54 ile *P. continua*; %62 ile *D. claritibia* ve *P. calliptera*, bunlarla % 10 ile *I.andydeansi*; %28 ile *S. rogerblancoi* ve *P. peckorum*, bunlarla %8 ile *P.brandondinartei*; %46 ile *H. melligaster* ve *M. canadensis*, bunlarla %10 ile *Nyereria* cinsi ve bunlarla %10 ile *H. plagios*; %28 ile *A. galleriae* ve *P. wesmaeli*, bunlarla %13 ile *P. bedelliae*; %45 ile *Phygoplitis aciculatus* ve *Kiwigaster variabilis*, bunlarla %6 ile *S. johnkrressi* ve %2 ile *L. cassander*; %30 ile *D. pitillaensis* ve *V. johnnyrosalesi*; %1 ile; %35 ile *R. perplexa* ve *A. melanoscelis*, bunlarla %21 ile *P. gouleti* ve *P. punctatus*, %26 ile *W. alexsmithi* ve %35 ile *P. almasolisae* türleri desteklenerek gruplandılar (Şekil 3.39).



Şekil 3. 31. Microgastriinae alt ailesine ait Minimum Evrim ağacı

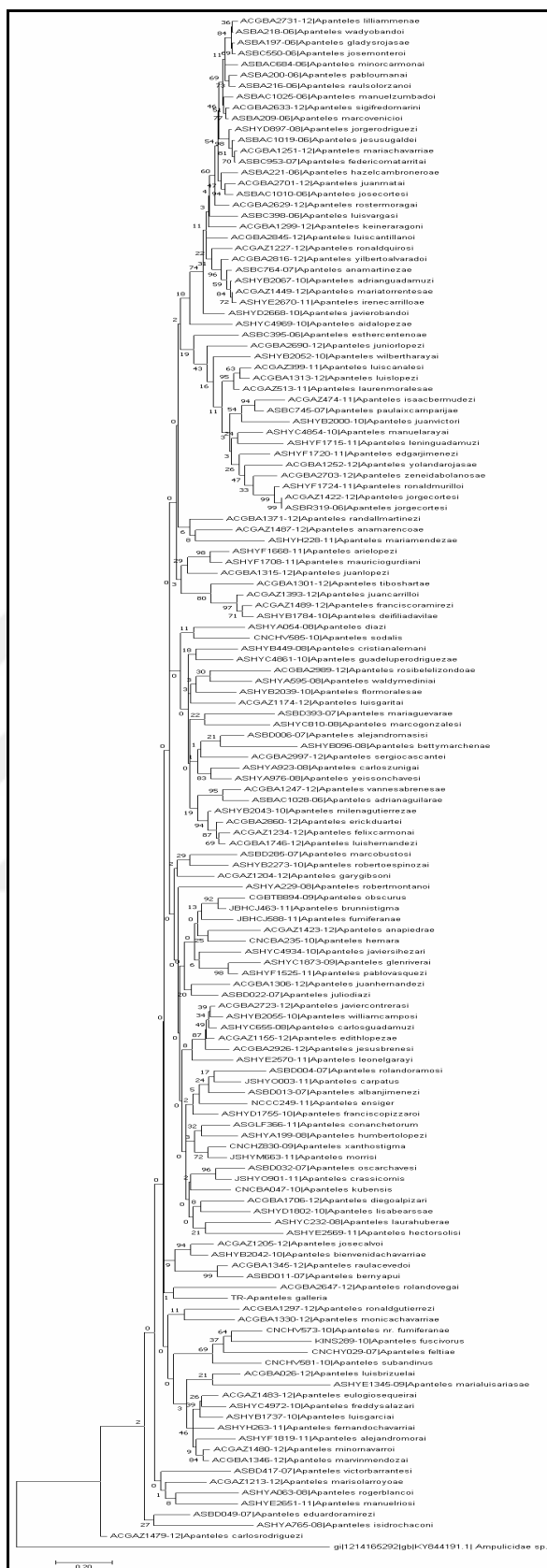
3.3.8. *Apanteles* cinsinin filogenetik analizi

KÜHFL'den alınan *Apanteles* cinsine ait alınan örneklerin (tek tür: *A. galleriae*) BLAST analizi yapıldı ve Gen Bankası'ndan diğer örnekleriyle karşılaştırıldı. Gen Bankası'ndan aynı cinse dahil olan örneklerin fasta dosyası indirildi. Gen Bankası'nda eksik veri içeren ya da hatalı üst üste çakışan (pseudogen olma ihtimali taşıyan türler) pikler içeren türler analize dahil edilmedi. *A. galleriae*'nın dahil

olduğu cins olan *Apanteles*'in analizleriyle, *A. galleriae*'ya en yakın türün *A. sergiocascentei* olduğu tespit edildi ve bu tür dış grup olarak seçildi.

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan *Apanteles* cinsine ait alınan örneklerin MEGA7 programında 'Find Best Models' seçeneğiyle en uygun baz değişim modeli GTR+G olarak bulundu. Bu modelde 10,000 bootstrap desteklenmesiyle türlerin Maksimum Likelihood (ML) analizi yapıldı. Bu analiz 142 nükleotid dizisi içermekte ve her bir örnek 658 baz çifti uzunluğundadır. Analiz sonucunda *A. galleriae*'nin yakın olarak gruplandığı tür *Apanteles rolandoveagai* olarak tespit edildi. Maksimum Likelihood analizinin sonucunda ağaç üzerinde: %36 bootstrap desteklenmesiyle *Apanteles lilliammenae* ve *Apanteles wadyobandoi*; %69 ile *Apanteles gladysrojasae* ve *josemonteroi*, bunlarla %84 ile *Apanteles minorcarmonai*; %73 ile *Apanteles pabloumanai* ve *Apanteles rausolorzanoi*; %77 ile *Apanteles marcuvencioi* ve *Apanteles sigifredomarini*, bunlarla %46 ile *Apanteles manuelzumbadoi*; %70 ile *Apanteles federicomatarritai* ve *Apanteles mariachavarriae*; %98 ile *Apanteles jorgerodriguezi* ve *Apanteles jesusugaldei*; %94 ile *Apanteles josecortezi* ve *Apanteles juanmatai*, bunlarla % 47 ile *Apanteles hazelcambreroae*; %60 ile *Apanteles rostermoragai* ve *Apanteles luiscantillanoi*, %4 ile *Apanteles luisvargasi*, %3 ile *Apanteles keineraragoni* ve %11 ile *Apanteles ronaldquirosoi*; %96 ile *Apanteles yilbertoalvaradoi* ve *Apanteles anamartinezae*, bunlarla %59 ile *Apanteles adrianguadamuzi*; %72 ile *Apanteles mariatorrentesae* ve *Apanteles irenecarrilloe*; %74 ile *Apanteles javierobandoi* ve *Apanteles aidalopezae*; %19 ile *Apanteles esthercentenoae* ve *Apanteles juniorlopezi*; %63 ile *Apanteles wilbertharayai* ve *Apanteles laurenmoralesae*; %95 ile *Apanteles luiscanalesi* ve *Apanteles laurenmoralesae*; %94 ile *Apanteles isaacbermudezi* ve *Apanteles paulaixcamparijiae*, bunlarla *Apanteles juanvictori*; %24 ile *Apanteles manuelarayai* ve *Apanteles leninguadamuzi*; *Apanteles edgarjimenezi* ve *Apanteles yolandrojasae*; %33 ile *Apanteles zeneidabolanosae* ve *Apanteles ronaldmurilloi*; %99 ile *Apanteles jorgecortesi* türünden iki örnek aynı türleri bir araya taşıdığını göstermek amacıyla kullandı ve gruplandı, bu tür *Apanteles randallmartinezi* ile monofiletik dallanma gösterdi; %6 ile *Apanteles anamarencoe* ve *Apanteles mariamendezae*; %98 ile *Apanteles ariellopezi* ve *Apanteles mauriciogurdiani*; %29 ile *Apanteles juanlopezi* ve *Apanteles tiboshartae*; %71 ile *Apanteles franciscoramirezi* ve *Apanteles*

deifiliadavilae; %11 ile *Apanteles diazi* ve *Apanteles sodalis*; %18 ile *Apanteles cristinalemani* ve *Apanteles guadeluperodriguezae*; %30 ile *Apanteles rosibelelizondoae* ve *Apanteles waldymediniai*; %3 ile *Apanteles flormoralesae* ve *Apanteles luisgaritai*; %22 ile *Apanteles mariaguevarae* ve *Apanteles marcogonzalesi*; %21 ile *Apanteles alejandromasisi* ve *Apanteles bettymarchenae*, bunlarla %1 ile *Apanteles sergiocascantei*; %83 ile *Apanteles carloszunigai* ve *Apanteles yeissonchavesi*; %95 ile *Apanteles vannesabrenesae* ve *Apanteles adrianaguilarae*; %94 ile *Apanteles milenagutierrezae* ve *Apanteles erickduartei*; %69 ile *Apanteles felixcarmonai* ve *Apanteles luishernandezii*; %29 ile *Apanteles marcobustosi* ve *Apanteles robertoespinozai*; %2 ile *Apanteles gargibsoni* ve *Apanteles robertmontanoi*; %92 ile *Apanteles obscurus* ve *Apanteles brunnistigma*; %25 ile *Apanteles anapiedrae* ve *Apanteles hemara*; %98 ile *Apanteles glenriverai* ve *Apanteles pablovasquezi*, bunlarla %6 ile *Apanteles javiersihezari*; %20 ile *Apanteles juanhernandezii* ve *Apanteles juliodiazi*; %39 ile *Apanteles javiercontrerasi* ve *Apanteles williamcamposi*; %34 ile *Apanteles carlosguadamuzi* ve *Apanteles edithlopezae*; %87 ile *Apanteles jesusbrenesi* ve *Apanteles leonelgarayi*; %17 ile *Apanteles rolandoramosi* ve *Apanteles carpatus*; %24 ile *Apanteles albanjimenezi*, *Apanteles ensiger* ve *Apanteles franciscopizzaroi*; %32 ile *Apanteles conanchetorum* ve *Apanteles humbertolopezi*; %72 ile *Apanteles xanthostigma* ve *Apanteles morrissi*; %96 ile *Apanteles oscarchavesi* ve *Apanteles kubensis*; %8 ile *Apanteles diegoalpizari* ve *Apanteles lisabearssae*; %21 ile *Apanteles laurahuberae* ve *Apanteles hectorsolisi*; %94 ile *Apanteles josecalvoi* ve *Apanteles bienvenidachavarriae*; %99 ile *Apanteles raulacevedoi* ve *Apanteles bernyapui*; %1 ile *A. rolandovegai* ve *TR-A. galleriae*; %11 ile *Apanteles ronaldgutierrezii* ve *Apanteles monicachavarriae*; %64 ile *Apanteles nr. fumiferanae* ve *Apanteles feltiae*, bunlarla %69 ile *Apanteles dubandinus*; %21 ile *Apanteles luisbrizuelai* ve *Apanteles marialuisariasae*; %26 ile *Apanteles eulogiosequeirai* ve *Apanteles freddysalazari*; %39 ile *Apanteles luisgarciai* ve *Apanteles fernandochavarriae*; %84 ile *Apanteles minorvarroi* ve *Apanteles marvinmendozai*, bunlarla %9 ile *Apanteles alejandromorai*; %1 ile *Apanteles victorbarrantesi* ve *Apanteles marisolarroyoae*; %8 ile *Apanteles rogerblancoi* ve *Apanteles manuelriosi*; %27 ile *Apanteles eduardoramirezi* ve *Apanteles isidrochaconi* desteklenerek gösterdi (Şekil 3.39).



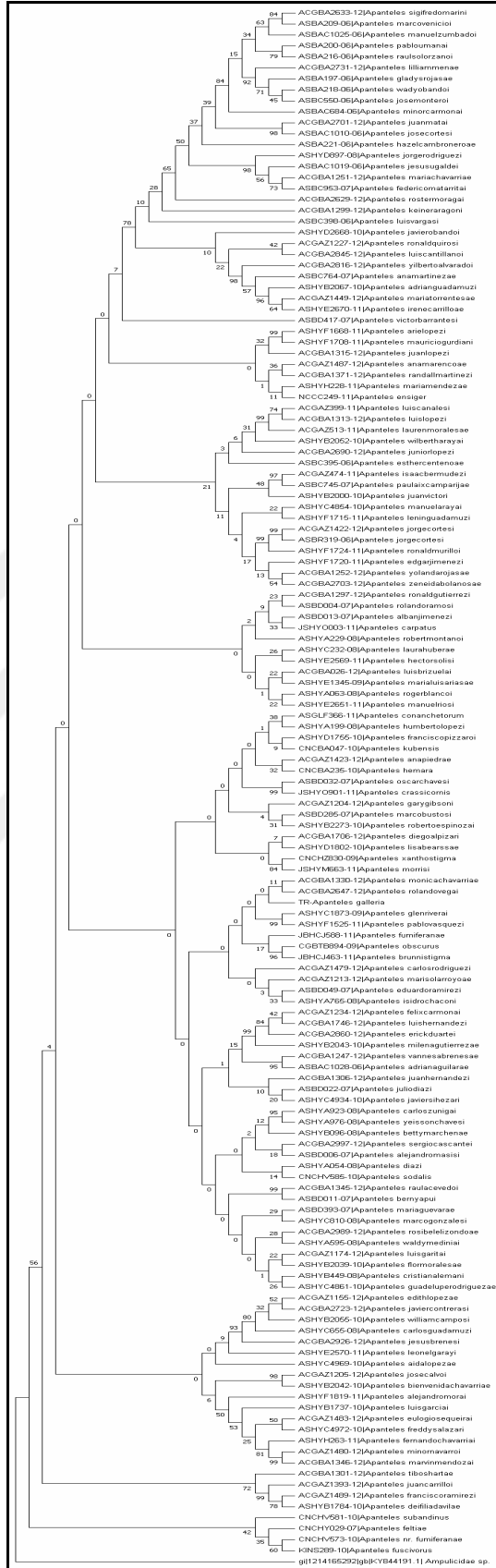
Şekil 3. 32. *Apanteles* cinsinin Maksimum Likelihood ağacı

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan *Apanteles* cinsine ait alınan tür örneklerin MEGA7 programında, Kimura-2Parametre'si kullanılarak 10,000 bootstrap desteklenmesiyle Neighbor Joining (NJ) analizi yapıldı. Analize 658 baz çifti uzunluğunda 142 nükleotid dizisi dahil edildi. Mevcut olan ağacın dal uzunluğu 5,87783650'dir. NJ analizinin sonucunda TR- *A. galleriae*, *A. monicarchavariae* ve *A. rolandgregai* türleri ile monofiletik dallanma gösterdi. Neighbor Joining analizinin sonucunda ağaç üzerinde: %83 bootstrap desteklenmesiyle *A. sigifredomarini* ve *A. marcovenicioi*, bunlarla %53 ile *A. manuelzumbadoi*; %75 ile *A. pabloumanai* ve *A. raulsolorzanoi*, bunlarla %30 ile *A. minorcamonai*; %88 ile *A. lilliammenae* ve *A. gladysrojasae*; %48 ile *A. wadyobandoi* ve *A. josemonteroi*; %98 ile *A. jorgerodriguezi* ve *A. jesusgaldei*; %71 ile *A. mariachavarriae* ve *A. federicomantaritai*; %98 ile *A. juanmatai* ve *A. josecortesi*; %76 ile *A. hazelcambroneroae* ve *A. rostermoragai*; %35 ile *A. keineraragoni* ve *A. ronaldquirosoi*; %42 ile *A. luiscantillanoi* ve *A. yilbertoalvaradoi*; %67 ile *A. anamartinezae* ve *A. adrianguadamuzi*; %62 ile *A. mariatorrentesae* ve *A. irenecarrilloae*; %84 ile *A. javierobandoi* ve *A. luisvargasi*, bunlarla *A. esthercentenoae*; %74 ile *A. luiscanalesi* ve *A. laurenmoralesae*; %31 ile *A. wilbertharayai* ve *A. juniorlopezi*; %19 ile *A. manuelarayai* ve *A. leninguadamuzi*; %96 ile *A. isaacbermudezi* ve *A. paulaixcamparijiae*; %99 ile *A. jorgecortesi* ve *A. ronaldmurilloi*; %14 ile *A. edgarjimenezi* ve *A. yolandarojasae*, bunlarla *A. zeneidabolanosae*; %31 ile *A. isidrochaconi* ve *A. eduardoramirezi*, bunlarla *A. carlosrodriguezi* ve *A. marisolarroyoae*; %31 ile *A. albanjimenezi* ve *A. carpatus*, bunlarla %32 ile *A. rolandramosi*; %10 ile *A. ronaldgutierrez* ve *A. robertomontanoi*; %26 ile *A. laurahuberae* ve *A. hectorsolisi*; %24 ile *A. luisbrizuelai* ve *A. marialuisariasae*; %21 *A. rogerblancoi* ve *A. manuelriosi*; %99 ile *A. ariellopezi* ve *A. mauriciogurdiani*, bunlarla %33 ile *A. juanlopezi*; %95 ile *A. brunnistigma* ve *A. obscurus*, bunlarla %96 ile *A. fumiferanae*; %99 ile *A. glenriverai* ve *A. pablovasquezi*; %12 ile TR- *A. galleriae* ve *A. monicachavarriae*, bunlarla *A. rolandovegai*; %31 ile *A. anapiedrae* ve *A. hemara*; %8 ile *A. franciscopizzaroi* ve *A. kubensis*; %36 ile *A. conanchetorum* ve *A. humbertolopezi*; %31 ile *A. robertoespinozai* ve *A. marcobustosi*, bunlarla %4 ile *A. garygibsoni*; %37 ile *A. anamarencoae* ve *A. randallmartinezi*; %8 ile *A. mariamendezae* ve *A. ensiger*; %6 ile *A. diegoalpizari* ve *A. lisabearssae*; %84 ile *A. xanthostigma* ve *A. morrissi*; %98

ile *A. oscarchavesi* ve *A. crassicornis*; %42 ile *A. luishernandezii* ve *A. erickduartei*, bunlarla %99 ile *A. milenagutierrezae*; %95 ile *A. vannesabrenesae* ve *A. adrianaguilarae*; %26 ile *A. juliodiazi* ve *A. juanhernandezii*, bunlarla *A. javiersihezari*; %13 ile *A. diazi* ve *A. sodalis*; %28 ile *A. mariaguevarae* ve *A. marcogonzalesi*; %19 ile *A. luisgaritai* ve *A. flormoralesae*; %30 ile *A. rosibelelizondoae* ve *A. waldymediniai*; %25 ile *A. cristianalemani* ve *A. guadeluperodriguezae*; %99 ile *A. raulacevedoi* ve *A. bernyapui*; %18 ile *A. alejandromasisi* ve *A. bettymarchenae*; %96 ile *A. yeissonchavesi* ve *A. carloszunigai*; %5 ile *A. aidalopezae* ve *A. leonelgarayi*; %98 ile *A. josecalvoi* ve *A. bienvenidachavarriae*; %41 ile *A. javiercontrerasi* ve *A. williamcamposi*; %39 ile *A. carlosguadamuzi* ve *A. edithlopezae*; %96 ile *A. jesusbrenesi* ve *A. alejandromorai*; %99 ile *A. minornacarroi* ve *A. marvinmendozai*; %74 ile *A. fernandochavarriae* ve *A. luidgarciai*; %43 ile *A. eulogiosequeirai* ve *A. freddysalazari*; %77 ile *A. tiboshartae* ve *A. juancarrilloi*; %78 ile *A. franciscoramirezi* ve *A. deifiliadavilae*; %33 ile *A. subandinus* ve *A. feltiae*; %64 *A. nr. fumiferanae* ve *A. fuscivorus* desteklenerek gösterilmiştir. ML ve NJ ağaçları birbirleriyle benzerlik gösterdi (Şekil 3.40).

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan *Apanteles* cinsine ait alınan tür örneklerin MEGA7 programında, Kimura-2Parametresi baz değişim modeli ve 10,000 bootstrap kullanıldı. Bu analiz 658 baz çifti uzunluğundaki 142 nükleotid dizisi içermektedir. Minimum Evolution analizinin sonucunda ağaçta: %84 bootstrap desteklenmesiyle *A. sigifredomarini* ve *A. marcovenicioi*, bunlarla %63 ile *A. manuelzumbadoi*; %79 ile *A. pablomanai* ve *A. raulsolorzanoi*; %45 ile *A. josemonteroi* ve *A. wadybandoi*, bunlarla %71 ile *A. gladysrojasae*, % 84 ile *A. minorcarmonai* ve %92 ile *A. lilliammenae*; %98 ile *A. juanmatai* ve *A. josecortesi*; %37 ile *A. hazelcambroneroae* ve *A. jorgerodriguezi*; %73 ile *A. federicomatarritai* ve *A. mariachavarriae*, bunlarla %98 ile *A. jorgerodriguezi*; %50 ile *A. rostermoragai* ve *A. keineraragoni*; %10 ile *A. javierbandoi* ve *A. luisvargasi*; %42 ile *A. ronaldquirosoi* ve *A. luiscantillanoi*; %98 ile *A. yilbertoalvaradoi* ve *A. anamartinezae*; %64 ile *A. irenecarrilloae* ve *A. mariatorrentesae*, bunlarla %96 ile *A. adrianguadamuzi*, bu grupta da %7 ile *A. victorbarrantesi*; %99 ile *A. arielozepezi* ve *A. mauriciogurdiani*, bunlarla *A. juanlopezi*; %36 ile *A. anamarencoae* ve *A. randallmartinezi*; %11 ile *A. mariamendezae* ve *A. ensiger*; %74 ile *A. luiscanalesi* ve *A. luislopezi*; %99 ile *A. laurenmoralesae* ve *A. wilbertharayai*; %31 ile *A. juniorlopezi* ve *A. esthercentenoae*; %97 ile *A. isaacbermudezi* ve *A. paulaixcamparijiae*, bunlarla %48 ile *A. juanvictori*; %22 ile *A. manuelarayai* ve *A. leninguadamuzi*; %99 ile *A. jorgecortesi* ve *A. ronaldmurilloi*; %54 ile *A. zeneidabolanosae* ve *A. yolandarojasae*, bunlarla *A. edgarjimenezi*; %23 ile *A. ronaldgutierrez* ve *A. rolandoramosi*; %33 ile *A. carpatus* ve *A. albanjimenezi*, bunlarla %2 ile *A. robertmontanoi*; %26 ile *A. laurahuberae* ve *A. hectorsolisi*; %22 ile *A. luisbrizuelai* ve *A. marialuisariasae*; %22 ile *A. rogerblancoi* ve *A. manuelriosi*; %38 ile *A. conanchetorum* ve *A. humbertolopez*; %9 ile *A. franciscopizzaroi* ve *A. kubensis*; %32 ile *A. anapiedrae* ve *A. hemara* ; %99 ile *A. oscarchavesi* ve *A. crassicornis*; %31 ile *A. robertoespinozai* ve *A. marcobustosi*, bunlarla %4 ile *A. garygibsoni*; %7 ile *A. diegoalpizari* ve *A. lisabearssae*; %84 ile *A. xanthostigma* ve *A. morrissi*; %11 ile *A. monicachavarriae* ve *A. rolandovegai*, bunlarla TR-A. *galleriae*; %99 ile *A. glenriverai* ve *A. pablovasguezi*; %36 ile *A. isidrochaconi* ve *A. eduardoramirez*, bunlarla %3 ile *A. marisolarroyoae* ve *A. carlosrodriguezi*; %42 ile *A. felixcarmonai*

ve *A. luishernandezii*; %84 ile *A. erickduartei* ve *A. milenagutierrezae*; %95 ile *A. vannesabrenesae* ve *A. adrianaaguilarae*; %20 ile *A. javiersihezari* ve *A. juliodiazi*, bunlarla *A. juanhernandezii*; %95 ile *A. carloszunigai* ve *A. yeissonchavesi*, bunlarla *A. bettymarchenae*; %18 ile *A. sergiocascantei* ve *A. alejandromasisi*; %14 ile *A. diazi* ve *A. sodalis*; %99 ile *A. raulacevedoi* ve *A. bernyapui*; %29 ile *A. mariaguevarae* ve *A. marcogonzalesi*; %28 ile *A. rosibelelizondoe* ve *A. waldymendiniiai*; %22 ile *A. luisfaritai* ve *A. flormoralesae*; %26 ile *A. cristianalemani* ve *A. guadeluperodriguezae*; %52 ile *A. edithlopezae* ve *A. javiercontrerasi*, bunlarla %32 ile *A. williamcamposi*, %80 ile *A. carlosguadamuzi*, %93 ile *A. jesusbrenesi*, %9 ile *A. leonelgarayi* ve *A. aidalopezae*; %98 ile *A. josecalvoi* ve *A. bienvenidachavarriae*; *A. eulogiosequeirai* ve *A. freddysalazari*, bunlarla %53 ile *A. luisgarciai* ve %50 ile *A. alejandromorai*; %99 ile *A. marvinmendozai* ve *A. minornavarroi*, bunlarla %81 ile *A. fernandochavarriae*; %78 ile *A. deifiliadavilae* ve *A. franciscoramirezi*, bunlarla %99 ile *A. juancarrilloi* ve %72 ile *A. tiboshartae*; %60 ile *A. nr. fumiferanae* ve *A. fuscivorus*, bunlarla %35 ile *A. feltiae* ve %42 ile *A. subandinus* desteklenerek gösterdi (Şekil 3.41).



Şekil 3. 34. *Apanteles cinsinin* Minimum Evolution ağacı

3.3.9. *A. galleriae* türünün filogenetik analizi

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *A. galleriae* örneklerden oluşan tür setinde her bir mitokondriyal dizi için BLAST analizi yapıldı ve her bir dizinin *A. galleriae* olduğu tespit edildi. Bu veri setlerinin her bir dizisi MEGA7 programında tek tek açıldı ve üst üste çakışan pikler bulunduran örnekler analizden çıkartıldı (TR örneklerinden LC01490_E12 ve HC02198_B11 analizden çıkartıldı).

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *A. galleriae* örneklerden oluşan tür seti DnSP6 programı ile açıldı ve 658bç uzunluğa sahip 4 örnek için haplotip sayısı 4 olarak tespit edildi, Haplotip çeşitliliği (HD, Haplotip Diversity) 1, haplotip çeşitliliğinin varyansı (Variance of Haplotype Diversity) 0,03125, standart sapması (Standard Deviation of Haplotip Diversity) 0,177 ve nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity, π , π) 0,00500 olarak hesaplandı. G+C konsantrasyonu 0,262 olarak bulundu. Monomorfik siteler 627 ve polimorfik siteler 6 olarak tespit edildi. Singleton değişken siteler 5 (1, 307, 438, 560, 605) ve parsimoni bilgilendirici siteler 1 (269) olarak bulundu. Bütün *A. galleriae* örneklerinin 658 baz çifti uzunluğundaki sitokrom c oksidaz al birim I'in veri setleri MEGA7 programı ile Tajima Nötralite Testine (Tajima's Neutrality Test) tabi tutuldu. Tajima Testi Sonuçları Tablo'da verilmiştir. Bu analiz 4 haplotipe ait nükleotid sekansı içermektedir. Kodon pozisyonları 1.+2.+3.+Kodlanmayan bölgeleri içermektedir. Evrimsel analizleri MEGA7'de (Kumar S., Stecher G. ve Tamura K., 2016) yapılmıştır.

Gen Bankası ve KÜHFL'den elde edilen *A. galleriae* türlerin haplotiplerini içeren türler evrimsel olarak en yakın tür olan *A. sergiocascentai* seçilerek MEGA7 programına aktarıldı ve 'find best models' seçeneği kullanılarak BIC (Bayesian Information Criterion) ve AICc (Akaike Information Criterion) kriterlerine göre en uygun baz değişim modeli tespit edildi.

Tablo 3. 9. *A. galleriae* türü için Tajima Nötralite Testinin sonuçları

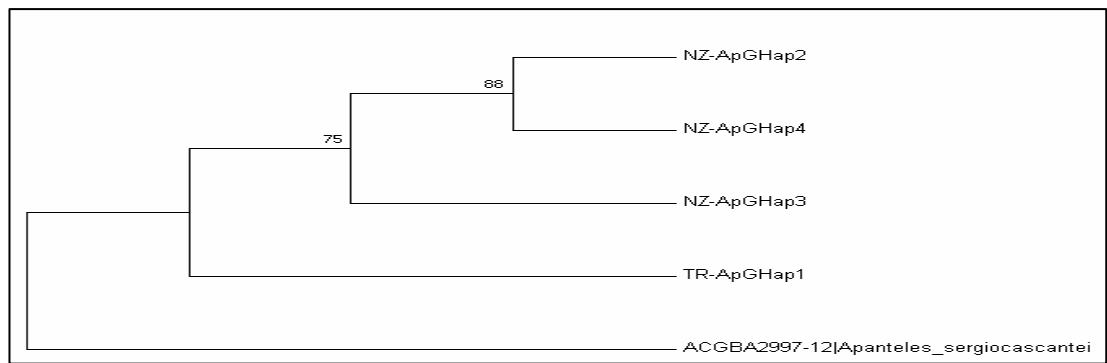
m	S	P_s	θ	π	D
4	6	0,009479	0,005170	0,005003	-0,314458

A. galleriae türüne ait örneklerin haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değeri MEGA7 programı ve Kimura2-Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanılarak incelendi. Tablo incelendiğinde, Tablo incelendiğinde *A. galleriae* haplotiplerinin tür içi en küçük uzaklık değeri %0,3 ile NZ-ApGHap4 ile TR-ApGHap1 arasında, en büyük uzaklık değeri ise %0,8 ile NZ-ApGHap2 ile TR-ApGHap1 arasında bulundu. D:0,005 (toplam ortalama) bulundu.

Tablo 3. 10. *Apanteles galleriae* türünün genetik uzaklık değerleri (%'lik)

	1	2	3	4
TR-ApGHap1	*			
NZ-ApGHap2	0,8	*		
NZ-ApGHap3	0,6	0,5	*	
NZ-ApGHap4	0,6	0,2	0,3	*

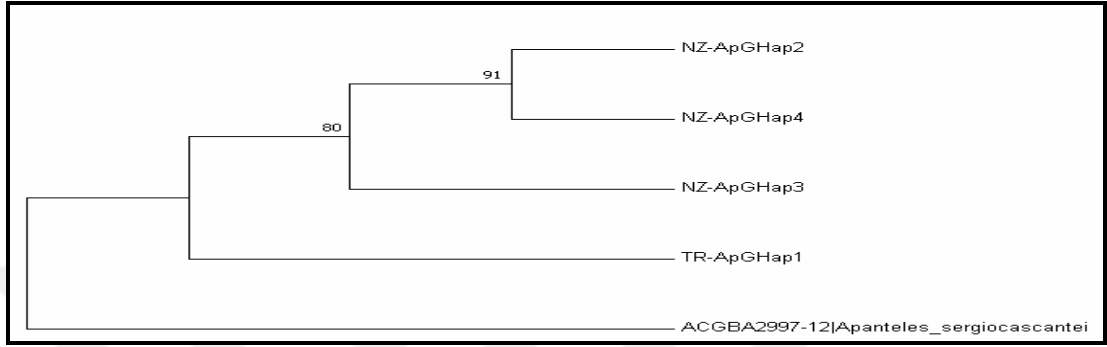
KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *A. galleriae* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (633 baz çifti), dış grup olarak *A. sergiocascentei* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve T92 baz değişim modeli ('find best models' analizini takiben bulunan baz değişim modeli olan T92) kullanılarak Maksimum Likelihood analizine tabi tutuldu. En yüksek log değeri -1101,29'dur. Analiz 5 nükleotid sekansı içermektedir. 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Maksimum Likelihood analizinin sonucunda: %88 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle NZ-ApGHap2 ve NZ-ApGHap4; %75 ile NZ-ApGHap3 ve TR-ApGHap1 birlikte gruplandı (Şekil 3.45'te gösterilmektedir).



Şekil 3. 35. *A. galleriae* türünün Maksimum Likelihood ağacı

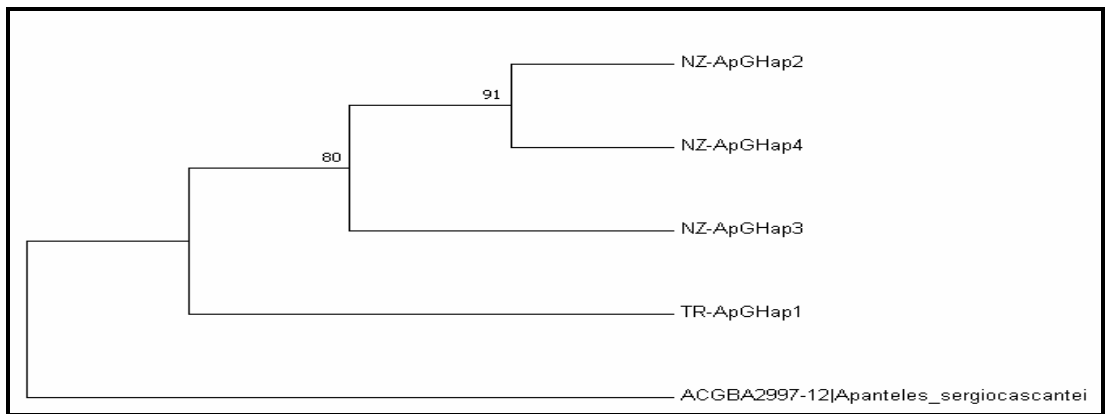
KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *A. galleriae* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (633 baz çifti), dış grup olarak *A. sergiocascentei* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve Kimura-2Parametre baz

değişim modeli seçilerek Neighbor-Joining analizine tabi tutuldu. Analiz 5 nükleotid sekansı içermektedir. 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Dal uzunluğu toplamı 0,11656108'dir. Neighbor-Joining analizinin sonucunda: %91 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle NZ-ApGHap2 ve NZ-ApGHap4; %80 ile NZ-ZpGHap3 ve TR-ApGHap1 birlikte gruplandı (Şekil 3.44'te gösterilmektedir).



Şekil 3. 36. *A. galleriae*'ye ait Neighbor-Joining ağacı

KÜHFL ve Gen Bankası'ndan elde edilen *A. galleriae* türünün 5 haplotip sekansı (mitokondriyal COI bölgesi) (633baz çifti), dış grup olarak *A. sergiocascentei* seçilerek MEGA7 programında, 10,000 bootstrap desteği ve Kimura-2Parametre baz değişim modeli seçilerek Minimum Evolution analizine tabi tutuldu. Analiz 5 nükleotid sekansı içermektedir. 1.+2.+3.+kodlanmayan bölgeler dahil edildi. Dal uzunluğu toplamı 0,11657090 ile en uygun ağaç gösterilmiştir. ME ağacı, 1 arama düzeyinde Yakın Çevre Değişim (CNI) algoritması kullanılarak arandı. Minimum Evolution analizinin sonucunda: %91 bootstrap (replikasyon) desteklenmesiyle NZ-ApGHap2 ve NZ-ApGHap4; %80 ile NZ-ZpGHap3 ve TR-ApGHap1 birlikte gruplandı (Şekil 3.45'te gösterilmektedir).



Şekil 3. 37. *A. galleriae*'ye ait çıkartılan Minimum Evolution ağacı

4. TARTIŞMA

Çalışmada elde edilen genomik DNA'ların mitokondriyal COI gen bölgesinin çıkartılması için Hebert ve diğ. (2003) ve Ratnasingham&Hebert'de (2007) yapılan çalışmalarda olduğu gibi evrensel folmer primerleri kullanıldı ve sekansdan gelen numunelerde 658 baz çifti uzunluğunda mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I'e ait gen elde edildi. Elde edilen gen bölgelerinin doğrulanması için Wu ve diğ. (2017)'deki çalışmaya göre BLAST analizi sonucunda örneklerin farklılıkları %1> olması gerekmektedir ve bu çalışmada bulunan değerler buna uymaktadır.

Daha önce bu çalışmayla benzer olarak Hymenoptera ve Hemiptera da yapılan bir çalışmada Schwarxfeld (2013), haplotip analizlerinde AT ve GC oranlarına bakılmış, yüksek AT oranı ve uzun homopolimer olmalarından dolayı, ampikonların dizilenmesinde zorluklar oluşmuş, bu zorlukların primer setleri ve hedef bölge arasında uyumsuzluklara sebep olduklarını saptamıştır. Bunun sonucu olarak analiz ağaçları üzerinde dağılımın net bir şekilde ayrışmamasına ve polimorfik bölgelerinin oluşmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında yapılan analizlerde Hymenoptera'ya ait türlerin analizlerinde çıkan ağaçların dallanmalarında ayrışmaların oluşmamasının sebebini desteklemektedir. Yine bu çalışmadaki balmumu güveleri ve parazitoidlerinin analizlerinde ortaya çıkan AT oranının yüksek ve GC oranının düşük çıkması Schwarxfeld'in çalışmasına göre pseudogenden ziyade mitokondriyal genlerin elde edildiğini desteklemektedir.

Fu (1996)'nın yaptığı bir araştırmanın sonucunda Tajima nötralite testinin D değerinin 0'a yakın olması beklenmektedir ve eğer değer negatifse pozitif seleksiyon ve popülasyon büyümesini gösterdiği bulunmuştur. Bu tezdeki haplotip analizlerinin hepsinin sonucunda Tajima D değerlerinin negatif çıkması popülasyon içinde genetik değişikliklerin olduğunu gösterdi.

Haplotip analizlerinde ortalama uzaklık değerleri (d) incelendiğinde *G. mellonella*'nın %0,7, *A. grisella*'nin %1,4, *P. turionellae*'nin %2,6, *H. hebetor*'un %4,2 ve *A. galleriae*'nin %0,5 olarak bulundu. Bu değerler karşılaştırıldığında

parazitoid olan *P. turionella* ve *H. hebetor*'un haplotipleri arasında genetik çeşitliliğin daha yüksek olduğunu görüyoruz. Bunun sebebi olarak, bu türlerin fazla konak çeşitliliğine ve yüksek ekolojik toleransa sahip olması düşünülmektedir. *P. turionellae* erken larva, larva ve pupayı parazitleyebildiği için konağa bağlı olarak evrimsel süreçte genetik farklılaşmaları olması muhtemeldir ve Ko-evrimi desteklemektedir. Soydabaş ve diğ., (2017) çalışmasında *P. turionellae*'nin konaklarının COI gen bölgesine bağlı filogenetiği çalışılmış ve bu konakların genetik olarak birbirlerine yakın oldukları tespit edilmiştir. Parazitoidler arasında farklı olan *A. galleria* ise erken larva parazitoidi olmasından kaynaklı sadece 4 türü parazitleyebilmektedir. Bu da evrimsel süreçte bu canlının daha düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğunu desteklemektedir.

Nei ve Tajima'nın (1981) ve Jobling ve diğ. (2004) çalışmalarına göre Haplotip Çeşitlilik 1'e ne kadar yakın çıkarsa, çeşitlenmenin o kadar çok olduğunu bulmuştur. Bu tez çalışması da incelendiğinde *G. mellonella* ve *A. grisella*'nın 1'e yakınlığı onların parazitoidleri olan *P. turionellae*, *H. hebetor* ve *A. galleriae*'ye göre daha düşük olarak bulundu. Parazitoid türlerin evrimsel süreçte konaklarına kıyasla daha fazla genetik olarak çeşitlendiği tespit edildi.

Hedrick, (2005) çalışmasında tür ve cins düzeylerinde yüksek bootstrap değerlerinin (1,000-10,000) kullanılmasının önemli olduğunu vurgulamıştır ve bu tez çalışmasındaki yüksek bootstrap değerleriyle topolojilerin doğruluğu desteklenmiş oldu. Yine Hedrick, (2005) çalışmasına ve Freeman ve Herron (2007)'a bakıldığında, Hedrick Maksimum Parsimoni analizinin sadece tür düzeyindeki evrimsel hızı yavaş ve kısa dallanmalarda işe yaradığını bulmuştur. Bu tez çalışmasındaki analizlerin hepsi karşılaştırıldığında sadece tür düzeyindeki MP ağacı NJ ve ML ile karşılaştırıldığında neredeyse tamamen aynı çıkmış, ancak daha kalabalık olan cins, alt Aile ve alt takım düzeylerinde farklılıklar göstermesinin sebebinin uzun dallanmalar olduğu destekledi.

Ağaçlar incelendiğinde, *A. grisella*, *G. mellonella*, *T. fructicassella* ve *A. fulminalis* türleri bütün ML-NJ ve ME ağaçlarında parafilatik dallanma gösterdiler. Bu 4 türün parazitoidleri incelendiğinde, alt takım analizlerinde hep birbirine yakın dallanan *P. turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) ve *A. galleriae* (Hymenoptera:

Braconidae) türlerinin parazitoidleri olan *A. grisella* ve *G. mellonella* türleri cins, alt Aile analizlerinde hep monofiletik dallanma gösterdi. Buna ek olarak *T. fructicassiella*'nın parazitoidlerini kapsayan Bethylidae Ailesi, alt takım ağaçlarında hep Ichneumonidae ve Braconidae ile monofiletik dallanma gösterdi. Buna yine ek olarak, *A. fulminalis*'in parazitoidi olan *Apanteles megathymi*, *A. galleriae* ile aynı cinse mensup olmaktadır. Bu durumda konaklar ve onların parazitoidlerinin kendi içlerinde hep yakın dallanmalar göstermiş olduğu görüldü. *A. megathymi*'nin Gen Bankası'nda COI gen bölgesine ait veri bulunmadığı için *Apanteles* cinsine dahil edilemedi. Ancak bu konaklar ile parazitoidlerinin benzer dallarda dallanmaları bu türünde *A. galleriae* ile yakınlığının fazla olduğunu düşündürmektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

G. mellonella, *A. grisella*, *A. galleriae*, *P. turionellae* ve *H. hebetor* türlerinin KÜHFL'den ve Yalova'dan elde edilen örnekleri DNA izolasyon işlemine tabi tutuldu. 5 türün DNA izolasyon işleminin sonucunda genel olarak elde edilen DNA saflık oranları, 260/280 nm ölçümünün sonucunda 1,8-2 arasında ve 260/230 nm ölçümünün sonucunda da 2-2,2 arasında olduğu tespit edildi. Elde edilen DNAlar PZR işlemine tabi tutuldu ve ardından jelde yürütülüp miktarlarına bakıldıktan sonra sekansa yollandı. Sekansdan gelen örnekler BLAST analizine tabi tutuldu ve örneklerin tür teşhisleri %98-99.6 oranlarında olduğu bulundu.

BLAST analizleri yapılan 5 türün BOLD Taxonomy ve NCBI'dan (National Center For Biotechnology Information) aynı türlerin diğer COI gen bölgesi fasta dosyaları kullanılarak KÜHFL ve Yalova'dan elde edilen örneklerin dünya üzerindeki en yakın akrabaları, haplotip analizleri yapılarak belirlendi. Haplotip analizlerinin sonucunda *G. mellonella* için D:-0,9372, HD: 0,7521 ve d: 0,007; *A. grisella* için D:-0,385836, HD:0,8842 ve d: 0,014; *P. turionellae* için D:-1,486140, HD:0,952 ve d:0,026; *H. hebetor* için D:-0,020072, HD:1 ve d:0,042; *A. galleriae* için D:-0,314458, HD:1 ve d:0,005 olarak bulundu. Yine haplotip analizleri sonucunda Tür içi analizlerde, *G. mellonella*'nın en yakın akrabası Kanada-GU091133.1, *A. grisella*'nın en yakın akrabası Finlandiya-KX041272.1, *P. turionellae*'nin en yakın akrabası Kanada-KR791223.1, *A. galleriae*'nin en yakın akrabası Yeni Zellanda-JQ853455.1 ve *H. hebetor*'un en yakın akrabası Kanada-KR890305.1 olarak tespit edildi.

ML, NJ ve ME analizlerinde tür ve cins düzeylerinde 10,000 bootstrap, alt aile ve alt takım düzeyindeki analizlerde 1,000 bootstrap değeri kullanıldı. Bu değerler yeterli olmakla beraber, alt aile ve alt takım düzeyinde yapılacak analizlerde 1,000 üzerinde değerler kullanılarak topolojilerinin güvenilirlikleri artırılabilir.

Alt takım düzeyindeki filogenetik analizlerde, Apocrita alt takımı için: dış grup olarak Multilidae kullanıldı, ML-ME-NJ ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi. Ichneumonidae bütün ağaçlarda Trigonalidae ile monofilatik ya da parafilatik

dallanma gösterdi. Braconidae ise Figitidae ile monofiletik ya da parafilatik dallanma gösterdi.

Alt takım düzeyindeki filogenetik analizlerde, Apocrita alt takımı için: dış grup olarak Mutilidae kullanıldı, ML-ME-NJ ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi. Ichneumonidae bütün ağaçlarda Trigonalidae ile monofiletik dallanma gösterdi, Braconidae ise Figitidae ile hep monofiletik ya da parafilatik dallanma ile birlikteydi.

Alt aile düzeyindeki filogenetik analizlerde Galleriinae alt ailesi için: dış grup olarak *Adela aethiops* kullanıldı ve ML-ME ağaçlarında dış grup ayrı köken aldı. Galleriinae alt ailesi üyeleriyle yapılan analizler sonucunda *Galleria* cinsine en yakın cins *Achroia* olarak bulundu ve yüzden de *G. mellonella* türünün en yakın olduğu tür *A. grisella* olarak tespit edildi. Pimpliinae alt Ailesi için: dış grup olarak *S. astrarches* kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları benzerlik gösterdi. Pimpliinae alt ailesinde yapılan analizlerin sonucunda *Pimpla* ve *Tromatobia* cinslerinin birbirlerine en yakın cinsler oldukları tespit edildi. Braconinae alt Ailesi için: dış grup *Mutilidae* sp. kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi, ancak dış grup, *Compsobracon* ile parafilatik dallanma gösterdi. Braconinae alt ailesinin analizlerinin sonucunda *Habrobracon* ve *Simplibracon* cinslerinin birbirlerine en yakın cinsler oldukları tespit edildi. Microgastriinae alt Ailesi için: dış grup olarak *Mutilidae* sp. kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi. Microgastriinae alt Ailesinin analizlerinin sonucunda *Apanteles* ve *Paroptilis* cinslerinin birbirlerine en yakın cinsler oldukları tespit edildi.

Cins düzeyinde yapılan filogenetik analizlerde *Galleria*, *Achroia* ve *Habrobracon* cinslerinin sadece tek bir üyesi olduğu için, analizleri yapılamadı. *Pimpla* cinsi için: dış grup olarak *Scambus astrarches* kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları benzerlik gösterdi. *Pimpla* cinsi içerisinde *P. turionellae* türüne en yakın tür *P. pedalis* olarak bulundu. *Apanteles* cinsi için: dış grup olarak *Ampulicidae* sp. kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları birbiriyle benzerlik gösterdi, ancak MP ağacında dış grup *A. feltiae* ile parafilatik dallanma ile eşleşme gösterdi. *Apanteles* cinsi içerisinde *A. galleriae* W'a en yakın tür *A. rolandovegai* olarak tespit edildi. Tür düzeyindeki filogenetik analizlerde, *G. mellonella* türü için: dış grup olarak *A. grisella* kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları benzerlik gösterdi, ancak MP ağacında dış grup TR-GMHap5 ile

parafilatik dallanma gösterdi. *A. grisella* türü için dış grup olarak *G. mellonella* kullanıldı ve ML ağacının dışında dış grup sırasıyla NJ'de FIN-AcGHap7 ile, ME'de FIN-AcGHap6 ile ve MP'de ise FIN-AcGHap7 ile monofiletik dallanma gösterdi. *P. turionellae* türü için: dış grup olarak *P. pedalis* kullanıldı ve ML-NJ-Me ağaçları benzerlik göstermekteydi. Parsimoni içeren bölge tespit edilemediği için MP analizi yapılamadı. *H. hebetor* türü için: dış grup olarak *Simplibracon* sp. kullanıldı, Türkiye örnekleri Rusya ile aynı dalda eşleşme gösterirken diğer ülkelerin örnekleri ayrı bir dallanma gösterdi ve bu iki ülkeninkinden %6 civarında genetik farklılık gösterdi ve ML-NJ-ME ağaçları benzerlik gösterdi. *A. galleriae* türü için: *A. sergiocascentei* kullanıldı ve ML-NJ-ME ağaçları benzerlik gösterdi.

Yapılan tez çalışmasıyla elde edilen verilerle, bu türlerin Türkiye örneklerinin daha önce mitokondriyal COI bölgesi analizine dayalı bilidirimi yapılmadığı için ileride bal mumu güveleri ve onların parazitoidlerinin üzerinde yapılacak olan biyolojik kontrol, evrimsel, filogenetik ve taksonomik çalışmalarında son derece yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

Alvarez J., Hoy M., Evaluation of The Ribosomal ITS2 DNA Sequences in Separating Closely Related Populations of The Parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 2002, **95**(2), 250-256.

Armstrong K. F., Ball, L., DNA Barcodes for Biosecurity: Invasive Species Identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2005, **360**(1462), 1813-1823.

Asghar U., DNA Extraction From Insects by Using Different Techniques: a Review, *Advances in Entomology*, **304**(2015), 132.

Baer C., Ball, Phylogeography of a Parasitoid Wasp (*Diaeretiella Rapae*): No Evidence of Host- Associated Lineages, *Molecular Ecology*, 2004, **13**(7), 1859-1869.

Ball, L., Armstrong K. F., DNA Barcodes for Insect Pest Identification: a Test Case With Tussock Moths (Lepidoptera: Lymantriidae), *Canadian Journal of Forest Research*, 2006, **36**(2), 337-350.

Barracough, Timothy G.; Vogler, Alfred P., Recent Diversification Rates in North American Tiger Beetles Estimated From a Dated mtDNA Phylogenetic Tree, *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**(10), 1706-1716.

Bergsten, Johannes, The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding, *Systematic Biology*, 2012, **61**(5), 851-869.

Bin, Ferdinando, Tyloids in *Pimpla Turionellae* (L.) Are Release Structures of Male Antennal Glands Involved in Courtship Behaviour (Hymenoptera: Ichneumonidae), *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1999, **28**(1), 61-68.

Brandt, L. S. E.; Greenfield, Condition- Dependent Traits and The Capture of Genetic Variance in Male Advertisement Song, *Journal of evolutionary Biology*, 2004, **17**(4), 821-828.

Clayton, Dale H., Johnson, Kevin P., Linking Coevolutionary History to Ecological Process: Doves and Lice, *Evolution*, 2003, **57**(10), 2335-2341.

Çetinkaya E., Kamuran A, Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi*, 2012, **2**(1), 53-62.

Danielson A., Kelly M., Greenfield J. K., Genotype Environment Interaction for Male Attractiveness in an Acoustic Moth: Evidence for Plasticity and Canalization, *Journal of Evolutionary Biology*, 2006, **19**(2), 532-542.

Derocles S., Molecular Analysis Reveals High Compartmentalization in Aphid–Primary Parasitoid Networks and Low Parasitoid Sharing Between Crop and Noncrop Habitats, *Molecular Ecology*, 2014, **23**(15), 3900-3911.

Ellis D.; Graham, Jason R.; Mortensen A., Standard Methods for Wax Moth Research, *Journal of Apicultural Research*, 2013, **52**(1), 1-17.

Ergin E., Effect Of Cypermethrin Exposed Hosts on Egg-Adult Development Time, Number of Offspring, Sex Ratio, Longevity, And Size of Apanteles Galleriae Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae), *Belgian Journal of Zoology*, 2007, **137**(1), 27.

Fallahzadeh M., Checklist of Braconidae (Insecta: Hymenoptera) From Iran, *Munis Entomology & Zoology*, 2010, **5**(1), 170-186.

Gaunt, Michael W.; Miles, Michael A., an Insect Molecular Clock Dates The Origin of The Insects and Accords with Palaeontological and Biogeographic Landmarks, *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**(5), 748-761.

Ghahari H., A Contribution to The Agathidinae, Alysinae, Aphidiinae, Braconinae, Microgastrinae and Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) From Cotton Fields and Surrounding Grasslands of Iran, *Linzer Biologische Beiträge*, 2011, **43**(2), 1269-1276.

Goldberg, Susanne M., A Sanger/Pyrosequencing Hybrid Approach for The Generation of High-Quality Draft Assemblies of Marine Microbial Genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**(30), 11240-11245.

Grada A., Weinbrecht K., Next-Generation Sequencing: Methodology and Application, *J Invest Dermatol*, 2013, **133**(8), e11.

Greenfield, Michael D., Moth Sex Pheromones: an Evolutionary Perspective, *The Florida Entomologist*, 1981, **64**(1), 4-17.

Güz N., Kılınçer N., Böcek Sistematiğinde Moleküler Markörlerin Kullanımı, *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 2012, **2**(2), 125-145.

Hajibabaei, Mehrdad, a Minimalist Barcode Can Identify a Specimen Whose DNA Is Degraded, *Molecular Ecology Resources*, 2006, **6**(4), 959-964.

- Harvey, Jeffrey A., Michael R., Strand., The Developmental Strategies of Endoparasitoid Wasps Vary With Host Feeding Ecology, *Ecology*, 2002, **83**(9), 2439-2451.
- Hebert P., A DNA 'Barcode Blitz': Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection, *PLoS One*, 2013, **8**(7), e68535.
- Hebert P., Biological Identifications Through DNA Barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2003, **270**(1512), 313-321.
- Hebert P., DNA Barcodes For 1/1000 of The Animal Kingdom, *Biology letters*, 2010, **6**(3), 359-362.
- Hebert, Paul DN, Alina Cywinska, Shelley L., Ball., Biological Identifications Through DNA Barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2003, **270**(1512), 313-321.
- Hebert, Paul DN., Counting Animal Species With DNA Barcodes: Canadian Insects, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2016, **371**(702), 20150333.
- Hilszczański, Jacek., The Effect of Pesticides Applied Aerially to Forest Stands on Four Species of Native Hymenopterous Parasitoids, *Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects*, 1998, **116**(247)-121.
- Hogg, Ian D.; Hebert P., Biological Identification of Springtails (Hexapoda: Collembola) From The Canadian Arctic, Using Mitochondrial DNA Barcodes, *Canadian Journal of Zoology*, 2004, **82**(5) 749-754.
- Janzen, Hebert., Integration of DNA Barcoding Into an Ongoing Inventory of Complex Tropical Biodiversity, *Molecular Ecology Resources*, 2009, **9**(1), 1-26.
- Jin-Kyung C., Song G.; Lee J., Review of The Genus *Apechthis* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) From South Korea, *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 2015, **31**(2), 77.
- Jinbo U., Toshihide K., Motomi I., "Current Progress in DNA Barcoding and Future Implications For Entomology, *Entomological Science*, 2011, **14**(2), 107-124.
- Kolarov J.; Gürbüz M. F., New Data on The Structure Of The Flagellum in Males of Perithous Divinator (Rossi)(Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae), *Acta Entomologica Serbica*, 2007, **12**(59), 59-66.
- Kwadha C. A., The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*, *Insects*, 2017, **8**(2), 61.

Leite L., Mitochondrial Pseudogenes in Insect DNA Barcoding: Differing Points of View on The Same Issue, *Biota Neotropica*, 2012, **12**(3), 301-308.

Leppäkoski, Erkki, The Baltic a Sea of Invaders, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2002, **59**(7), 1175-1188.

Logan, Jesse A., Régnière J., Powell J. A., Assessing The Impacts of Global Warming on Forest Pest Dynamics, *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2003, **1**(3), 130-137.

Metzker, Michael L., Sequencing Technologies—The Next Generation, *Nature reviews Genetics*, 2010, **11**(1), 31-46.

Mighell A. J., Vertebrate Pseudogenes, *FEBS Letters*, 2000, **468**(2-3), 109-114.

Mutanen M., Species-Level Para-and Polyphyly in DNA Barcode Gene Trees: Strong Operational Bias in European Lepidoptera, *Systematic Biology*, 2016, **65**(6), 1024-1040.

Nurullahoğlu Z., Ülya S., *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larva ve Pupunun Yağ Asidi Bileşimi, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 2003, **1**(21), 75-78.

Otten H., Efficiency of Vibrational Sounding in The Parasitoid *Pimpla turionellae* is Affected by Female Size, *Animal Behaviour*, 2001, **61**(3), 671-677.

Otten H., Wäckers F., Battini M., Dorn S., Efficiency of Vibrational Sounding in The Parasitoid *Pimpla turionellae* Is Affected by Female Size, *Animal Behaviour*, 2001, **61**(3), 671-677.

Papadopoulou A., Anastasiou I., Vogler A. P., Revisiting The Insect Mitochondrial Molecular Clock: The Mid-Aegean Trench Calibration, *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **27**(7), 1659-1672.

Piotrowska, Monika., The Theoretical Costs of DNA Barcoding, *Biological Theory*, 2009, **4**(3), 235-239.

Pschorn-Walcher, Hubert, Biological Control of Forest Insects, *Annual Review of Entomology*, 1977, **22**(1) 1-22.

Quicke D., Linneus J., Host Location Behaviour and a New Host Record For *Gabunia* Aff. *Togoensis* Krieger (Hymenoptera: Ichneumonidae: Cryptinae) in Kibale Forest National Park, West Uganda, *African Entomology*, 2003, **11**(2), 308-310.

Richards, Elaine H.; Parkinson, Neil M., Venom From The Endoparasitic Wasp *Pimpla Hypochondriaca* Adversely Affects The Morphology, Viability, and Immune Function of Hemocytes From Larvae of The Tomato Moth, *Lacanobia Oleracea*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, **76**(1), 33-42.

Roe, Amanda D., Felix A., Patterns of Evolution of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase I and II DNA and Implications for DNA Barcoding, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **44**(1), 325-345.

Sak O., Uçkan F., Ergin E., Effects of Cypermethrin on Total Body Weight, Glycogen, Protein, and Lipid Contents of *Pimpla turionellae* (L.)(Hymenoptera: Ichneumonidae), *Belgian Journal of Zoology*, 2006, **136**(1), 53.

Seyhan D., Turan C., DNA Barcoding of Scombrid Species in The Turkish Marine Waters, *DNA*, 2016, **22**(1).

Smith A., M., DNA Barcoding and The Taxonomy of Microgastrinae Wasps (Hymenoptera, Braconidae): Impacts After 8 Years and Nearly 20,000 Sequences, *Molecular Ecology Resources*, 2013, **13**(2), 168-176.

Smith M., Alex, Wolbachia and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems, *Plos One*, 2012, **7**(5), e36514.

Snedden W., Tosh, Colin R., Ritchie, Michael G., The Ultrasonic Mating Signal of The Male Lesser Wax Moth, *Physiological Entomology*, 1994, **19**(4), 367-372.

Uçkan F., Morphology of The Reproductive Tract and Ovariole Histology of *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on Two Host Species, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2003, **6**(16), 1389-1395.

Van M., Hanny, A Phylogenetic Tree of Nematodes Based on About 1200 Full-Length Small Subunit Ribosomal DNA Sequences, *Nematology*, 2009, **11**(6), 927-950.

Virgilio, Massimiliano, Comparative Performances of DNA Barcoding Across Insect Orders, *BMC Bioinformatics*, 2010, **11**(1), 206.

Virgilio, Massimiliano, Identifying Insects With Incomplete DNA Barcode Libraries, African Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) As A Test Case, *PLoS One*, 2012, **7**(2), e31581.

Von B., Andreas, Next-Generation Sequencing: The Race Is On, *Cell*, 2008, **132**(5), 721-723.

Vrijenhoek R., DNA Primers For Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I From Diverse Metazoan Invertebrates, *Molecular marine biology and biotechnology*, 1994, **3**(5), 294-299.

Whitfield, James B., Review of The Apanteles Species (Hymenoptera: Braconidae) Attacking Lepidoptera in Bombus (Fervidobombus)(Hymenoptera: Apidae) Colonies In The New World, With Description of A New Species From South America, *Annals of the Entomological Society of America*, 2001, **94**(6) 851-857.

Whitworth T. L., DNA Barcoding Cannot Reliably Identify Species of The Blowfly Genus Protocalliphora (Diptera: Calliphoridae), *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2007, **274**(1619), 1731-1739.

Wilson K., The Complete Sequence of The Mitochondrial Genome of The Crustacean Penaeus Monodon: Are Malacostracan Crustaceans More Closely Related To Insects Than To Branchiopods, *Molecular Biology and Evolution*, 2000, **17**(6), 863-874.

Zaitoun, Shahera T., The Effect of Different Mediterranean Plant Extracts on The Development of The Great Wax Moth *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae) And Their Toxicity To Worker Honeybees *Apis Mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions, *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2007, **5**(2), 289.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Soydabaş H., Uçkan F., **Nogaylar B.**, Preliminary Phylogenetic Analysis of Hosts of *Pimpla turionellae* Based on Cytochrome Oxidase I, *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, Belarus, 5-8, July 2017.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında K.K.T.C Lefkoşa'da doğdu. İlköğretimini Kuzey Kıbrıs'ta tamamladı. Orta öğretim ve liseyi İstanbul'da tamamladı. 2010 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2016 yılında Kocaeli Üniversitesi tarafından verilen kısmi asistanlık bursunu aldı.

