

**T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SYMPHYTA (HYMENOPTERA: INSECTA)
ÜYELERİNDE ÇEKİRDEK RİBOZOMAL DNA (çrDNA) ITS2
BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Murat GÜLER
(2012FEY014)**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŞIBÜYÜK

**SİVAS
AĞUSTOS 2015**

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, TÜBİTAK 113Z753 no.lu araştırma projesi ve Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-393 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© MURAT GÜLER, 2015

Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

10/08/2015

Murat GÜLER

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana öneren ve her aşamasında desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Hasan H. Başıbüyük'e teşekkür ederim. Verinin üretilmesi ve analizi sırasında sınırsız destek sunan Yrd. Doç. Dr. E. Mahir Korkmaz ve Yrd. Doç. Dr. Mahir Budak'a teşekkür ederim.

Tez kapsamında örnek teminindeki katkılarında dolayı Dr. Gavin Broad (Orussidae: *Ophrella eldorado*) ve Dr. Martha Mahlangu (Siricidae: *Sirex noctilio*)'ya teşekkür ederim.

Çalışmanın teşhis aşamasında yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sevda Hastaoğlu Örgen'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında hiçbir desteğini esirgemeyen Filiz Tokgöz'e teşekkür ederim.

Çalışma kapsamında laboratuvar çalışmaları ve verilerin analizindeki katkılarından dolayı CUMSAG ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında sıcak bir ortam sağlayan Arş. Gör. Dr. Ergün Kasaka, Arş. Gör. Mahir Yıldırım ve Birol Çiçek'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış, sabır, kesintisiz maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme teşekkür ederim.

ÖZET

**SYMPHYTA (HYMENOPTERA: INSECTA)
ÜYELERİNDE ÇEKİRDEK RİBOZOMAL DNA (çrDNA) ITS2
BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI**

MURAT GÜLER

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan H. BAŞIBÜYÜK

2015, xiv+92 sayfa

Biyçeşitliliğin korunmasında ilk adım türlerin teşhisi ve adlandırılmasıdır. Ancak geleneksel yöntemler birçok nedenle yetersiz kalmış ve bu soruna bir çözüm olarak açığa çıkan DNA barkodlama yaklaşımı son yıllarda kabul görmüştür. Ancak hayvan gruplarında DNA barkodlama aracı olarak kullanılan *COI* geninin doğasından kaynaklanan bazı kısıtlamalar nedeni ile barkodlama çalışmalarından alternatif belirteçlerin barkodlama yaklaşımlarına kazandırılması gerekmektedir. Bu anlamda son yıllarda ITS2 (internal transcribed spacer 2) bölgesi alternatif bir DNA barkodlama aracı olarak önerilmiştir. ITS2 bölgesi yalnızca nükleotid dizisi ile değil aynı zamanda oluşturduğu ikincil yapı motifleriyle de taksonomik bilgi sunmaktadır. Ancak farklı yaşam stratejileri ve evrimleşme hızına sahip gruplar içeren Symphyta alttakımında ITS2 bölgeleri hakkında bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Symphyta alttakımından 10 familya ve 78 türü kapsayan 180 örnek kullanılarak ITS2 bölgelerinin primer nükleotid dizisi ve ikincil yapı verisi aracılığıyla DNA barkodlama bir araç olarak test edilmiştir. Aynı zamanda Symphyta alttakımı ITS2 bölgelerinin ikincil yapıları oluşturularak karakterize edilmiştir ve korunmuş dizi motifleri açığa çıkarılmıştır. Sonuç olarak ITS2 bölgesinin Symphyta üyelerinde başarılı bir DNA barkod aracı olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Symphyta, DNA barkodlama, ITS2, İkincil yapı

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NUCLEAR RIBOSOMAL DNA ITS2 REGION IN THE MEMBER OF SYMPHYTA (HYMENOPTERA: INSECTA)

MURAT GÜLER

Master of Science Thesis

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hasan H. BAŞIBÜYÜK

2015, xiv+92 pages

The first step in conservation of biodiversity is identification and naming of the species. However, the traditional methods are inappropriate for many reasons and the recent barcoding approaches have been recognized as a possible solution for the problem. Since there are some limitation of *COI* as a barcoding tool because of the nature of the gene, it is necessary to search for alternative barcoding markers. In this scope, ITS2 (internal transcribed spacer 2) region has been suggested to be an alternative barcoding tool in recent years. The ITS2 region provides taxonomic information not only for its nucleotide sequences but also for its secondary structure motif. However, our knowledge on ITS2 region Symphyta is very limited, a suborder including groups with different evolutionary rate and life strategies. Here, the utility of ITS2 region as a barcoding tool is tested by generating nucleotide sequence and secondary structure information of the region in 180 specimens from 78 species belonging to 10 families of Symphyta suborder. Moreover, the secondary structure of ITS2 in Symphyta is characterized and the conserved sequences motives are identified. As a result, the ITS2 region is suggested to be a relevant barcoding tool in Symphyta.

Key words: Symphyta, DNA barcoding, ITS2, Secondary structure

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Symphyta Alttakımı	5
1.2 DNA Barkodlama	7
1.3 ITS2 Bölgesi	9
1.3.1 ITS2 Bölgesinin Evrimi ve Kökeni	11
1.3.2 ITS2 Bölgesinin İkincil Yapısı	12
2. MATERYAL ve METOT	16
2.1 Örneklerin Toplanması ve Çalışmaya Dahil Edilmesi	17
2.2 DNA İzolasyonu	19
2.3 ITS2 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çoğaltılması	20
2.4 ITS2 Bölgesinin Dizilenmesi ve Dizilerin Düzeltilmesi	21
2.5 ITS2 Bölgesinin Sınırlarının Belirlenmesi (Annotation)	22
2.6 ITS2 Bölgesinin Barkod Aracı Olarak Sınanması	23
2.7.1 Nükleotid Dizisi Tabanlı Analizler	23
2.7.2 İkincil Yapı Tabanlı Analizler ve İkincil Yapıların Karakterizasyonu	23
3. BULGULAR	25
3.1 Laboratuvar Çalışmaları	25
3.2 ITS2 Bölgelerinin Uzunluğu ve Nükleotid Kompozisyonları	28
3.3 Barkod Aracı Olarak ITS2 Bölgesi	32
3.3.1 Primer Nükleotid Dizisi Kullanılarak Gerçekleştirilen Analizler	32
3.3.2 İkincil Yapılar Kullanılarak Gerçekleştirilen Analizler	45
3.4 Symphyta Alttakımı ITS2 İkincil Yapıları ve Korunmuş Dizi Motifleri	60
3.4.1 Familya Düzeyinde İkincil Yapılar ve Korunmuş Yapılar	60
3.4.2 Symphyta Alttakımında Korunmuş ITS2 Dizi Motifleri	69
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1	Apocrita (soldaki) ve Symphyta (sağdaki) alttakımlarına ait temsili türlerin genel görünümü, ok ile abdomen-toraks arasındaki incelme gösterilmiştir ..	6
Şekil 1.2	Nükleer çrDNA üzerinde ITS2 bölgesinin konumu	10
Şekil 1.3	Prokaryotik ve ökaryotik rDNA genleri	12
Şekil 1.4	Coleman (2007), ökaryotik ITS2 genel yapısı ve korunmuş motifleri	13
Şekil 1.5	ITS2 ikincil yapısı üzerinde CBC ve Hemi-CBC'ler	14
Şekil 2.1	Çalışmada gerçekleştirilen aşamalar ve gerçekleştirilen analizlerin özeti...	16
Şekil 2.2	Argidae familyası türlerinin ITS2 PZR ürünleri	21
Şekil 2.3	<i>Aglaostigma aucupariae</i> türüne ait ITS2 kromotogram görüntüsü	22
Şekil 2.4	ITS2 veri tabanında ham dizilerin sınırların belirlenmesi	22
Şekil 2.5	Cimbicidae türlerine ait .xfasta dosyası	24
Şekil 3.1	Cephidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı.....	34
Şekil 3.2	Argidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı	35
Şekil 3.3	Cimbicidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı ..	36
Şekil 3.4	Allantinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı	38
Şekil 3.5	Nematinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı	39
Şekil 3.6	Tenthredininae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı	41
Şekil 3.7	Selandriinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı	42
Şekil 3.8	Tüm Symphyta türlerinin dahil edildiği NJ ağacı.....	44
Şekil 3.9	Cephidae familyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı	46
Şekil 3.10	Cephidae familyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı	46
Şekil 3.11	Argidae familyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı	48
Şekil 3.12	Argidae familyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı	49
Şekil 3.13	Allantinae altfamilyasının CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı	52
Şekil 3.14	Allantinae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı.....	53
Şekil 3.15	Nematinae ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı	54
Şekil 3.16	Tenthredininae altfamilyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı	56
Şekil 3.17	Tenthredininae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı	57
Şekil 3.18	Selandriinae altfamilyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı .	58
Şekil 3.19	Selandriinae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı .	58
Şekil 3.20	Tüm türler dahil edilerek oluşturulan PNJ ağacı	59
Şekil 3.21	Argidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	61
Şekil 3.22	Cephidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	62
Şekil 3.23	Cimbicidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	63
Şekil 3.24	Tenthredininae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri	64

Şekil 3.25	Allantinae ve Blennocampinae altfamilyasını ait olan türlerin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	66
Şekil 3.26	Nematinae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	67
Şekil 3.27	Selandriinae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	68
Şekil 3.28	Diğer Symphyta familyaları ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri.....	69
Şekil 3.29	Symphyta alttakımdan iki familyaya ait korunmuş ITS2 bölgeleri.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1	Symphyta alttakımı oluşturan üstfamilyalar ve familyalar, † fosil kayıt ..	6
Çizelge 2.1	Proje kapsamında kullanılan türler.....	18
Çizelge 2.2	GenBank veri tabanında alınarak çalışmaya dahil edilen türler.....	19
Çizelge 3.1	DNA konsantrasyonları, A260/280 oranları	27
Çizelge 3.2	PZR aşamasında kullanılan primerler (+/- başarılı/başarısız).....	28
Çizelge 3.3	ITS2 bölgelerinin uzunluğu ve nükleotid kompozisyonları.....	31
Çizelge 3.4	Tür içi genetik uzaklık analizleri.....	33
Çizelge 3.5	Cephalidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri	34
Çizelge 3.6	Argidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri	35
Çizelge 3.7	Cimbicidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri.....	36
Çizelge 3.8	Allantinae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri	37
Çizelge 3.9	Nematinae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri.....	39
Çizelge 3.10	Tenthredininae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri.....	40
Çizelge 3.11	Selandriinae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri	42
Çizelge 3.12	Cephalidae familyası CBC tablosu	45
Çizelge 3.13	Argidae familyası CBC tablosu	47
Çizelge 3.14	Cimbicidae familyası CBC tablosu.....	49
Çizelge 3.15	Allantinae altfamilyası türleri CBC tablosu.....	51
Çizelge 3.16	Tenthredininae altfamilyası türlerinin CBC tablosu	55
Çizelge 3.17	Selandriinae altfamilyası türleri CBC tablosu.....	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

-	Tire
-	Eksi
%	Yüzde
%GC	Yüzde guanin-sitozin
+	Artı
µl	Mikro litre
A	Adenin
A260	260 nm dalga boyunda absorban değeri
A280	260 nm dalga boyunda absorban değeri
bç.	Baz çifti
BIONJ	BIO komşu bağlama
C	Sitozin
cm	Santimetre
COI	Sitokrom c oksidaz I
dk	Dakika
ECCUS	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Entomoloji Koleksiyonu
EtOH	Etanol
g	Yerçekim birimi
G	Guanin
ITS2	Internal transcribed spacer 2
KCl	Potasyum klorür
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
ng/µl	Nanogram/Mikrolitre
NJ	Komşu bağlama
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
pmol	Pikomol
PNJ	Profil komşu bağlama
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T	Timin
U	Enzimatik aktivite birimi
α	Alfa

1. GİRİŞ

Biyoeçeşitliliği oluşturan öğelerin korunmasının ilk aşaması bu öğelerin tanımlanmasıdır. Her gün birçok doğal ortam yok olmakta, doğal ve biyolojik zenginliklerimiz ortadan kalkmaktadır (Sala ve ark., 2000). Bu nedenle biyolojik çeşitlilik günümüzde önemli bir kavram haline gelişmiştir (Krishna ve Francis, 2012). Bu kavram sadece biyolojik disiplinler için değil, ziraat (örneğin, zararlılar ve biyolojik düşmanları), tıp (örneğin, patojenler ve ilaç geliştirme) ve hatta ekonomi için de önemlidir (Futuyma, 2004; Springer ve Murphy, 2007; Domazet ve Tautz, 2008). Biyolojik çeşitlilik kavramı tür, ekosistem ve genetik çeşitlilik boyutlarında değerlendirilmektedir (McNeely ve ark., 1990). Ancak doğada var olan çeşitliliğin saptanması çalışmalarında ilk basamağı oluşturan “tür kategorisinin tanımlanması” sistematik biyolojide sıcak tartışmaların yaşandığı önemli bir alandır (De Queiroz, 2007). Türlerin doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanması ve sınırlarının saptanması biyoeçeşitliliğin tanımlanması için temel gereksinim olmaya devam etmektedir ve biyologların karşılaştığı en temel problem tür kavramındaki taksonomik engeldir. Doğada çok fazla sayıda tür vardır (May, 2011), fakat bu muazzam çeşitliliği açığa çıkarma uzmanlığı olan çok az taksonomist bulunmaktadır (Ball ve Armstrong, 2006; Bleeker ve ark., 2008; Chown ve ark., 2008). Bu nedenle taksonomik uzmanlar mevcut biyoeçeşitliliği tanımlamakta yetersiz kalmaktadır (Packer ve ark., 2009).

Türlerin teşhisi ve adlandırılmaları yalnızca biyoeçeşitliliğin tanımlanmasına değil; ekolojik sorunların tanımlanması, evrimsel ve biyocoğrafik soruların cevaplanmasına da fayda sağlamaktadır (Fişer Pečnikar ve Buzan, 2014). Büyük ölçüde morfolojik karakterlere dayalı anahtarlar yardımıyla ayırım yapan geleneksel tanımlama sistemi günümüzde halen yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu sistem maliyet, zaman ve işgücü açısından avantajlı bir yöntem gibi görünse de, bir takım ciddi dezavantajlara ve kısıtlamalara sahiptir (Knowlton ve ark., 1993; Jarman ve Elliott, 2000; Hebert ve ark., 2003a; Ward ve ark., 2005; Frézal ve Leblois, 2008; Lim ve ark., 2009). Morfolojik özellikler kullanarak tür tespiti yapan bütün araştırmacılar bu kısıtlamalarla karşılaşmaktadır. Morfolojik tür teşhisinin; lokal adaptasyon kaynaklı fenotipik değişkenliklerin yanlış tanımlara yol açabilmesi, kriptik türlerin teşhisinin mümkün

olmaması, sadece belli bir yaşam evresine (genellikle ergin bireyler) uygulanabilir olması, genellikle farklı eşeyler için farklı teşhis anahtarların kullanılması gerekliliği, teşhisi yapılacak türün morfolojik özelliklerini (renk, anatomi ve tüy gibi) koruyor olması, morfolojik karakterlerin taksonun evrimsel hikayesini yansıtmaya gücünün sınırlı olması ve son olarak türün doğru teşhisi için uzman kişilere yani taksonomistlere ihtiyaç duyulması genel olarak bu kısıtlamaların en çok karşılaşılanları arasında sayılabilir (Packer ve ark., 2009).

Tüm bu nedenlerden dolayı, morfolojik karakterlere dayalı tanımlama yöntemine alternatif bir yöntem geliştirilmesi gereksinimi uzun yıllar bilimsel önemini korumuştur ve farklı yaklaşımlar altında tartışılmıştır (De Queiroz, 2007). İlk olarak virüs, bakteri ve protista gibi morfolojik olarak teşhisleri çok zor ya da olanaksız olan canlı grupları için, genomun küçük bir segmentinin kullanılması ile moleküler olarak teşhis önerilmiştir (Nanney, 1982; Pace, 1997; Allander ve ark., 2001; Hamels ve ark., 2001). Önerilen bu yöntem sistematik bir biçimde Hebert ve ark. (2003b) tarafından mitokondriyal *COI* (*sitokrom c oksidaz I*) genini yaklaşık 600 bç. uzunluğunda bir bölgesi kullanılarak Hexapoda üyelerinde denenmiştir ve bu günümüzde “DNA Barkodlama” olarak bilinmektedir (Hebert ve ark., 2003a). DNA barkodlama yaklaşımı, kısa DNA dizileri kullanılarak tür seviyesinde canlıları tanımlamak için hızlı, doğru ve standart bir yöntem sunmayı hedeflemektedir (Lim ve ark., 2009). Bu yaklaşım türlerin moleküler taksonomisini oluşturmak amacıyla değil, yalnızca referans kütüphaneleri inşa ederek taksonomik bilgiye dayalı basit bir tanı aracı üretmek amacıyla önerilmiştir (Ebach ve Holdrege, 2005; Gregory, 2005; Schindel ve Miller, 2005). Önerilen bu yaklaşım çok kısa bir süre içerisinde içlerinde uluslararası kuruluşlarında bulunduğu birçok kuruluşun desteğini kazanarak hayata geçirilmiştir. Bu doğrultuda, 2004 yılında 45 ülke ve 150'den fazla kuruluşun katılımı ile CBOL (Consortium for the Barcode of Life) olarak bilenen konsorsiyum kurulmuştur (Frézal ve Leblois, 2008). Bu gelişmeler doğrultusunda birçok çalışma grubu çeşitli canlıların barkodlanması amacı ile çalışmalar başlatılmıştır. Örnek olarak; ekolojik ve ekonomik önemi olan türlerin barkodlama çalışmaları kapsamında arılar (Bee Barcode of Life, Bee-BOL), karıncalar (Ant Barcode of Life), balıklar (Fish Barcode of Life), kuşlar (All Birds Barcoding Initiative, ABBI), kelebekler (Lepidoptera Barcode of Life), hastalık etkeni parazitler (HealthBOL), köpekbalıkları (Shark Barcode of Life, SharkBOL), süngerler (Sponge

Barcoding Project SpongeBOL), memeliler (Mammalia Barcode of Life Campaign) ve kutup canlıları (Polar Barcode of Life, PolarBOL) barkodlanmıştır. Bu çalışma gruplarının oluşturduğu ve GenBank veri tabanında yer alan barkod DNA dizi verisi BOLD (Barcode of Life Database) olarak adlandırılan veri tabanında toplanmaktadır.

Hayvan mitokondri genomu 13 protein kodlayan gene sahip olup, bu genlerden birisi olan *COI* genin bir kısmı hayvan grupları için evrensel barkod aracı olarak kullanılmaktadır. Bu bölge hayvanların tümünde olmasa da birçoğu için evrensel primerler yardımıyla çoğaltılabilmektedir (Folmer ve ark., 1994; Zhang ve Hewitt, 1997). Mitokondri genomuna ait bir belirteç olan *COI* gen bölgesi filogeni ve barkodlama çalışmalarında eşsiz bir belirteç olmakla birlikte birden fazla sayıda kopyasının bulunması nedeniyle heterojenite sergilemesi (Lopez ve ark., 1994; Thalmann ve ark., 2004; Strugnell ve Lindgren, 2007; Frézal ve Leblois, 2008; Buhay, 2009), çoğaltılan bölgenin evrensel bölgeleri temsil etmesi nedeniyle kaynak dokuda bulunan endosimbiyotik *COI* bölgelerinin çoğaltılması olasılığı (Frézal ve Leblois, 2008; Smith ve ark., 2012), yatay ve dikey gen transferleri ile farklı kaynaklara ait *COI* fragmanlarının çoğaltılması olasılığı (Hurst ve Jiggins, 2005; Dasmahapatra ve Mallet, 2006; Rot ve ark., 2006) ve çeşitli gruplarda farklı evrimsel farklılaşma oranlarına sahip olması gibi dezavantajlı yönleri de bulunmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda DNA barkodlama çalışmalarında *COI* temelli barkodlamaların alternatif belirteçlerle desteklenmesi gerektiği ve barkodlama amacıyla farklı belirteçlere ihtiyaç duyulduğu sıklıkla bildirilmektedir (Frézal ve Leblois, 2008; Chase ve Fay, 2009; Yao ve ark., 2010).

Son yıllarda ITS2 (internal transcribed spacer) olarak bilinen çekirdek ribozomal DNA (çrDNA) gen bölgesi içerisinde konuşlanmış ayıraç (spacer) diziler barkodlama çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Chen ve ark., 2010; Li ve ark., 2010; Yao ve ark., 2010). Farklı taksonomik gruplarda yürütülen araştırmalar, ITS2 DNA bölgesinin barkodlamada giderek önem kazandığını ve hızla benimsendiğini göstermektedir (Keller ve ark., 2009). ITS2 bölgesi hızlı evrimleşme kapasitesine sahiptir ve bu nedenle yüksek varyasyon göstermektedir. Bu özelliği nedeni ile tür ve tür altı taksonomik seviyeler için kullanışlı bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir (Coleman, 2000, 2003, 2007; Álvarez ve Wendel, 2003; Müller ve ark., 2007; Sonnenberg ve ark., 2007). ITS2 DNA bölgesinin doğrudan nükleotid dizi verisinin kullanımına ek olarak transkripsiyona

uğraması sonucunda açığa çıkan transkript, tıpkı rRNA alt birimlerinde olduğu gibi sekonder (ikincil) yapılar oluşturmaktadır (Coleman, 2003, 2007; Schultz ve ark., 2005; Wolf ve ark., 2005a; Schultz ve ark., 2006; Selig ve ark., 2008). Bu sekonder yapı bilgisi barkodlama yaklaşımında farklı bir boyutu, yani tür üstü taksonomik grupları değerlendirme avantajı sunmaktadır (Coleman, 2003, 2007; Schultz ve ark., 2005; Wolf ve ark., 2005a; Schultz ve ark., 2006; Hunter ve ark., 2007; Selig ve ark., 2008). Hem nükleotid dizi verisi hem de ikincil yapı özgünlüğü gibi avantajlarının yanı sıra ITS2 DNA bölgeleri nükleotid uzunluğu (fragman uzunluğu) açısından da türe özgünlük sergileyebilmektedir (Allen ve ark., 2004; Yao ve ark., 2010). Ayrıca, oldukça iyi korunmuş iki bölgeye (5.8S rDNA ve 28S rDNA) komşu olması bu bölgenin çoğaltılması için evrensel primerler geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Larena ve ark., 1999; Ji ve ark., 2003). Tüm bu nedenlerden dolayı ITS2 bölgesi günümüzde özellikle hayvan gruplarında *COI* bölgesine ek olarak ikinci bir barkod aracı olarak önerilmektedir (Yao ve ark., 2010; Pino-Bodas, 2013). Ancak bir barkod aracı olarak önerilen ITS2 bölgesinin birçok grupta yapısı bilinmemektedir ve barkodlama için uygun olup olmadığını test etmek için yeterli dizi bilgisi bulunmamaktadır (Chen ve ark., 2010; Yao ve ark., 2010). Örneğin Genbank veri tabanında böceklere ait yaklaşık 110.000 *COI* dizisi bulunurken, ITS2 bölgesine ait 5.600 dizi bulunmaktadır (erişim tarihi 13.07.2015). Böcekler; otuz iki takım, 762'den fazla familya ve 1 milyondan fazla tanımlanmış tür ile biyoçeşitliliği oluşturan en önemli canlı grubudur (Footitt ve Adler, 2009). Ancak şimdiye kadar tanımlanmış böcek türlerinin sayısının onlarca katı kadar böcek türünün dünya üzerinde keşif edilmeyi beklediği yönünde tahminler bulunmaktadır (Stork, 1988, 1993). Biyolojik açıdan olağanüstü düzeyde çeşitliliğine sahip olan böcekler biyoçeşitliliğin yaklaşık %55'ini oluşturmaktadır (Footitt ve Adler, 2009). Bu nedenle ITS2 bölgesinin böcek gruplarında bir barkodlama aracı olarak daha çok sınılanması gerekmektedir.

Böcek takımları arasında yaşam şekli ve tür çeşitliliği açısından en zengin gruplardan birisi olan Hymenoptera takımı 27 üstfamilya (9 üstfamilya Symphyta, 18 üstfamilya Apocrita), 132 familya ve 153.088 tür ile temsil edilmektedir (Aguiar ve ark., 2013). Geleneksel olarak Symphyta (testereli arılar) ve Apocrita (ince belli arılar) olmak üzere iki alttakıma ayrılan Hymenoptera takımı tür çeşitliliği bakımından Coleoptera ve Lepidoptera takımlarından sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Aguiar ve ark., 2013).

Hymenoptera takımı farklı yaşam stratejilerine sahip gruplar içermesi nedeniyle ekosistemde anahtar roller üstlenen türlere sahiptir. Biyolojik mücadelede önemli role sahip parazitoit ve predatör türlerin yanı sıra, çiçekli bitkilerin tozlaşmasında rol alan polinatör türlerin büyük çoğunluğu da bu takımda bulunmaktadır. Aynı zamanda dünya çapında 9 üstfamilya, 25 familya ve yaklaşık 8.600 tür ile temsil edilmekte olan fitofag yaşam tarzını benimsemiş olan Symphyta alttakımı tür çeşitliliği bakımından görece fakir bir grup olmasına rağmen, evrimsel olarak oldukça ilgi çekici bir gruptur (Sharkey, 2007; Aguiar ve ark., 2013). Symphyta alttakımı fitofaglıktan parazitoidliğe geçiş ve Holometabol böceklerin kökeni gibi konularda model bir organizma grubu olarak görülmektedir (Malm ve Nyman, 2015; Vilhelmsen, 2015). Bu nedenle Symphyta alttakımına ait türlerin tanımlanması ve sınıflandırılması oldukça önemlidir. Symphyta alttakımının üyelerini tanımlamak amacıyla morfolojik karakterlere dayalı tür anahtarları yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (örneğin: Wright, 1990; Benson, 1946, 1950, 1951, 1968). Ancak bu anahtarlar çoğunlukla yapısal karakterlerden ziyade organizmalarda renk desenlenmesi gibi çoklu kalıtıma sahip, adaptif varyasyon etkisi altında ve uzmanlık gerektiren karakterlerin kullanımına dayalıdır. Diğer taraftan bu tanı anahtarları yalnızca erişkin ve morfolojik olarak zarar görmemiş bireylerde kullanılabilir (örneğin; Zhelokhovtsev, 1994; Wright, 1990; Benson, 1946, 1950, 1951, 1968). Bu nedenle Symphyta üyelerinin alternatif ve pratik yaklaşımlarla tanımlanması bu canlıların ekolojilerini, çeşitliliğini ve biyocoğrafyalarını anlamamız açısından oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, hayvan grupları için alternatif bir barkod aracı olarak gösterilen ITS2 bölgesine ait bilgilerimiz Symphyta alttakımı türleri için oldukça sınırlı düzeydedir. Genbank veri tabanında Tenthredinidae familyasına ait *Empria* (26 tür) ve *Monsoma* (1 tür) cinslerine ait toplam 27 türün ITS2 dizi bilgisi mevcuttur. Tez projesi kapsamında Symphyta alttakımından 10 familyayı temsilen 51 türe ait 109 bireye ait ITS2 dizi veri seti oluşturulmuştur. Bu veri setine Genbank veri tabanında mevcut olan 27 türden 71 bireye ait ITS2 verisi de eklenerek, ITS2 bölgesinin dizi özellikleri ve barkodlama için uygunluğu araştırılmıştır.

1.1 Symphyta Alttakımı

Holometabol böceklerin bir üyesi olan Hymenoptera takımı geleneksel olarak Symphyta ve Apocrita olmak üzere iki alttakıma ayrılmaktadır. Testereli arılar olarak bilenen

Symphyta alttakımı familyaları Hymenoptera takımı içerisinde atasal taksonları barındırmaktadır. Symphyta alttakımı üyeleri genellikle bahar aylarında ergin olarak gözlemlenir ve Apocrita alttakımı üyelerinden abdomen-toraks arasındaki incelmeyi ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Apocrita (soldaki) ve Symphyta (sağdaki) alttakımlarına ait temsilî türlerin genel görünümü, ok ile abdomen-toraks arasındaki incelmeyi gösterilmiştir

Orussidae familyası larvaları hariç bütün Symphyta türleri fitofag beslenme tarzını benimsemişlerdir (Gauld ve Bolton, 1988). Bu nedenle bazı Symphyta türleri tarım ve orman ürünlerinde ekonomik zarara yol açabilmektedir.

Çizelge 1.1 Symphyta alttakımı oluşturan üstfamilyalar ve familyalar, † fosil kayıt

Üstfamilya	Familya
Anaxyleoidea	Anaxyelidae
Cephoidea	Cephidae
Orussoidea	Orussidae
Pamphilioidea	Megalodontesidae
	Pamphiliidae
Siricoidea	Siricidae
Xiphydrioidea	Xiphydriidae
Tenthredinoidea	Argidae
	Blasticotomidae
	Cimbicidae
	Diprionidae
	Pergidae
	Tenthredinidae
Xyeloidea	Xyelidae
† Karatavitoidea	Karatavitidae

Symphyta alttakımı 9 üstfamilya, 25 familya ve yaklaşık 8.600 (fosil kayıtlar ile birlikte) tür ile dünya üzerinde temsil edilmektedir (Aguilar ve ark., 2013). Bu üstfamilyalar ve familyalar Çizilge 1.1'de gösterilmiş olup, Karatavitoidea (Rasnitsyn, 1963) üstfamilyası fosil kayıtlardan tanımlanmıştır. Kozmopolit bir yayılış gösteren Symphyta altfamilyası ağırlıklı olarak Palearktık bölgeden tanımlanmıştır (Taeger ve Liston, 2010).

Symphyta alttakımının filogenisi yüksek taksonomik düzeyler için son zamanlarda yapılan çalışmalarda büyük oranda birbirini destekleyen sonuçlar vermektedir (Klopfstein ve ark., 2013; Malm ve Nyman, 2015; Sharkey ve ark., 2012). Ancak Xyelidae familyasının monofilisi (Klopfstein ve ark., 2013) ve Pamphilioidea familyasının diğer üstfamilyalar arasındaki yeri (Ronquist ve ark., 2012; Schulmeister ve ark., 2002; Sharkey ve ark., 2012) halen tartışmalıdır. Aynı zamanda Tenthredinoidea üstfamilyası içerisindeki Tenthredinidae familyasının altfamilyaları olan Cimbicidae ve Diprionidae monofilisi açık bir şekilde ortaya konulamamıştır (Klopfstein ve ark., 2013; Malm ve Nyman, 2015; Schulmeister, 2003; Sharkey ve ark., 2012).

1.2 DNA Barkodlama

Son yirmi yıl içerisinde moleküler biyolojideki baş döndürücü gelişmeler biyolojik çeşitliliğin bir elemanı olan türlerin, sınırlandırılması ve moleküler araçlar kullanılarak sınırın içerisindeki türlerin teşhis edilmesi süreçlerini de değiştirmiştir. Aynı zamanda bilgisayar ve internet teknolojisindeki gelişmelerle verilerin analizi ve erişimi görece kolaylaşmıştır. Tüm bu gelişmeler şimdilerde “DNA Barkodlama” olarak anılan yöntemin doğmasını tetiklemiştir (Fişer ve Buzan, 2014). Bu yöntem basit olarak referans barkod kütüphanesi olarak adlandırılan DNA dizi havuzu içerisinde aynı türün bireylerinin daha benzer dizilere sahip olması prensibiyle çalışmaktadır. Barkodlama ilk olarak mikrogenomik tanı yaklaşımları olarak açığa çıkmış olup, morfolojik karakterlere dayalı teşhisin zor ve/veya imkânsız olduğu bazı mikroorganizma grupları için kullanılmıştır (Nanney, 1982; Pace, 1997; Allander ve ark., 2001; Hamels ve ark., 2001; Frézal ve Leblois, 2008). Daha sonra Hebert ve ark. (2003a,b) tarafından yüksek organizasyonlu türlerin tanımlanması için de benzer bir yaklaşım önerilmiş ve DNA barkodlama sistemi olarak adlandırılmıştır. Bu sistem kısa sürede oldukça yaygın hale gelmiştir. Günümüzde, DNA barkodlama kısa ve standart gen bölgelerini kullanarak tür

düzeyinde tanımlamayı otomatize edebilmenin yanı sıra, araştırmacılar için hızlı ve güvenilir bir araç olmuştur (Hebert ve Gregory, 2005; Lim ve ark., 2009; Pino-Bodas ve ark., 2013).

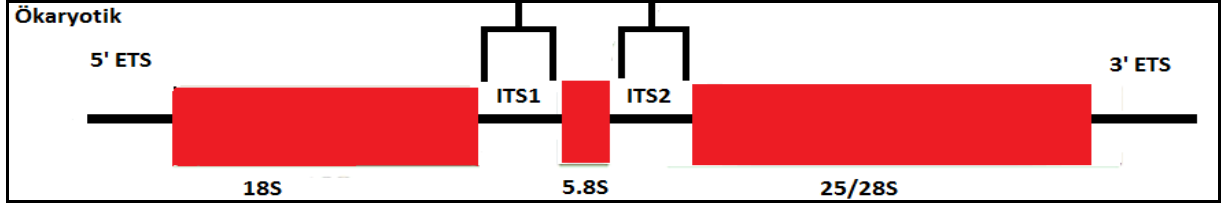
Hayvan gruplarının DNA barkodlama çalışmalarında mitokondri DNA'sının *sitokrom c oksidaz I (COI)* gen bölgesine ait 648 bç. uzunluğunda bir nükleotid dizisi (Folmer bölgesi) evrensel bir DNA barkod belirteci olarak kabul görmüştür (Folmer ve ark., 1994, Hebert ve ark., 2003a, b; Frézal ve Leblois, 2008). Mitokondriyal *COI* geni hücre solunumundan sorumlu enzim sisteminin katalitik bir alt birimini kodlamaktadır. Hücre içerisindeki fonksiyonları nedeniyle bu gen görece yavaş evrimleşmektedir (Lynch ve Jarrell, 1993) Bu nedenle *COI* dizisinde meydana gelen nükleotid değişimleri, insersiyonlar ve delesyonlar kodon yapısını bozmayacak düzeyde meydana gelmektedir ve bu da dizinin hizalamasını kolaylaştırmaktadır (Hebert ve ark., 2003). Hebert ve ark. (2003b) tarafından 11 hayvan şubesinden 13.320 tür kullanılarak *COI* bölgesindeki farklılaşma düzeylerini [p-uzaklık (distance): toplam nükleotid değişiminin toplam nükleotid sayısına oranı] incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda *COI* aynı cinse ait türler arasında ortalama olarak %1 (Cnidaria) ile %15,7 (Annelida) arasında farklılaşma değerlerine sahiptir. Bazı omurgalı (örneğin kuşlar, balıklar) ve omurgasız (örneğin böcekler) hayvan gruplarında *COI* bölgesi barkod aracı olarak kullanılmaktadır, ancak bazı Cnidaria (Shearer ve Coffroth, 2008) ve Insecta (Bourke ve ark., 2013; Hebert ve ark., 2003a; Wiemers ve Fiedler, 2007) türlerinde bu barkod aracı başarılı olmamıştır. Günümüzde DNA barkodlama çalışmalarında *COI* temelli barkodlamaların alternatif belirteçlerle desteklenmesi gerektiği ve barkodlama için farklı belirteçlere ihtiyaç duyulduğu sıklıkla bildirilmektedir (Chen ve ark., 2010; Fišer Pečnikar ve Buzan, 2014; Yao ve ark., 2010). İdeal barkod aracı olarak aday DNA segmentinin tür içinde neredeyse hiç değişmemiş düzeyde olması fakat yakın türleri bile ayırma gücüne sahip olacak şekilde türler arasında farklılaşmış olması, farklı taksonomik düzeylerde paylaşılması ve farklı canlı gruplarında korunmuş primer bağlanma bölgelerini içermesi gibi özellikleri taşımalıdır (Hebert ve ark., 2003a; Hebert ve ark., 2003b). Bu özellikleri kısmen taşıyan bir barkod aracı olan *COI* bölgesi (i) birçok organizmada birden fazla sayıda kopyasının bulunması nedeniyle heterojenite sergilemesi (Lopez ve ark., 1994; Thalmann ve ark., 2004; Strugnell ve Lindgren, 2007; Frézal ve Leblois, 2008; Buhay, 2009), (ii) çoğaltılan bölgenin evrensel bölgeleri temsil etmesi nedeniyle kaynak dokuda

bulunan endosimbiyotik *COI* bölgelerinin çoğaltılması olasılığı (Frézal ve Leblois, 2008; Smith ve ark., 2012); (iii) yatay ve dikey gen transferleri ile farklı kaynaklara ait *COI* fragmanlarının çoğaltılması olasılığı (Hurst ve Jiggins, 2005; Dasmahapatra ve Mallet, 2006; Rot ve ark., 2006) ve en önemlisi (iv) çeşitli gruplarda farklı evrimsel farklılaşma oranlarına sahip olması gibi nedenlerle farklı belirteçlerle desteklenmesine ihtiyacı duymaktadır (Hulcr ve ark., 2007; Frézal ve Leblois, 2008). Araştırmacılar bu problemlerin üstesinden gelmek için birçok çalışma yürütmektedir. Örneğin Numt (nuclear-mitochondrial kontaminat) bölgeleri kodon yapısının oluşturulması ile belirlenebilmektedir (Strugnell ve Lindgren, 2007; Frézal ve Leblois, 2008). Aynı zamanda BOLD sisteminde de dizi denetleme uygulaması bulunmaktadır. Ancak BOLD sisteminde bilinmeyen bir örneğin tanısını yapacak bir araştırmacı için bu diziler halen yanıltıcı olabilmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılar anasal kalıtım sergileyen *COI* bölgesinin doğada var olan karmaşıklığı asla yansıtmayacağını öne sürmektedir (Chase ve ark., 2005; Yao ve ark., 2010; Kvist, 2013). Bu sorunların çözümü için DNA barkodlamada çekirdek DNA belirteçlerinin daha bilgi verici olacağı önerilmiştir (Chase ve Fay, 2009). Tüm bu nedenlerden dolayı ökaryotların üç ana grubu için ayrı barkodlama belirteçleri araştırılmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. Hayvanlarda *COI* standart barkod olarak kullanılırken (Hebert, 2003a,b), bitkilerde ise *matK* ve *rbcL* bölgeleri tercih edilmektedir (CBOL Plant Working Group, 2009). Mantar gruplarının barkodlamasında zaten kullanılmakta olan çekirdek ribozomal DNA (rDNA) gen bölgesi içerisinde konuşlanmış ITS (internal transcribed spacer) dizileri son yıllarda bitki ve hayvan grupları içinde önerilmiştir (Bourke ve ark., 2013; Chen ve ark., 2010; Seena ve ark., 2010; Yao ve ark., 2010).

1.3 ITS2 Bölgesi

Ribozomlar hücrede protein sentezi makinaları olarak görev almaktadır. Bu nedenle hücre bölünmesi, büyümesi ve fonksiyonu için oldukça önemli birimlerdir. Bu nedenle ribozomların oluşumu yani ribozomların biyogenizi canlılar için yaşamsaldır. Ökaryotik hücrelerde ribozom biyogenizi RNA polimeraz I tarafından tek bir birim halinde sentezlenen rRNA sentezi ile başlamaktadır (Nazar, 2004). Ökaryotik çekirdek rDNA'ları yaklaşık 5000 kopya ile genomda ardışık sıralı bir şekilde bulunmaktadır. Her tekrar eden birim küçük altbirim (SSU), büyük altbirim (LSU) ve 5.8S rDNA'lardan oluşmaktadır. Bu rRNA kodlayan bölgeler birbirlerinden ayıraçlar

(spacer) ile ayrılır. SSU ve LSU rDNA'ları iki ETS (external transcribed spacer) ve bir NTS (non-transcribed spacer) ile ayrılmaktadır. Bu ayraçların hepsi IGS (intergenic spacer) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2) (Choe ve ark., 1999).



Şekil 1.2 Nükleer çrDNA üzerinde ITS2 bölgesinin konumu

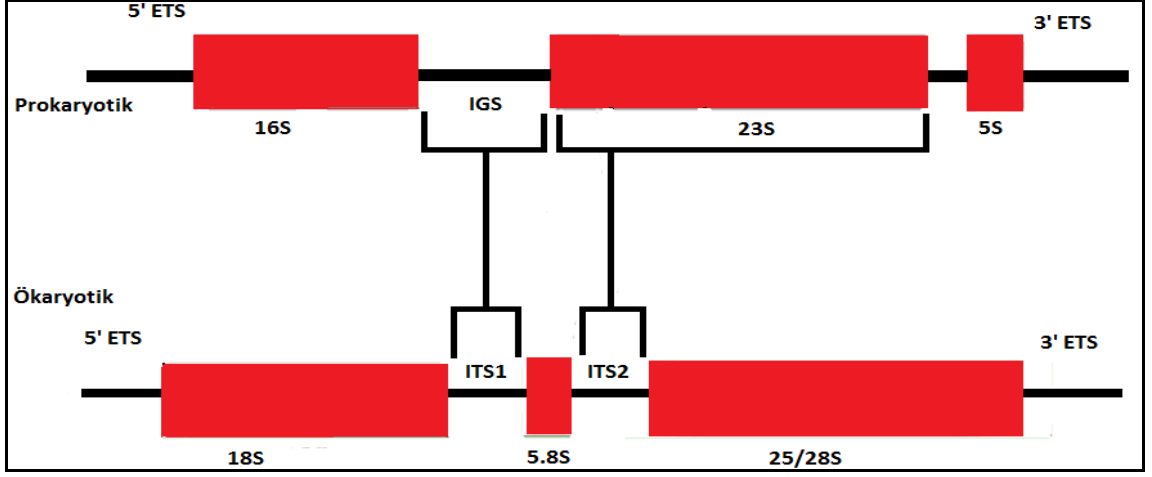
Geleneksel olarak ITS1, ITS2 ve 5.8S rRNA bölgesinin tamamı ITS bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Yüzlerce tekrardan oluşan ITS bölgesinin filogenetik bir belirteç olarak kullanımı konusundan tekrarlar arasındaki varyasyonlar bulunabileceği şüphesi ile uzun yıllar kaçınılmıştır (Coleman, 2003). Ancak açığa çıkan veriler ITS bölgelerinin tekrarları arasındaki varyasyonun yalnızca hibrit ve allopoliploid türlerde gözlemlendiğini göstermiştir (Buckler ve ark., 1997; Fuertes ve ark., 1999). Bu süreç “uyumlu evrim” (concerted evolution) olarak adlandırılan bir mekanizmanın sonucudur ve ITS bölgeleri gibi çoklu gen ailelerinin homojenize, tek bir gen gibi evrimleşmesini sağlamaktadır (Elder ve Turner, 1995). Ancak bazı bitki türlerinin ITS bölgelerinde intragenomik (genom içerisindeki tekrarlarda) “uyumlu olmayan” evrim durumları bildirilmiştir (Harpke ve Peterson, 2006).

Farklı taksonomik gruplarda yürütülen araştırmalar, ITS2 DNA bölgesinin barkodlama da giderek önem kazandığını ve hızla benimsendiğini göstermektedir (Chen ve ark., 2010; Wolf, 2015; Yao ve ark., 2010). ITS2 bölgesi hızlı evrimleşme kapasitesine sahiptir ve bu nedenle yüksek varyasyon göstermektedir (Coleman ve Vacquier, 2002; Coleman, 2003). Bu özelliği nedeni ile tür ve tür altı taksonomik seviyeler için kullanışlı bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir (Coleman, 2000, 2003, 2007; Álvarez ve Wendel, 2003; Müller ve ark., 2007; Rainer ve ark., 2007; Sonnenberg ve ark., 2007). ITS2 DNA bölgesinin doğrudan nükleotid dizi verisinin kullanımına ek olarak transkripsiyona uğraması sonucunda açığa çıkan transkript, tıpkı rRNA alt birimlerinde olduğu gibi sekonder (ikincil) yapılar oluşturmaktadır (Coleman, 2003, 2007; Schultz ve ark., 2005; Wolf ve ark., 2005a; Schultz ve ark., 2006; Selig ve ark., 2008). Bu sekonder

yapı bilgisi barkodlama yaklaşımında farklı bir boyutu, yani tür üstü taksonomik grupları değerlendirme avantajı sunmaktadır (Coleman, 2003, 2007; Schultz ve ark., 2005; Wolf ve ark., 2005a; Schultz ve ark., 2006; Hunter ve ark., 2007; Selig ve ark., 2008). Hem nükleotid dizi verisi hem de sekonder yapı özgünlüğü gibi avantajlarının yanı sıra ITS2 DNA bölgeleri nükleotid uzunluğu (fragman uzunluğu) açısından da türe özgünlük sergileyebilmektedir (Allen ve ark., 2004; Yao ve ark., 2010). Tüm bu nedenlerden dolayı ITS2 bölgesi günümüzde özellikle hayvanlarda DNA barkodlama sistemi için önerilen ikili belirteç kullanımı (*COI* ve ITS2) için önemli bir aday konumundadır (Yao ve ark., 2010; Pino-Bodas, 2013). ITS2 temelli barkodlamaların hayvan grupları için kullanımı oldukça yeni bir gelişme olup, *COI* belirtecinin bu alternatif belirteçle desteklenmesi barkodlama sistemine olan güveni oldukça güçlendireceği düşünülmektedir (Yao ve ark., 2010). Ancak ITS2 dizileri halen birçok grup için test edilebilmiş değildir ve barkod referans kütüphanesi oluşturabilecek yeterlilikte DNA dizi bilgisi henüz mevcut değildir (Coleman, 2015; Wolf, 2015; Yao ve ark., 2010).

1.3.1 ITS2 Bölgesinin Evrimi ve Kökeni

Ribozomal RNA genleri evrimsel biyologların şube ve sınıf gibi yüksek taksonomik düzeylerde filogenetik ilişkileri incelemesine olanak tanıyacak kadar yavaş evrimleşmektedir (Woese ve Fox, 1977). rRNA genleri arasında yer alan ITS2 bölgesi komşu olduğu bölgelere oranla yaklaşık 100 kat daha hızlı evrimleşmektedir (Elder ve Turner, 1995). Ökaryotik organizmalarda bu denli hızlı evrimleşen ITS2 bölgesinin kökeni hakkında tam kabul görmüş bir hipotez bulunmamaktadır. Ökaryotik hücrelerde 100'den fazla kopyası bulunan rRNA gen kümesi, Bacteria ve Archaea genomlarında yaklaşık 10 tekrardan oluşmaktadır (Coleman, 2015).

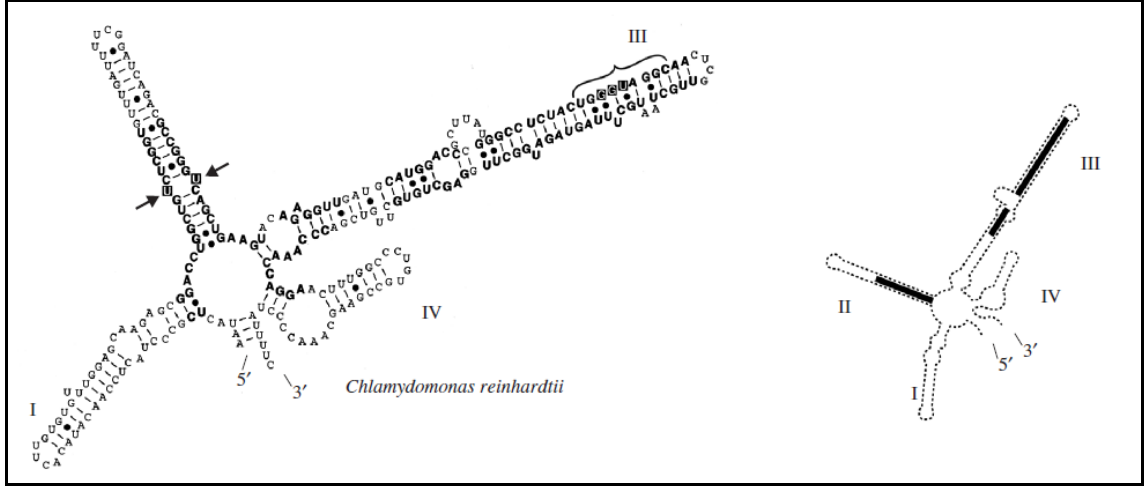


Şekil 1.3 Prokaryotik ve ökaryotik rDNA genleri

Bacteria ve Archaea rRNA kümesi küçük altbirim (SSU) ile büyük altbirimi (LSU) birbirinden ayıran tek bir aralayıcı bölge ile ayrılmaktadır (Şekil 1.3). Bu aralayıcı bölge bir ya da iki tane tRNA genini içermektedir (Nazar, 1980). Ancak ökaryotik ITS bölgelerinin içerisinde tRNA geni ya da kalıntısı yönünde hiçbir bulgu bulunmamaktadır. Ökaryotik ITS1 bölgesinin prokaryotik ITS bölgesinden (Clark, 1987) ve ITS2 bölgesinin ise rDNA'nın büyük alt biriminin (LSU) genişleyen segmentinden köken aldığı düşünülmektedir (Lafontaine ve Tollervey, 2001; Nazar, 1980).

1.3.2 ITS2 Bölgesinin İkincil Yapısı

ITS2 bölgesi yalnızca dizi bilgisi aracılığı ile değil rRNA transkriptinin ikincil yapısı ile de taksonomik veri sunmaktadır. Neredeyse tüm ökaryotik ITS2 bölgelerinin ikincil yapılarını korumuştur ve Şekil 1.4'de gösterilen yapıya sahiptir (Coleman, 2007). Bu korunmuş yapı ilk olarak yeşil alglerle ve karasal bitkilerin karşılaştırılması sırasında gözlemlenmiştir (Mai ve Coleman, 1997). ITS2 tipik olarak dört helikse sahiptir (Şekil 1.4). Bu helikslerden I ve IV; tür hatta tür altı taksonomik düzeyde değişkenlik gösterebilmektedir ve en değişken helikslerdir (Coleman, 2007). En azından cins içinde, heliks I, II ve IV'in bazal eşleşmeleri korunmuş iken en korunmuş yapı heliks III'ün distal bölgesindedir (Coleman, 2007; Schultz ve ark., 2005).

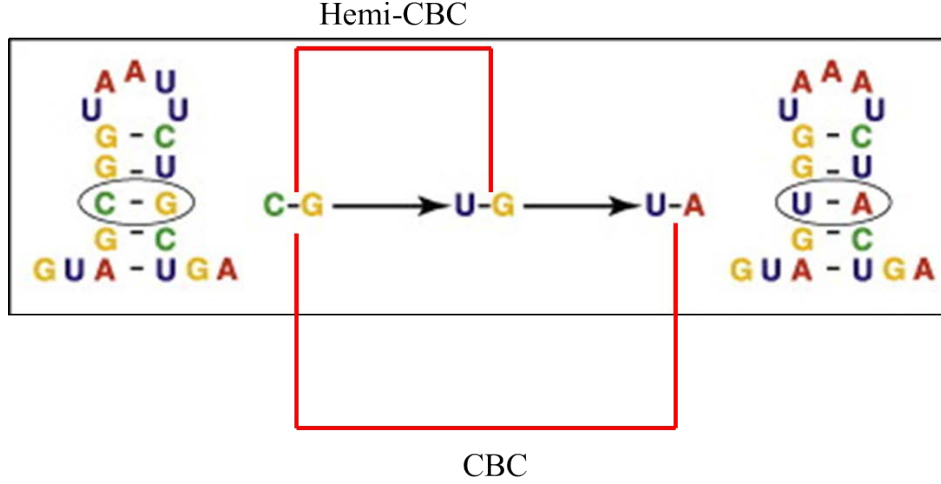


Şekil 1.4 Coleman (2007), ökaryotik ITS2 genel yapısı ve korunmuş motifleri

Korunmuş ITS2 ikincil yapısının; dört kollu (heliks) olması, uzun heliks III'e sahip olması, heliks III'ün 5' apeksine yakın bir bölgede UGGU benzeri (örneğin; UGGGU, UGG, GGU) bir yapı içermesi, heliks II'de pirimidin-pirimidin hatalı eşleşmeleri (örneğin U-U, C-C) gibi genel özellikleri bulunmaktadır (Schultz ve ark., 2005). Ancak, bütün ökaryotik organizma ITS2'leri aynı heliks sayısına sahip değildir (Coleman, 2007). Özellikle böcekler de heliks II ile heliks III arasında bir heliks daha yer alabilmektedir ve heliks III'ün 5' apeksine yakın bir bölgede tüm böcekler için genelleyebilecek bir yapı henüz bulunamamıştır (Coleman, 2007; Schultz ve ark., 2005). Örneğin Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelinae) altfamilyasında 5'-CGA TCG TCG TG-3' dizisi heliks III'ün apeksindeki korunmuş motif iken, *Drosophila* türlerinde 5'-GTC TAG CAT A-3' dizisi bu bölgede korunmuştur (Coleman, 2007).

ITS2 ikincil yapılarının taşıdıkları bir özellik nedeniyle "CBC tür kavramı" olarak adlandırılan yeni bir tür kavramının doğmasını sağlamıştır (Coleman, 2000). Bu tür kavramı ilk olarak yeşil alglerin (Volvocales), ITS2 ikincil yapılarındaki heliks II ve heliks III üzerinde bir CBC'nin (telafi edici baz değişimi, CBC: Compensatory Base Changes) varlığı ile suşlarının eşeysel uyumsuzluğu arasında bir korelasyonun görülmesiyle ortaya atılmıştır. Telafi edici baz değişimleri (CBC) ITS2 transkriptinin helikslerinden herhangi birinde gözlemlenebilir (Coleman, 2000; Müller ve ark., 2007). Basitçe ITS2 ikincil yapısındaki herhangi bir heliksin bir tarafında meydana gelen nükleotid değişimini diğer tarafındaki nükleotid değişimi ile beraber gerçekleştiriyorsa bu bir CBC'nin varlığına işaret eder. Örneğin heliks üzerindeki herhangi bir pozisyonun A-

U olduğunu varsayarsak A→G mutasyonunu U →C mutasyonu ile telafi edilmesi bir CBC'ye işaret eder (Şekil 1.5). Eğer bu değişim heliksin bir tarafında gerçekleşiyorsa bu durum “Hemi-CBC” olarak tanımlanmaktadır (Coleman ve Vacquier, 2002).



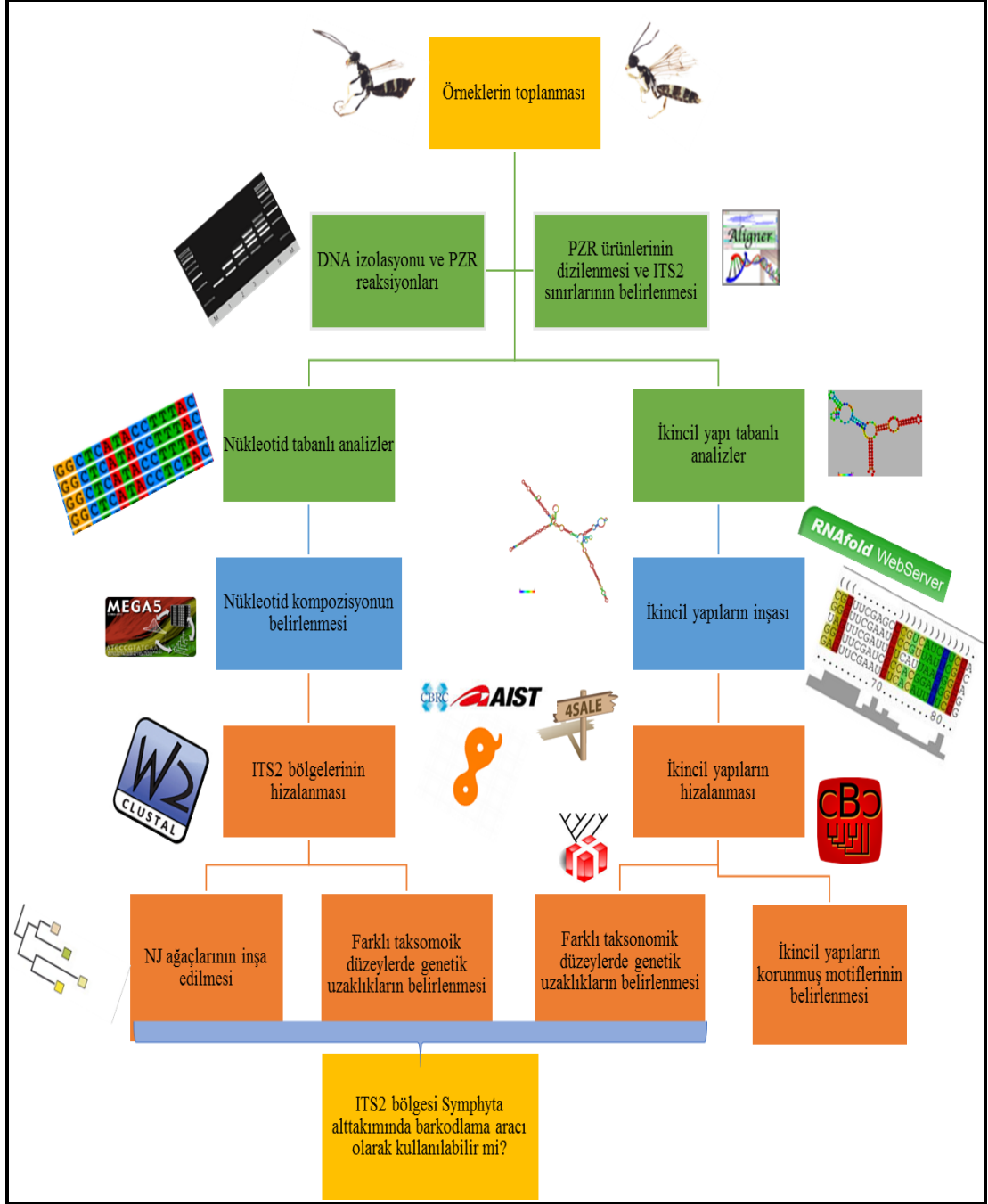
Şekil 1.5 ITS2 ikincil yapısı üzerinde CBC ve Hemi-CBC'ler

ITS2 yapılarında meydana gelen değişimlerle ilişkilendiren CBC tür kavramı, Ernst Mayr tarafından ortaya atılan biyolojik tür kavramıyla ilişkilidir ve iki organizmanın ITS2 korunmuş ikincil yapısında tek bir CBC'nin tanımlanmasının iki farklı biyolojik türe işaret ettiğini öne sürmektedir (Coleman ve Vacquier, 2002). Fakat iki organizma arasında bir CBC'nin tanımlanmaması bu iki organizmayı tek bir tür içerisine almamaktadır (Coleman, 2000). Müller ve ark. (2007) tarafından bu tür kavramı 1300 yakın ilişkili türe (çoğunlukla bitki ve mantar) ait ITS2 dizileri analiz edilerek sınanmıştır ve aynı cinse ait türler arasında bir CBC'nin varlığı %93 oranında farklı türleri açığa çıkarmıştır (Müller ve ark., 2007). Daha sonra özellikle yeşil alglerde CBC tür kavramı kullanılarak yeni türler tanımlanmıştır (Bock ve ark., 2011; Demchenko ve ark., 2012; Hegewald ve ark., 2010; Krienitz ve ark., 2011). Ruhl ve ark. (2010) tarafından morfolojik olarak ayıramayan bir Coleoptera cinsi olan, *Altica* türlerinde CBC analizinin çok yakın türleri ayırdığını ve morfolojik olarak ayıramayan türlerin CBC analizi ile ayırt edilebileceklerini bildirmişlerdir (Ruhl ve ark., 2010). Ancak CBC varlığı ile türleşme arasında bir ilişki henüz bulunamamıştır. Bunun yalnızca bir korelasyon olduğu düşünülmektedir (Wolf ve ark., 2013).

Genom içerisindeki ITS2 çoklu tekrarlarından dolayı intragenomik varyasyon kaynaklı hatalar CBC tür kavramını yanlış yönlendirebilir. Özellikle karmaşık evrimsel hikayeye sahip tür kompleksleri, yatay gen transferleri ve atasal hibrit türler için bu durum olası görülmektedir (Müller ve ark., 2007). Ancak Wolf ve ark. (2013) tarafından 178 bitki türü ve 5000'den fazla intragenomik varyant ITS2 bölgesi kullanılarak yapılan çalışmada, intragenomik ITS2'ler arasında bir CBC'nin bulunma olasılığı % 0,01 olarak hesaplanmıştır (Wolf ve ark., 2013).

2. MATERYAL ve METOT

Çalışmanın veri setinin oluşturulması ve analizlerin gerçekleştirilmesi birbirine bağımlı süreçlerin sıralı olarak takip edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar ve süreçler Şekil 2.1’de özetlenmiş olup, ayrıntıları başlıklar halinde bu bölümde açıklanmıştır.



Şekil 2.1 Çalışmada gerçekleştirilen aşamalar ve gerçekleştirilen analizlerin özeti

2.1 Örneklerin Toplanması ve Çalışmaya Dahil Edilmesi

Kullanılan Symphyta alttakımına ait türlerin bir kısmı Cumhuriyet Üniversitesi Entomoloji Koleksiyonunda gerek alkol gerekse müze materyali olarak bulunmakta olup, çalışma kapsamında ECCUS bünyesinde bulunmayan türlerin temin edilmesi için Batı Karadeniz ve İç Anadolu bölgelerini kapsayan arazi çalışması yapılmıştır. Örneklerin toplanması ve çalışma kapsamında kullanılması için T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden izin belgesi alınmıştır. Örnekler çapı 40 cm olan bir el ağı (atrap) kullanılarak tarama ve konak bitki tespiti yöntemi ile toplanmıştır. Arazi çalışması sırasında toplanan örnekler cam şişe içerisine alarak %99'luk etanol (EtOH) içerisinde laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvar ortamına getirilen örneklerin alkolleri değiştirilerek ve etiket bilgileri düzenlenerek -20 °C'de saklanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak örneklerin tespiti için teşhis işlemi yapılmıştır. Bu amaçla birçok teşhis anahtarı birlikte kullanılmıştır (Wright, 1990; Benson, 1946, 1950, 1968; Zhelokhovtsev-Medvedev, 1994; Goulet ve Huber, 1993). Teşhis işlemleri SMZ-1500 Nikon marka stereo mikroskop yardımıyla yapılmıştır.

Teşhis edilen ve ECCUS bünyesinde bulunan örnekler arasından Symphyta alttakımının tüm familyalarını temsil edecek şekilde ITS2 bölgesi dizi verisinin oluşturulabilmesi için 10 farklı familyadan 109 birey ve 51 tür kullanılmıştır. Bu türlerin ayrıntıları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Aynı zamanda GenBank veri tabanında yer alan Tenthredinidae familyasına ait 27 türden 71 bireyin ITS2 verisi de analizlere dahil edilmiştir ve Çizelge 2.2'de bu türlerin ayrıntıları verilmiştir.

Çizelge 2.1 Proje kapsamında kullanılan türler

Familya	Altfamilya	Türler	Birey Sayısı
Argidae	Arginae	<i>Arge dimidiata</i> (Fallén, 1808)	4
		<i>Arge ochropus</i> (Gmelin, 1790)	4
		<i>Arge pleuritica</i> (Klug, 1834)	4
		<i>Arge enodis</i> (Linné, 1767)	1
		<i>Arge</i> sp.	1
	Sterictiphorinae	<i>Sterictiphora angelicae</i> (Panzer, 1799)	1
		<i>Sterictiphora furcata</i> (Villers, 1789)	1
Cephalidae	Cephinae	<i>Calameuta pygmaea</i> (Poda, 1761)	1
		<i>Cephus pygmeus</i> (Linné, 1767)	16
		<i>Cephus rjabovi</i> (Dovnar-Zapolskij, 1926)	1
		<i>Hartigia linearis</i> (Schrank, 1781)	1
		<i>Pachycephus smyrnensis</i> (J.P.E.F. Stein, 1876)	1
		<i>Trachelus iudaicus</i> (Konow, 1907)	1
		<i>Trachelus tabidus</i> (Fabricius, 1775)	1
		<i>Calameuta idolon</i> (Rossi, 1794)	1
Cimbicidae	Abiinae		
	Corynidinae	<i>Corynis crassicornis</i> (Rossi, 1790)	1
		<i>Corynis lateralis</i> (Brullé, 1832)	1
Diprionidae	Diprioninae	<i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785)	1
Megalodontesidae		<i>Megalodontes cephalotes</i> (Fabricius, 1781)	1
Pamphiliidae	Cephalciinae	<i>Acantholyda posticalis</i> (Matsumura, 1912)	1
Siricidae	Siricinae	<i>Sirex noctilio</i> (Fabricius, 1793)	1
Tenthredinidae	Allantinae	<i>Allantus cinctus</i> (Linné, 1758)	1
		<i>Allantus didymus</i> (Klug, 1818)	1
		<i>Athalia circularis</i> (Klug, 1815)	1
		<i>Athalia scutellariae</i> (Cameron, 1880)	1
	Blennocampinae	<i>Monophadnoides rubi</i> (T.W. Harris, 1845)	1
		<i>Cladius pectinicornis</i> (Geoffroy, 1785)	1
	Nematinae	<i>Nematus</i> sp.	1
		<i>Pontania</i> sp.	1
		<i>Pristiphora conjugata</i> (Dahlbom, 1835)	1
		<i>Pristiphora platycerus</i> (Hartig, 1840)	1
	Selandriinae	<i>Dolerus vestigialis</i> (Klug, 1818)	1
		<i>Dolerus pratensis</i> (Linné, 1758)	1
		<i>Dolerus germanicus</i> (Fabricius, 1775)	1
		<i>Selandria serva</i> (Fabricius, 1793)	1
	Tenthredininae	<i>Aglaostigma aucupariae</i> (Klug, 1817)	1
		<i>Aglaostigma fulvipes</i> (Scopoli, 1763)	1
		<i>Macrophya diversipes</i> (Schrank, 1782)	1
		<i>Macrophya superba</i> (Tischbein, 1852)	1
		<i>Rhogogaster viridis</i> (Linné, 1758)	1
		<i>Tenthredo costata</i> (Klug, 1817)	1
		<i>Tenthredo asiatica</i> (Enslin, 1910)	1
		<i>Tenthredo zonula</i> (Klug, 1817)	1
		<i>Tenthredopsis andrei</i> (Konow, 1898)	6
		<i>Tenthredopsis annuligera</i> (Eversmann, 1847)	10
<i>Tenthredopsis friesei</i> (Konow, 1884)	4		
<i>Tenthredopsis guichardi</i> Benson, 1968	13		
<i>Tenthredopsis litterata</i> (Geoffroy, 1785)	6		
Xiphydriidae	Xiphydriinae	<i>Xiphydria prolongata</i> (Geoffroy, 1785)	1
Xyelidae	Xyelinae	<i>Xyela curva</i> (Benson, 1938)	1

Çizelge 2.2 GenBank veri tabanında alınarak çalışmaya dahil edilen türler

Familya	Altfamilya	Türler	Birey Sayısı	GenBank No.
Tenthredinidae	Allantinae	<i>Empria alector</i>	4	HM177273.1-HM177276.1
		<i>Empria alpina</i>	2	HM177300.1-HM177301.1
		<i>Empria basalis</i>	7	HM177266.1-HM177272.1
		<i>Empria candidata</i>	1	HM177315.1
		<i>Empria excisa</i>	1	HM177313.1
		<i>Empria fletcheri</i>	1	HM177308.1
		<i>Empria honshuana</i>	1	JN029854.1
		<i>Empria hungarica</i>	1	JN788313.1
		<i>Empria immersa</i>	3	HM177305.1-HM177307.1
		<i>Empria improba</i>	1	JN788309.1
		<i>Empria japonica</i>	4	HM177297.1-HM177299.1, JN029843.1
		<i>Empria liturata</i>	2	JN029855.1, HM177310.1
		<i>Empria loktini</i>	3	JN029845.1-JN029846.1, HM177302.1
		<i>Empria longicornis</i>	7	HM177290.1-HM177296.1
		<i>Empria minuta</i>	2	HM177304.1, HQ412769.1
		<i>Empria multicolor</i>	1	JN788314.1
		<i>Empria pallimacula</i>	1	HM177311.1
		<i>Empria parvula</i>	1	HM177312.1
		<i>Empria plana</i>	2	JN029847.1-JN029848.1
		<i>Empria pumiloides</i>	1	HM177309.1
		<i>Empria quadrimaculata</i>	2	JN029857.1-JN029858.1
		<i>Empria rubicola</i>	1	JN029856.1
		<i>Empria sexpunctata</i>	1	HM177314.1
		<i>Empria takeuchii</i>	2	JN029852.1-JN029853.1
		<i>Empria tridens</i>	14	HM177277.1-HM177288.1, JF505296.1, JN029842.1
		<i>Empria tridentis</i>	3	JN029849.1-JN029851.1
		<i>Monsoma pulveratum</i>	2	JN788315.1, HM177316.1

2.2 DNA İzolasyonu

Total genomik DNA izolasyonu %99'lük alkol içerisinde saklanan örneklerin bir bacak seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerden pens yardımıyla alınan bacak setleri kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra mikrosantrifüj tüpleri içerisine alınarak mekanik ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra QIAGEN marka (DNeasy Blood & Tissue Kit) DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu sırasında ticari kit protokolünde bazı değişiklikler yapılmıştır ve protokol şu şekilde izlenmiştir:

1. Doku örneklerine mekanik ezme işlemi uygulanır.
2. Mekanik ezme gerçekleştirilen örnek, 180 µl ATL tamponu ile süspansiyon edilir. Üzerine 20 µl proteinaz K eklenir, karıştırılır ve dokunun tümüyle lizis olması amacıyla 37 °C'de gece boyu karıştırıcılı ortamda inkübasyona bırakılır.
3. Homojenatın üzerine 200 µl AL tamponu eklenir ve ardından tekrar karıştırma işlemi yapılır. Homojenat üzerine 200 µl absolute etanol eklenir ve tekrar karıştırılır.

4. Bu karışım kitle birlikte temin edilen 2 ml'lik santrifüj tüplerinin içindeki DNeasy Mini spin kolon içine yerleştirilir ve ardından 6000 x g'de 2 dakika santrifüj edilir.
5. DNeasy Mini spin kolonun alttaki tüp kısmı atılarak yine kit ile beraber temin edilen 2 ml'lik santrifüj tüpüne konular ve içerisine 500 µl AW1 tamponu eklenerek 6000 x g'de 2 dakika santrifüj edilir.
6. DNeasy Mini spin kolon tekrar 2 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl AW2 tamponu eklenir ve 20,000 x g'de 5 dk santrifüj edilir.
7. Tüp uzaklaştırılarak DNeasy Mini spin kolon 2 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilir ve DNA'nın kolondan elüsyonu amacıyla membran üzerine 50 µl AE tamponu dikkatli bir şekilde eklenir. Oda sıcaklığında 2 dakikalık inkübasyondan sonra 6000 x g'de 3 dakika santrifüj edilir.
8. Genomik DNA örnekleri saklanmak üzere -20 °C' ye kaldırılır. PZR uygulamaları aşamasında ihtiyaç duyulursa mevcut genomik DNA'nın çözünmesini kolaylaştırmak amacıyla DNA örnekleri sıcak-soğuk şokuna (65 °C'de 10 dk ve -20 °C'de 20 dk) maruz bırakılabilir.

DNA izolasyonu aşamasının tamamlanmasından sonra genomik DNA'nın kalite ve kantitesinin belirlenmesi amacıyla NanoDrop (MaestroNano®) aleti kullanılarak ölçümleri yapılmıştır.

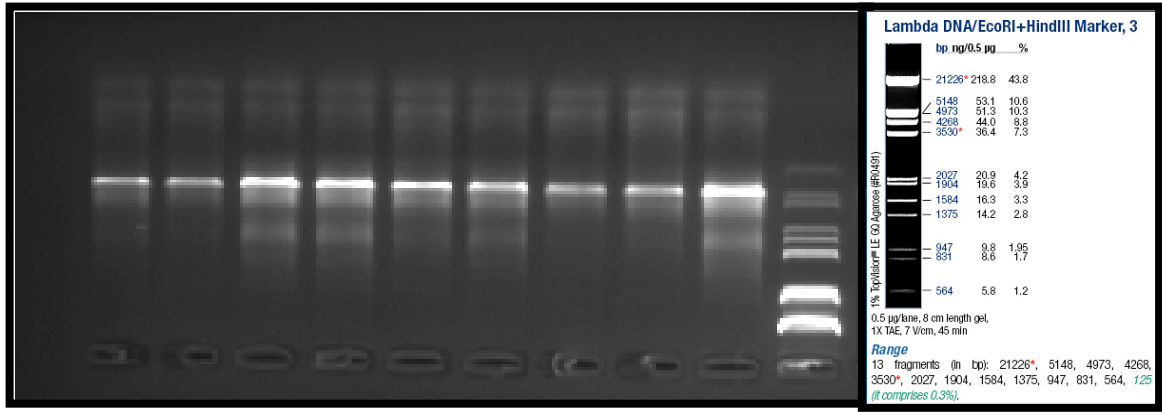
2.3 ITS2 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla (PZR) Çoğaltılması

Çekirdek DNA'nın 5.8S-ITS2-28S rDNA bölgeleri Ji ve ark. (2003) tarafından tasarlanan evrensel Hymenoptera ITS2 primerleri Cas5p8sFt (5'ATG AAC ATC GAC ATT TCG AAC GCA TAT 3') ve Cas28sB1d (5'TTC TTT TCC TCC GCT TAG TAA TAT GCT TAA 3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak bazı örneklerin ITS2 bölgelerinin çoğaltımından bu primer ile başarı sağlanamamıştır. Symphyta alttakımdan *Empria* cinsinin ITS2 bölgelerinin çoğaltılması sırasında benzer problemle karşılaşan Prous ve ark. (2011) tarafından kullanılan AM1 (5' TGT GAA CTG CAG GAC ACA TGA 3') ve AM2 (5'ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC 3') primerleri kullanılarak tüm bireylerin ITS2 bölgesi çoğaltılmıştır (Prous ve ark., 2011).

PZR reaksiyonları 50µl son hacimde hazırlanmış olup, reaksiyon ortamına 0,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl 10 × reaksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), primer çiftlerinin her birinden 10 pmol (Macrogen), 0,2 mM dNTP (MBI Fermentas), 3 mM MgCl₂ ve 10-200 ng kalıp DNA eklenmiştir. PZR

uygulamalarında; 94 °C’de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonu ve sonrasında 33 döngüden oluşan; denatürasyon (94 °C’de 40 saniye), primer bağlanma (51 °C’de 40 saniye), uzama (72 °C, 1 dakika) ve son uzama (72 °C’de 10 dakika) adımları takip edilmiştir.

ITS2 bölgesinin PZR ürünlerinin kalite ve kantitesi %1’lik konsantrasyonla hazırlanan agaroz jel ile elektroforetik olarak kontrol edilmiştir (Şekil 2.2). Dizileme öncesi PZR ürünlerinin konsantrasyonun yaklaşık olarak bilinmesi gerektiğinden bant parlaklıklarına göre belirteç ile karşılaştırma yapılarak konsantrasyon tahmin edilmiştir.

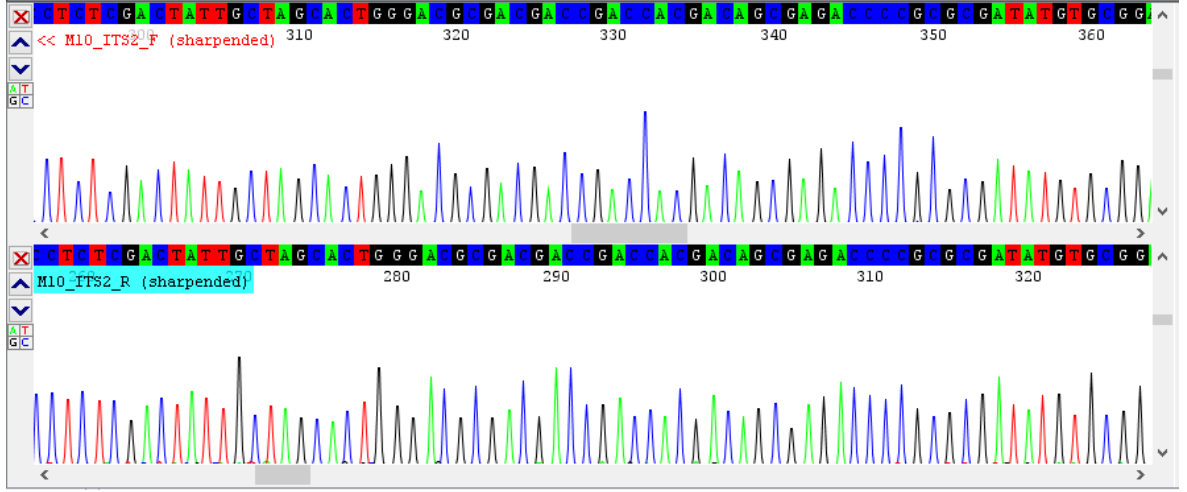


Şekil 2.2 Argidae familyası türlerinin ITS2 PZR ürünleri

Kalitesi ve kantitesi jel üzerinde tespit edilen örneklerden başarılı bir şekilde çoğalanlar dizileme reaksiyonları için -20 °C’de saklanmıştır. Düşük konsantrasyonlu örnekler PZR ürünün kalıp olarak kullanılmasıyla tekrardan çoğaltılmıştır ve böylelikle dizilemeye gönderilmiştir.

2.4 ITS2 Bölgesinin Dizilenmesi ve Dizilerin Düzeltilmesi

PZR reaksiyonları sonucunda çoğaltılan ITS2 bölgelerinin dizilenme ve saflaştırılma işlemleri Macrogen firmasından (Meibergdreef 31, A.2. Amsterdam, The Netherlands, P.K: 1105) hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. Dizileme reaksiyonları PZR de kullanılan primer çiftleri kullanılarak iki yönlü gerçekleştirilmiştir.

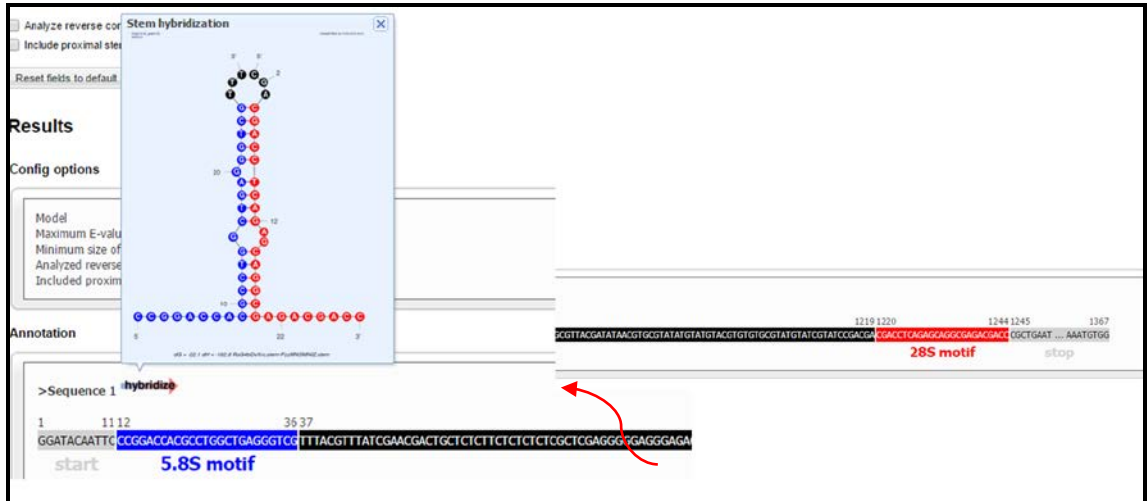


Şekil 2.3 *Aglaostigma aucupariae* türüne ait ITS2 kromotogram görüntüsü

DNA dizileme işlemleri sonucunda firma tarafından gönderilen her bir örneğin iki yönlü dizileme pikleri CodonCode Aligner v.5.1.5 (CodonCode Corporation) paket programı kullanılarak gözle kontrol edilmiştir ve hatalı diziler düzeltilmiştir (Şekil 2. 3).

2.5 ITS2 Bölgesinin Sınırlarının Belirlenmesi (Annotation)

ITS2 bölgelerinin in vitro amplifikasyonunda kullanılan primerler çrDNA'nın 5.8S ve 28S bölgelerine bağlanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 ITS2 veri tabanında ham dizilerin sınırların belirlenmesi

Bu nedenle dizileme sonrasında bu bölgelerin ITS2 bölgesinden ayrılması gerekmektedir. Ham diziler ITS2 rRNA Database bünyesinde çevrimiçi hizmet veren program kullanılarak sınırlandırılmıştır (Keller ve ark., 2009). Ancak bazı dizilerin 5.8S

ya da 28S bölgelerine ait dizilerin kısa olması nedeniyle referans dizilerle hizalama yapılarak sınırlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.6 ITS2 Bölgesinin Barkod Aracı Olarak Sınanması

Dizileme çalışmaları sonrasında 10 farklı familyadan 51 türün 109 bireyinin ITS2 dizi bilgisi oluşturulmuştur (Çizelge 2.1). Ayrıca GenBank veritabanında yer alan 27 türden 71 bireyin ITS2 verisi de analizlere dahil edilmiştir (Çizelge 2.2). Sonuç olarak 180 bireyi kapsayan bir veri seti oluşturulmuştur ve bu veri seti hem bir bütün olarak hem de tür, cins, altfamilya ve familya olarak ayrılarak korunmuşluk ve değişkenlik düzeylerini bulmak için uzaklık tabanlı analizler gerçekleştirilmiştir.

2.7.1 Nükleotid Dizisi Tabanlı Analizler

ITS2 dizi verisi MAFFT v7.017 (Kato ve ark., 2002) çoklu dizi hizalama programı kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanmış dizi verisi üzerinden korunmuşluk ve değişkenlik düzeylerinin belirlenmesi amacıyla Mega 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı içerisinde yer alan “p-distance” uzaklık yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda minimum evrim prensibi tabanlı komşu bağlama (NJ - neighbour joining) yöntemi ve nükleotid yer değişime modeli olarak da Kimura 2-parametre (K2P) modeli kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır (Kimura, 1980).

2.7.2 İkincil Yapı Tabanlı Analizler ve İkincil Yapıların Karakterizasyonu

Sınırları belirlenen dizilerin ikincil yapıları RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), mFOLD (Zuker, 2003) ve NUPACK (Serra ve Turner, 1995; Mirela ve ark., 2003) programları kullanılarak tahmin edilmiştir. İkincil yapı şekli ve “vienna” formatındaki bilgisi sonraki analizler için kayıt edilmiştir. İkincil yapı tahminleri içerisinde ökaryotlar için önerilen genel ITS2 özelliklerine uyan yapılar seçilmiştir. Bu yapılar model olarak kullanılarak ITS2 veri tabanı (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) içerisinde homoloji modelleme modülü kullanılarak yakın taksonomik grupların ikincil yapıları belirlenmiştir. İkincil yapıların karşılaştırılması ExpaRNA (Smith ve ark., 2010) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve homolog heliksler böylelikle adlandırılmıştır.

İkincil yapı verisini içeren dizi dosyaları daha sonra farklı taksonomik düzeyler için ayrı ayrı 12 x 12 veri matrisini (4 nükleotid için ve 3 ikincil yapı durumu) kullanan 4SALE (Seibel ve ark., 2008) programı kullanılarak hizalanmıştır. Bu veri seti ikincil yapı-

nükleotid verisini içeren “.xfasta” formatında kayıt edilmiştir. Bu veri dosyası nükleotid dizi bilgisinin yanı sıra nokta ve parantez işaretleriyle ikincil yapının durumunun da bilgisini içermektedir, parantezler iki nükleotid arasındaki eşleşme (sağ ve sol yönlü olarak), noktalar ise eşleşmeme durumunu ifade etmektedir(Şekil 2.5). Tür, cins, altfamilya ve familya düzeyinde CBC tabloları 4SALE programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Corynis_lateralis	C	A	G	C	G	G	C	C	C	U	C	G	C	U	G	U
Corynis_crassicornis	G	G	C	C	C	U	C	G	C	G	G	U	U	A	U	U
Abia_sericea	C	U	C	C	U	C	U	G	C	C	G	G	A	C	G	A
Corynis_lateralis	(((((((.	.	.	.)))))
Corynis_crassicornis)))))	.)))))
Abia_sericea))))))))	.)	.

Şekil 2.5 Cimbicidae türlerine ait .xfasta dosyası

CBC veri matrislerini bir karakter olarak kullanarak BIONJ olarak adlandırılan komşu bağlama ağaçları oluşturan CBCAnalyzer (Wolf ve ark., 2005b) programı kullanılarak CBC verisi üzerinde filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Aynı zamanda 4SALE programı ile hizalanmış ikincil yapı-nükleotid verisi (.xfasta formatı) ProfDist programına (Wolf ve ark., 2008) yüklenerek PNJ (Profile Neighbor Joining) ağaçları çizilmiştir. ProfDist programında uzaklık doğrulama modeli (distance correction model) olarak “General Time Reversible” kullanılmış olup, “Ratematrix Q” opsiyonu için ITS2 dizileri için özel olarak geliştirilen nükleotid değişim modeli “ITS2-Q” değişim modeli kullanılmıştır (Wolf ve ark., 2008). Ağaç topolojilerinin test edilmesi amacıyla seç-bağla testi (bootstrap) kullanılmış olup, her analiz için 1000 tekrarlı olarak ayarlanmıştır (Felsenstein, 1985). Her filogenetik ağaç üzerinde desteklenme değerleri yüzde olarak verilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında Symphyta alttakımı üyelerinin ITS2 bölgelerinin yapısı, evrimi ve DNA barkodlama da kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu kapsamda 10 familyaya ait 51 türden 109 birey ITS2 bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılmış ve DNA dizi bilgisi elde edilmiştir. Aynı zamanda GenBank veri tabanında yer alan 27 türden 71 birey çalışmaya dahil edilerek veri seti genişletilmiştir. Böylelikle Symphyta üyelerine ait ITS2 bölgesi ilk defa, hem primer dizi bilgisi hem de ikincil yapı bilgisi kullanılarak DNA barkodlama uygulamalarında bir araç olarak sınanmış ve yapısal olarak karakterize edilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler sırası ile sistematik olarak başlıklar halinde bu kısımda verilmiştir.

3.1 Laboratuvar Çalışmaları

Moleküler çalışmalarda DNA izolasyonu ilk aşamayı oluşturmaktadır. PZR ve dolayısıyla dizileme aşamaların başarı ile yürütülebilmesi için izole edilen DNA'nın saf ve yeterli konsantrasyonda olması gerekmektedir. Bu amaçla, QIAGEN marka (DNeasy Blood & Tissue Kit) DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Daha sonra her örnek için izole edilen DNA'lar kalite ve kantitesinin belirlenmesi için NanoDrop (MaestroNano®) aleti kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda en düşük konsantrasyon 30 ng/µl ile *T. frisei* türüne, en yüksek konsantrasyon ise 3368 ng/µl ile *X. prolongata* türüne aittir. İzolasyonların kalitesinin belirlenmesi için ise 260 ve 280 nm dalga boyunda yapılan okumaların oranları hesaplanmıştır. İdeal saf DNA'nın A260/A280 oranı 1,8 olmalıdır. Bu değerin altında olan örnekler protein, üstünde olan örnekler ise RNA kontaminasyonu içerebilir. Yapılan ölçümler sonucunda en düşük A260/280 oranı 1,15 ile *P. smyrnensis* türüne ait iken en yüksek değer olan 2 *T. tabidus*, *R. viridis* ve *M. rubi* türlerine aittir. Yapılan ölçümler ve sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışmada Orussidae familyasının temsil edilmesi amacıyla *Ophrella eldorado* türü yurtdışından temin edilmiştir (Natural History Museum, London). Ancak örnekten PZR reaksiyonları için yeterli kalite ve nicelikte DNA izole edilememiştir. Bu nedenle çalışmadan çıkarılmıştır.

DNA barkodlama çalışmalarında kullanılacak DNA dizisinin laboratuvar ortamında PZR ile çoğaltılmasının kolay olması ve evrensel primerlere sahip olması gerekmektedir (Frézal & Leblois, 2008). Bu kapsamda Cas5p8sFt- Cas28sB1d ve AM1-AM2 primer

çiftleri Symphyta alttakımda ITS2 bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında kullanılmış olup, AM1-AM2 primer çiftinin çalışılan tüm gruplarda daha başarılı olduğu görülmüştür. Cas5p8sFt- Cas28sB1d primer çifti ise 51 türden 35'inin ITS2 bölgesinin çoğaltılmasında başarılı olmuştur. Bu iki primer çiftine ait başarı (+) ve başarısızlık (-) durumları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 DNA konsantrasyonları, A260/280 oranları

Familya	Altfamilya	Türler	DNA Konsantrasyonu.(ng/µl)	A260/A280
Argidae	Arginae	<i>Arge dimidiata</i> (Fallén, 1808)	197	1,62
		<i>Arge ochropus</i> (Gmelin, 1790)	137	1,54
		<i>Arge pleuritica</i> (Klug, 1834)	560	1,67
		<i>Arge enodis</i> (Linné, 1767)	79	1,56
		<i>Arge</i> sp.	140	1,63
	Sterictiphorinae	<i>Sterictiphora angelicae</i> (Panzer, 1799)	238	1,64
		<i>Sterictiphora furcata</i> (Villers, 1789)	166	1,6
Cephalidae	Cephinae	<i>Calameuta pygmaea</i> (Poda, 1761)	61	1,83
		<i>Cephus pygmeus</i> (Linné, 1767)	50	1,57
		<i>Cephus rjabovi</i> (Dovnar-Zapolskij, 1926)	63	1,6
		<i>Hartigia linearis</i> (Schrank, 1781)	1538	1,59
		<i>Pachycephus smyrnensis</i> (J.P.E.F. Stein, 1876)	119	1,15
		<i>Trachelus iudaicus</i> (Konow, 1907)	242	1,75
		<i>Trachelus tabidus</i> (Fabricius, 1775)	41	2
		<i>Calameuta idolon</i> (Rossi, 1794)	163	1,6
Cimbicidae	Abiinae	<i>Abia sericea</i> (Linné, 1767)	398	1,76
	Corynidinae	<i>Corynis crassicornis</i> (Rossi, 1790)	314	1,74
		<i>Corynis lateralis</i> (Brullé, 1832)	173	1,18
Diprionidae	Diprioninae	<i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785)	60	1,83
Megalodontesidae		<i>Megalodontes cephalotes</i> (Fabricius, 1781)	55	1,59
Pamphiliidae	Cephalciinae	<i>Acantholyda posticalis</i> (Matsumura, 1912)	245	1,68
Siricidae	Siricinae	<i>Sirex noctilio</i> (Fabricius, 1793)	897	1,55
		<i>Allantus cinctus</i> (Linné, 1758)	541	1,68
Tenthredinidae	Allantinae	<i>Allantus didymus</i> (Klug, 1818)	278	1,75
		<i>Athalia circularis</i> (Klug, 1815)	89	1,66
		<i>Athalia scutellariae</i> (Cameron, 1880)	257	1,91
		<i>Blennocampinae</i>	<i>Monophadnoides rubi</i> (T.W. Harris, 1845)	326
	Nematinae	<i>Cladius pectinicornis</i> (Geoffroy, 1785)	260	1,67
		<i>Nematus</i> sp.	352	1,94
		<i>Pontania</i> sp.	430	1,92
		<i>Pristiphora conjugata</i> (Dahlbom, 1835)	1030	1,76
	Selandriinae	<i>Pristiphora platycerus</i> (Hartig, 1840)	1059	1,59
		<i>Dolerus vestigialis</i> (Klug, 1818)	1012	1,64
		<i>Dolerus pratensis</i> (Linné, 1758)	638	1,93
		<i>Dolerus germanicus</i> (Fabricius, 1775)	856	1,57
	Tenthredininae	<i>Selandria serva</i> (Fabricius, 1793)	320	1,88
		<i>Aglaostigma aucupariae</i> (Klug, 1817)	1056	1,95
		<i>Aglaostigma fulvipes</i> (Scopoli, 1763)	942	1,96
		<i>Macrophya diversipes</i> (Schrank, 1782)	1525	1,74
		<i>Macrophya superba</i> (Tischbein, 1852)	1389	1,69
		<i>Rhogogaster viridis</i> (Linné, 1758)	323	2
		<i>Tenthredo costata</i> (Klug, 1817)	1700	1,8
		<i>Tenthredo asiatica</i> (Enslin, 1910)	104	1,7
<i>Tenthredo zonula</i> (Klug, 1817)		103	1,9	
<i>Tenthredopsis andrei</i> (Konow, 1898)		79	1,8	
<i>Tenthredopsis annuligera</i> (Eversmann, 1847)		77	1,8	
<i>Tenthredopsis friesei</i> (Konow, 1884)		30	1,8	
<i>Tenthredopsis guichardi</i> Benson, 1968	145	1,4		
<i>Tenthredopsis litterata</i> (Geoffroy, 1785)	81	1,73		
Xiphytriidae	Xiphytriinae	<i>Xiphytria prolongata</i> (Geoffroy, 1785)	3368	1,78
Xyelidae	Xyelinae	<i>Xyela curva</i> (Benson, 1938)	400	1,72

Çizelge 3.2 PZR aşamasında kullanılan primerler (+/- başarılı/başarısız)

Familiya	Altfamilya	Türler	Cas5p8sFt-Cas28SB1d	AM1-AM2
Argidae	Arginae	<i>Arge dimidiata</i> (Fallén, 1808)	+	+
		<i>Arge ochropus</i> (Gmelin, 1790)	-	+
		<i>Arge pleuritica</i> (Klug, 1834)	-	+
		<i>Arge enodis</i> (Linné, 1767)	+	+
		<i>Arge</i> sp.	+	+
	Sterictiphorinae	<i>Sterictiphora angelicae</i> (Panzer, 1799)	+	+
		<i>Sterictiphora furcata</i> (Villers, 1789)	+	+
Cephidae	Cephinae	<i>Calameuta pygmaea</i> (Poda, 1761)	+	+
		<i>Cephus pygmeus</i> (Linné, 1767)	+	+
		<i>Cephus rjabovi</i> (Dovnar-Zapolskij, 1926)	+	+
		<i>Hartigia linearis</i> (Schrank, 1781)	+	+
		<i>Pachycephus smyrnensis</i> (J.P.E.F. Stein, 1876)	+	+
		<i>Trachelus iudaicus</i> (Konow, 1907)	+	+
		<i>Trachelus tabidus</i> (Fabricius, 1775)	+	+
		<i>Calameuta idolon</i> (Rossi, 1794)	+	+
Cimbicidae	Abiinae	<i>Abia sericea</i> (Linné, 1767)	-	+
	Corynidinae	<i>Corynis crassicornis</i> (Rossi, 1790)	+	+
		<i>Corynis lateralis</i> (Brullé, 1832)	+	+
Diprionidae	Diprioninae	<i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785)	+	+
Megalodontesidae		<i>Megalodontes cephalotes</i> (Fabricius, 1781)	+	+
Pamphiliidae	Cephalciinae	<i>Acantholyda posticalis</i> (Matsumura, 1912)	-	+
Siricidae	Siricinae	<i>Sirex noctilio</i> (Fabricius, 1793)	-	+
Tenthredinidae	Allantinae	<i>Allantus cinctus</i> (Linné, 1758)	-	+
		<i>Allantus didymus</i> (Klug, 1818)	-	+
		<i>Athalia circularis</i> (Klug, 1815)	-	+
		<i>Athalia scutellariae</i> (Cameron, 1880)	-	+
	Blennocampinae	<i>Monophadnoides rubi</i> (T.W. Harris, 1845)	-	+
	Nematinae	<i>Cladius pectinicornis</i> (Geoffroy, 1785)	-	+
		<i>Nematus</i> sp.	-	+
		<i>Pontania</i> sp.	-	+
		<i>Pristiphora conjugata</i> (Dahlbom, 1835)	-	+
	Selandriinae	<i>Pristiphora platycerus</i> (Hartig, 1840)	-	+
		<i>Dolerus vestigialis</i> (Klug, 1818)	+	+
		<i>Dolerus pratensis</i> (Linné, 1758)	+	+
		<i>Dolerus germanicus</i> (Fabricius, 1775)	+	+
		<i>Selandria serva</i> (Fabricius, 1793)	-	+
	Tenthredininae	<i>Aglaostigma aucupariae</i> (Klug, 1817)	+	+
		<i>Aglaostigma fulvipes</i> (Scopoli, 1763)	+	+
		<i>Macrophya diversipes</i> (Schrank, 1782)	+	+
		<i>Macrophya superba</i> (Tischbein, 1852)	+	+
		<i>Rhogogaster viridis</i> (Linné, 1758)	+	+
		<i>Tenthredo costata</i> (Klug, 1817)	+	+
		<i>Tenthredo asiatica</i> (Enslin, 1910)	+	+
		<i>Tenthredo zonula</i> (Klug, 1817)	+	+
		<i>Tenthredopsis andrei</i> (Konow, 1898)	+	+
<i>Tenthredopsis annuligera</i> (Eversmann, 1847)		+	+	
<i>Tenthredopsis friesei</i> (Konow, 1884)		+	+	
<i>Tenthredopsis guichardi</i> Benson, 1968		+	+	
<i>Tenthredopsis litterata</i> (Geoffroy, 1785)		+	+	
Xiphydriidae		Xiphydriinae	<i>Xiphydria prolongata</i> (Geoffroy, 1785)	+
Xyelidae	Xyelinae	<i>Xyela curva</i> (Benson, 1938)	+	+

3.2 ITS2 Bölgelerinin Uzunluğu ve Nükleotid Kompozisyonları

Symphyta alttakımı üyelerinde 10 familyayı kapsayan veri seti ITS2 bölgelerini içeren diziler sınırlandırılmış ve oluşturulan tam ITS2 bölgelerinin nükleotid uzunluğu ve

%GC içeriği belirlenmiştir. Çizelge 3.3'de tüm türlere ait ITS2 bölgesi nükleotid uzunluğu ve %GC içeriği bilgisi sunulmuş olup, tür içerisinde uzunluk ve %GC bakımından varyasyonlar gözlemlenmiştir.

Alttakım içerisinde ITS2 bölgesi en uzun olan tür 1351 baz çifti (bç) ile *T. iudaicus* türü iken, *E. pallimacula* türü 406 bç. ile en kısa ITS2 bölgesine sahiptir. Argidae familyası içerisinde 442 bç (*S. furcata*) ile 661 bç (*Arge* sp.) arasında değişen büyüklüğe sahip ITS2 bölgesi, *A. pleuritica* türüne ait örnekler içerisinde 582-591 bç arasında varyasyon göstermektedir. Cephidae familyası içerisinde ITS2 bölgesi 733 bç (*T. tabidus*) ile 1351 bç (*T. iudaicus*) arasında değişen uzunluğa sahiptir. Cephidae familyasından 16 birey ile temsil edilen *C. pygmeus* türünde tür içi uzunluk varyasyonu görülmemiştir. Cimbicidae familyasında ITS2 bölgesi, 688 bç (*C. crassicornis*) ile 697 bç (*C. lateralis*) arasında değişmektedir. Tek tür ile temsil edilen Diprionidae, Megalodontesidae, Pamphiliidae, Siricidae, Xiphydriidae ve Xyelidae familyalarına ait türlerin ITS2 bölgeleri, sırası ile 476 bç (*N. sertifer*), 1251 bç (*M. cephalotes*), 559 bç (*A. posticalis*), 1183 bç (*S.noctilio*), 600 bç (*X. prolongata*) ve 488 bç (*X. curva*) uzunluğundadır. Symphyta alttakımı içerisinde tür çeşitliliği bakımından en geniş grubu oluşturan Tenthredinidae familyası çalışmamızda da 5 altfamilya ile temsil edilmiştir. Allantinae altfamilyası içerisinde ITS2 bölgelerinin uzunluğu 406 bç (*E. pallimacula*) ile 538 bç (*A. didymus*) arasında değişmektedir. Bu altfamilyanın *M. pulveratum* (445-468 bç), *E. tridens* (469-470 bç), *E. quadrimaculata*(493-494 bç), *E. minuta* (468-467 bç), *E. liturata* (415-422 bç), *E. basalis* (470-472 bç) ve *E. alpina* (470-471 bç) türlerinde tür içi ITS2 büyüklük varyasyonu gözlemlenmiştir. Tenthredinidae familyasının bir diğer altfamilyası olan Blennocampinae, tek tür ile çalışmada yer almıştır ve ITS2 bölgesi 455 bç (*M. rubi*) uzunluğundadır. Nematinae altfamilyasında ise ITS2 bölgesi 421 bç (*Nematus* sp.) ile 549 bç (*P. platycerus*) arasında değişmektedir. ITS2 bölgesi Selandriinae altfamilyasında ise 521 bç (*D. vestigialis*) ile 699 bç (*S. serva*) arasında değişmektedir. Tenthredininae altfamilyası içerisinde 482 bç (*M. diversipes*) ile 603 bç (*T. litterata*) arasında değişen ITS2 bölgesi *T. guichardi* (540-541 bç), *T. litterata* (592-603) ve *T. annuligera* (547-548) türlerinde tür içi büyüklük varyasyonu göstermektedir.

ITS2 nükleotid kompozisyonu açısından oldukça çeşitlilik gösteren Symphyta alttakımı türlerine ait ITS2 bölgelerinin GC içeriği %44,9 (*M. cephalotes*) ile %64,8 (*E. quadrimaculata*) arasında değişmektedir. Argidae familyasında %52,7 (*A. enodis*) ile

%62,7 (*S. furcata*) arasında değişiklik göstermektedir. Cephidae familyası içerisinde ise GC içeriği %47,4 (*C. pygmeus*) ile %56,9 (*P. smyrnensis*) arasında değişmektedir. Cimbicidae familyasında % 53,9 (*C. lateralis*) ile %56,3 (*A. sericea*) arasında değişkenlik gösteren GC içeriği; Diprionidae, Megalodontesidae, Pamphiliidae, Siricidae, Xiphydriidae ve Xyelidae familyalarında sırası ile %60,5 (*N. sertifer*), %44,9 (*M. cephalotes*), %56,5 (*A. posticalis*), %62 (*S. noctilio*), %59 (*X. prolongata*) ve %54,2 (*X. curva*) arasında değişmektedir. En yüksek %GC içeriğine sahip olan Tenthredinidae familyası, %51,5 (*Tenthredopsis guichardi*) ile %64,8 (*E. quadrimaculata*) arasında değişen GC içeriğine sahiptir.

Çizelge 3.3 ITS2 bölgelerinin uzunluğu ve nükleotid kompozisyonları

Familya	Altfamilya	Türler	Birey Sayısı	%GC	Uzunluğu (b.ç.)	
Argidae	Arginae	<i>Arge dimidiata</i> (Fallén, 1808)	4	56,6	603	
		<i>Arge ochropus</i> (Gmelin, 1790)	4	57,4	612	
		<i>Arge pleuritica</i> (Klug, 1834)	4	59,6-59,7	582-591	
		<i>Arge enodis</i> (Linné, 1767)	1	52,7	647	
	<i>Arge</i> sp.	1	53,1	661		
		Sterictiphorinae	<i>Sterictiphora angelicae</i> (Panzer, 1799)	1	59,4	503
		<i>Sterictiphora furcata</i> (Villers, 1789)	1	62,7	442	
Cephiidae	Cephinae	<i>Calameuta pygmaea</i> (Poda, 1761)	1	49,3	1004	
		<i>Cephus pygmeus</i> (Linné, 1767)	16	47,4	1035	
		<i>Cephus rjabovi</i> (Dovnar-Zapolskij, 1926)	1	48,7	862	
		<i>Hartigia linearis</i> (Schrank, 1781)	1	52,1	1048	
		<i>Pachycephus smyrnensis</i> (J.P.E.F. Stein, 1876)	1	56,9	1126	
		<i>Trachelus iudaicus</i> (Konow, 1907)	1	50,3	1351	
		<i>Trachelus tabidus</i> (Fabricius, 1775)	1	48,6	733	
		<i>Calameuta idolon</i> (Rossi, 1794)	1	52,5	1008	
				<i>Calameuta idolon</i> (Rossi, 1794)	1	52,5
Cimbicidae	Abiinae	<i>Abia sericea</i> (Linné, 1767)	1	56,3	689	
	Coryninae	<i>Corynis crassicornis</i> (Rossi, 1790)	1	54,9	688	
		<i>Corynis lateralis</i> (Brullé, 1832)	1	53,9	697	
Diprionidae	Diprioninae	<i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785)	1	60,5	476	
Megalodontesidae		<i>Megalodontes cephalotes</i> (Fabricius, 1781)	1	44,9	1251	
Pamphiliidae	Cephalciinae	<i>Acantholyda posticalis</i> (Matsumura, 1912)	1	56,5	559	
Siricidae	Siricinae	<i>Sirex noctilio</i> (Fabricius, 1793)	1	62,0	1183	
Tenthredinidae	Allantinae	<i>Allantus cinctus</i> (Linné, 1758)	1	59,1	440	
		<i>Allantus didymus</i> (Klug, 1818)	1	61,5	538	
		<i>Athalia circularis</i> (Klug, 1815)	1	53,5	508	
		<i>Athalia scutellariae</i> (Cameron, 1880)	1	58,7	511	
		<i>Empria alector</i>	4	62,8-63	470	
		<i>Empria alpina</i>	2	63,1-63,2	470-471	
		<i>Empria basalis</i>	7	63,1-63,2	470-472	
		<i>Empria candidata</i>	1	61,7	449	
		<i>Empria excisa</i>	1	60,0	488	
		<i>Empria fletcheri</i>	1	62,9	442	
		<i>Empria honshuana</i>	1	62,1	486	
		<i>Empria hungarica</i>	1	60,8	487	
		<i>Empria immersa</i>	3	62,7	442	
		<i>Empria improba</i>	1	62,9	442	
		<i>Empria japonica</i>	4	62,9	469	
		<i>Empria liturata</i>	2	61,4-61,7	415-422	
		<i>Empria lokitini</i>	3	62,9-63,1	466	
		<i>Empria longicornis</i>	7	62,9-63,1	469	
		<i>Empria minuta</i>	2	62,7	468-467	
		<i>Empria multicolor</i>	1	64,5	439	
		<i>Empria pallimacula</i>	1	60,3	406	
	<i>Empria parvula</i>	1	63,1	483		
	<i>Empria plana</i>	2	62,2-62,6	445		
	<i>Empria pumiloides</i>	1	61,5	481		
	<i>Empria quadrimaculata</i>	2	64,7-64,8	493-494		
	<i>Empria rubicola</i>	1	64,4	480		
	<i>Empria sexpunctata</i>	1	63,0	497		
	<i>Empria takeuchii</i>	2	62,3	470		
	<i>Empria tridens</i>	14	63-63,4	469-470		
	<i>Empria tridentis</i>	3	62,6	465		
	<i>Monsoma pulveratum</i>	2	61,6-61,8	445-468		
		Blennocampinae	<i>Monophadnoides rubi</i> (T.W. Harris, 1845)	1	60,7	455
		Nematinae	<i>Cladius pectinicornis</i> (Geoffroy, 1785)	1	53,0	546
			<i>Nematus</i> sp.	1	54,4	421
			<i>Pontania</i> sp.	1	54,2	522
			<i>Pristiphora conjugata</i> (Dahlbom, 1835)	1	53,0	548
			<i>Pristiphora platycerus</i> (Hartig, 1840)	1	52,5	549
		Selandriinae	<i>Dolerus vestigialis</i> (Klug, 1818)	1	57,4	521
			<i>Dolerus pratensis</i> (Linné, 1758)	1	55,6	619
			<i>Dolerus germanicus</i> (Fabricius, 1775)	1	55,6	640
			<i>Selandria serva</i> (Fabricius, 1793)	1	55,2	699
		Tenthredininae	<i>Aglaostigma aucupariae</i> (Klug, 1817)	1	52,3	499
			<i>Aglaostigma fulvipes</i> (Scopoli, 1763)	1	52,1	495
			<i>Macrophya diversipes</i> (Schrank, 1782)	1	60,0	482
			<i>Macrophya superba</i> (Tischbein, 1852)	1	60,0	483
			<i>Rhogogaster viridis</i> (Linné, 1758)	1	51,8	539
			<i>Tenthredo costata</i> (Klug, 1817)	1	54,8	547
			<i>Tenthredo asiatica</i> (Enslin, 1910)	1	53,6	509
			<i>Tenthredo zonula</i> (Klug, 1817)	1	62,3	584
			<i>Tenthredopsis andrei</i> (Konow, 1898)	6	52,1-52,5	537
			<i>Tenthredopsis annuligera</i> (Eversmann, 1847)	10	52,6-52,8	547-548
			<i>Tenthredopsis friesei</i> (Konow, 1884)	4	52,8	545
			<i>Tenthredopsis guichardi</i> Benson, 1968	13	51,5-52	540-541
			<i>Tenthredopsis litterata</i> (Geoffroy, 1785)	6	54,9-55	592-603
	Xiphydriidae	Xiphydriinae	<i>Xiphydria prolongata</i> (Geoffroy, 1785)	1	59,0	600
	Xyelidae	Xyelinae	<i>Xyela curva</i> (Benson, 1938)	1	54,5	488

3.3 Barkod Aracı Olarak ITS2 Bölgesi

3.3.1 Primer Nükleotid Dizisi Kullanılarak Gerçekleştirilen Analizler

Yalnızca nükleotid dizisi aracılığı ile uzaklık temelli analizler yapılarak ITS2 bölgesinin Symphyta alttakımında barkod aracı olarak etkinliğini test edilmiştir. Bu amaçla tür içerisinde, yeterli örnekleme sahip olan gruplarda familya ve altfamilya düzeyinde genetik uzaklıklar ve NJ ağaçları inşa edilmiştir.

3.3.1.1 Tür İçi Analizler

Symphyta alttakımında barkod aracı olarak ITS2 bölgesinin test edilmesi amacıyla tür içi p-distance analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 3.4'de özetlenmiştir. Tür içinde en çok farklılaşma %3,75 ile *E. liturata* türünde gözlemlenmiştir. Allantinae tür içi uzaklık değerleri %0 ile %3,75 arasında değişmektedir. Bu altfamilyada tür içi değişkenlik ortalama olarak % 0 ile % 3,75 değerleri arasındadır. Ancak bu en yüksek değeri oluşturan *E. liturata* türünden sadece iki bireyin ITS2 dizi bilgisi bulunmaktadır ve Allantinae altfamilyasında ortalama genetik uzaklık değerlerinin standart sapması %1 olarak hesaplanmıştır. Arginae altfamilyasında tür içi uzaklık değerleri %0-1,5 değerleri arasında değişmektedir. Arginae familyasında tür içi ITS2 bölgesindeki değişkenlik ortalama olarak % 0 ile % 0,76 değerleri arasındadır. Arginae altfamilyasında ortalama genetik uzaklık değerlerinin standart sapması %0,3 olarak hesaplanmıştır. Tek tür ile temsil edilen Cephidae familyası (*C. pygmeus*) bireyleri arasında ise varyasyon gözlemlenmemiştir.

Çizelge 3.4 Tür içi genetik uzaklık analizleri

Türler			Birey Sayısı	p-distance		
				Min.	Max.	Ortalama
Argidae	Arginae	<i>Arge dimidiata</i> (Fallén, 1808)	4	0,0000	0,0151	0,0076
		<i>Arge ochropus</i> (Gmelin, 1790)	4	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Arge pleuritica</i> (Klug, 1834)	4	0,0000	0,0051	0,0028
Cephididae	Cephinae	<i>Cephus pygmeus</i> (Linné, 1767)	15	0,0000	0,0000	0,0000
Tenthredinidae	Tenthredininae	<i>Tenthredopsis andrei</i> Konow, 1898	6	0,0019	0,0094	0,0047
		<i>Tenthredopsis annuligera</i> (Eversmann, 1847)	10	0,0000	0,0055	0,0016
		<i>Tenthredopsis friesei</i> (Konow, 1884)	4	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Tenthredopsis guichardi</i> (Benson, 1968)	13	0,0000	0,0093	0,0034
		<i>Tenthredopsis litterata</i> (Geoffroy, 1785)	6	0,0017	0,0171	0,0090
	Allantinae	<i>Empria alector</i> (Benson, 1938)	4	0,0000	0,0021	0,0010
		<i>Empria alpina</i> (Benson, 1938)	2	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Empria basalis</i> (Lindqvist, 1968)	7	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Empria immersa</i> (Klug, 1818)	3	0,0000	0,0022	0,0015
		<i>Empria japonica</i> (Heidemaa & Prous, 2011)	4	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Empria liturata</i> (Gmelin, 1790)	2	0,0375	0,0375	0,0375
		<i>Empria loktini</i> (Ermolenko, 1971)	3	0,0000	0,0043	0,0028
		<i>Empria longicornis</i> (Thomson, 1871)	7	0,0000	0,0043	0,0020
		<i>Empria minuta</i> (Lindqvist, 1968)	2	0,0129	0,0129	0,0129
		<i>Empria plana</i> (Jakowlew, 1891)	2	0,0022	0,0022	0,0022
		<i>Empria quadrimaculata</i> (Takeuchi, 1952)	2	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Empria takeuchii</i> (Prous & Heidemaa, 2011)	2	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Empria tridens</i> (Konow, 1896)	14	0,0000	0,0065	0,0023
		<i>Empria tridentis</i> (Lee & Ryu, 1996)	2	0,0000	0,0000	0,0000
		<i>Monsoma pulveratum</i> (Retzius, 1783)	2	0,0229	0,0229	0,0229

Gerçekleştirilen çalışmadan her familyadan tür içi genetik uzaklık analizi için temsilci bulunmayışı nedeniyle Argidae, Cephididae, ve Tenthredinidae gerçekleştirilen tür içi genetik uzaklık analizinden elde edilen veri diğer grupların genetik uzaklıklarının yorumlanmasında referans olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle Symphyta alttakımında ITS2 bölgesinin tür içinde genetik uzaklık değerleri %0 ile %3,75 arasındadır.

3.3.1.2 Altfamilya ve Familya Analizleri

ITS2 bölgesine ait primer nükleotid dizisinin barkodlamada bir araç olarak kullanılabilirliğinin test edilmesi sonucunda açığa çıkan veriler her familya veya altfamilya için aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

a)Cephididae Familyası

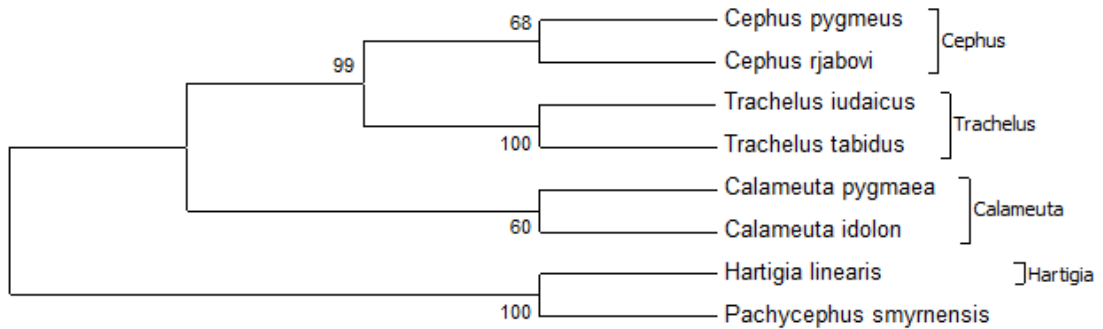
Cephididae familyasından 8 türün ITS2 dizi verisi kullanılarak ikili uzaklık değerleri (p-distance) hesaplanmıştır. *Calameuta* cinsine ait *C. pymaea* ve *C. idolon* arasında % 20,73'lük farklılaşma bulunmuştur. *Cephus* cinsine ait *C. pygmeus* ve *C. rjabovi* arasında ise %10,53'lük bir farklılaşma değeri vardır. *Trachelus* cinsine ait *T. iudaicus* ve *T. tabidus* türleri arasında ise %8 farklılaşma tespit edilmiştir. Diğer iki cins olan *Hartigia* ve *Pachycephus* birer tür ile temsil edilmektedir. Cephididae familyasında en çok farklılaşma %67 ile *T. iudaicus*-*H. linearis* türleri arasında gözlemlenirken, en

düşük farklılaşma %8 ile *T. tabidus*-*T.iudacius* türleri arasındadır. Çalışma kapsamında kullanılan Cephidae türlerine ait tüm ikili uzaklık değerleri Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Cephidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>C. pygmaea</i>	<i>C. idolon</i>	<i>C. pygmeus</i>	<i>C. rjabovi</i>	<i>H. linearis</i>	<i>P. smyrnensis</i>	<i>T. iudaicus</i>	<i>T. tabidus</i>
<i>C. pygmaea</i>								
<i>C. idolon</i>	0,2073							
<i>C. pygmeus</i>	0,2849	0,2766						
<i>C. rjabovi</i>	0,2983	0,2957	0,1053					
<i>H. linearis</i>	0,6037	0,5873	0,6145	0,5981				
<i>P. smyrnensis</i>	0,5021	0,4978	0,4825	0,4489	0,5513			
<i>T. iudaicus</i>	0,4438	0,4669	0,3954	0,3803	0,6795	0,5913		
<i>T. tabidus</i>	0,3269	0,3169	0,3085	0,2291	0,6551	0,5410	0,0808	

Hizalanmış nükleotid verisi kullanılarak K2P modeli kullanılarak 1000 döngülü seç-bağla (“bootstrap”) testi kullanılarak NJ ağacı inşa edilmiştir (Şekil 3.1). Ağaç üzerinde *Cephus*, *Trachelus*, *Calameuta* ve *Hartigia* cinsleri ayrı konuşlanmıştır. Bu cinslere ait türlerin her biri farklı dallar üzerinde çıkmıştır ve birbirlerinden ayrılmışlardır. Yani cins ve tür düzeyinde Cephidae familyasının monofilisi sağlanmıştır. Cephidae familyası ITS2 bölgelerinde, tür içi genetik uzaklığın çok düşük olması (%0) ve türler arasında genetik uzaklığın fazla (%8-67) olması nedeniyle DNA barkodlamanın etkili bir araç olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.1 Cephidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

b) Argidae Familyası

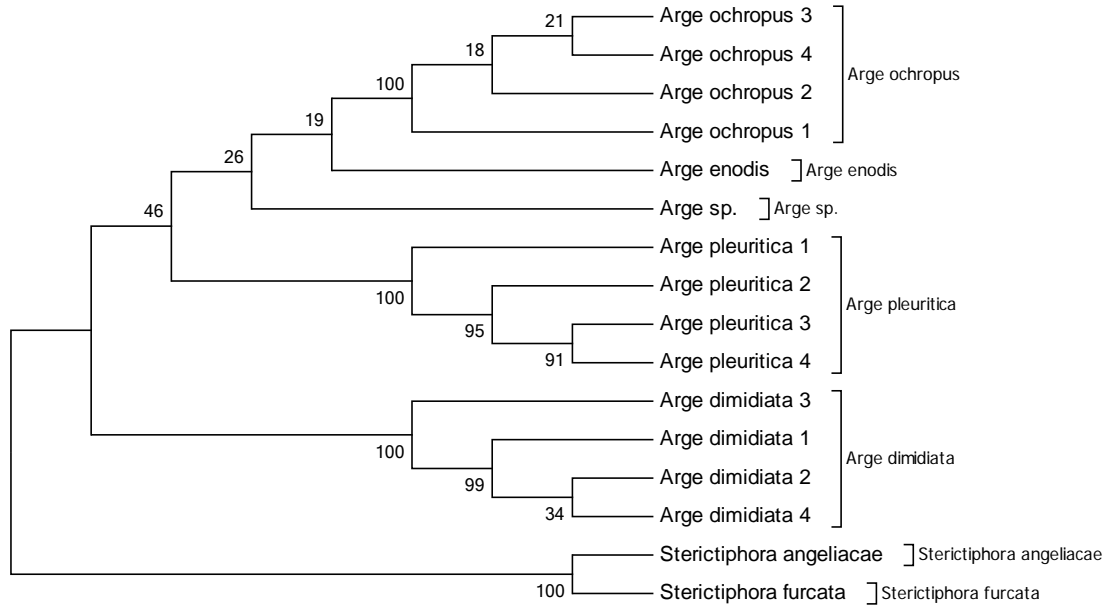
Argidae familyasından *Arge* ve *Sterictiphora* cinslerine ait 7 türe ait ITS2 nükleotid dizileri hizalanmıştır. *Arge* cinsi türleri ikili genetik uzaklık değerleri en az %21,26 ile *A. pleurita*-*A. ochropus* arasında bulunmuştur. Bu cins içerisinde en büyük uzaklık ise

%31,37 ile *A. sp.*-*A. enodis* türleri arasında bulunmuştur. *Sterictiphora* cinsinde *S. furcata*-*S. angeliacae* türleri arasında %29,43 farklılaşma bulunmuştur. Familyaya ait ikili uzaklık değerleri Çizelge 3.6’da sunulmuştur.

Çizelge 3.6 Argidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>A. dimidiata</i>	<i>A. ochropus</i>	<i>A. pleuritica</i>	<i>A. enodis</i>	<i>A. sp.</i>	<i>S. angeliacae</i>	<i>S. furcata</i>
<i>A. dimidiata</i>							
<i>A. ochropus</i>	0,2714						
<i>A. pleuritica</i>	0,2725	0,2126					
<i>A. enodis</i>	0,3045	0,2646	0,2612				
<i>A. sp.</i>	0,3122	0,2800	0,2747	0,3137			
<i>S. angeliacae</i>	0,5428	0,5783	0,5314	0,5676	0,5808		
<i>S. furcata</i>	0,5336	0,5221	0,4925	0,5104	0,5264	0,2943	

İnşa edilen NJ ağacı Şekil 3.2’de gösterilmiş olup, farklı cinslerin türleri farklı dallarda yer almıştır. Aynı zamanda türler birbirinde farklı dallarda yer almışlardır.



Şekil 3.2 Argidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

ITS2 bölgesi kullanılarak yapılan analiz sonucunda Argidae familyasının cins ve tür düzeyinde monofilisi sağlanmıştır. Tür içi ve türler arası genetik uzaklık göz önüne alınarak Argidae familyasında ITS2 bölgesinin etkili bir barkod aracı olduğu söylenebilir.

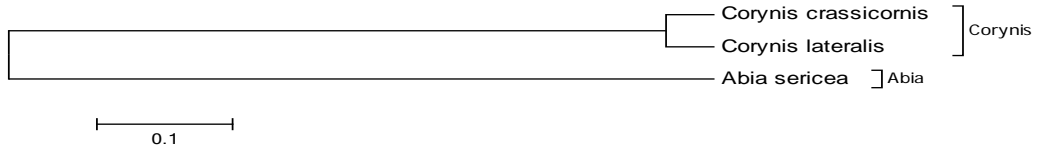
c) Cimbicidae Familyası

Cimbicidae familyasında *Corynis* ve *Abia* cinsleri ile yapılan genetik uzaklık tabanlı analizler sonucunda *C. crassicornis*-*C. lateralis* arasında %6,67 farklılaşma

hesaplanmıştır. Familya içerisinde en büyük farklılaşma %55,35 ile *A. sericea*-*C. lateralis* arasında bulunmuştur. İkili uzaklık değerleri Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 Cimbicidae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>A. sericea</i>	<i>C. crassicornis</i>	<i>C. lateralis</i>
<i>A. sericea</i>			
<i>C. crassicornis</i>	0,5516		
<i>C. lateralis</i>	0,5535	0,0667	



Şekil 3.3 Cimbicidae familyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

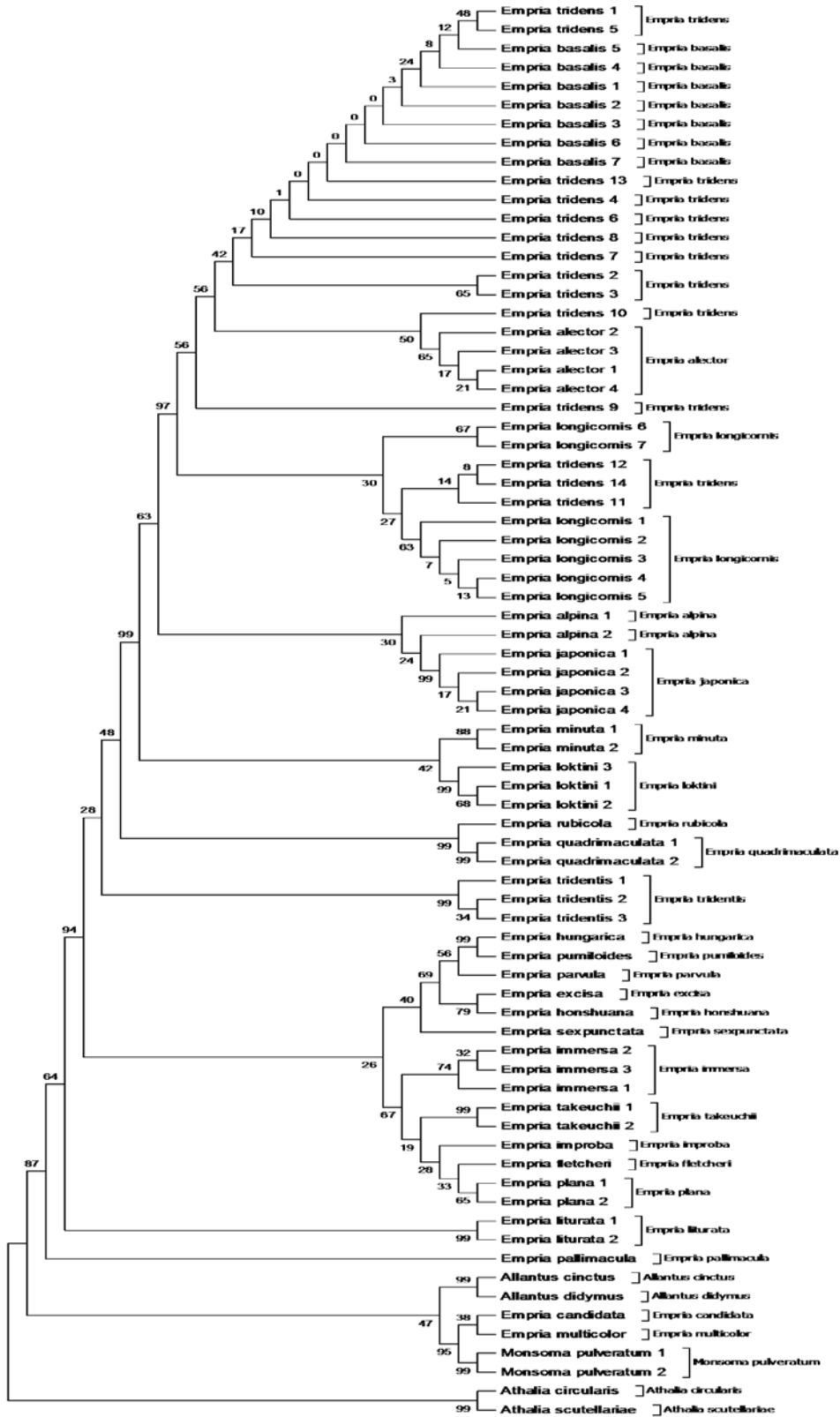
İnşa edilen NJ ağacında *Cornis* ve *Abia* cinsleri farklı dallarda yer almıştır. *Cornis* türleri de birbirinden ayrılmıştır (Şekil 3.3). Symphyta altfamilyası tür içi genetik uzaklık değerleri göz önüne alınarak Cimbicidae familyası için ITS2 bölgesinin bir barkodlama aracı olarak kullanılabilir olduğu görülmüştür.

d) Allantinae Altfamilyası

Allantinae altfamilyasına ait *Allantus*, *Athalia*, *Empria* ve *Monsoma* cinslerine ait 31 tür ile gerçekleştirilen analiz sonucunda en az farklılaşma %0,15 ile *E. tridens*-*E. basalis* türleri arasında gözlemlenirken, en fazla farklılaşma %51 ile *A. circularis* - *Allantus didymus* türleri arasında görülmüştür. Analizler sonucunda bazı *Empria* türleri arasında farklılaşmanın tür içi genetik uzaklık hesaplamalarında en büyük değer olarak bulunan %3,75’den daha az olduğu görülmüştür (Çizelge 3.8’de bu türler kırmızı ile işaretlenmiştir).

Çizelge 3.8 Allantınæ türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>A. cinerea</i>	<i>A. abnormis</i>	<i>A. erubescens</i>	<i>A. canadensis</i>	<i>E. decora</i>	<i>E. alpina</i>	<i>E. borealis</i>	<i>E. canadensis</i>	<i>E. scottii</i>	<i>E. borealis</i>	<i>E. monticola</i>	<i>E. longicauda</i>	<i>E. hungarica</i>	<i>E. humilis</i>	<i>E. myrica</i>	<i>E. spicata</i>	<i>E. limosa</i>	<i>E. ibidii</i>	<i>E. longicornis</i>	<i>E. minima</i>	<i>E. multicolor</i>	<i>E. pallidulus</i>	<i>E. parvulus</i>	<i>E. piana</i>	<i>E. punctulata</i>	<i>E. subnivalis</i>	<i>E. sibirica</i>	<i>E. sibirica</i>	
<i>A. cinerea</i>																													
<i>A. abnormis</i>	0.137																												
<i>A. erubescens</i>	0.438	0.510																											
<i>A. canadensis</i>	0.464	0.493	0.306																										
<i>E. decora</i>	0.222	0.260	0.475	0.400																									
<i>E. alpina</i>	0.262	0.304	0.499	0.400	0.0134																								
<i>E. borealis</i>	0.232	0.296	0.442	0.407	0.0027	0.0129																							
<i>E. canadensis</i>	0.309	0.348	0.476	0.492	0.279	0.279	0.279																						
<i>E. scottii</i>	0.361	0.292	0.495	0.442	0.217	0.118	0.189	0.284																					
<i>E. borealis</i>	0.239	0.272	0.418	0.402	0.079	0.062	0.073	0.214	0.082																				
<i>E. monticola</i>	0.359	0.278	0.467	0.448	0.124	0.105	0.106	0.275	0.072	0.074																			
<i>E. hungarica</i>	0.267	0.283	0.499	0.429	0.100	0.093	0.088	0.280	0.087	0.073	0.079																		
<i>E. humilis</i>	0.213	0.272	0.417	0.406	0.072	0.082	0.083	0.247	0.070	0.022	0.099	0.070																	
<i>E. myrica</i>	0.266	0.244	0.418	0.408	0.073	0.075	0.085	0.258	0.082	0.009	0.076	0.071	0.022																
<i>E. spicata</i>	0.274	0.308	0.442	0.419	0.0240	0.0027	0.0235	0.246	0.136	0.075	0.148	0.095	0.077	0.079															
<i>E. limosa</i>	0.286	0.300	0.452	0.422	0.084	0.105	0.105	0.266	0.159	0.452	0.168	0.109	0.400	0.146	0.129														
<i>E. ibidii</i>	0.202	0.203	0.448	0.415	0.0236	0.0132	0.0280	0.266	0.123	0.082	0.102	0.082	0.080	0.072	0.0216	0.125													
<i>E. longicornis</i>	0.204	0.267	0.462	0.402	0.0089	0.0123	0.0064	0.278	0.162	0.093	0.108	0.073	0.065	0.067	0.0220	0.090	0.0296												
<i>E. minima</i>	0.244	0.287	0.440	0.405	0.0207	0.0184	0.0202	0.284	0.122	0.096	0.109	0.082	0.058	0.050	0.0248	0.127	0.0215	0.0117											
<i>E. multicolor</i>	0.230	0.276	0.465	0.399	0.262	0.262	0.262	0.249	0.262	0.215	0.262	0.179	0.446	0.129															
<i>E. pallidulus</i>	0.220	0.287	0.472	0.407	0.196	0.146	0.132	0.258	0.124	0.100	0.113	0.124	0.129	0.120	0.129	0.129	0.146	0.149	0.132	0.132									
<i>E. parvulus</i>	0.267	0.279	0.493	0.479	0.100	0.092	0.093	0.268	0.087	0.064	0.075	0.070	0.082	0.084	0.108	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124									
<i>E. piana</i>	0.248	0.277	0.429	0.407	0.075	0.067	0.076	0.257	0.072	0.0079	0.072	0.074	0.0064	0.0079	0.073	0.423	0.064	0.069	0.064	0.250	0.204								
<i>E. punctulata</i>	0.208	0.287	0.450	0.425	0.104	0.094	0.107	0.292	0.066	0.075	0.092	0.0070	0.072	0.077	0.109	0.103	0.097	0.099	0.097	0.273	0.199	0.064	0.078						
<i>E. quadrinervis</i>	0.203	0.222	0.476	0.440	0.182	0.130	0.135	0.292	0.160	0.181	0.194	0.188	0.189	0.126	0.145	0.196	0.185	0.115	0.133	0.200	0.145	0.150	0.156						
<i>E. subnivalis</i>	0.298	0.322	0.465	0.437	0.190	0.126	0.122	0.278	0.113	0.108	0.129	0.123	0.102	0.102	0.125	0.184	0.177	0.122	0.119	0.268	0.173	0.139	0.162	0.148					
<i>E. sibirica</i>	0.299	0.307	0.452	0.450	0.139	0.139	0.147	0.287	0.140	0.150	0.132	0.107	0.099	0.100	0.142	0.142	0.142	0.142	0.129	0.264	0.164	0.169	0.100	0.129	0.189	0.132			
<i>E. sibirica</i>	0.285	0.289	0.444	0.414	0.117	0.097	0.109	0.279	0.194	0.073	0.148	0.089	0.050	0.052	0.104	0.167	0.097	0.106	0.094	0.206	0.142	0.099	0.046	0.078	0.147	0.127	0.145		
<i>E. sibirica</i>	0.211	0.297	0.494	0.400	0.0056	0.0127	0.0015	0.292	0.128	0.075	0.109	0.097	0.087	0.079	0.0229	0.187	0.0285	0.0058	0.0207	0.259	0.150	0.079	0.072	0.102	0.143	0.115	0.139	0.102	
<i>E. sibirica</i>	0.294	0.289	0.449	0.416	0.092	0.085	0.085	0.286	0.076	0.083	0.093	0.097	0.068	0.083	0.180	0.184	0.186	0.082	0.088	0.202	0.121	0.089	0.066	0.092	0.152	0.130	0.132	0.091	
<i>M. polivorum</i>	0.288	0.289	0.476	0.453	0.262	0.263	0.263	0.221	0.259	0.267	0.246	0.255	0.294	0.267	0.214	0.287	0.289	0.262	0.278	0.206	0.200	0.245	0.244	0.260	0.290	0.292	0.292	0.291	



Şekil 3.4 Allantinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

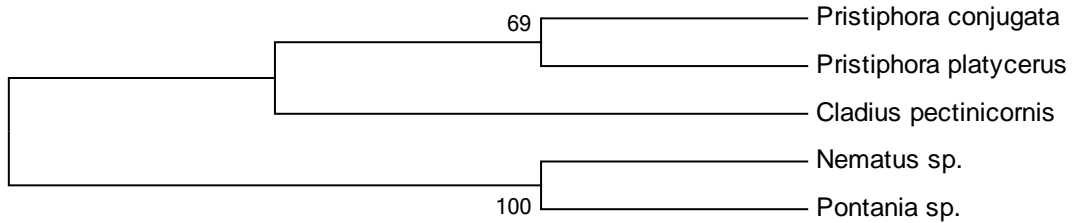
Hizalanan ITS2 dizi verisi kullanılarak NJ ağacı inşa edilmiş olup inşa edilen ağaç Şekil 3.4’de gösterilmiştir. Allantinae altfamilyası içerisinde *Allantus*, *Athalia* ve *Monsoma* cinslerinin monofilisi desteklenmiştir. Ancak *Empria* cinsi parafiletik bir grup olarak bulunmuştur.

e) Nematinae Altfamilyası

Nematinae altfamilyasından *Cladius*, *Nematus*, *Pontania* ve *Pristiphora* cinslerinden 5 türün ITS2 dizileri karşılaştırılmıştır. *Pristiphora* cinsine ait *P. conjugata* ve *P. platycerus* türleri ile *C. pectinicornis* arasındaki farklılaşma sırası ile %0,92 ve %2,39 olarak belirlenmiştir. Tüm Nematinae türlerinin ikili uzaklık değerleri Çizelge 3.9’da sunulmuştur. Hizalanan diziler ile inşa edilen Nematinae NJ ağacı Şekil 3.5’de sunulmuştur.

Çizelge 3.9 Nematinae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>C. pectinicornis</i>	<i>Nematus</i> sp.	<i>Pontania</i> sp.	<i>P. conjugata</i>	<i>P. platycerus</i>
<i>C. pectinicornis</i>					
<i>Nematus</i> sp.	0,3873				
<i>Pontania</i> sp.	0,3844	0,1909			
<i>P. conjugata</i>	0,0092	0,3873	0,3844		
<i>P. platycerus</i>	0,0239	0,4015	0,3956	0,0184	



Şekil 3.5 Nematinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

f) Tenthredininae Altfamilyası

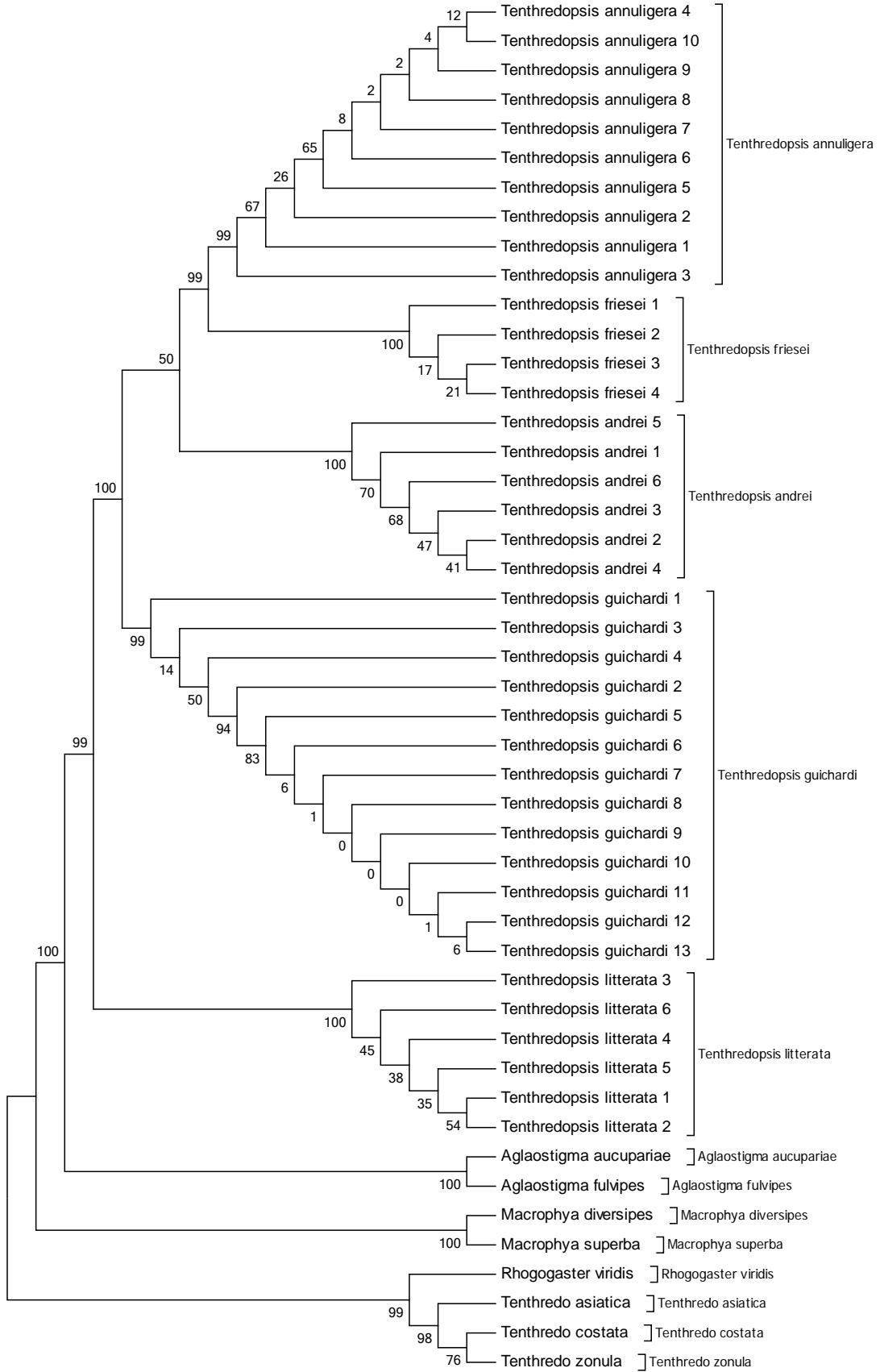
Tenthredininae altfamilyasına ait *Aglaostigma*, *Macrophya*, *Rhogogaster*, *Tenthredo* ve *Tenthredopsis* cinslerine ait türlerin ITS2 bölgeleri göre yapılan uzaklık analizlerinde *Tenthredopsis* türleri arasında en az %3,47 (*T. friesei*-*T. annuligera*), en fazla ise %14,53 (*T. friesei*-*T. litterata*) farklılaşma gözlenmiştir. Benzer şekilde *Tenthredo* türleri arasında en az %21,09 (*T. zonula*-*T. asiatica*), en fazla %23,55 (*T. zonula*-*T. costata*) farklılaşma bulunmuştur. Tüm Tenthredininae türleri arasında en az farklılaşma %2,02

(*A. aucupariae*-*A. fulvipes*), en fazla farklılaşma %39,26 (*A. aucupariae*-*R. viridis*) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.10 Tenthredininae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>A. aucupariae</i>	<i>A. fulvipes</i>	<i>M. diversipes</i>	<i>M. superba</i>	<i>R. viridis</i>	<i>T. costata</i>	<i>T. asiatica</i>	<i>T. zonula</i>	<i>T. andrei</i>	<i>T. annuligera</i>	<i>T. friesei</i>	<i>T. guichardi</i>	<i>T. litterata</i>
<i>A. aucupariae</i>													
<i>A. fulvipes</i>	0,0202												
<i>M. diversipes</i>	0,2801	0,2791											
<i>M. superba</i>	0,2854	0,2844	0,0335										
<i>R. viridis</i>	0,3926	0,3791	0,3580	0,3542									
<i>T. costata</i>	0,3503	0,3482	0,3589	0,3582	0,3253								
<i>T. asiatica</i>	0,3212	0,3203	0,3066	0,3130	0,3300	0,2167							
<i>T. zonula</i>	0,3466	0,3443	0,3303	0,3395	0,3163	0,2355	0,2109						
<i>T. andrei</i>	0,1746	0,1712	0,2907	0,2890	0,3584	0,3559	0,3210	0,3521					
<i>T. annuligera</i>	0,1840	0,1848	0,2807	0,2814	0,3666	0,3654	0,3208	0,3570	0,0476				
<i>T. friesei</i>	0,1848	0,1835	0,2813	0,2820	0,3646	0,3674	0,3257	0,3600	0,0498	0,0347			
<i>T. guichardi</i>	0,1823	0,1772	0,2771	0,2843	0,3591	0,3578	0,3184	0,3543	0,0394	0,0529	0,0608		
<i>T. litterata</i>	0,2073	0,2008	0,2890	0,2918	0,3672	0,3723	0,3177	0,3667	0,1141	0,1343	0,1453	0,1222	

Nükleotid verisi kullanılarak oluşturulan NJ ağacı üzerinde tüm cinsler ayrılmıştır. Şekil 3.6'da gösterilen ağaç topolojisi tür ve cins düzeyinde Tenthredininae altfamilyasının monofilisini desteklemiştir.



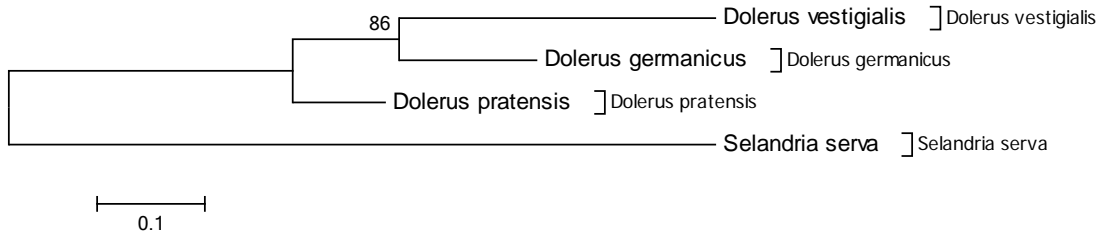
Şekil 3.6 Tenthredininae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

g) Selandriinae Altfamilyası

Selandriinae altfamilyasından *Dolerus* ve *Selandria* cinslerine ait 4 tür kullanılarak gerçekleştirilen uzaklık analizi sonucunda en az farklılaşma %28,22 ile *D. germanicus*-*D. pratensis* arasında, en fazla farklılaşma ise %60,74 ile *S. serva*-*D. vestigialis* arasında bulunmuştur. İkili uzaklık değerleri Çizelge 3.11’de verilmiş olup, oluşturulan NJ ağacı Şekil 3.7’de verilmiştir. İnşa edilen NJ ağacı *Dolerus* cinsinin monofilisini desteklemiştir.

Çizelge 3.11 Selandriinae türleri arasındaki ikili uzaklık değerleri

	<i>D. vestigialis</i>	<i>D. pratensis</i>	<i>D. germanicus</i>	<i>S. serva</i>
<i>D. vestigialis</i>				
<i>D. pratensis</i>	0,3265			
<i>D. germanicus</i>	0,3190	0,2822		
<i>S. serva</i>	0,6074	0,5483	0,5705	



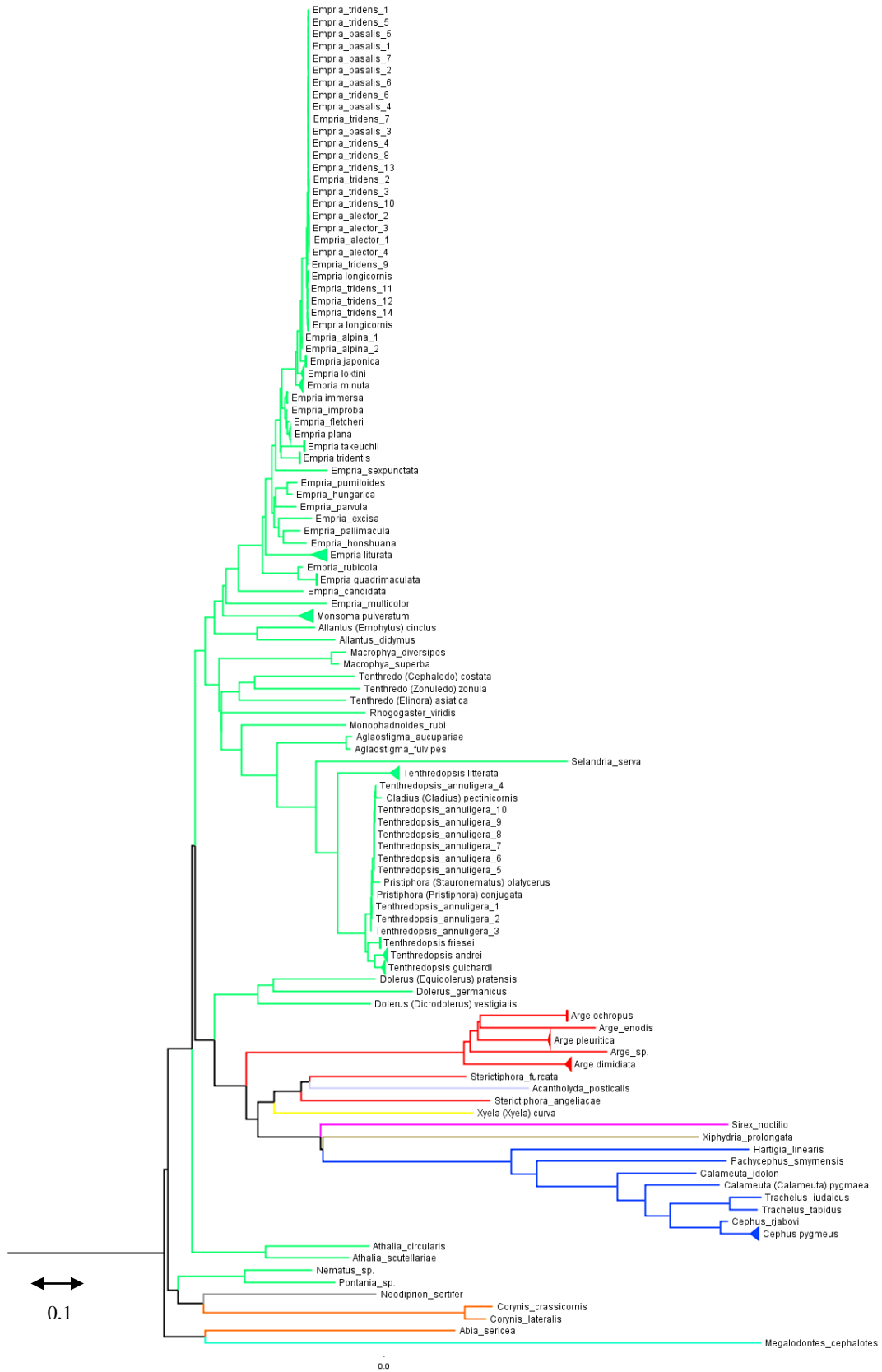
Şekil 3.7 Selandriinae altfamilyası ITS2 nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacı

3.3.1.3 Tüm Veri Kullanılarak Gerçekleştirilen Analiz

ITS2 dizi bilgisi kullanılarak Argidae, Cephidae, Cimbicidae, Diprionidae, Megalodontesidae, Pamphiliidae, Siricidae, Tenthredinidae, Xiphydriidae ve Xyelidae olmak üzere 10 farklı familyadan türler kullanılarak NJ ağacı inşa edilmiştir. İnşa edilen ağaç Şekil 3.8’de verilmiştir. Sonuç olarak;

1. Arginae altfamilyasının monofilisi desteklenmemiştir. *Arge* cinsinin monofilisi desteklenmiştir. *A. dimidiata*, *A. ochropus* ve *A. pleuritica* türlerine ait örnekler monofiletiktir. *Sterictiphora* türleri Pamphiliidae familyasıyla parafiletik bir grup oluşturmuştur.

2. Cephidae familyasının monofilisi desteklenmiştir. *Trachelus* ve *Cephus* cinslerinin monofilisi sağlanmıştır. *C. pygmeus* türüne ait örnekler monofiletik bir grup oluşturmuştur.
3. Cimbicidae familyasının monofilisi desteklenmemiştir. *Corynis* cinsi türleri monofiletik bir grup oluşturmuştur.
4. Diprionidae familyasının Cimbicidae familyası ile kardeş grup ilişkisi desteklenmiştir.
5. Pamphilioidea (Megalodontesidae + Pamphiliidae) üstfamilyasının monofilisi desteklenmemiştir.
6. Tenthredinidae familyası monofilisi sağlanamamıştır. *C. pectinicornis* ve *Pristiphora* cinsi *T. annuligera* türü ile birlikte kümelenmiştir. Aynı zamanda *Empria* türlerinin monofilisi desteklenmemiş olup, bir grup halinde konumlanmışlardır.
7. Barkodlama perspektifinden bakıldığında 6. maddede verilen gruplar dışında tüm türler ITS2 belirteci kullanılarak genetik uzaklık tabanlı NJ ağacı ile birbirinden ayrılmıştır.



Şekil 3.8 Tüm Symphyta türlerinin dahil edildiği NJ ağacı

3.3.2 İkincil Yapılar Kullanılarak Gerçekleştirilen Analizler

ITS2 bölgesinin oluşturduğu ikincil yapılar hem nükleotid dizisi ile kombine edilerek (4SALE ile hizalama ve ProfDist ile PNJ ağaçları) hem de CBC varlığı kullanılarak (4SALE ile CBC tablosunun oluşturulması ve CBCAnalyzer ile CBCTree inşası) Symphyta alttakımında barkodlamada bir araç olarak sınanmıştır. Bu amaçla aynı familya ya da altfamilyaya ait türler ve tüm verisi seti ayrı ayrı analiz edilmiştir.

3.3.2.1 Altfamilya ve Familya Analizleri

Çalışmayı oluşturan toplamda 78 tür ait olduğu familya ve altfamilya göz önüne alınarak parçalara ayrılmıştır. Bu kapsamda Cephidae (8 tür), Argidae (7 tür) ve Cimbicidae (3 tür) familyaları ve Tenthredinidae familyasının altfamilyaları olan Allantinae (31 tür), Nematinae (5 tür), Tenthredininae (13 tür) ve Selandriinae (4 tür) ayrı ayrı değerlendirilmiştir. İkincil yapının barkodlamada bir araç olarak kullanılabilirliğinin test edilmesi sonucunda açığa çıkan veriler her familya ve altfamilya için aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

a) Cephidae Familyası

Cephidae familyasının 8 türü için oluşturulan ikincil yapı verisi nükleotid dizisi ile birlikte hizalanarak CBC tablosu oluşturulmuştur. CBC tablosu üzerinde türler arasında her bir CBC'nin varlığı 1 değerine sahiptir ve CBC yokluğu 0 olarak tabloya girilmektedir. Cephidae familyası için oluşturulan CBC tablosu Çizelge 3.12'de verilmiştir ve iki tür arasında CBC yokluğu kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

Çizelge 3.12 Cephidae familyası CBC tablosu

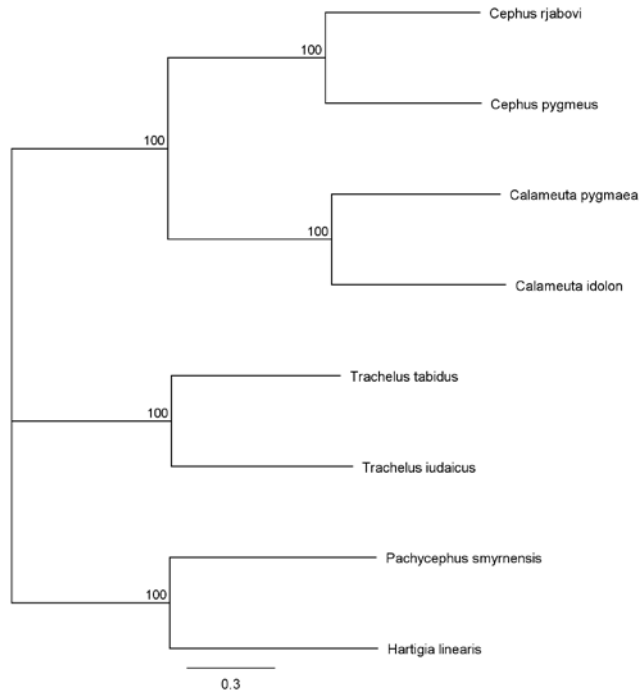
	<i>C. pygmeus</i>	<i>C. rjabovi</i>	<i>C. pygmaea</i>	<i>C. idolon</i>	<i>H. linearis</i>	<i>P. smyrnensis</i>	<i>T. iudaicus</i>	<i>T. tabidus</i>
<i>Cephus pygmeus</i>	0	1	4	7	3	4	6	2
<i>Cephus rjabovi</i>	1	0	3	6	3	1	1	1
<i>Calameuta pygmaea</i>	4	3	0	2	3	4	0	1
<i>Calameuta idolon</i>	7	6	2	0	4	4	2	3
<i>Hartigia linearis</i>	3	3	3	4	0	3	3	2
<i>Pachycephus smyrnensis</i>	4	1	4	4	3	0	4	4
<i>Trachelus iudaicus</i>	6	1	0	2	3	4	0	0
<i>Trachelus tabidus</i>	2	1	1	3	2	4	0	0

CBC varlığı yada yokluğu durumlarını analiz ederek NJ ağaçları oluşturan CBCAnalyzer programı kullanılarak Şekil 3.9'daki ağaç topolojisi elde edilmiştir. *Cephus* ve

Calameuta cinslerinin monofilisi desteklenmiştir. Ancak *Trachelus* cinsinin tür düzeyinde monofilisi sağlanamamıştır.



Şekil 3.9 Cephidae familyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı



Şekil 3.10 Cephidae familyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

İkincil yapı verisi ile birlikte analiz olanağı tanıyan ProfDist programı kullanılarak Cephidae familyasında NJ ağacı inşa edilmiştir (Şekil 3.10). Analiz sonucunda tüm cinslerin monofilisi desteklenmiştir.

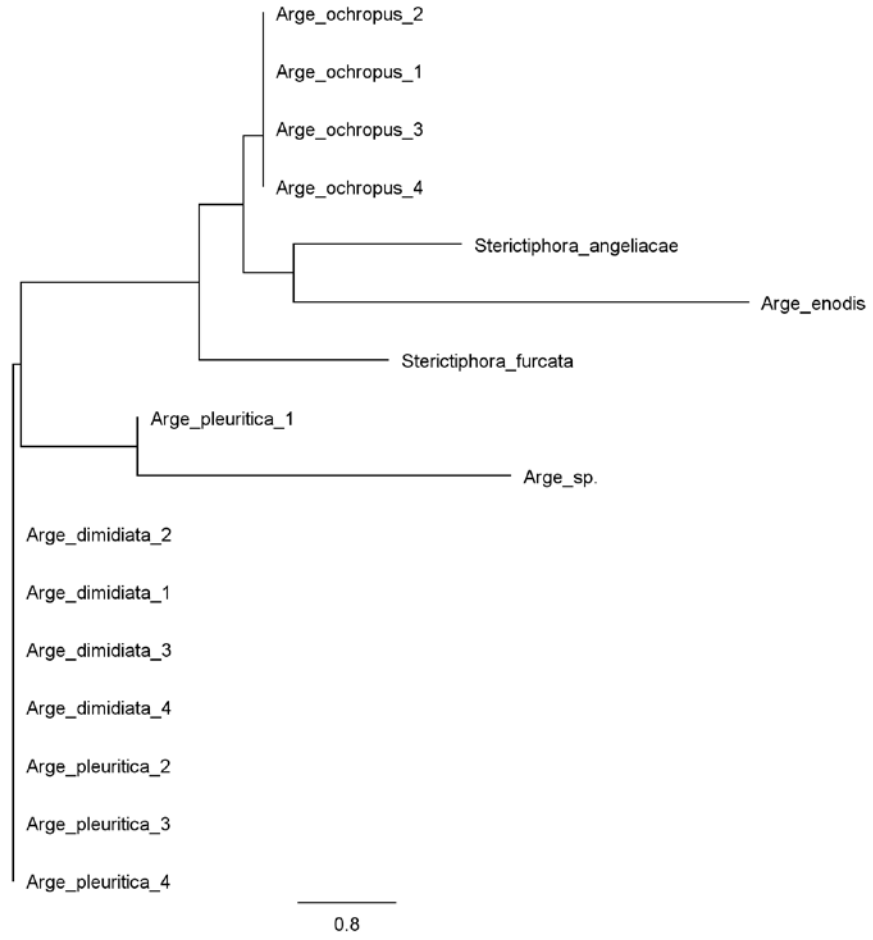
b) Argidae Familyası

Argidae familyasının 7 türü için oluşturulan ikincil yapı verisi nükleotid dizisi ile birlikte hizalanarak CBC tablosu oluşturulmuştur. Argidae familyası için oluşturulan CBC tablosu Çizelge 3.13’de verilmiştir. CBC analizi sonucunda tür içi CBC varlığı tespit edilememiştir. Aynı zamanda *A. dimidiata*-*A. pleuritica* türleri arasında CBC yoktur. Çizelge 3.13’deki Argidae familyası CBC tablosu; yeşil ile boyalı alanlar tür içi, kırmızı ile boyalı alanlar taksonlar arasında CBC bulunmayışını göstermektedir.

Çizelge 3.13 Argidae familyası CBC tablosu

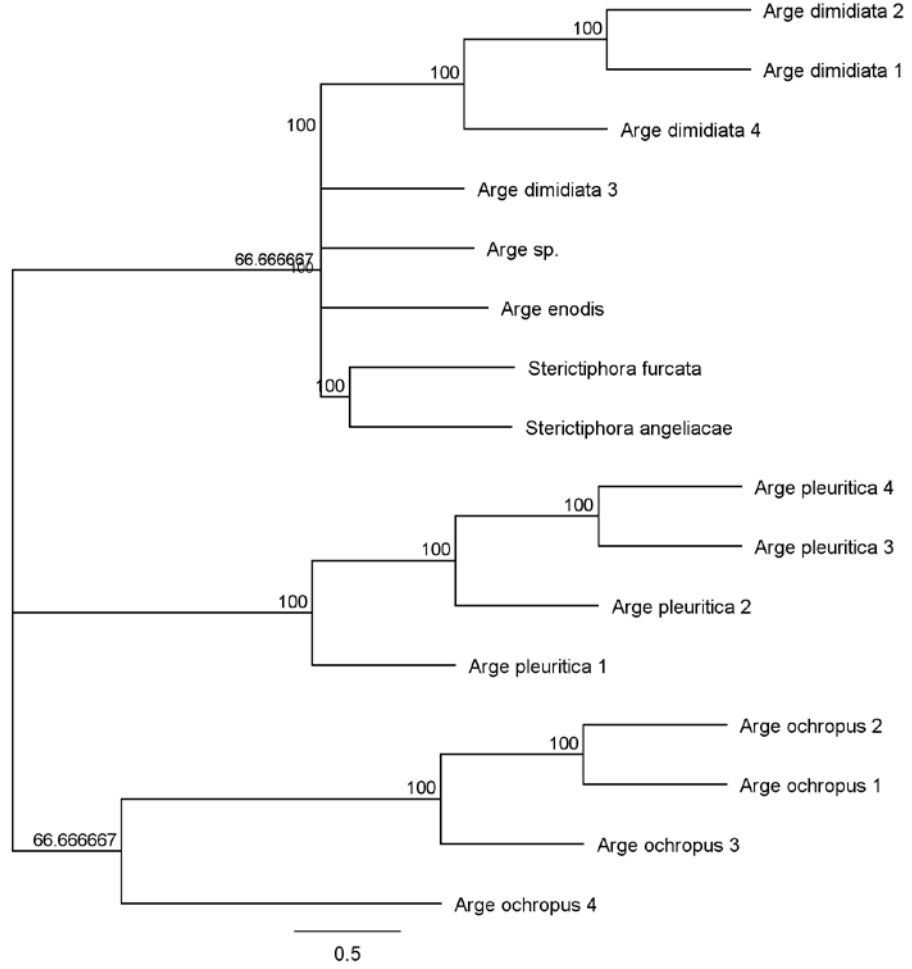
	<i>A. enodis</i>	<i>A. sp.</i>	<i>S. angeliacae</i>	<i>S. furcata</i>	<i>A. dimidiata 1</i>	<i>A. dimidiata 2</i>	<i>A. dimidiata 3</i>	<i>A. dimidiata 4</i>	<i>A. ochropus 1</i>	<i>A. ochropus 2</i>	<i>A. ochropus 3</i>	<i>A. ochropus 4</i>	<i>A. pleuritica 1</i>	<i>A. pleuritica 2</i>	<i>A. pleuritica 3</i>	<i>A. pleuritica 4</i>
<i>A. enodis</i>	0	7	5	6	7	7	7	7	4	4	4	4	5	5	5	5
<i>A. sp.</i>	7	0	7	7	7	7	6	7	5	5	5	5	2	2	2	2
<i>S. angeliacae</i>	5	7	0	4	5	5	5	5	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>S. furcata</i>	6	7	4	0	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
<i>A. dimidiata 1</i>	7	7	5	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. dimidiata 2</i>	7	7	5	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. dimidiata 3</i>	7	6	5	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. dimidiata 4</i>	7	7	5	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. ochropus 1</i>	4	5	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
<i>A. ochropus 2</i>	4	5	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
<i>A. ochropus 3</i>	4	5	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
<i>A. ochropus 4</i>	4	5	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
<i>A. pleuritica 1</i>	5	2	2	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. pleuritica 2</i>	5	2	2	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. pleuritica 3</i>	5	2	2	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>A. pleuritica 4</i>	5	2	2	3	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0

CBC verisi kullanılarak oluşturulan BIONJ ağacı Şekil 3.11’de verilmiş olup, *A. pleuritica* türünün bireyleri farklı dallarda yer almıştır. Aynı zamanda cins düzeyinde monofili sağlanamamıştır.



Şekil 3.11 Argidae familyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı

Hızalanmış ikincil yapı ve nükleotid dizisini içeren veri ile oluşturulan PNJ ağacı Şekil 3.12’de verilmiştir. *A. dimidiata*, *A. sp* ve *A.enodis* türleri ağaç üzerinde politomik olarak yer almıştır.



Şekil 3.12 Argidae familyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

c) Cimbicidae Familyası

Cimbicidae familyasının 3 türü kullanılarak gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri sonucunda türler birbirinden ayrılmıştır. Çizelge 3.14’de sunulan CBC tablosunda her tür taksonun en az 1 CBC varlığı ile CBC tür kavramını desteklediği görülmektedir. Cimbicidae familyası için BIONJ ve PNJ ağaçları oluşturulmuştur ve Şekil 3.3’de verilen nükleotid dizi verisi ile oluşturulan ağaç ile aynı topolojiye sahiptir.

Çizelge 3.14 Cimbicidae familyası CBC tablosu

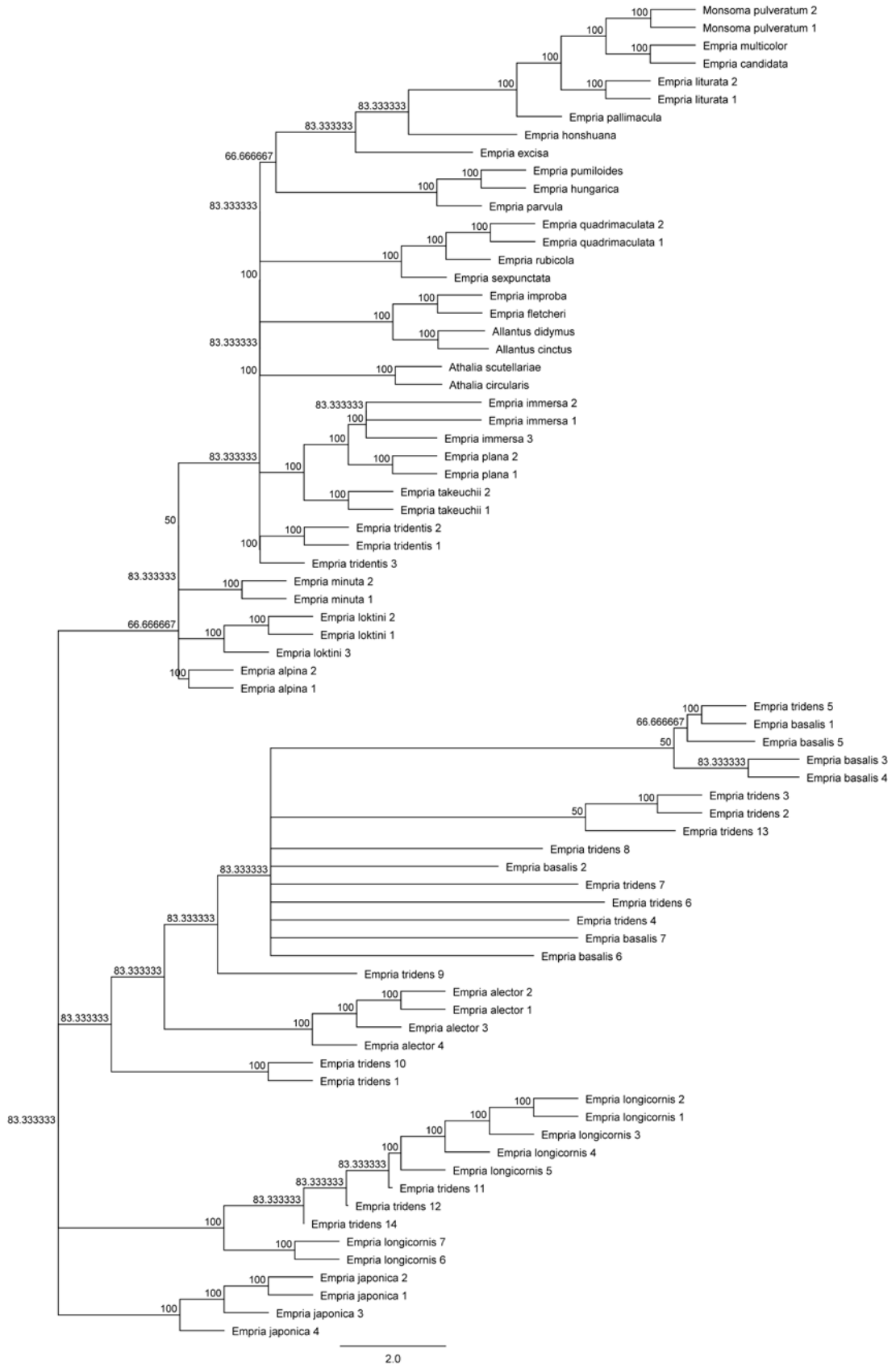
	<i>Corynis lateralis</i>	<i>Corynis crassicornis</i>	<i>Abia sericea</i>
<i>Corynis lateralis</i>	0	1	2
<i>Corynis crassicornis</i>	1	0	2
<i>Abia sericea</i>	2	2	0

d) Allantinae Altfamilyası

Allantinae familyasına ait 31 türden 75 örneğin dahil edildiği analizler sonucunda türler arasında CBC analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda oluşturulan CBC tablosu Çizelge 3.15’de sunulmuştur. Tür içerisinde CBC’ye rastlanmamıştır (Çizelge 3.15’de yeşil ile işaretli alanlar). CBC verisi ile oluşturulan BIONJ ağacı Şekil 3.13’de verilmiştir. *Empria* ve *Allantus* cinsinin monofilisi desteklenmemiş olup, CBC verisi ile *Empria* cinsinin türleri ayrılmamıştır. İkincil yapı verisinin nükleotid dizisi ile birlikte kullanılmasıyla oluşturulan PNJ ağacında ise *E. longicornis*, *E. tridens* ve *E. basalis* türlerinin monofilisi sağlanamamıştır (Şekil 3.14).



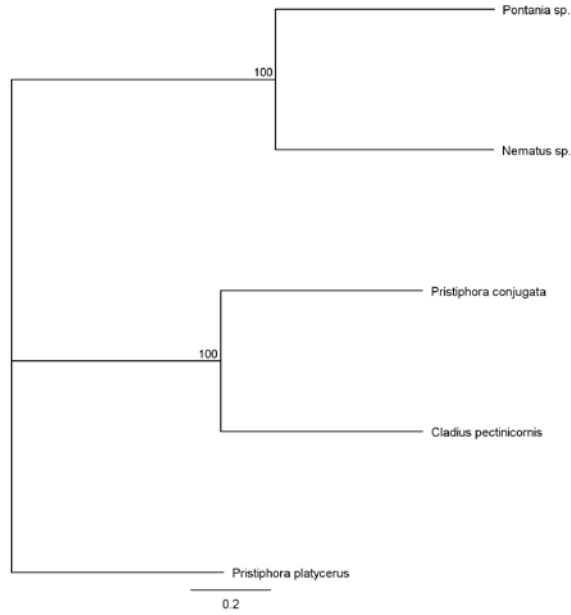
Şekil 3.13 Allantinae altfamilyasının CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı



Şekil 3.14 Allantinae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

e) Nematinae Altfamilyası

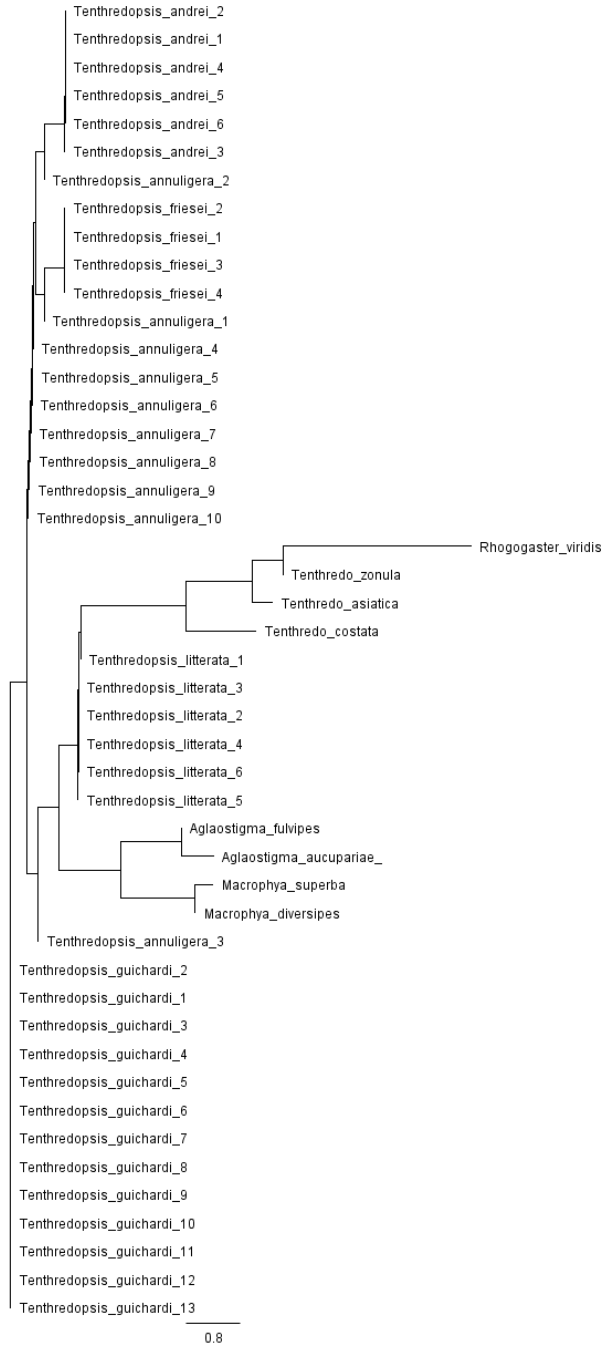
Nematina türleri arasında yapılan CBC analizi sonucunda hiçbir tür arasında CBC bulunmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle yalnızca ikincil yapı bilgisi kullanılarak gerçekleştirilen PNJ ağacı inşa edilmiştir (Şekil 3.15). *Pristiphora* cinsinin monofilisi sağlanamamıştır.



Şekil 3.15 Nematinae ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

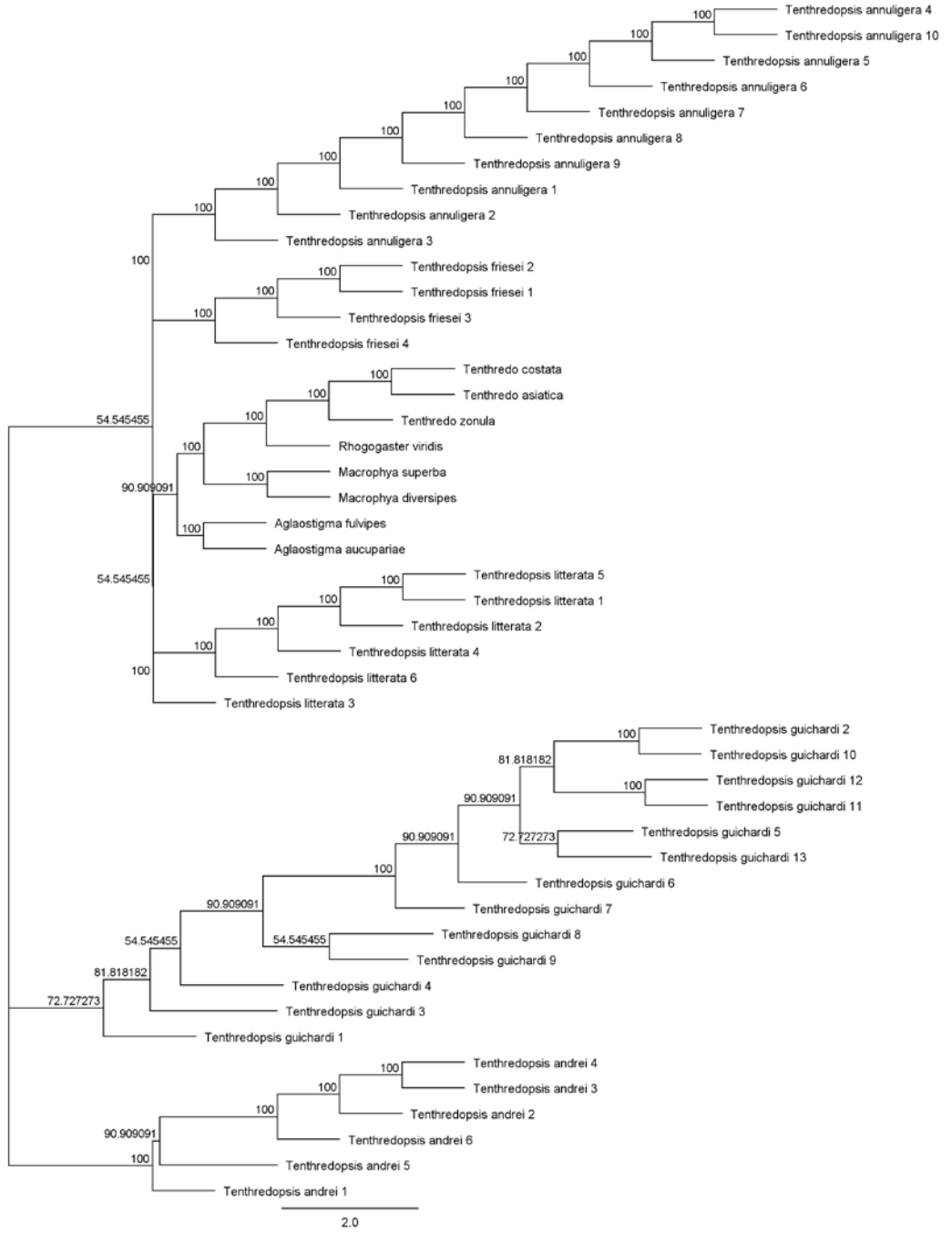
f) Tenthredininae Altfamilyası

Tenthredininae familyası türlerinde tür içi CBC varlığı tespit edilememiştir. *T. guichardi-T. annuligera*, *T. annuligera-T. litterata*, *T. annuligera-T. friesei* (*T. annuligera* türünün yalnızca bir örneği), *T. annuligera-T. andrei*, *T.zonula- T.asiatica*, *M. diversipes-M. superba* ve *A. aucupariae-A. fulvipes* türleri arasında bir CBC bulunamamıştır (Çizelge 3.16).



Şekil 3.16 Tenthredininae altfamilyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı

Dizi verisi ile birlikte ikincil yapıların hizalanarak analiz edilmesi sonucunda oluşturulan ağaç topolojisi politomik olsa da, tüm türlerin monofilisi sağlanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Tenthredininae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

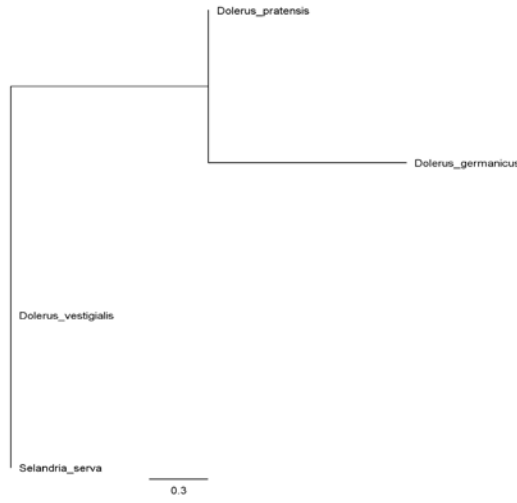
g) Selandriinae Altfamilyası

Selandriinae altfamilyasından *Dolerus* cinsi türleri arasında en az bir CBC varlığı tespit edilmiştir. Ancak *S. serva* - *D. germanicus* ve *S. serva* - *D. vestigalis* türleri arasında CBC bulunamamıştır.

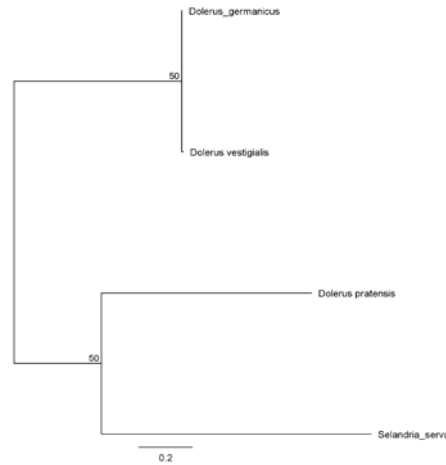
Çizelge 3.17 Selandriinae altfamilyası türleri CBC tablosu

	<i>D. germanicus</i>	<i>D. pratensis</i>	<i>D. vestigialis</i>	<i>S. serva</i>
<i>D. germanicus</i>	0	1	4	0
<i>D. pratensis</i>	1	0	1	1
<i>D. vestigialis</i>	4	1	0	0
<i>S. serva</i>	0	1	0	0

CBC verisi kullanılarak inşa edilen BIONJ ağacı Şekil 3.18’de gösterilmiştir. *Dolerus* türlerinin monofilisi sağlanamamıştır.



Şekil 3.18 Selandriinae altfamilyası CBC tablosu verisi ile inşa edilen BIONJ ağacı

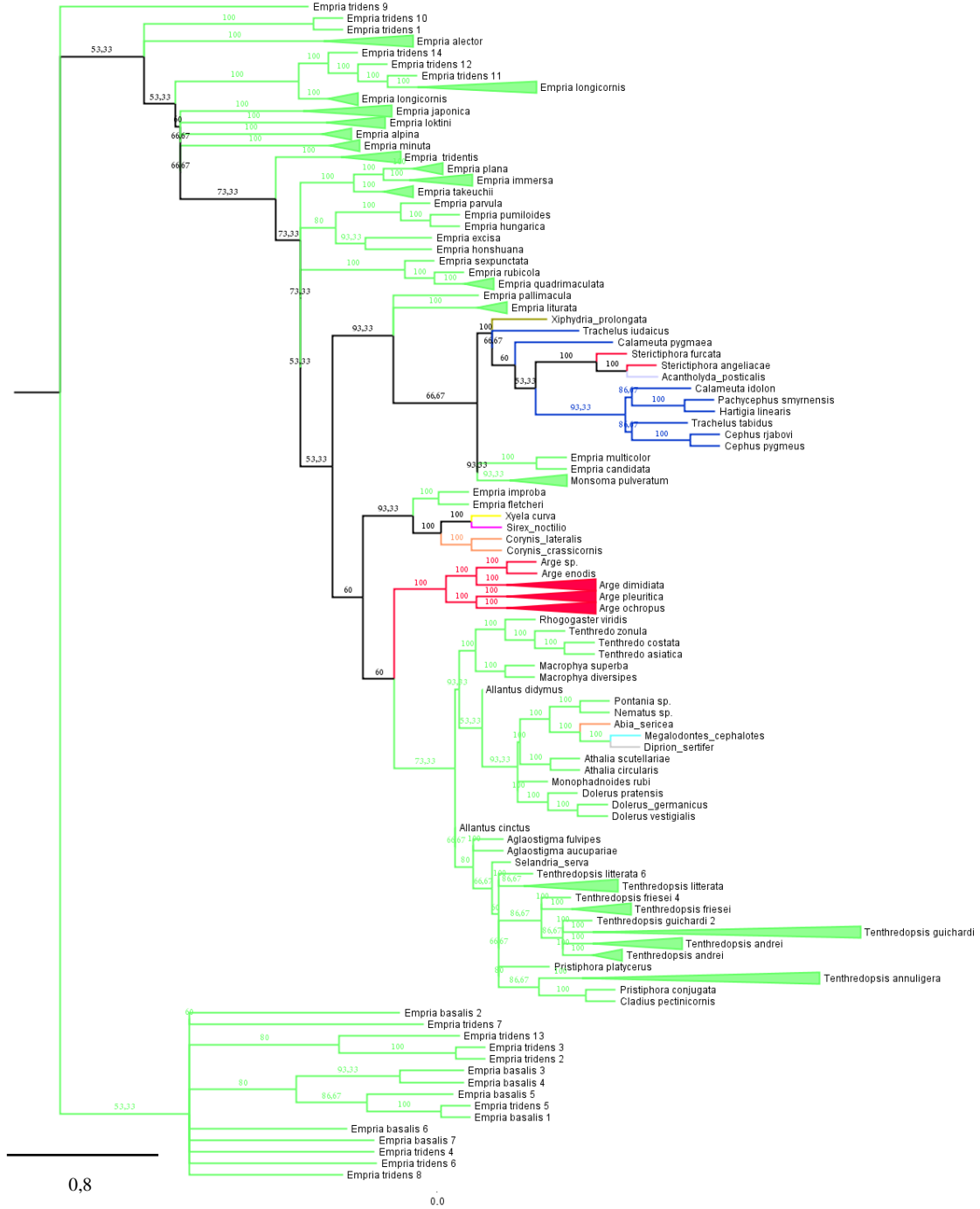


Şekil 3.19 Selandriinae altfamilyasının ProfDist programı ile oluşturulan PNJ ağacı

ITS2 ikincil yapı ve nükleotid dizisinin birlikte analizi sonucunda oluşturulan PNJ ağacı CBC verisi ile uyumludur.

3.3.2.2 Tüm Veri Kullanılarak Gerçekleştirilen Analiz

Symphyta alttakımına ait tüm familyalar ikincil yapı verisi ve nükleotid dizisi kullanılarak analiz edilmiştir. İnşa edilen PNJ ağacı Şekil 3.20’de gösterilmiştir ve familyalar göre ağacın dalları renklendirilmiştir. Familya ve altfamilya düzeyinde monofili sağlamamıştır.



Şekil 3.20 Tüm türler dahil edilerek oluşturulan PNJ ağacı

Symphyta alttakımından tüm bireylerin (*Cephus pygmeus* türünün aynı olan 15 dizisi yerine 1 temsilci kullanılmıştır, toplam 165 birey, 78 tür) ikincil yapı verisi ile birlikte nükleotid dizisi hizalanarak CBC tablosu oluşturulmuştur. Tablo 27.225 (165x165) hücreden oluşmaktadır ve teorikte aynı türün bireyleri arasında hiç CBC olmaması ve farklı türden bireyler arasında CBC bulunması iki türü ayırmak için gereklidir. Ancak CBC tür kavramına göre farklı türler ile bir CBC'nin varlığı arasında bir korelasyon vardır, yani iki tür arasında CBC olmaması durumu bu iki türün aynı tür olduğunu ileri sürmemektedir (Müller ve ark. 2007). Oluşturulan CBC tablosunda "0" CBC durumu 841 pozisyonda aynı türlerin çakıştığı pozisyonda beklenmektedir (iki tür arasında CBC olmama durumu-"0"). Tür için beklenen 841 pozisyon sağlanmıştır, ancak toplam "0" 10.055 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak farklı türe ait bireyler arasında "0" CBC durumu % 33,84 olarak hesaplanmıştır. Ancak bu rakam Cephidae familyası için %6, Argidae familyası için %12,5, Cimbicidae familyası için %0, Tenthredininae familyası için %21,5, Selandriinae familyası için %25 ve Allantinae familyası için %63 olarak hesaplanmıştır. Ancak aynı türe ait bireyler içerisinde hiç CBC bulunamamıştır.

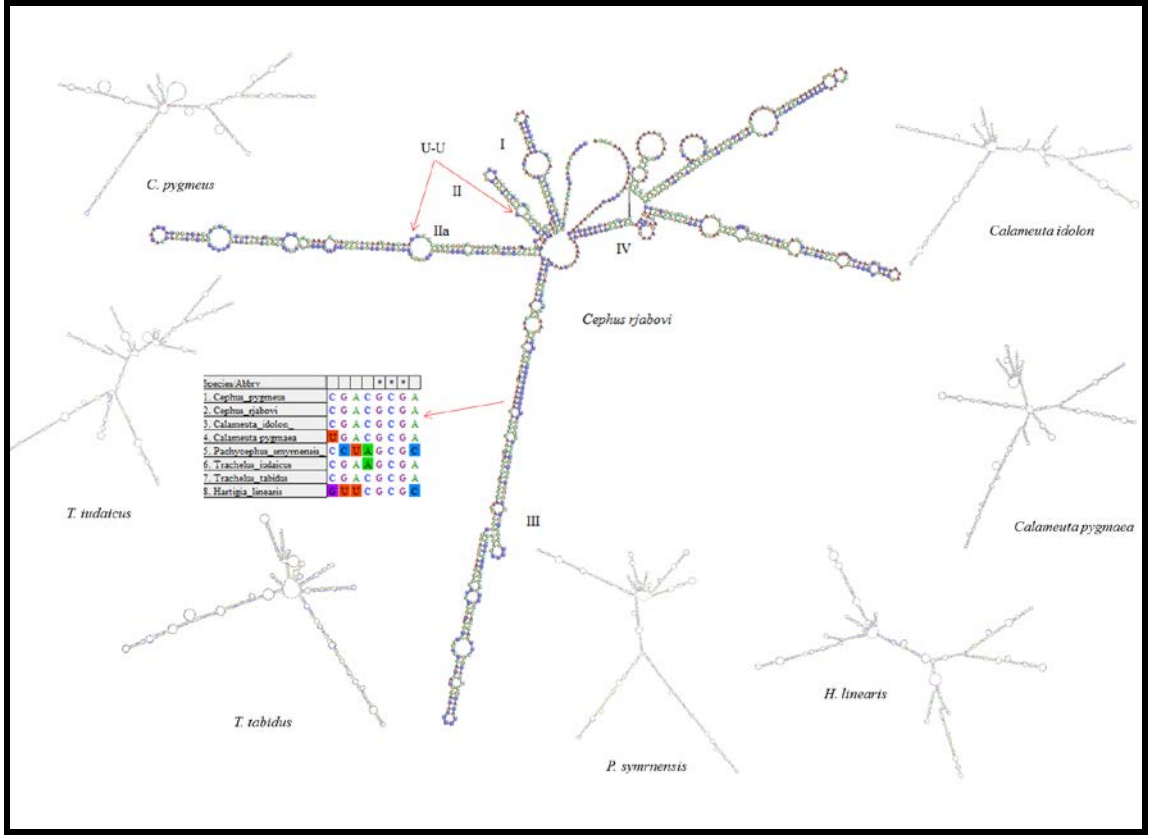
3.4 Symphyta Alttakımı ITS2 İkincil Yapıları ve Korunmuş Dizi Motifleri

Symphyta alttakımından 78 türe ait DNA dizi bilgisi kullanılarak, ITS2 ikincil yapıları oluşturulmuştur. Oluşturulan ikincil yapıların standart korunmuş bölgeleri, heliks sayıları ve korunmuş motifleri belirlenmiştir. İkincil yapıların karşılaştırmasının daha anlaşılabilir olması için Symphyta alttakımındaki farklı taksonomik düzeylerde ayrı ayrı değerlendirilmiş olup, sonuçlar karşılaştırılarak alttakım düzeyinde korunmuş motifler tespit edilmiştir.

3.4.1 Familya Düzeyinde İkincil Yapılar ve Korunmuş Yapılar

a) Argidae familyası

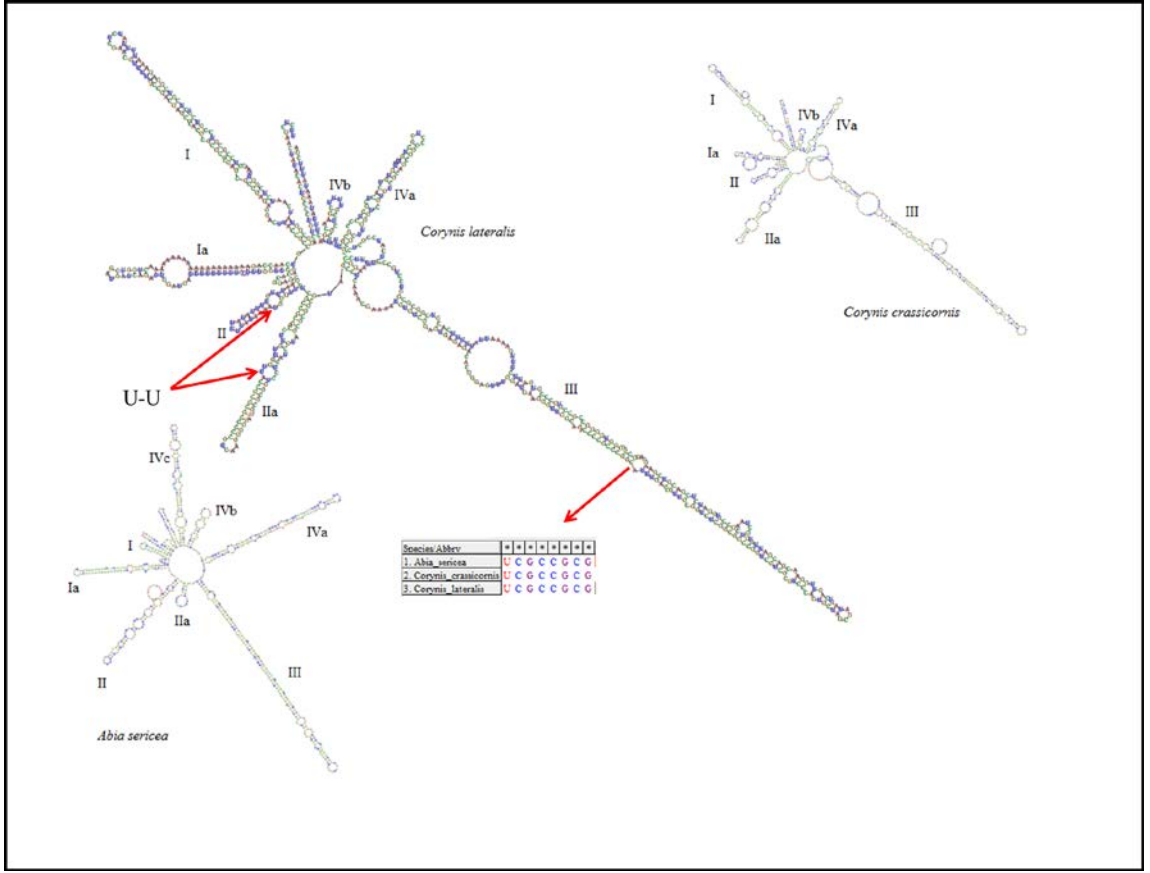
Symphyta alttakımı içerisinde ortalama ITS2 nükleotid uzunluğuna sahip olan Argidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapıları, ökaryotlar için önerilen genel ITS2 yapısına bazı farklılıkları olsa da uygundur. Tüm Argidae ITS2 ikincil yapılarında primidin-primidin hatalı eşleşmelerine sahip heliks II ve uzun heliks III tespit edilmiştir. Aynı zamanda heliks III'ün 5' apeksine yakın bir bölgede oldukça korunmuş bir motif tespit edilmiştir (5'...CGA UCG UCG CGU C...-3'). Şekil 3.21'de Argidae familyası ITS2 bölgelerinin genel yapısı ve korunmuş motifleri verilmiştir. *S. furcata* hariç tüm Argidae



Şekil 3.22 Cephidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

c) Cimbicidae Familyası

Cimbicidae familyasından 2 farklı cinse ait toplam 3 türün ITS2 ikincil yapısı verisi oluşturulmuştur. U-U eşleşmesi yapan heliks II, korunmuş motife sahip heliks III ve diğer heliksler tanımlanmıştır. *Corynis* cinsine ait iki tür toplam 7 heliksli, *A. sericea* türü ise 8 heliksli bir yapı oluşturmaktadır. Standart dört heliksli ITS2 yapısından farklı olarak heliks I ile heliks II arasında heliks Ia; heliks II-heliks III arasında heliks IIa yer almaktadır. Ayrıca standart ökaryotik ITS2 ikincil yapısından farklı olarak, *Corynis* cinsi türleri heliks IVa ve heliks IVb olmak üzere iki *A. sericea* ise üç (heliks IVc) heliks IV oluşturmaktadır. Cimbicidae türlerine ait ikincil yapılar Şekil 3.23'de özetlenmiştir.

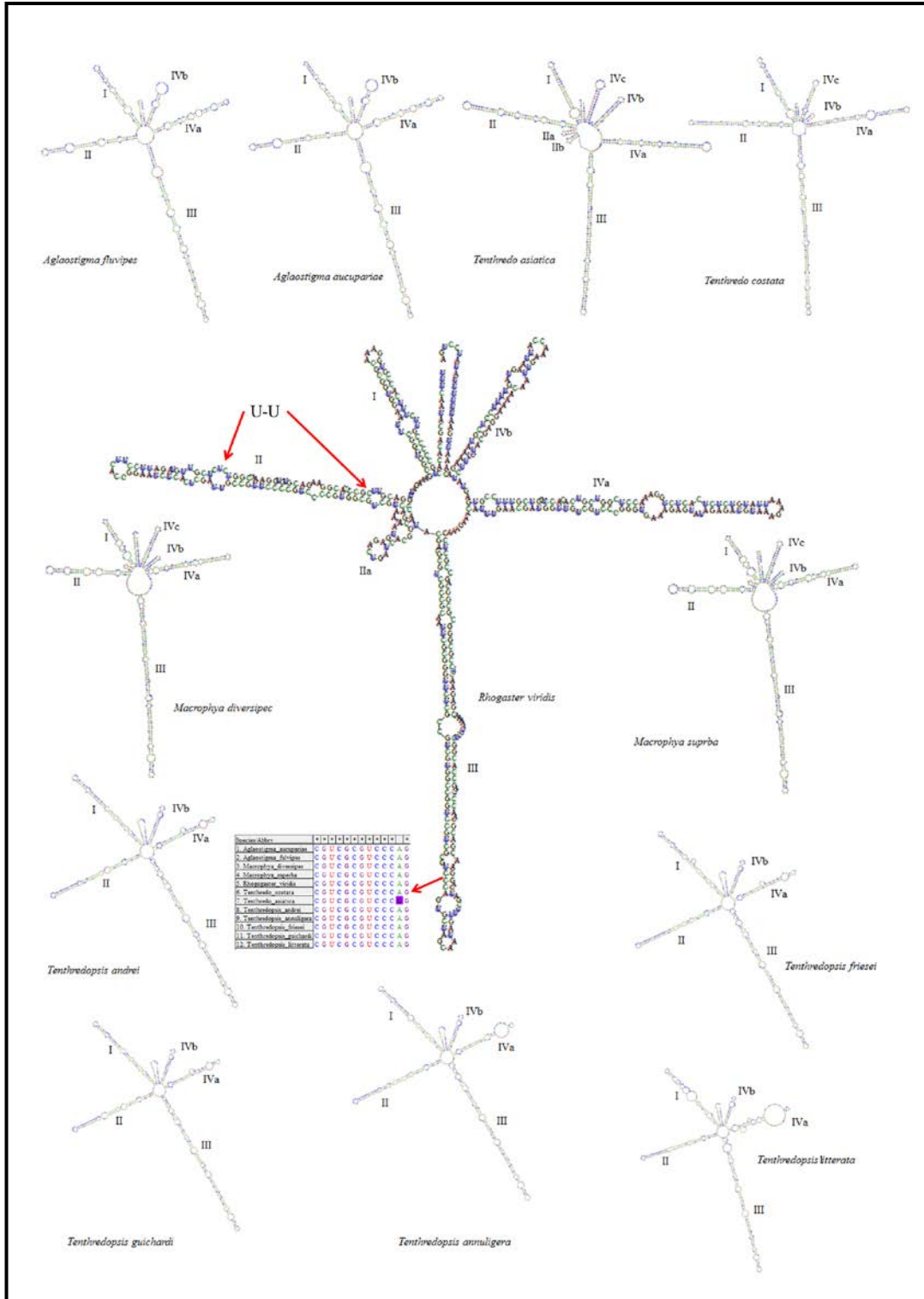


Şekil 3.23 Cimbicidae familyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

d) Tenthredinidae

Tenthredinidae familyasının Tenthredininae, Allantinae, Blennocampinae, Nematinae ve Selandriinae altfamilyalarına ait türlerin ITS2 ikincil yapıları oluşturularak heliks sayısı, korunmuş motifleri ve ökaryotik organizmalar için önerilen 4 heliksli standart yapıdan farklı olarak bulundurduğu yapılar karakterize edilmiştir. Tenthredininae altfamilyasından *Aglao stigma*, *Macrophya*, *Rhogogaster*, *Tenthredo* ve *Tenthredopsis* cinslerinin ITS2 ikincil yapıları karakterize edilmiştir ve Şekil 3.24’de sunulmuştur. *Aglao stigma* ve *Tenthredopsis* cinslerine ait türlerde standart dört kollu ITS2 yapısından farklı olarak heliks IVa ve IVb olarak adlandırılan yapılar bulunmuştur. *Macrophya* ve *Tenthredo* cinslerinde ise heliks IVa ve IVb’ye ek olarak helik IVc olarak adlandırılan fazladan bir heliks daha tespit edilmiştir. Ayrıca *Tenthredo asiatica* türü ITS2 ikincil yapısı helik II ile heliks III arasında IIa ve IIb olarak adlandırılan

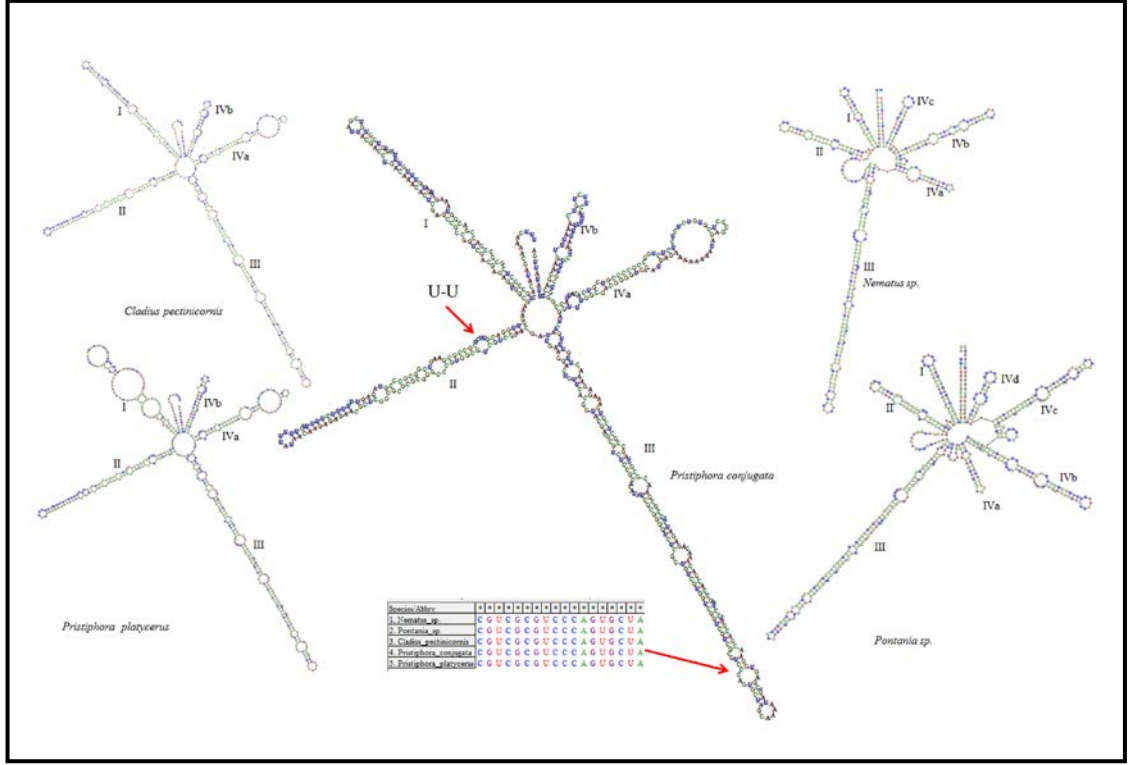
yapıları içermektedir. *R. viridis* türünde heliks II ile heliks III bölgesi arasında heliks IIa olarak adlandırılan bir heliks yapısı daha tespit edilmiştir.



Şekil 3.24 Tenthredininae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

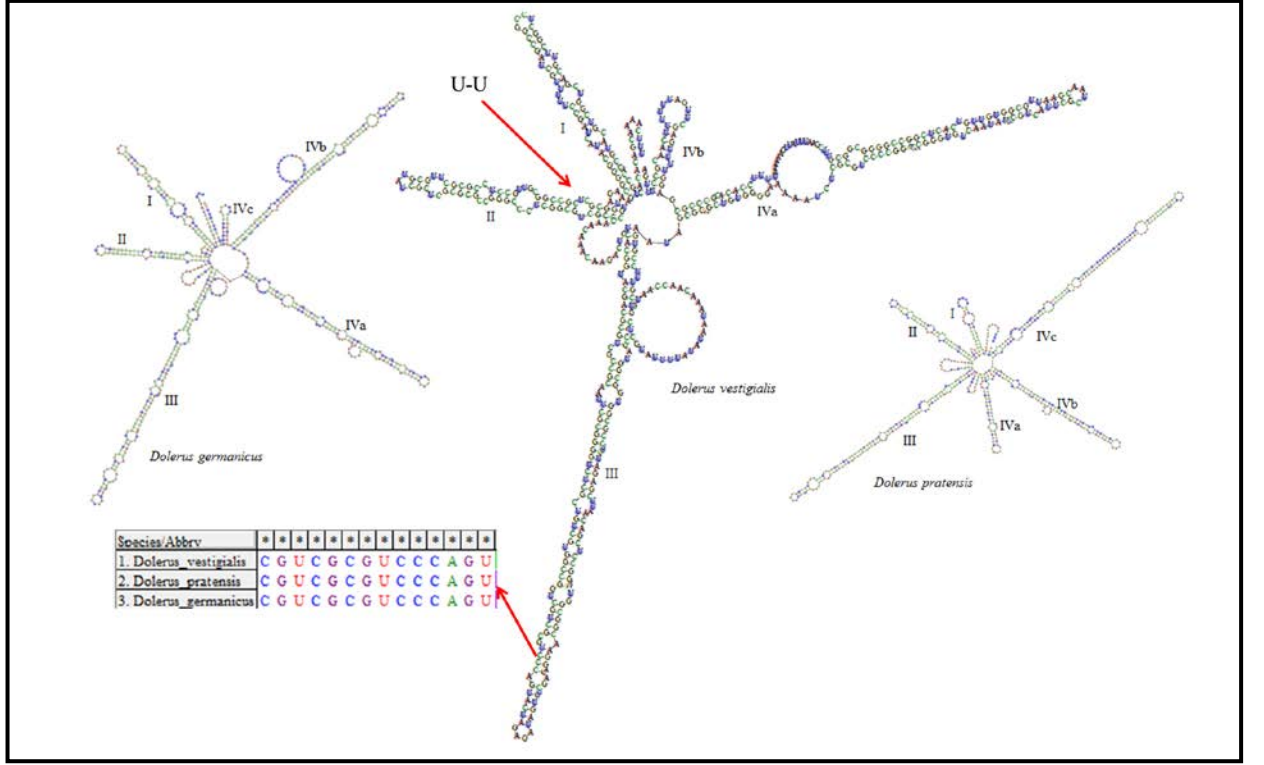
Tenthredininae altfamilyasına ait tüm türlerin ITS2 ikincil yapılarının U-U hatalı eşleşmeleri içeren heliks II, 5' apeks bölgesinde korunmuş bir motif içeren ve görece uzun heliks III bölgesi tanımlanmıştır. Heliks III 5' ucunun apeksine yakın bir bölgede oldukça korunmuş 5'...CGU CGC GUC CCA G...-3' dizisi tespit edilmiştir.

Allantinae altfamilyasına ait *Allantus*, *Athalia*, *Empria* ve *Monsoma* cinsleri ait türleri ve Blennocampinae altfamilyasına ait *M. rubi* türünün ITS2 ikincil yapısı oluşturulmuştur. *Allantus* cinsinden *A. cinctus* 6 heliksli bir ikincil yapı oluştururken *A. didymus* 5 heliksli bir ikincil yapı oluşturmaktadır. *Athalia* cinsinden, *A. circularis* 6 heliksli, *A. scutellariae* 7 heliksli bir ikincil yapı oluşturmaktadır. *Empria* cinsine ait türler ve Blennocampinae altfamilyasının tek temsilcisi olan *M. rubi* standart 4 heliksli ITS2 yapısı oluşturmaktadır. *M. pulveratum* türü ise 6 heliksli bir ITS2 ikincil yapısı oluşturmaktadır. Tenthredininae altfamilyasından farklı olarak Allantinae ve Blennocampinae altfamilyaları heliks II ile heliks III arasında fazladan heliks yapıları bulundurmamaktadır, heliks sayılarındaki farklılıklar standart yapıdaki heliks IV konumunun içerdiği heliks sayısı nedeniyle meydana gelmektedir. Allantinae ve Blennocampinae altfamilyaları U-U hatalı baz eşleşmeleri yapın bir heliks II, görece uzun ve 5' apeks bölgesinde korunmuş bir motif bulunduran heliks III yapısı bulundurmaktadır (Şekil 3.25). Korunmuş dizi motifi Tenthredininae altfamilyası ile ortaktır (5'...CGU CGC GUC CCA G...-3') ve her iki altfamilyada da oldukça korunmuştur.



Şekil 3.26 Nematinae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

Selandriinae altfamilyasına ait *Dolerus* cinsinin *D. vestigalis*, *D. pratensis* ve *D. germanicus* türlerinin ITS2 ikincil yapısı karakterize edilmiştir. *D. vestigalis* ve *D. pratensis* türleri 6 heliksli bir yapıya sahipken *D. germanicus* türü 5 heliksli bir ITS2 yapısına sahiptir. *Dolerus* türlerinin görece uzun heliks III bölgesi korunmuş 5'-...CGU CGC GUC CCA GU...-3' dizi motifine sahiptir.

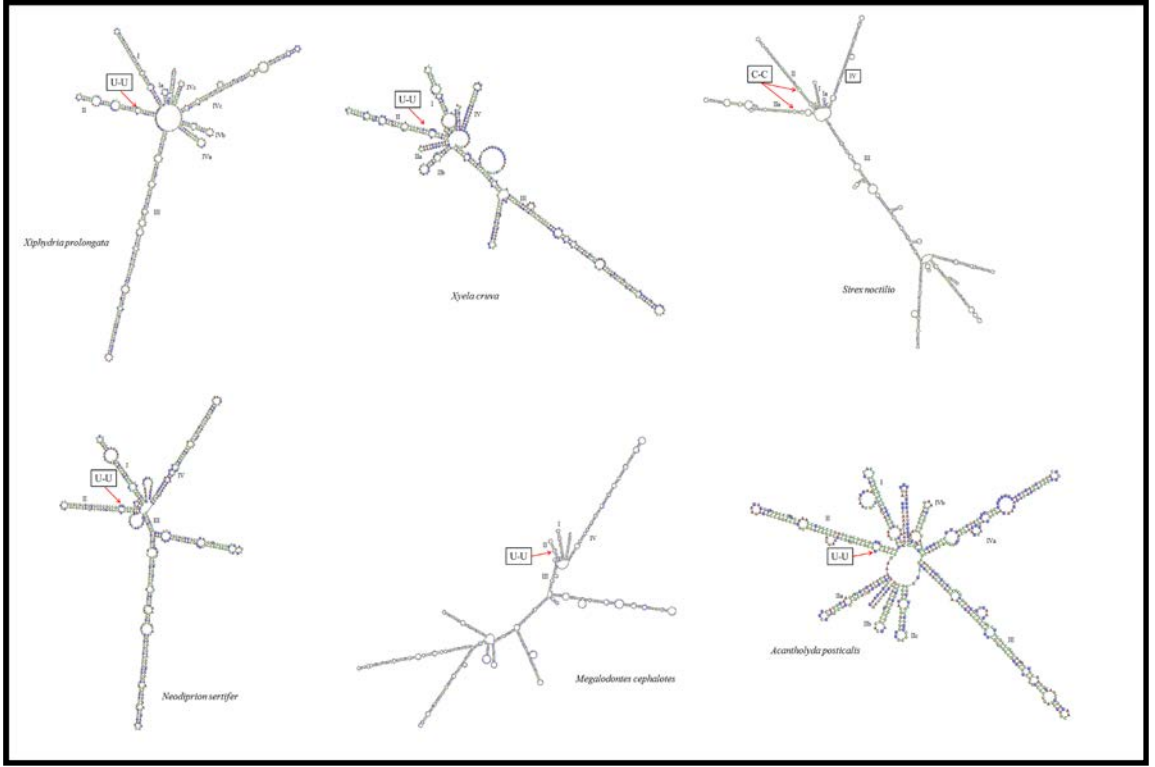


Şekil 3.27 Selandriinae altfamilyası türlerinin ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

e) Diğer Familyalar

Diprionidae, Megalodontesidae, Pamphiliidae, Siricidae, Xyelidae ve Xiphydriidae familyaları çalışmada tek türle temsil edilmiştir. Bu nedenle bu familyaların ITS2 bölgelerinin ikincil yapılarının ve korunmuş dizileri bu başlık altında toplanmıştır ve Şekil 3.28’de görselleştirilmiştir. Xiphydriidae familyasını temsil eden *X. prolongata* türü 7 heliksli ITS2 yapısına sahiptir. Standart ITS2 yapısının heliks IV olarak adlandırılan bölge IVa, IVb, IVc ve IVd helikslerinin olduğu tespit edilmiştir. Xyelidae familyasından *X. curva* türünün ITS2 ikincil yapısı heliks II ile heliks III arasında heliks IIa ve IIb olarak adlandırılan yapıları içermektedir. Siricidae familyasından *S. noctilio* türü Symphyta alttakımında en uzun ITS2 bölgelerinden birine sahiptir. Bu nedenle *S. noctilio* türünün heliks III bölgesi oldukça uzun ve dallanmıştır. Heliks II ile heliks III bölgesinde heliks IIa olarak adlandırılan bir yapıya daha sahip olan *S. noctilio* aynı zamanda 5' bölgesinin bitişiğinde heliks Ia olarak adlandırılan bir heliks yapısına daha sahiptir ve toplamda 6 heliksi bulunmaktadır. Diprionidae familyasında *N. sertifer* türü

4 heliksli bir ITS2 yapısına sahiptir. *N. sertifer* görece uzun ve dallanmış bir heliks III yapısına sahiptir.



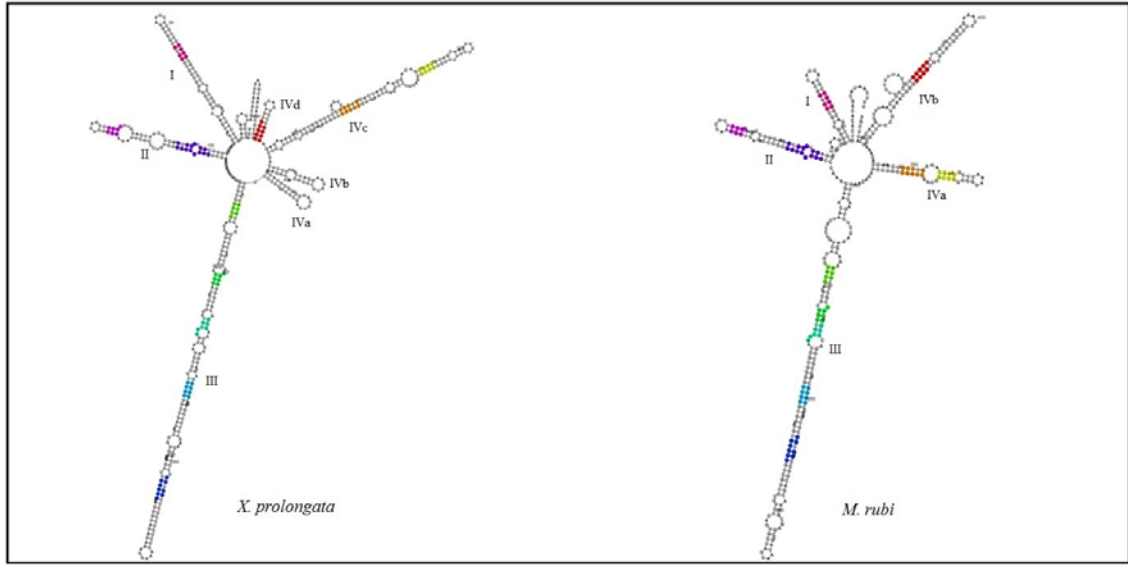
Şekil 3.28 Diğer Symphyta familyaları ITS2 ikincil yapılarının genel yapısı ve bazı korunmuş dizi motifleri

Cephalidae familyasından sonra ITS2 nükleotid uzunluğu bakımından ikinci sırada yer alan Megalodontesidae familyası oldukça uzun bir heliks III yapısına sahiptir. Heliks III yapısı oldukça dallanmıştır ve üzerinde 7 heliks bulunmaktadır. Ancak genel ITS2 yapısı bu familyada da korunmuştur ve 4 heliksli bir yapıya sahiptir. Pamphiliidae familyasından *A. posticalis* türü 8 heliksli bir ITS2 yapısına sahiptir. Heliks II ve heliks III bölgesi arasında IIa, IIb ve IIc olarak adlandırılan heliks yapılarına sahiptir. Aynı zamanda heliks IVa ve IVb olarak adlandırılan yapılara da sahiptir.

3.4.2 Symphyta Alttakımında Korunmuş ITS2 Dizi Motifleri

Symphyta alttakımı ITS2 bölgesi 415-1351 bp gibi çok geniş bir aralıkta uzunluk varyasyonu göstermektedir. Ancak alttakım içerisinde oldukça korunmuş bazı dizi motifleri bulunmaktadır. Bütün Symphyta alttakımı ITS2 bölgeleri 5'-TTH-3' dizi ile başlamakta ve 5'-HGA-3' dizisi ile sonlanmaktadır. Bu durumun tek istinası olarak

Tenthredo cinsi üyelerinde ITS2 bölgesi 5'-TCT-3' ile başlamaktadır ve bu karakter Symphyta alttakımı içerisinde *Tenthredo* cinsi için otoapomorfik bir karakterdir. Alttakım içerisinde korunmuş bir diğer dizi motifi heliks I üzerinde yer alan 5'-ACTGC-3' dizisidir, ancak *A. sericea* (Cimbicidae) ve *A. orchropus* (Argidae) türlerinde adenin nükleotidi yerine guanin bu dizi içerisinde yer almaktadır. Heliks II'nin 3' bölgesinde yer alan 5'-GGC GUC GYC YSA AA-3' dizisi oldukça korunmuştur. Heliks III Symphyta alttakımında oldukça değişkendir ancak 5' ucuna yakın bir bölgede 5'-TCGCG-3' dizisi tüm alttakımda korunmuştur, yalnızca Megalodontesidae familyasında 5'-TTGTG-3' ve Xiphydriidae familyasında 5'-TTGTG-3' dizileri bu bölgede korunmuştur. Bu korunmuş dizilerin heliks III üzerinde en az iki kopyası bulunmaktadır. Korunmuş dizi motiflerinin bazılarının heliksler üzerinde gösterimi Xiphydriidae familyasına ait *X. prolongata* ve Tenthredinidae familyasına ait *M. rubi* türleri kullanılarak Şekil 3.29'da gösterilmiştir.



Şekil 3.29 Symphyta alttakımından iki familyaya ait korunmuş ITS2 bölgeleri

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik çeşitlilik ya da biyoçeşitlilik olarak adlandırılan kavram, modern çağımızın felaketi olan ekolojik dengenin tahribatı nedeniyle oldukça önem kazanmıştır. Ancak canlıların eşsiz çeşitliliği ve karmaşıklığı, biyolojik çeşitliliği anlamazı ve tanımlamamızı zorlaştırmaktadır. Biyolojik çeşitliliğin önemli unsurlarından biri olan böcekler, eklembacaklılar (Arthropoda) şubesinin sınıflarından yalnızca bir tanesini ifade etmektedir. Böcekler; otuz iki takım, 762'den fazla familya ve bir milyondan fazla tanımlanmış tür ile biyoçeşitliliği oluşturan en önemli canlı grubudur (Footitt ve Adler, 2009). Ancak şimdiye kadar tanımlanmış böcek türlerinin 2-50 katı kadar, yani 2- 50 milyon arasında türün dünya üzerinde olduğu yönünde bazı spekülatif hesaplamalar bulunmaktadır (Stork, 1988, 1993). Bu nedenle böceklerin biyolojik, ekolojik ve genetik çeşitliliğinin tanımlanması oldukça önemlidir. Ancak biyolojik çeşitliliğin tanımlanmasının ilk aşamasını oluşturan türlerin sınırlandırılması ve tanımlanması geleneksel morfolojik yöntemler ile tür sayısı, yaşam şekli ve karmaşık evrimsel tarihi gibi nedenlerle ile böcek gruplarında oldukça yavaş ilerlemektedir ve birçok sınırlamayı beraberinde getirmektedir (Packer ve ark., 2009).

Teknolojik ilerlemelere paralel olarak DNA dizileme ve bilgisayar sistemlerinin daha pratik ve ekonomik hale gelmesi ile geleneksel morfolojik yöntemlere alternatif olarak DNA barkodlama yaklaşımı doğmuştur (Hebert ve ark., 2003a). Ancak böcek grupları için kullanılan DNA barkod aracının (*COI* Folmer bölgesi) bazı eksiklikleri olduğu ve başka araçlarla desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Yao ve ark., 2010). Son zamanlarda nükleer çekirdek DNA ITS2 bölgesi DNA barkodlama çalışmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Schultz ve ark., 2005; Rampersad, 2014; Wolf, 2015; Zhang ve ark., 2015). Korunmuş iki rRNA geni (5.8S ve 28S rDNA) arasında yer alan ITS2 bölgesi bu özelliği sayesinde evrensel primerler ile çoğaltılabilme özelliğine sahiptir ve DNA barkodlama açısından elverişli bir araçtır. Aynı zamanda ITS2 bölgesi ile birlikte transkribe olduğu rRNA genleri gibi ikincil yapılar oluşturmaktadır. Özellikle bitki ve alg gruplarında yapılan çalışmalarda oldukça korunmuş dört heliksli bir yapı kazandıkları gözlenmiştir (Mai ve Coleman, 1997). Daha sonra bu yapı tüm ökaryotik organizmalar için tanımlanmış ve bazı korunmuş dizi motifleri tanımlanmıştır

(Coleman, 2007). Tüm bu özelliklerinin yanı sıra ITS2 bölgesi ikincil yapılarının heliks bölgelerinde CBC olarak adlandırılan bir özelliğin varlığı ile eşeysel uyumsuzluk arasında bir korelasyon bulunmuştur (Coleman, 2000, 2009). Bu durum daha sonra yaklaşık 300.000 ITS2 dizisi ikincil yapı oluşturularak Müller ve ark. (2007) sınanmıştır. Sonuç olarak eğer iki ITS2 dizisi arasında bir CBC varsa %93 olasılıkla farklı tür ve eğer iki dizi arasında hiç CBC yok ise %76 olasılıkla aynı tür olarak bulmuşlardır. CBC varlığı ya da yokluğunun türleşme ile bir ilişkisinden ziyade bu durum yalnızca bir korelasyonla açıklanmaktadır ve biyolojik tür kavramına atıfta bulunarak türleme izolasyonu sonrasında türleşme için geçen sürenin CBC oluşumu için gerekli olduğu düşünülmektedir (Coleman, 2007; Coleman, 2015; Wolf, 2015).

Symphyta alttakımı ITS2 bölgeleri hakkındaki bilgilerimiz, yalnızca Prous ve ark. (2011) tarafından *Empria* ve *Monsoma* cinslerinin taksonomik revizyonu çalışmasında *COI* genine ek olarak moleküler belirteç olarak kullanılmasıyla sınırlıdır ve Allantinae alttakımına ait bu iki cins dışında Symphyta alttakımı ITS2 dizileri hakkında dizi bilgisi mevcut değildir. Aynı zamanda Hyemoptera takımı içerisinde ikincil yapı bilgisi kullanılarak daha önce hiçbir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca ikincil yapı verisi kullanılarak bir çalışma yapılmadığı için CBC tür kavramı da bu grupta daha önce hiç test edilmemiştir. Bu kapsamda Symphyta alttakımını familya düzeyinde temsil edecek şekilde bir örneklem oluşturulmuş olup, ITS2 bölgesinin yapısı, DNA barkodlama aracı olarak etkinliği, oluşturulan ikincil yapı verisinin DNA barkodlamada kullanılabilirliği ve CBC tür kavramını test edilmiştir. Aynı zamanda Symphyta alttakımı ITS2 ikincil yapılarının özellikleri ve korunmuş motifleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar “Symphyta Alttağından Barkod Aracı Olarak ITS2” ve “Symphyta Alttağı ITS2 İkincil Yapısı” olmak üzere iki ana başlık altında toplanmış ve tartışılmıştır.

1. Symphyta Alttağında Barkod Aracı Olarak ITS2 Kullanılması

Symphyta alttakımını temsilen Çizelge 3.1’de verilen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sırasında izlenen yöntem başarılı sonuç vermiştir, ancak Orussidae familyasından *Ophrella eldorado* türünden DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilememiştir. Bu tür Natural History Museum’dan (UK, Birleşik Krallık) temin edilmiş olup örneğin toplanma şekli ve saklanma koşulları nedeniyle DNA izolasyonun başarısız olduğu düşünülmektedir (Mitchell, 2015). Bu örnek dışında

PZR reaksiyonlarında engel teşkil edecek şekilde nitelik ve nicelik yönünden DNA izolasyonunda sorunla karşılaşılmamıştır. Moleküler verinin oluşturulmasında DNA izolasyonundan sonra gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarını etkileyen en önemli faktör kullanılan primerin ilgili bölgeye doğru ve etkili bir şekilde bağlanmasıdır. DNA barkod aracı olarak aday gösterilen bir bölgenin PZR aşamasında yüksek başarı oranına sahip olması beklenmektedir (Valentini ve ark., 2009). ITS2 bölgelerinin çoğaltılması için White ve ark. (1990) tarafından geliştirilen ITS4-5 primerleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, ancak bu primerler mantar grupları için tasarlanmıştır ve Symphyta alttakımı üyelerinin bazılarının fungus simbiyotu bulunmaktadır (Srútká ve ark., 2007). Bu nedenle ilk olarak Ji ve ark. (2003) tarafından tasarlanan Cas5p8s-Cas28SB1d primer çifti kullanılmıştır. Ancak bu primer çiftinin ileri yönlü olarak bağlanan primeri (Cas5p8s) 3' ucunda Symphyta 5.8S rDNA bağlanma bölgesine tüm türler için uyumlu değildir. Bu durum Prous ve ark.(2011) tarafından rapor edilmiştir ve çözüm olarak Diptera takımı üyeleri için geliştirilen AM1-AM2 primerleri kullanılmıştır (Marinucci ve ark., 1999). Böylelikle Symphyta alttakımından tüm türlerin ITS2 bölgeleri çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2). Dizileme işlemleri içinde bu primer çifti Cas5p8s-Cas28SB1d primer çiftinden daha başarılıdır (Her iki primer çifti kullanılarak dizileme yaptırılmıştır).

ITS2 bölgeleri komşu olduğu 5.8S ve 28S korunmuş rRNA dizilerini de kapsayan bir PZR ürününün oluşturmaktadır. Dizileme sonrasında çift yönlü olarak kontrol edilen dizilerin ITS2 bölgesinin sınırlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu aşamanın başarı ile sonuçlanması ikincil yapı analizlerinin sorunsuz bir şekilde ilerlemesi için gereklidir. Bu amaçla Keller ve ark. (2009) tarafından HMM-temelli (hidden markov model) bir yöntem kullanılarak ITS2 bölgelerinin sınırlarının belirlenmesi başarılmıştır ve algoritma ITS2 veri tabanına entegre edilmiştir. Ancak HMM-temelli ITS2 sınırlarının belirlenmesi sistemde yüklü referans dizilerin varlığına ve sınırlandırılacak dizinin 5.8S-28S çrDNA dizilerini içeren sinyal dizisinin uzunluğuna bağlıdır. Özellikle *T. iudaicus* (1.351 bç.), *S. noctilio* (1.183 bç.) ve *M. cephalotes* (1.251 bç.) türleri gibi uzun ITS2 dizilerine sahip türlerin 5.8S-28S çrDNA sinyallerinin bulunmasında ve ITS2 dizilerinin sınırlandırılmasında sorun yaşanmıştır. Çünkü bu türler gibi PZR ürünlerinin uzunluğu 1000 bç.'den daha fazla olan türlerin dizileme aşamasında sinyal dizilerini içeren uç kısımların kaliteli okuması yapılamamaktadır.

Gerek PZR etkinliği gerekse ITS2 bölgelerinin sınırlarının kolaylıkla belirlenebilmesi için Symphyta alttakımı ITS2 bölgesinin uzunluk aralığının bilinmesi gerekmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Symphyta alttakımı ITS2 bölgelerinin nükleotid uzunluğu belirlenmiştir. Bu kapsamda Cephidae, Megalodontesidae ve Siricidae familyalarına ait türlerin ITS2 bölgesinin 1.000 bç.'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Diğer familyalarda ise 406-699 bç. aralığında olan ITS2 bölgesi Symphyta alttakımında ortalama olarak 576 bç. (standart sapma:194) uzunluğundadır (Çizelge 3.3). Genbank veri tabanında yapılan arama sonucunda Hymenoptera takımında en uzun ITS2 bölgesi 2.052 bç. ile *Bombus ignitus* (Genbank erişim no: HQ228482) türüne ait iken en kısa ITS2 bölgesi 232 bç. ile *Sycoryctes sp.* (Genbank erişim no: AY536490) türüne ait olduğu görülmüştür. Böcek grupları içerisinde ise 49 familyadan 378 tür ile yapılan bir çalışmada ITS2 bölgesinin ortalama olarak 269 bç. uzunluğunda olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise hayvan gruplarında için ITS2 bölgesinin 100-1.209 bç. (yığılma 195-510 bç. aralığında) aralığında olduğu bildirilmiştir (Yao ve ark., 2010). Symphyta takımı içerisinde ITS2 nükleotid uzunluğu familyalara göre farklılık göstermektedir ve bazı familyalar hayvan grupları için aşırı sayılabilecek nükleotid uzunluğuna sahiptir. Bu aşırı nükleotid uzunluğu DNA barkodlama yaklaşımı için bir dezavantajdır. DNA barkodlama yaklaşımında kullanılacak bölgenin kolaylıkla çoğaltılabilmesi için bir diğer parametre PZR verimini etkileyen %GC içeriğidir (McDowell ve ark., 1998). Symphyta alttakımı ITS2 bölgeleri 44,9-64,8 aralığında % GC içeriğine sahiptir (ortalama %57). PZR reaksiyonlarında %GC içeriğine bağlı olarak herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

ITS2 bölgesinin barkod aracı olarak sınanmasında primer nükleotid dizi verisi ve ikincil yapı verisi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. İdeal bir barkod aracının tür içerisinde neredeyse hiç değişmemiş türler arasında ise yeterince farklılaşmış olması beklenmektedir (Hebert, 2003a). Bu amaç Symphyta alttakımı içerisinde tür içi farklılaşma değerleri hesaplanmıştır ve %0-%3,75 arasında bulunmuştur. Yao ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada hayvan gruplarında ITS2 tür içi farklılaşma değerleri ortalama olarak %5 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak türler arasında genetik uzaklığın %3-5 büyük olması durumu ITS2 bölgesini Symphyta alttakımında etkili bir araç kılmaktadır. Bu amaçla familyalar ayrı ayrı değerlendirilerek son olarak tüm veri seti birleştirilerek nükleotid düzeyinde analiz edilmiştir. Aynı zamanda ikincil yapı ve

CBC verisi kullanılarak ITS2 bölgesi farklı bir boyutta barkodlamada araç olarak test edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm analizlerin sonuçları her grup için maddeler halinde tartışılmıştır:

a) Cephidae Familyası

Primer nükleotid dizisi kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda en az farklılaşma % 8 ile *T. tabidus* ve *T. iudaicus* türleri arasında görülmüştür. Bu değer tür içi farklılaşma değerinin neredeyse iki katına yakındır. Aynı zamanda inşa edilen uzaklık temelli NJ ağacında tüm cinsleri monofilisi sağlanmıştır ve ITS2 bölgesi primer nükleotid dizisi kullanılarak. Cephidae familyasının barkodlaması başarılı olmuştur. ITS2 ikincil yapı verisi kullanılarak oluşturulan PNJ ağacında primer nükleotid dizisine benzer olarak tüm cinslerin monofilisi sağlanmıştır. Ancak PNJ ağacında 1000 tekrarlı gerçekleştirilen seç-bağla testi destekleme değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu nedenle ikincil yapı verisi kullanılarak gerçekleştirilen Cephidae familyasının barkodlanması başarılı olmuştur. Gerçekleştirilen CBC analizi sonucunda *T. iudaicus-C. pgmaea* ve *T. iudaicus-T. tabidus* türleri dışında her tür arasında en az bir CBC olduğu görülmüştür. CBC tablosu üzerinde farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %6,25 ve farklı türlere ait türler arasında “≥1” olma durumu %93,75 olarak hesaplanmıştır. Böylelikle ITS2 bölgesi diğer barkod araçlarına göre ekstradan bir bilgi daha sunmuştur. CBC verisi kullanılarak inşa edilen BIONJ ağacında yalnızca *Trachelus* cinsinin monofilisi sağlanamamıştır. Bu cins dışında diğer tüm cinslerin monofilisi desteklenmiştir. Sonuç olarak Cephidae familyasında ITS2 bölgesi başarılı bir barkod aracıdır.

b) Argidae Familyası

Argidae familyasından *Arge* ve *Sterictiphora* cinsler ile gerçekleştirilen analizler sonrasında nükleotid dizi verisinin %21-%31 arasında farklılaşma sergilediği bulunmuştur. Bu nedenle primer nükleotid dizisine bakılarak ITS2 bölgesinin Argidae familyasından iyi bir barkod aracı olduğu söylenebilir. Nükleotid dizi verisi kullanılarak inşa edilen NJ ağaçları cinslerin ve türlerin monofilini desteklemiştir ve ITS2 bölgesinin Argidae familyasında iyi bir barkod aracı olduğunu doğrulamıştır. İkincil yapı bilgi bilgisiyle birlikte nükleotid dizisinin hizalanmasıyla inşa edilen ağaç *Arge* cinsinin monofilisini desteklememiştir ve politomi içermektedir. İkincil yapı bilgisiyle gerçekleştirilen CBC analizi sonucunda *A. pleuritica-A. dimidata* türleri dışında tüm

farklı türler arasında en az bir CBC bulunmaktadır. CBC tablosu üzerinde farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %12,5 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %87,5 olarak hesaplanmıştır. Tür içinde bireyler arasında hiç CBC bulunmamaktadır ve sonuç olarak teorikte CBC tür kavramı hatasız olarak taksonları ayırmıştır. Ancak pratikte Argidae familyası türlerinde %87,5 oranında doğruluk ile ayırım yapmıştır. CBC veri tablosu karakter matrisi olarak kullanılarak BIONJ ağacı inşa edilmiştir ve ağaç topolojisinin diğer sonuçlara göre oldukça farklı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte *A. dimidiata* ve *A. pleuritica* türlerini bu analiz ayıramamıştır.

c) Cimbicidae Familyası

Cimbicidae familyasını temsil eden 3 tür ile gerçekleştirilen analizleri sonucundan ITS2 bölgesinin bu familya içerisinde %6-%55 arasında farklılaşma sergilediği görülmüştür. Tür içi genetik uzaklık değerlerine yakın bir değer olan %6’lık farklılaşma *Corynis* cinsinin bireyleri arasında gözlemlenmiştir. Oluşturulan ikincil yapı veri seti kullanılarak inşa edilen PNJ ve BIONJ ağaçları nükleotid dizi verisi ile oluşturulan NJ ağacını desteklemiştir. Ayrıca oluşturulan CBC tablosu üzerinden farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %0 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %100 olarak hesaplanmıştır. Böylelikle analize dahil edilen üç tür birbirinden barkodlama yaklaşımıyla ayrılmıştır. Ayrıca CBC tür kavramı yaklaşımı Cimbicidae familyası türleri arasında düşük farklılaşma oranını telafi ederek barkodlama yaklaşımını güçlendirmiştir.

d) Allantinae Altfamilyası

Allantinae altfamilyası çalışmada en çok tür ile temsil edilen grubu oluşturmaktadır. Bu grubu oluşturan *Empria* ve *Monsoma* cinsleri GenBank veri tabanından elde edilmiştir. Nükleotid dizisi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda *E. tridens*, *E. basalis*, *E. alector*, *E. alpina*, *E. japonica*, *E. loktini*, *E. minuta*, ve *E. longicornis* türleri arasındaki genetik uzaklık %0,15-3,17 arasında değiştiği görülmüştür. Benzer olarak *E. fletcheri*, *E. immersa*, *E. improba* ve *E. plana* arasındaki genetik uzaklık %0,64-1,21 değerleri arasındadır. Yine aynı cins içerisinde *E. quadrimaculata*-*E. rubicola* türleri arasındaki genetik uzaklık %2,51 ve *E. alector*-*E. basalis*, *E. alector*-*E. longicornis*, *E. basalis*-*E. longicornis*, *E. alector*-*E. tridens*, *E. basalis*-*E. tridens*, ve *E. longicornis*-*E. tridens*

türlerinin bazı bireyleri arasında ITS2 bölgeleri arasında hiç farklılaşma görülmemiştir (Çizelge 3.8). Bu düşük farklılaşma oranları türlerin adlandırılmalarında bir hataya işaret etmektedir. Ancak yine de CBC tür konseptinin test edilebilmesi ve barkodlama yaklaşımının pratik olarak test edilmesi için bu gruplar analizlere dahil edilmiştir. Nükleotid dizi verisi kullanılarak inşa edilen NJ ağacında *E. basalis-E. tridens-E. alector-E. longicornis* bir grup halinde ve *E. alpina-E. japonica* bir grup halinde olarak adlandırılan türleri kümelemiştir. Yani türler bir birinde ayırlamamıştır. Bunun nedeninin ITS2 belirtecinin yetersiz kalması olarak değil taksonların adlandırılmalarında bir hata yapıldığı yönünde yorumlaması yapılabilir. Çünkü aynı altfamilya içerisinde yer alan ve bu çalışma sonucunda dizi verisi üretilen *Allantus* ve *Athalia* cinslerinin türleri arasında sırasıyla %15 ve %33 ITS2 farklılaşması olduğu bulunmuştur. Ayrıca yine *Empria* cinsine ait *E. fletcheri-E. multicolor* türleri arasında %24'lük bir genetik farklılaşma bulunmaktadır. İkincil yapı verisi ile inşa edilen PNJ ağacında ise yine *E. basalis-E. tridens-E. alector-E. longicornis* bir grup halinde yer almışlardır. Hem nükleotid dizisi hemde ikincil yapı verisi ile oldukça yakın gruplar olarak görülen bazı *Empria* türleri CBC analizi sonucunda da birbirinden ayırlamadığı görülmüştür (Çizelge 3.15). CBC tablosu üzerinden farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %63 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %36 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Symphyta alttakımdaki genel örüntüye uymamaktadır ve böylesine düşük bir başarı oranı *Empria* cinsi türleri arasında “0” CBC durumunun çokluğu nedeniyle meydana gelmektedir.

e) Tenthredininae Altfamilyası

Tenthredininae altfamilyası türleri kullanılarak gerçekleştirilen genetik uzaklık analizlerinde %2-%39 aralığında olduğu görülmüştür. Nükleotid dizi verisi kullanılarak inşa edilen ağaç tüm türleri ayrı ayrı gruplamıştır ve cins düzeyinde her grubun monofilisi desteklenmiştir. Ancak *Aglaostigma* ve *Macrophya* cinslerinin türleri arasındaki genetik uzaklık %3,75'den daha az olarak bulunmuştur. Aynı durum *Tenthredopsis* cinsinin bazı türleri arasında mevcuttur. Oluşturulan ikincil yapı verisi kullanılarak inşa edilen PNJ ağacı nükleotid verisi ile inşa edilen ağaçtan farklı bir topoloji oluştursa da, genel olarak aynı türün bireylerini bir arada kümelemiştir. Ancak cins düzeyinde monofiliyi desteklememiştir. İkincil yapı verisi kullanılarak gerçekleştirilen CBC analizi sonucunda farklı türler arasında “0” CBC olması durumu

%21 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %79 olarak hesaplanmıştır. CBC analizi sonuçları genetik uzaklık verisi ile uyumludur ve *Aglostigma*, *Macrophya* ve bazı *Tenthredopsis* türleri arasında CBC yoktur. CBC verisi kullanılarak inşa edilen BIONJ ağacında *T. annuligera* türünün monofilisi desteklenmemiştir (Şekil 3.16).

f) Selandriinae Altfamilyası

Selandriinae ITS2 bölgeleri %28-%60 oranında genetik olarak farklılaşmıştır. Nükleotid dizi verisi kullanılarak inşa edilen NJ ağacı *Dolerus* cinsinin monofilisini desteklemiştir ve türleri birbirinden ayırmıştır. İkincil yapı verisi kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde *Dolerus* cinsinin 3 türü en az bir CBC'nin varlığı ile birbirlerinden ayrılmışlardır. Ancak *S. serva-D. germanicus* ve *S. serva-D. vestigalis* türleri arasında CBC yoktur. Farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %25 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %75 olarak hesaplanmıştır. İkincil yapı verisi kullanılarak inşa edilen PNJ ağacını nükleotid verisi ile oluşturulan ağacı desteklemektedir ve *Dolerus* cinsinin monofilisi desteklenmemiştir.

g) Symphyta Alttakımının Birlikte Değerlendirilmesi

Tüm familyalara ait ITS2 bölgesi dizi, ikincil yapı ve CBC verisi kullanılarak değerlendirilmiştir. Nükleotid dizi verisi kullanılarak inşa edilen NJ ağacında yalnızca Cephidae familyasının monofilisi sağlanmıştır. Yani Symphyta ITS2 bölgeleri familya ve üstfamilya düzeyinde bilgi verici değildir. Benzer şekilde ikincil yapı verisi kullanılarak gerçekleştirilen analizde ITS2 bölgesi familya ve üstfamilya düzeyinde bilgi verici olmamıştır. Nükleotid dizi verisi ve ikincil yapısı verisi ile gerçekleştirilen analiz sonucunda Allantinae altfamilyası maddesinde verilen *Empria* cinsine ait bazı türlerinin birlikte kümelenmesi durumu gözlemlenmiştir. Bunun dışında tüm türler birbirinden ayrılmıştır. Tüm türler dahil edilerek gerçekleştirilen CBC analizi sonucunda farklı türler arasında “0” CBC olması durumu %33 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %67 olarak hesaplanmıştır. Fakat “0” CBC durumun çoğunluğunu *Empria* cinsin türleri arasında kaynaklanmaktadır ve bu cins analizden çıkarılarak yeniden hesaplama yapılırsa Symphyta alttakımında, “0” CBC olması durumu %16 ve farklı türlere ait türler arasında “ ≥ 1 ” olma durumu %84 olarak hesaplanmaktadır. Sonuç olarak Symphyta alttakımında ITS2 bölgesi primer nükleotid dizisi, ikincil yapı verisi ve CBC analizi ile başarılı bir barkod aracıdır. Ancak

gerçekleştirilen çalışma tür ve familya sayısıyla Symphyta alttakımı temsil edecek düzeyde olsa da tür içi ve aynı cinsin farklı türlerini içerme açısından yetersiz kalmıştır. Bu nedenle, türü temsil eden daha fazla örnek ve aynı cinsin türlerini içeren farklı familyalardan oluşturulacak bir çalışma ile grubu ile ITS2 bölgesinin bir barkod aracı olarak test edilmesi Symphyta alttakımında ITS2 barkod aracına olan güveni artıracaktır.

2. Symphyta Alttakımı ITS2 İkincil Yapısı

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda Symphyta alttakımından 10 familyanın ITS2 ikincil yapıları karakterize edilerek korunmuş motifleri tespit edilmiştir. Symphyta alttakımı ITS2 ikincil yapıları ökaryotik organizmalar için önerilen korunmuş bazı yapıları içermektedir. Bunlardan ilki tüm Symphyta üyeleri primidin-primidin hatalı baz ekleşmeleri yapan, görece korunmuş ve dallanma yapmayan bir heliks II yapısına sahiptir. İkinci olarak ise tüm Symphyta ITS2'leri en uzun heliks olma özelliğine sahip, görece az korunmuş fakat içerisinde korunmuş dizi motifleri barındıran bir heliks III yapısına sahiptir. Bunun yanı sıra böcek gruplarında daha önceden bildirilen heliks II ile helik III arasında yer alan heliks IIa bazı Symphyta üyelerinde de gözlemlenmiştir (Coleman, 2007). Heliks sayısı Symphyta alttakımında cins düzeyinde bile değişkenlik göstermekte olup, Symphyta üyesi 4-8 heliksli ITS2 yapıları oluşturmaktadır. Böcek gruplarının heliks sayısının ökaryotik organizmalar için önerilen 4 heliksli yapıdan farklı olabileceği bildirilmiştir (Coleman, 2007). Ancak daha önce Symphyta alttakımından ya da Hymenoptera takımından ITS2 ikincil yapısı bildirilmemiştir ve Hymenoptera takımı için heliks sayısı ilk defa bu çalışma ile açığa çıkarılmıştır. Symphyta alttakımında özellikle heliks IV pozisyonunda ve heliks II-heliks III arasında heliks sayısı değişmektedir. Bazı Symphyta türlerinde heliks IV pozisyonunda dört farklı heliks yapısı görülebilmektedir. Symphyta ITS2 ikincil yapıları üzerinde bazı korunmuş dizi motifleri tanımlanmış olup, bu motiflerin rRNA'nin olgunlaştırılması sırasında görev aldığı farklı canlı gruplarında bildirilmiştir (Coleman, 2015).

Sonuç olarak yapılan çalışma ile ITS2 bölgelerinin Symphyta alttakımında barkodlama bir araç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Aynı zamanda CBC tür kavramının barkodlamada yardımcı ve doğrulayıcı bir araç olarak kullanılabilir olduğu olarak belirlenmiştir. Symphyta ITS2 ikincil yapıları hem CBC'lerin tanımlanması ile

barkodlamada bir araç olarak test edilmiştir hem de yapıların korunmuş motifleri tanımlanarak bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalar için temel nitelikte bilgi üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aguiar, A. P., Deans, A. R., Engel, M. S., Forshage, M., Huber, J. T., Jennings, J. T. ve Yu, D.S.K.** (2013). Order hymenoptera. *Zootaxa*, 3703(1), 51–62.
- Allander, T., Emerson, S.U., Engle, R. E., Purcell, R.H. ve Bukh, J.** (2001). A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 11 609–11 614.
- Allen, C., Chang, C.C. ve ark.** (2004). Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals, *Zoological Studies*, 43(4): 759-771.
- Álvarez, I. ve Wendel, J.F.** (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29:417–34.
- Ball, S.L. ve Armstrong, K.F.** (2006). DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research*, 36, 337–350.
- Benson, R.B.** (1946). Classification of the Cephidae. Transactions of Royal Entomological Society, London, 96, 89-108.
- Benson, R.B.** (1950). An introduction to the natural history of British sawflies. Transactions of the Society for British Entomology 10 (Part 2), 48–142.
- Benson, R.B.** (1951). Hymenoptera, Symphyta. Section (a). Handbooks for the the Identification of British Insects, 6:2(a), 1-49
- Benson, R.B.** (1968). Hymenoptera from Turkey, Symphyta. Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology, 22 (4), 109-207.
- Bleeker, W., Klausmeyer, S., Peintinger, M. ve Dienst, M.** (2008). DNA sequences identify invasive alien Cardamine at Lake Constance. *Biological Conservation*, 141(3), 692-698.
- Bock, C., Krienitz, L. ve Pröschold, T.** (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2), 293–312.
- Bourke, B.P., Oliveira, T.P., Suesdek, L., Bergo, E.S. ve Sallum, M.A.M.** (2013). A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 6(1), 111.

- Buckler, E.S., Ippolito, A. ve Holtsford, T.P.** (1997). The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*, 145(3), 821–32.
- Buhay, J.E.** (2009). “COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29: 96–110.
- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N.ve Savolainen, V.** (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and longterm goals. *Philos. Trans. R. Soc. B* 360, 1889–1895.
- Chase M.W. ve Fay M.F.** (2009). Barcoding of Plants and Fungi. *Ecology*. 325: 682–683. 6.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L. ve Leon, C.** (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLOS ONE*, 5(1), 1–8.
- Choe, C.P., Hwang, U.W. ve Kim W.** (1999). Putative secondary structures of unusually long strepsipteran SSU rRNAs and its phylogenetic implications, *Mol. Cells*, 9(2):191–199.
- Chown, S.L., Sinclair, B.J. ve Van Vuuren, B.J.** (2008). DNA barcoding and the documentation of alien species establishment on sub-Antarctic Marion Island. *Polar Biology*, 31(5), 651–655.
- Clark, C.G.** (1987). On the evolution of ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 25(4), 343–350.
- Coleman, A.W.** (2000). The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*, 151(1), 1–9.
- Coleman, A.W.** (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7), 370–375.
- Coleman, A.W.** (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3322–3329.
- Coleman, A.W.** (2009). Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 197–203.
- Coleman, A.W.** (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*, 31(3), 157–163.
- Coleman, A.W. ve Vacquier, V.D.** (2002). Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution*, 54(2), 246–257.

- Dasmahapatra, K.K. ve Mallet, J.** (2006). DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity*, 97, 254–255.
- De Queiroz, K.** (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A.W. ve Pröschold, T.** (2012). Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal of Phycology*, 47(3), 264–290
- Domazet-Lošo, T. ve Tautz, D.** (2008) An ancient evolutionary origin of genes associated with human genetic diseases. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 2699–2707.
- Ebach, M.C. ve Holdrege, C.** (2005). DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434, 697.
- Elder, J.F. ve Turner, B.J.** (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70(3), 297–320.
- Fišer Pečnikar, Ž. ve Buzan, E.V.** (2014). 20 years since the introduction of DNA barcoding: From theory to application. *Journal of Applied Genetics*, 55(1), 43–52.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Footitt, R.G. ve Adler, P.H.** (2009). *Insect Biodiversity: Science and Society*. (R. G. Footitt ve P. H. Adler, Eds.). Wiley-Blackwell.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. ve Vrijenhoek, R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 294–299.
- Frézal, L. ve Leblois, R.** (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727–736.
- Fuertes Aguilar, J., Rosselló, J. A. ve Nieto Feliner, G.** (1999). Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology*, 8(8), 1341–1346.
- Futuyma, D.J.** (2004). The fruit of the tree of life. In: Cracraft J, Donoghue MJ (Eds) *Assembling the Tree of Life*. *Oxford University Press*, New York, 25–39.
- Gauld, I. ve Bolton, B.** (1988). *The Hymenoptera*. (I. Gauld & B. Bolton, Eds.). *Oxford University Press*.

- Goulet, H. ve Huber, J.T.** (1993) Hymenoptera of the World: An identification guide to families. Agriculture Canada 1894E, 688 pp.
- Gregory, T.R.** (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 434, 1067.
- Hamels, J., Gala, L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammateo, N. ve Remacle, J.** (2001) Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques*, 31, 1364–1372.
- Harpke, D. ve Peterson, A.** (2006). Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 579–593.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L. ve deWaard, J.R.** (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. ve deWaard, J.R.** (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270, S96–S99.
- Hebert, P.D.N. ve Gregory, T.R.** (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 852–859.
- Hegewald, E., Wolf, M., Keller, A., Friedl, T. ve Krienitz, L.** (2010). ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia*, 49(4), 325–335.
- Hulcr, J., Miller, S.E., Setliff, G.P., Darrow, K., Mueller, N.D., Hebert, P.D.N. ve Weiblen, G.D.** (2007). DNA barcoding confirms polyphagy in a generalist moth, *Homona mermerodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Mol. Ecol. Notes*, 7, 549–557.
- Hunter, R.L., LaJeunesse, T.C. ve Santos, S.R.** (2007) Structure and evolution of the rDNA internal transcribed spacer (ITS) region 2 in the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *J Phycol*, 43: 120–128.
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M.** (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272: 1525–1534.
- Jarman, S.N. ve Elliott, N.G.** (2000). DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspidae, ‘living fossils’ from the Triassic. *J. Evol. Biol.*, 13, 624–633.

- Ji, Y., Zhang, D. ve He, L.** (2003) Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Mol. Ecol.*, Notes 3: 581-585.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T.** (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.*, 30, 3059–3066.
- Keller, A., Schleicher, T., Schultz, J., Müller, T., Dandekar, T. ve Wolf, M.** (2009). 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 430(1-2), 50–57.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Klopfstein, S., Vilhelmsen, L., Heraty, J. M., Sharkey, M. ve Ronquist, F.** (2013). The Hymenopteran Tree of Life: Evidence from Protein-Coding Genes and Objectively Aligned Ribosomal Data. *PLoS ONE*, 8(8), 1–23.
- Knowlton, N., Weigt L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E.** (1993) Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260, 1629–1632.
- Krienitz, L., Bock, C., Dadheech, P. K. ve Pröschold, T.** (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia*, 50(1), 89–106.
- Krishna Krishnamurthy, P. ve Francis, R. A.** (2012). A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*, 21(8), 1901–1919.
- Kvist, S.** (2013). Barcoding in the dark: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69:39–45.
- Lafontaine, D.L. ve Tollervey, D.** (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2: 514-520.
- Larena, I., Salazar, O., González, V. ve Julián, M.C.** (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75, 187–194.
- Li, Y., Zhou, X., Feng, G., Hu, H., Niu, L., Hebert, P. D. N. ve Huang, D.** (2010). COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources*, 10(1), 31–40.

- Lim, J., Kim, S.Y., Kim, S., Eo, H.S., Kim, C.B., Paek, W.K., Kim, W. ve Bhak, J.** (2009). BioBarcode: a general DNA barcoding database and server platform for Asian biodiversity resources. *BMC Genomics*, 10(Suppl 3):S8.
- Lopez, J.V. ve ark.** (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.*, 39, 174–190.
- Lynch, M. ve Jarrell, P.E.** (1993). A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 135(4), 1197–208.
- Mai, J.C. ve Coleman, A.W.** (1997). The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*, 44(3), 258–271.
- Malm, T. ve Nyman, T.** (2015). Cladistics Phylogeny of the symphytan grade of Hymenoptera : new pieces into the old jigsaw (fly) puzzle. *Cladistics*, 31, 1–17.
- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Luca, M.Di ve Severini, C.** (1999). Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Molecular Biology*, 8(4), 469–480.
- May, R.M.** (2011). Why worry about how many species and their loss *PLoS Biology*, 9(8), 8–9.
- McDowell, D.G., Burns, N.A. ve Parkes, H.C.** (1998). Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research*, 26(14), 3340–3347.
- MCNeely, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A., Werner, T.B.** (1990). Conserving the World's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.
- Mirela A., Rosalia A.H., Anne, C. ve Holger H.** (2003) .Hoos: RNAsoft: a suite of RNA secondary structure prediction and design software tools. *Nucleic Acids Research*, 31 (13): 3416-3422.
- Mitchell, A.** (2015). Collecting in collections: a PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. *Molecular Ecology Resources*, 15(5):1102-11.
- Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J. ve Wolf, M.** (2007). Distinguishing species. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(9), 1469–1472.
- Nanney, D.L.** (1982). Genes and phenes in Tetrahymena. *Bioscience*, 32, 783–788.
- Nazar, R.N.** (1980). A 5.8 S rRNA-like sequence in prokaryotic 23 S rRNA. *FEBS Letters*, 119(2), 212–214.

- Nazar, R.N.** (2004). Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life*, 56(8), 457–465.
- Pace, N.R.** (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734–740.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C. ve Hanner, R.** (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9(Suppl. 1), 42–50.
- Pino-Bodas, R., Martin, M.P., Burgaz, A.R. ve Lumbsch, H.T.** (2013). Species delimitation in *Cladonia* (Ascomycota): a challenge to the DNA barcoding philosophy. *Mol Ecol Resour*, 13(6):1058-68.
- Prous, M., Heidema, M., Shinohara, A. ve Soon, V.** (2011). Review of the sawfly genus *Empria* (Hymenoptera, Tenthredinidae) in Japan. *ZooKeys*, 150, 347–380.
- Rainer S., Arne, W. ve Diethard, T.** (2007) An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *BioMed Central*, 16;4:6.
- Rampersad, S.N.** (2014). ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* species complex. *SpringerPlus*, 3(1), 684.
- Ronquist, F., Klopfstein, S., Vilhelmsen, L., Schulmeister, S., Murray, D.L. ve Rasnitsyn, A.P.** (2012). A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the hymenoptera. *Systematic Biology*, 61(6), 973–999.
- Rot, C., Goldfarb, I., Ilan, M. ve Huchon, D.** (2006). Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria. *BMC Evol. Biol.* 6 (71).
- Ruhl, M.W., Wolf, M. ve Jenkins, T. M.** (2010). Compensatory base changes illuminate morphologically difficult taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 664–669.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R. ve Wall, D.H.** (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5459), 1770–1774.
- Schindel, D.E. ve Miller, S.E.** (2005) DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435: 17.
- Schulmeister, S.** (2003). Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): Introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(2), 245–275.

- Schulmeister, S., Wheeler, W. C. ve Carpenter, J. M.** (2002). Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics*, 18(5), 455–484.
- Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Müller, T. ve Wolf, M.** (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(4), 361–364.
- Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P.N., Dandekar, T. ve Wolf, M.** (2006). The internal transcribed spacer 2 database-a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucl. Acids Res.*, 34, W704–W707.
- Seena, S., Pascoal, C., Marvanová, L. ve Cássio, F.** (2010). DNA barcoding of fungi: A case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity*, 44, 77–87.
- Seibel, P.N., Müller, T., Dandekar, T. ve Wolf, M.** (2008). Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Research Notes*, 1(1), 91.
- Selig, C., Wolf, M., Muller, T., Dandekar, T. ve Schultz, J.** (2008) The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. *Nucleic Acids Res.*, 36 (Database issue) : D377–D380.
- Serra, M.J. ve Turner, D.H.** (1995). Predicting thermodynamic properties of RNA. *Methods Enzymol.*, 259: 242-261.
- Sharkey, M.J.** (2007). Phylogeny and classification of hymenoptera. *Zootaxa*, 548(1668), 521–548.
- Sharkey, M.J., Carpenter, J.M., Vilhelmsen, L., Heraty, J., Liljeblad, J., Dowling, A.P. G. ve Wheeler, W.C.** (2012). Phylogenetic relationships among superfamilies of Hymenoptera. *Cladistics*, 28(1), 80–112.
- Shearer, T.L. ve Coffroth, M.A.** (2008). DNA Barcoding: Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 247–55.
- Smith, C., Heyne, S., Richter, A.S., Will, S. ve Backofen, R.** (2010). Freiburg RNA Tools: a web server integrating INTARNA, EXPARNA and LOCARNA. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W373–W377.
- Smith, M.A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E.S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B. L., Gibbs, J., ve ark.** (2012). Wolbachia and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems, *Plos One*, 7 (5)
- Sonnenberg, R., Nolte, A.W. ve Tautz, D.** (2007). An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification, *Frontiers in Zoology*, 4:6

- Springer, M.S. ve Murphy, W.J.** (2007). Mammalian evolution and biomedicine: new views from phylogeny. *Biological Reviews*, 82, 375–392.
- Srůtka, P., Pazoutová, S. ve Kolarík, M.** (2007). *Daldinia decipiens* and *Entonaema cinnabarina* as fungal symbionts of Xiphydria wood wasps. *Mycological Research*, 111(Pt 2), 224–31.
- Stork, N.E.** (1988). Insect diversity: facts, fiction and speculation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 35(January), 321–337.
- Stork, N.E.** (1993). How Many Species Are There. *Biodiversity and Conservation*, 2(3), 215–232.
- Strugnell, J.M. ve Lindgren, A.R.** (2007). A barcode of life database for the Cephalopoda Considerations and concerns. *Rev. Fish Biol. Fish.* 17, 337–344.
- Taeger, A., Blank, S.M. ve Liston, A.D.** (2010). World catalog of symphyta (Hymenoptera). *Zootaxa*, 1064(2580), 1–1064.
- Thalmann, O., Hebler, J., Poinar, N., P'a'abo S. ve Vigilant, L.** (2004). Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Mol. Ecol.*, 13:321–35.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. ve Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Valentini, A., Pompanon, F. ve Taberlet, P.** (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110–117.
- Vilhelmsen, L.** (2015). Morphological phylogenetics of the Tenthredinidae (Insecta : Hymenoptera). *Invertebrate Systematics*, 29(2), 164.
- Wang, X.C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.H. ve Li, J.Q.** (2014). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources*, 15(3):573-86.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. ve Hebert, P.D.N.** (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 1716, 11.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Swinsky J, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, CA: *Academic Press*, 315–322.
- Wiemers, M. ve Fiedler, K.** (2007). Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4(February), 8.

- Woese, C.R. ve Fox, G.E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–90.
- Wolf, M., Achtziger, M., Schultz, J., Dandekar, T. ve Müller, T.** (2005a). Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *RNA* 11: 1616–1623.
- Wolf, M., Friedrich, J., Dandekar, T. ve Müller, T.** (2005b): CBCAnalyzer: inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures. *In Silico Biology* 5: 0027.
- Wolf, M.** (2015). ITS so much more. *Trends in Genetics*, 31(4), 175–176.
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., Ankenbrand, M. ve Müller, T.** (2013). Compensatory Base Changes in ITS2 Secondary Structures Correlate with the Biological Species Concept Despite Intragenomic Variability in ITS2 Sequences - A Proof of Concept. *PLoS ONE*, 8(6), 1–5.
- Wolf, M., Ruderisch, B., Dandekar, T., Schultz, J. ve Müller, T.** (2008). ProfDistS: (profile-) distance based phylogeny on sequence - Structure alignments. *Bioinformatics*, 24(20), 2401–2402.
- Wright, A.** (1990). British Sawflies (Hymenoptera: Symphyta): a key to adults of the genera occurring in Britain. Field Studies Council.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y. ve Chen, S.** (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, 5(10).
- Zhang, D.X. ve Hewitt, G.M.** (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.*, 25: 99–120.
- Zhang, W., Yuan, Y., Yang, S., Huang, J. ve Huang, L.** (2015). ITS2 Secondary Structure Improves Discrimination between Medicinal “Mu Tong” Species when Using DNA Barcoding. *Plos One*, 10(7), e0131185.
- Zhelokhovtsev, A.H.** (1994): Order Hymenoptera. Suborder Symphyta (Chalastogastra). In: G.S Medvedev. (ed.), Keys to the Insects of the European Part of the USSR. Hymenoptera, Part 6. Symphyta. E. J. Brill Academic Publisher, Leiden: 1– 432 (English translation printed in 1994).
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Murat GÜLER
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara, 16.12.1989
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	muratgmbg@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Aydınlıkevler İnönü Lisesi, 2004-2007
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2007-2011 Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Projeler

1. Nükleer faktör kappa B1 ve B1A genleri ile ateroskleroz arasındaki ilişkinin araştırılması (Lisans Bitirme Ödevi, 2009-2011)
2. Symphyta (Hymenoptera: Insecta) Üyelerinde Çekirdek Ribozomal DNA (çrDNA) ITS2 Bölgesinin Araştırılması, (Yüksek Lisans Tez Projesi, 2013 - 2015, CÜBAP F-393 no'lu Proje)
3. Barkodlamada İkili Belirteç (COI ve ITS2) Sisteminin Bazı Hemimetabol ve Holometabol Böceklerde Araştırılması, TUBİTAK (113Z753), (2014 - devam etmekte, Bursiyer)

İş Tecrübesi

Akuvatur Su Ürünleri A.Ş. Araştırma-Geliştirme Sorumlusu 2011-2012

Kongreler ve Bildiriler

1. II. Taksonomi Yaz Okulu Temmuz-2013 İzmir
2. Güler M., Budak M., Anadolu *Cephus pygmeus* (Hymenoptera: Symphyta:

Cephidae) Populasyonlarında Yüksekliğe Bağlı Coğrafik Yapılanma, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (Sözlü bildiri)

3. Budak M., **Güler M.**, Tokgöz F., Hastaoğlu Örgen S., Korkmaz E.M., Başibüyük H.H. - Identification of Tenthredopsis (Hymenoptera: Symphyta) species based on predicted ITS2 secondary structure, The second Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 6-7 Ağustos 2015, ODTÜ, Ankara (Poster sunumu)