

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**TÜRKİYE PİMELIA FABRICIUS, 1775
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) TÜRLERİNİN
SİTOGENETİĞİ VE DNA BARKODLAMASI**

Dirim ŞENDOĞAN

Danışman : Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Doktora Programı

İzmir

2023

Dirim ŞENDOĞAN tarafından doktora tezi olarak sunulan “Türkiye *Pimelia* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Tenebrionidae) Türlerinin Sitogenetiği ve DNA Barkodlaması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:		
Raportör Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Türkiye *Pimelia* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Tenebrionidae) Türlerinin Sitogenetiği ve DNA Barkodlaması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET

**TÜRKİYE PİMELİA FABRİCIUS, 1775 (COLEOPTERA:
TENEBRIONIDAE) TÜRLERİNİN SİTOGENETİĞİ VE DNA
BARKODLAMASI**

ŞENDOĞAN, Dirim

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN

Ocak 2023, 110 sayfa

Bu tez çalışmasında Türkiye'nin çeşitli lokalitelerinden toplanan *Pimelia* cinsine dahil 18 popülasyonda sitogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Ergin erkek bireylerin gonadlarından elde edilen, Rutin Giemsa, gümüş nitrat ve floresan DAPI uygulamaları yapılan her bireyde, diploid sayı Xy_p cinsiyet belirleme sistemiyle beraber $2n=18 (8+Xy_p)$ olarak belirlenmiştir. Kromozomlar üzerindeki heterokromatin dağılımları her üç boyama tekniğiyle de incelendiğinde, genellikle perisentromerik bölgelerde yoğunlaşmış olarak gözlenmiştir. Ancak diferansiyel boyalar DAPI ve gümüş nitrat ile işaretlenmiş bazı popülasyonların kromozom setlerinde, belirli noktalarda daha yoğun sinyal veren noktalar belirlenmiştir. NOR bölgelerinin işaretlenmesi için gümüş nitrat uygulanan profaz I nukleuslarında, popülasyonların büyük bir çoğunda bir adet belirgin olası NOR belirlenmiştir. Sitogenetik analizleri yapılan Burdur_Pim3, P.timarchoides_Sivas1(1690m) ve P.s.polita_Bozdağ3 bireylerinde ekstrakromozomal yapılar olan B kromozomlarının varlığı belirlenmiştir.

Anadolu'da dağılışı gösteren *Camphonota* alt cinsine dahil olan *Pimelia* örneklerinin filogenetik analizleri 829 bp uzunluğundaki mitokondriyal COI gen bölgesi (3' mt-COI) kullanarak gerçekleştirilmiştir. Uygun substitüsyon modelleri altında tür sınırlarının belirlenebilmesi için gerçekleştirilen Bayesian analizler *Camphonota* alt cinsini 13 taksona ayırmıştır. *Camphonota*'nın, veri setindeki diğer alt cinslerden yaklaşık 37-38 My önce ayrıldığı görülmüştür. Bu durum önceden hesaplanan alt cinslerin ayrılma noktasının daha geride olabileceğini

göstermiştir. *Camphonota* alt cinsini oluşturan klad da kendi içinde de 2 ana soy hattına ayrılmıştır. Elde edilen 91 adet *Pimelia*-COI dizisi “Genus *Pimelia* diversity [PIMEU]” isimli proje oluşturularak BOLD sistemine aktarılmıştır.

Ayrıca tür tayinlerinde yaygın olarak kullanılan aedeagus yapılarının genel morfolojileri incelenmiş ve ileride gerçekleştirilecek olan tür tanımlarında kullanılmak üzere fotoğraflanmışlardır.

Sonuç olarak Türkiye’de dağılışı gösteren *Pimelia* cinsine ait ilk sitogenetik veriler elde edilmiş ve mtCOI gen bölgesi kullanılarak cinse ait filogenetik çıkarsamalar gerçekleştirilmiştir. Türkiye’de dağılışı gösteren *Pimelia* taksonlarının kesin tür tanımlarının yapılabilmesi için elde edilen morfolojik, sitogenetik ve moleküler verilerin bir arada değerlendirilecektir.

Anahtar sözcükler: Tenebrionidae, *Pimelia*, *Camphonota*, kromozom, DAPI, barkodlama, COI

ABSTRACT
CYTOGENETICS AND DNA BARCODING OF PIMELIA
FABRICIUS, 1775 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) SPECIES
FROM TURKEY

ŞENDOĞAN, Dirim

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN

January 2023, 110 pages

In this study, cytogenetic analyzes were carried out on 18 populations of the genus *Pimelia* collected from various locations in Turkey. Preparations obtained from the adult male gonads stained with routine Giemsa, silver nitrate and fluorescent DAPI revealed the diploid number was determined as $2n=18$ (8+Xyp) with the Xyp sex determination system in each individual. The heterochromatin distribution was determined to be concentrated in the pericentromeric regions with all three staining techniques. However the chromosome sets of some populations labeled with the differential dyes DAPI and silver nitrate gave more intense signals at certain points. One distinct probable NOR was identified in the majority of populations in prophase I nuclei treated with silver nitrate which marks NOR regions. The presence of B chromosomes, which are extrachromosomal structures, was determined in Burdur_Pim3, *P.timarchoides*_Sivas1(1690m) and *P.s.polita*_Bozdağ3 individuals.

Phylogenetic analyses of *Pimelia* samples distributed in Anatolia belonging to the subgenus *Camphonota*, were carried out using the 829 bp long mitochondrial COI gene region (3' mt-COI). Bayesian analyses carried out to determine species boundaries under appropriate substitution models divided the *Camphonota* subgenus into 13 taxa. It was determined that *Camphonota* diverged from other subgenus in the dataset approximately 37-38 Ma ago. This showed the previously calculated subspecies separation point may be further behind. The clade constituting the subgenus *Camphonota* is also divided into 2 main lineages

within itself. The obtained 91 *Pimelia*-COI sequences were transferred to the BOLD system by the project name “Genus *Pimelia* diversity [PIMEU]”.

In addition, the general morphologies of aedeagus structures, which are widely used in species identifications, were examined and photographed for the use of future species descriptions.

As a result, the first cytogenetic data of the genus *Pimelia* distributed in Turkey were obtained and phylogenetic relations were determined by using the mtCOI gene region. The morphological, cytogenetic and molecular data obtained in this study will be evaluated together in order to make precise species determinations of the *Pimelia* genus distributed in Turkey.

Keywords: Tenebrionidae, *Pimelia*, *Camphonota*, chromosome, DAPI, barcoding, COI

ÖNSÖZ

Türkiye biyoçeşitlilik açısından dünyada oldukça önemli bir yere sahiptir. Tenebrionidae ailesi açısından ele alındığında da son yıllarda tanımlanan yeni türler ve kayıtlar, Türkiye’deki böcek biyoçeşitliliğinin bilinenden daha fazla olabileceğini göstermektedir. Ülkemize endemik ve subendemik olan, uçamayan böcek gruplarının moleküler sistematik çalışmaları; biyoçeşitliliğin tarihsel, jeolojik ve iklimsel olaylar çerçevesinde yorumlanmasına katkı sağlamaktadır. Tenebrionidae grubu içerisinde model organizma olarak kullanılan türlerin sayısı giderek artarken, belli bir coğrafyaya uyum sağlamış organizmaların da model olarak kullanılabilme durumları araştırılmalıdır.

Bu açıdan ele alınarak, Türkiye’ye endemik ve subendemik türler içeren *Pimelia* cinsinin *Camphonota* alt cinsi model olarak seçilmiştir. Biyoçeşitliliğin genetik temelli kaynaklarını ortaya çıkartabilmek için grubun filogenisi, moleküler ve sitogenetik belirteçlerle test edilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda Türkiye genelinde dağılışı gösteren türlerin toplanması için düzenlenen arazi çalışmalarıyla, *Pimelia* faunasıyla ilgili bilgiler gözden geçirilmiş ve gruba ait DNA koleksiyonu oluşturulmuştur. DNA barkodlama yöntemi ile tür sınırları belirlenirken, bu bulgular morfolojik ve sitogenetik verilerle bir arada değerlendirilmiştir.

İZMİR

.../.../20..

Dirim ŞENDOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1 Arazi Çalışmaları ve Türlerin Temini.....	13
3.2 Sitogenetik Analizler.....	17
3.2 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve COI Gen Bölgesinin Çoğaltılması.....	18
3.3 Veri Setinin Oluşturulması.....	21
3.4 Filogenetik Analizler.....	24
3.4.1 Tür sınırlarının belirlenmesi.....	25
4 BULGULAR.....	28
4.1 Türlerin Tayini, Genel Morfoloji ve Aedeagus Yapıları.....	28
4.2 Kromozom Morfolojileri ve Sayısı.....	33
4.3 Cinsiyet Belirleme Sistemleri.....	37
4.4 Heterokromatin Dağılımları.....	45
4.5 NOR Bölgeleri.....	51
4.6 B Kromozomları.....	56
4.7 Filogenetik Analizler.....	59
4.7.1 Tür sınırlarının belirlenmesi.....	61
4.7.2 Moleküler saat analizleri /zaman ağaçları.....	68
5 SONUÇ VE TARTIŞMA.....	76

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	93
TEŞEKKÜR.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	110
EKLER.....	



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

2.1 NCBI veri tabanında COI geninin 5' ve 3' kısımlarına denk gelen dizilerin konumları.....	10
3.1. Tez çalışmasının laboratuvar aşamasını gösteren yol şeması.....	11
3.2. Tez çalışmasının biyoenformatik uygulamalarını gösteren yol şeması.....	12
3.3. Pimelia türlerinin örnekleme noktaları (kırmızı: Pimelia akbesiana akbesiana*, beyaz: Pimelia lendli, sarı: Pimelia subglobosa polita, siyah: Pimelia s. salaria, mor: Pimelia s. verruculifera, turuncu: Pimelia timarchoides, yeşil: Pimelia sp., mavi: Pimelia bajula solieri (Hatay), Pimelia cursor (İğdır) (*Aedeagus yapısına göre bu bireylerin P. a. akbesiana olmadığı belirlenmiştir). 14	14
3.4. Camphona alt cinsine dahil Pimelia örneklerinin aedeagus yapılarının şematik görünümü A-dorsal ve B-ventral.....	16
3.5. JerryTen-PatTen primerleri kullanarak, COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.....	20
3.6 JerryTen-PatTen primerleri kullanarak, erime sıcaklığı ve MgCl ₂ miktarı modifikasyonları ile COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.....	21
3.7 Jerry-Pat primerleri kullanarak, COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.....	21
3.8. P. s. verruculifera örneğine ait COI dizisinin BLAST programı ile karşılaştırılması.....	22
3.9. BLAST programı ile NCBI veri tabanındaki Pimelia COI dizilerinin Tribolium castaneum mitokondrial genomu ile karşılaştırılması.....	23
3.10. COI gen bölgesinin Mesquite programıyla elde edilmiş olan amino asit ifadeleri ('SGNF' olarak biten P. s. salaria örnekleri 46.-52. diziler arasında görülebilmektedir).....	24
4.1 ZDEU-Ent koleksiyonunda bulunan türler a) Pimelia akbesiana, b) Pimelia bajula, c) Pimelia polita, d) Pimelia salaria, e) Pimelia sublobosa, f) Pimelia testudo, g) Pimelia verruculifera (Bar = 5mm).....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.2	Pimelia örneklerinin aedeagus yapılarının ventral görünümü, a) P.s.verruculifera_Davraz1, b) P.s.verruculifera_Çamiçi1, c) Burdur_Pim3, d) P.polita_Bozdağ2, e) P.s.verruculifera_Babadağ2, f) P.s.verruculifera_Çanakkale2, g) Amasya_Pim4 h)Küçükşapçı_Pim2, i) P.timarchoides_Sivas1(1690m), j) P.s.salaria_Güre1, k) P.timarchoides_Sivas1(1830m), l) Bolkar_Pim1, m) P.timarchoides_Mazıkıran4, n) Meke_Pim9, o) Berendi_Pim1, p) Şeyhşaban_Pim1, (Bar = 5mm).....	32
4.3	Mitotik metafaz setleri a) P.s.verruculifera_Davraz1 b) P.s.verruculifera_Davraz2* c) Burdur_Pim3 +B kromozomu d) P.s.verruculifera_Babadağ2 e) Amasya_Pim5 f) P.timarchoides_Sivas1(1830m) g) P.timarchoides_Mazıkıran3 h) Berendi_Pim1 i) Bolkar_Pim1 j) Meke_Pim7 (siyah ok ve yıldız: y kromozomu, kırmızı yıldız: y ve B kromozomları, Bar = 5µm).....	34
4.4	Mitotik metafaz setleri a) P.s.polita_Bozddag2 b) P.s.verruculifera_Çanakkale3 c) Küçükşapçı3_Pim d) Güre_Pim1 e) P.s.salaria_Güre1 f) P.lendli_Kayseri3 (1960m) g) Şeyhşaban_Pim1 (siyah ok y: kromozomu, Bar = 5µm).....	35
4.5	a) P.cursor_Iğdır4 ve b) P.b.solieri_Hatay2 bireylerinin mitotik metafaz setleri (siyah ok: y kromozomu, Bar=5µm).....	36
4.6.	a) P.s.verruculifera_Babadağ2, b) Meke_Pim7, c) P.lendli_Kayseri3 (1960m) bireylerinin karyotipleri (Bar=5µm).....	36
4.7.	a) Amasya_Pim4 ve b) P.s.verruculifera_Çanakkale7 bireylerinin DAPI ile boyanmış mitotik metafaz setleri (beyaz ok: y kromozomu Bar=5µm).....	37
4.8.	Xyp cinsiyet kromozomlarının gözlendiği Giemsa boyalı metafaz 1 setleri a) P.s.verruculifera_Davra1 b) P.s.verruculifera_Davra2 c) Burdur_Pim3 +B kromozomu d) Amasya_Pim 5 e) P.s.verruculifera_Babadağ2 f) P.timarchoides_Sivas1 (1830m) g) P.s.verruculifera_Çamiçi1 h)P.s.polita_Bozdağ2 (siyah ok: y kromozomu, kırmızı yıldız: B kromozomu, Bar=5µm).....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

- 4.9. Xyp cinsiyet kromozomlarının gözlendiği Giemsa boyalı metafaz 1 setleri a) Küçükşapçı_Pim2 b) Güre_Pim1 c) P.s.salaria_Güre1 d) Bolkar_Pim1 e) P.lendli_Kayseri3 (1960m) f) Şeyhşaban_Pim1 g) P.cursor_Iğdır4 h) P.b.solieri_Hatay2 (siyah ok: y kromozomu, Bar=5µm).....39
- 4.10. Xyp cinsiyet kromozomlarının gözlendiği DAPI işaretli Metafaz 1 setleri a) Amasya_Pim4 b) P.timarchoides_Mazıkıran4 c) Berendi_Pim5 d) P.s.verruculifera_Çamiçi3 (beyaz ok: y kromozomu, Bar=5µm).....40
- 4.11. Xyp cinsiyet kromozomlarının gözlendiği DAPI işaretli Metafaz 1 setleri a) P.lendli_Kayseri2 b) P.s.verruculifera_Çanakkale7 c) Küçükşapçı_Pim3 d) Meke_Pim10 e) P.s.polita_Bozdağ11 (beyaz ok: y kromozomu, Bar a-d=5µm, Bar e=5µm).....41
- 4.12. y kromozomu taşıyan metafaz II setlerinde Geimsa boyama a) P.s.verruculifera_Davraz2* b) Amasya_Pim5 c) P.timarchoides_Sivas1(1839m) d) P.s.verruculifera_Çamiçi4 e) P.s.verruculifera_Çanakkale2 f) Meke_Pim7 (siyah ok: y kromozomu, Bar =5µm).....42
- 4.13. X kromozomu taşıyan metafaz II setlerinde Geimsa boyama a) P.s.verruculifera_Davraz1 b) Berendi_Pim1 c) Küçükşapçı_Pim2 d) P.s.salaria_Güre1 e) P.lendli_Kayseri3 f) Şeyhşaban_Pim1 (Bar =5µm).....43
- 4.14. Gümüş nitrat ile boyanmış metafaz II setleri a) P.s.verruculifera_Davraz2* b) P.s.verruculifera_Babadağ6 c) P.timarchoides_Sivas1 (1690m) +B kromozomu, d) P.timarchoides_Mazıkıran3 e) P.s.verruculifera_Çanakkale5 f) Güre_Pim1 (siyah ok: y kromozomu, Bar =5µm).....44
- 4.15. Floresan DAPI ile işaretlenmiş metafaz II setleri a) P.s.verruculifera_Davraz1 b) Amasya_Pim4 c) P.s.verruculifera_Çanakkale7 d) Küçükşapçı_Pim3 (beyaz ok: y kromozomu, Bar =5µm; b-d aynı büyütmededir). 45
- 4.16. Küçük boyutlu y kromozomu görülemediği için n=8 gibi görünen metafaz II setleri a) P.s.verruculifera_Babadağ2 b)P.b.solieri_Hatay2.....45

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.17. Leptoten (profaz I) evresinde Giemsa boyama uygulaması a) P.s.verruculifera_Davraz1 b) Burdur_Pim c) P.s.verruculifera_Babadağ2 d) Amasya_Pim5 e) P.timarchoides_Sivas1(1830m) f) P.b.solieri_Hatay2 (Bar 5µm).	46
4.18. Pakiten (profaz I) evresinde Giemsa boyama a) P.s.verruculifera_Davraz1 b) P.s.verruculifera_Davraz2* c) Burdur_Pim3 d) P.timarchoides_Sivas1(1830m) (Bar 5µm).....	47
4.19. Pakiten (profaz I) evresinde Giemsa boyama a) P.s.polita_Bozdağ2 b) P.s.verruculifera_Çanakkale2 c) Küçükşapçı_Pim2 d) Bolkar_Pim2 e) Şeyhşaban_Pim1 f) P.cursor_Iğdır4 (Bar 5µm).....	48
4.20. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a) P.s.verruculifera_Davraz1 ve b) P.s.polita_Bozdağ8 (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri, Bar 5µm).....	49
4.21. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a-b) Amasya_Pim4 ve c-d) P.s.verruculifera_Çanakkale7 (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri, Bar 5µm)...	49
4.22. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a) P.timarchoides_Mazıkıran4 b) Berendi_Pim5 c) P.s.verruculifera_Çamiçi3 d) Küçükşapçı_Pim3 e) Meke_Pim10 f) P.lendli2 (2235m) (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri,Bar 5µm).....	50
4.23. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) P.s.verruculifera_Davraz2* b) Burdur_Pim3 c) P.s.verruculifera_Babadağ6 d) P.timarchoides_Sivas1 (1690m) (siyah ok: Xyp bivalenti, Bar 5µm).....	51
4.24. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) P.timarchoides_Mazıkıran3 b) P.s.verruculifera_Çamiçi6 c) P.s.polita_Bozdağ3 +B kromozomu d) P.s.verruculifera_Çanakkale5 (siyah ok: Xyp bivalenti, Bar 5µm).....	52
4.25. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) Güre_Pim1 b) P.s.salaria_Güre3 c) Meke_Pim9 d) P.lendli5(1960m) e) P.cursor_Iğdır6 f) P.b.solieri_Hatay2 (siyah ok: Xyp bivalenti, Bar 5µm).....	53
4.26. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a - b) P.s.verruculifera_Babadağ6 c-d) Güre_Pim1 e-f) P.s.polita_Bozdağ3 g-h) .P.timarchoides_Sivas1(1690m) (siyah ok: olası NOR bölgesi, yıldız: telomerik heterokromatin, Bar 5µm).....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.27. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) P.s.verruculifera_Davraz2* b) P.timarchoides_Mazıkıran3 c) P.lendli_Kayseri5 (1960m) d) P.b.solieri_Hatay2 (siyah ok: olası NOR bölgesi, Bar 5µm).....	55
4.28. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) Burdur_Pim3 b) Berendi_Pim4 c) P.s.verruculifera_Çamiçi6 d) P.s.verruculifera_Çanakkale5 e) Meke_Pim9 f) P.cursor_Iğdır6 (siyah ok: olası NOR bölgesi, Bar 5µm).....	56
4.29. Burdur_Pim3 bireyinde rutin Giemsa boyamasında B kromozomları a) mitotik metafaz, b) metafaz I, c) metafaz II evreleri (kırmızı ok: B kromozomu, yeşil ok: y kromozomu, siyah ok: Xyp, Bar = 5µm).....	57
4.30. P.timarchoides_Sivas1(1690m) bireyinde gümüş nitrat uygulamasında B kromozomları a) mitotik metafaz, b) metafaz II, c-d) metafaz I (kırmızı ok: B kromozomu, Bar = 5µm).....	58
4.31. P.s.polita_Bozdağ3 bireyinde gümüş nitrat uygulamasında B kromozomları a-b) metafaz I (kırmızı ok: B kromozomu, Bar = 5µm).....	58
4.32. SplitsTree programında çizdirilen Pimelia örneklerinin haplotip ağacı.....	60
4.33. Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin ABGD analizine göre belirlenen tür gruplandırmaları.....	62
4.34. Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin ASAP analizine göre belirlenen tür sınırları.....	63
4.35. Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin GMYC analizine göre belirlenen tür sınırları.....	64
4.36. COI gen dizilerinin HKY ve GTR modelleri altında yürütülen GMYC analizlerinin sunduğu zaman-soyhattı grafikleri (Vertikal kırmızı çizgi türler arası dallanma olaylarından tür içi dallanma olaylarına geçişle ilgili eşik değerini temsil etmektedir).....	65
4.37. BOLD sistemindeki Pimelia cinsine ait verilerin özeti.....	66
4.38. BOLD sistemindeki Camphonota alt cinsine ait verilerin özeti.....	66
4.39. BOLD sistemine yüklenmiş olan P.s.salaria_Güre örneğinin barkod illüstrasyonları ve dizi bilgilerinin özeti.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

4.40. Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin GMYC analizinin sunmuş olduğu 13 MOTU'yu temsilen seçilen örneklerin barkod illüstrasyonları, (Her bir MOTU numarası ve temsil ettiği birey kodu, barkod illüstrasyonlarının üstünde, GMYC ağacındaki renklere göre belirtilmiştir).....	68
4.41. Türkiye Camphonota alt cinsine dahil Pimelia türlerine ait mitokondriyal COI gen bölgesi zaman ağacı, “Strict-clock” (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My ⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).....	71
4.42. Esnek saat hızı varsayımı altında majority rule consensus ağacının nod güven aralıkları (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My ⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).....	72
4.43. Esnek saat hızı varsayımı altında majority rule consensus ağacının posterior olasılık değerleri (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My ⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).....	73
4.44. Türkiye Camphonota alt cinsine dahil Pimelia türlerine ait mitokondriyal COI gen bölgesi zaman ağacı, “Relaxed Clock Log Normal” (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında moleküler divergens hızı % 2.39 My ⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).....	74
5.1 B kromozomu taşıyan birey (sol üstte belirtilmiş) ile aynı popülasyonda bulunan bireylerin barkod verilerinin karşılaştırılması.....	81
5.2 Camphonota altcinsine dahil Pimelia türlerinin A) mitokondriyal COI haplotiplerinin dağılımı, B) bölgesel haplotip dağılımı.....	85
5.3. Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin GMYC analizine göre 1. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri...	87
5.4 Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin GMYC analizine göre 8. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri...	88
5.5 Camphonota alt cinsine dahil Anadolu Pimelia örneklerinin GMYC analizine göre 10. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri.	90

TABLolar DİZİNİTabloSayfa

2.1. Türkiye’de bulunan Pimelia tür ve alt türleri (Löbl and Smetana, 2008; Nabozhenko et al., 2022).....	5
3.1. 2018-2021 yılları arasında toplanan Pimelia türleri ve lokaliteleri.....	15
3.2. Türkiye Pimelia türlerine ait COI gen bölgesine ait dizilerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri.....	19
3.3. Ultrametrik ağaçların R ortamında okunarak GMYC analizlerinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların çizdirilmesi için kullanılan kod.....	26
5.1. Ağaç ve uzaklık temelli yaklaşımlarla elde edilen tür sınırlandırmaları ve öneriler.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

µm	mikro metre
°C	Santigrad derece
AgNO ₃	Gümüş Nitrat

Kısaltmalar

NOR	Nukleolar Organizasyon Bölgesi
FISH	Fluoresan in situ Hibridizasyon
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
CMA3	Chromomycin A3
COI	Sitokrom oksidaz I
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MOYU	Molecular Operational Taxonomic Unit
GMYC	General Mixed Yule Coalescent
ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
ASAP	Assemble Species by Automatic Partitioning
HKY	Hasegawa–Kishino–Yano
GTR	Gran Turismo–Racing

BOLD	Barcode of Life Database
mtDNA	Mitokondrial DNA
rDNA	Ribozomal DNA
AIC	Akaike Information Criterion
BIC	Bayesian Information Criterion
ESS	Effective Sample Size
My	Milyon yıl

1 GİRİŞ

Dünyada geniş bir dağılış göstermesi ve yüksek tür çeşitliliğine sahip olması nedeniyle *Pimelia* Fabricius, 1775 cinsi, biyoçeşitliliğin kromozom ve DNA seviyesinde çalışılması için uygun bir model organizma olma potansiyeline sahiptir.

DNA barkodlama yöntemi ile türlerin tanımlanması ve evrimsel ilişkilerinin ortaya konmasıyla ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Barkod olarak belirlenen dizilerin kısa, evrensel primerlerle çoğaltılabilen korunmuş bölgeler olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra tür seviyesinde evrimsel süreçlerin anlaşılmasına uygun bir mutasyon hızına sahip olan bir gen bölgesinden seçilmelidirler. Bu bağlamda hayvan grupları içinde en yaygın kullanılan barkod bölgesi COI genine aittir. Morfolojik karakterlerin yeterli olmadığı veya eksik kaldığı yerde bu tipte moleküler belirteçler ile türlerin tanımlanması ve evrimsel ilişkilerinin ortaya konması mümkündür (Trivedi, et al., 2018).

Pimelia cinsi taksonomik olarak tartışmalı ve sürekli değişen bir gruptur. Palearktik Coleoptera Kataloğunda (Löbl and Smetana, 2008) 4 alt cins ayrılmıştır. Son zamanlarda yapılan, daha çok batı Akdeniz havzasında dağılış gösteren ve tanımlanmış *Pimelia* türlerinin %20'sini içine alan nispeten kapsamlı bir moleküler sistematik değerlendirme sonrasında grup 14 alt cins ayrılmıştır (Mas-Peinado et al., 2018). Ancak cinsin tamamını temsil etmeyen bu taksonomik ayırımın tüm taksonları içerecek bir moleküler değerlendirme ile desteklenmesi gerekmektedir. Özellikle *Camphonota* alt cinsinin sadece 2 türe ait 5 örnek üzerinden son derece homojen bir grup olarak değerlendirilmiş olması literatürde büyük bir boşluk yaratmaktadır. Bu nedenle alt cinsin türlerini içeren filogenetik çalışmalar önem kazanmaktadır.

Diğer taraftan, cins içinde çeşitli taksonların statü değişikliklerini ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Abdurakhmanov and Nabozhenko, 2011). Türkiye'de dağılış gösteren türlerin çoğunun *Camphonota* Solier, 1836 alt cinsine ait olduğunu ve ülkemize endemizm / subendemizm gösterdiğini söylemek mümkündür. Ancak son zamanlarda verilen yeni kayıtlar ve cins içi

düzenlenmeler Türkiye’den kaydı verilen tür sayısının hesaplanandan daha farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye *Pimelia* türlerinin sitogenetik özelliklerinin belirlenmesi ve DNA verilerinin filogenetik ve biyoinformatik yaklaşımlarla incelenmesi amaçlanmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda; çalışılacak olan *Pimelia* türlerinin, kromozom sayı ve cinsiyet belirleme sistemlerinin saptanması, grubun monofilisinin test edilmesi ve elde edilen DNA barkodları ile Türkiye *Pimelia* türlerine ait bir referans kütüphane oluşturulması hedeflenmektedir. DNA barkodlama yöntemi ile tür sınırları belirlenirken, bu bulgular morfolojik ve sitogenetik verilerle bir arada değerlendirilecektir.

2 GENEL BİLGİLER

Türkiye böcek biyoçeşitliliği açısından oldukça önemli bir merkezdir. Kın kanatlı böceklerin içinde bulunduğu Coleoptera takımı hayvan grupları içerisinde en kalabalık olanlardan biridir (Lira-Neto et al., 2012, Kergoat et al., 2014). Bu takımın 7. en kalabalık üyesi olan Tenebrionidae ailesi; dünyada 20.000 türle temsil edilmektedir (Lilig et al., 2012; Lira-Neto et al., 2012). Tenebrionidae ailesinin Türkiye’de dağılışı gösteren tür sayısı, 539 olarak kaydedilmiştir (Canpolat and Hasbenli, 2012). Ancak son dönemde tanımlanan yeni türler ve yeni kayıtlar (Keskin and Nabozhenko, 2012, 2015; Keskin et al. 2017a) Anadolu ve Trakya’da dağılışı gösteren tür sayısının bununla sınırlı olmadığını göstermektedir.

Un kutları olarak isimlendirilen Tenebrionidler; genellikle siyah-kahverengi renklenme gösteren, kurak ve yarı kurak alanlarda dağılışı gösteren ve gece aktif olan türlerdir. Genellikle saprofag beslenen türler olsalar da aile içerisinde önemli tarım zararlısı türler de bulunmaktadır (Matthews et al., 2010; Kergoat et al, 2014).

Tenebrionidae ailesinin bir üyesi olan *Pimelia* cinsi; dünya çapında Paleartik, Afrotropikal ve Indomalayan bölgelerde dağılışı gösterir (Bouchard et al., 2021). Yoğunlukla Akdeniz çevresinde dağılışı gösteren bu grup; uçamayan, saprofag ve kserofilik olan çok sayıda tür içermektedir (Contreras-Diaz et al., 2003; Bruvo-Madaric et al., 2007; Pons et al., 2004; Stroschio et al., 2011; Lopez et al., 2018). *Pimelia* türlerinin tarım zararlısı olduğuna dair bir bilgi olmasa da 2004 yılında yapılmış olan bir yüksek lisans tez çalışmasında, *Caretta caretta* (İribaş Deniz Kaplumbağası) yuvalarında *Pimelia* larvalarının yuvadaki yumurtalara zarar verdiği sunulmuştur (Katılmış, 2004).

Pimelia türlerinde genellikle kare-kalp şekilli mentum vardır. İlk antenomerleri uzun olan antenlerin distal segmentleri bir dereceye kadar küresel iken 10 ve 11. segmentleri koniktir. Vücut kompakt, baş ve protoraks elitrardan daha dardır. Labrum açıkta, pronotum kısa ve yanlarda kıvrımlıdır (Latreille, 1802; Cuvier & Latreille, 1834; Solier, 1836; Kraatz, 1865; Sénac, 1884). Vücut büyüklükleri ve elitra morfolojileri oldukça çeşitlilik gösterebilir (Pierre, 1985;

Soldati, 2009; Mas-Peinado et al., 2018). Genel olarak; elitra üzerinde 3 adet karina bulunmaktadır. Bunlar elitronların birleşim yerinden laterale doğru; dorsal, humoral ve lateral karina şeklinde isimlendirilirler. Karinalar arasında veya üzerinde irili ufaklı tüberküller, bu tüberküller arasında da mikro-oyuklar (microsculpture) bulunabilmektedir. Tanı anahtarlarında bu karakterlerin yanı sıra, bacaklar ve erkeklerdeki aedeagus yapıları da türlerin birbirlerinden ayrılmasında kullanılan özelliklerdir (Reitter, 1915; Kaszab, 1938).

Pimelia üyeleri; nokturnal veya diurnal davranışlar sergileyebildikleri gibi sahil şeridinden, dağlık alanlara olmak üzere oldukça farklı ekosistemlerde de bulunabilirler. Türlerin çoğunluğunda görülen, geçirgen olmayan, kalın kütikula; su kaybını indirmekle beraber, uçuşu engeller ve dolayısıyla yayılma potansiyelini de azaltır (Adhearn, 1970; Contreras-Diaz et al., 2003; Soldati, 2009; Lopez et al., 2018; Mas-Peinado et al., 2018).

Toplamda 14 alt cinse ayrılan *Pimelia*; Palearktik bölgede yaklaşık 308 tür/alt tür ile temsil edilmektedir (Löbl and Smetana, 2008; Lopez et al., 2018; Mas-Peinado et al., 2018). Oldukça fazla üyesi olan bu cinsin taksonomisi, yeni çalışmalarla sürekli yeniden düzenlenmekte, türlerle ilgili yeni lokalite kayıtları literatüre eklenmektedir (Abdurakhmanov and Nabozhenko, 2011; Mas-Peinado et al., 2018; Nabozhenko et al., 2022). Örneğin Türkiye'deki *Pimelia* türleri göz önünde bulundurulduğunda; Abdurakhmanov and Nabozhenko (2011)'ya göre, *Pimelia* cinsi altındaki çeşitli taksonomik kategorilerde yeniden diriltmeler gerçekleştirilmiştir. Buna göre; *Pimelia dubia syn. resurr*, *Pimelia cursor*'un sinonimi olarak yeniden diriltilirken, *P. dubia*'nın sinonimi kabul edilen *Pimelia persica spec. resurr*. ise tekrar tür statüsüne getirilmiştir.

Türkiye'den kaydı verilmiş olan 13 tür, 4 farklı alt cins altında bulunmaktadır. Bu 13 türden *Pimelia akbesiana* 2 alt tür, *Pimelia subglobosa* ise 3 alt tür ile temsil edilmektedir. Dolayısıyla ülkemizden cinse dair, 16 takson kaydı olduğunu söylemek mümkündür (Çizelge 2.1). Bu taksonların büyük bir çoğunluğu *Camphonota* alt cinsine dahil ve ülkemize endemiktir (Löbl and Smetana, 2008; Nabozhenko et al., 2022).

Çizelge 2.1. Türkiye’de bulunan *Pimelia* tür ve alt türleri (Löbl and Smetana, 2008; Nabozhenko et al., 2022)

Alt cins	Tür	Genel Dağılışı	
<i>Camphonota</i>	<i>Pimelia akbesiana akbesiana</i>	Suriye, Türkiye	Subendemik
	<i>Pimelia a. evanescence</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia anatolica</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia lendli</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia monikovae</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia repleta</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia subglobosa polita</i>	Bulgaristan, Yunanistan, Romanya, Türkiye (A+E)	Subendemik
	<i>Pimelia s. salaria</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia s. verruculifera</i>	Bulgaristan, Yunanistan, Makedonya, Türkiye(A+E)	Subendemik
	<i>Pimelia testudo</i>	Türkiye	Endemik
	<i>Pimelia timarchoides</i>	Türkiye	Endemik
<i>Chaetotoma</i>	<i>Pimelia cursor</i>	Azerbaycan, Ermenistan, İran, Türkiye	Subendemik
	<i>Pimelia persica</i>	Azerbaycan, Ermenistan, İran, Türkiye	Subendemik
<i>Pimelia</i>	<i>Pimelia bajula solieri</i>	Kıbrıs, İran, Türkiye	Subendemik
	<i>Pimelia robusta</i>	Ermenistan, Türkiye	Subendemik
<i>Amblyptera</i>	<i>Pimelia ventricosa</i>	Azerbaycan, İran, Türkiye	Subendemik

Tenebrionidae ailesine dahil ve sitogenetik olarak çalışılmış olan 250 türe göre; aile içinde diploid sayının 14 ila 38 arasında değişebildiği ve en yaygın görülen formülün $2n=20$ olduğunu belirlenmiştir (Juan and Petitpierre, 1991; Pons, 2004; Holecova et al., 2008; Lira-Neto et al., 2012; Blackmon et al., 2015).

Sitogenetik olarak çalışılmış olan 47 *Pimelia* türünde; yoğunlukla $2n=18$ ($8+X_{yp}$) formülü görülmekle beraber, $2n=18$ ($8+X_{yr}$) ve $2n=20$ ($9+X_{yp}$) formüllerine sahip olan türler de mevcuttur (Blackmon et al., 2015). *Pimelia* türlerinde diploid sayı ve cinsiyet belirleme sistemlerinin varyasyon göstermesi; kromozom evriminin daha iyi anlaşılması ve atasal diploid formülünün belirlenebilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Türkiye *Pimelia* türleriyle ilgili herhangi bir sitogenetik veri mevcut olmadığı gibi Türkiye Tenebrionidleriyle ilgili sitogenetik veriler de oldukça sınırlıdır (Gündoğan, 2015; Kaya, 2015; Şendoğan and Alpagut-Keskin, 2016; Şendoğan et al. 2019; Öğren et al., 2022; Çalışan and Alpagut Keskin, 2023). Aile içindeki farklı grupların çeşitlenme sürecinde kromozomal ve genomik varyasyonların, etkili ve doğru bir şekilde değerlendirilmesi için çalışmaların artırılması gereklidir.

DNA barkodlama; Hebert et al. (2003a) tarafından sunulmuş bir kavramdır. Bu yaklaşımda; DNA'daki korunmuş genlerin kısa dizileri (400-800 bp), DNA barkodları olarak kullanılır. DNA barkodlama yönteminde kısaca; dizinin amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, sekanslama ve sonrasında da veri tabanındaki barkodları oluşturulmuş örneklerle karşılaştırılması şeklinde bir yol izlenir (Trivedi et al., 2018). Morfoloji bazlı tür tanımlarında karşılaşılan bazı zorluklar ve sınırlamalar, araştırmacıların yeni yöntemler aramaya yönlendirmiştir. Bu durum; virüsler, bakteriler ve protistler (Nanney 1982; Pace 1997; Allander et al. 2001; Hamels et al. 2001) gibi morfolojik değerlendirmelerin daha zor olduğu gruplarda zaten geniş kabul görmeye başlamışken, aynı kavram diğer canlı gruplarında da önemli bir yer edinmeye başlamıştır (Hebert et al., 2003a).

DNA barkodlamanın genel kullanım alanları; morfolojik olarak benzeyen türleri birbirinden ayırarak, türlerin tanımlanması, grupların evrimsel ilişkileri ve biyoçeşitliliklerinin ortaya çıkartılmasının yanı sıra ekoloji ve koruma biyoloji olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca zirai koruma, çevre koruması, sağlık ve adli tıp alanlarında da DNA barkodlama kullanılmaktadır (Trivedi et al., 2018).

Bir gen bölgesinin DNA barkodu olarak kullanılabilmesi için; tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon göstermesi, evrensel primerlerle çoğaltılabilen kısa ve korunmuş bölgelere sahip olması, son olarak da insersiyon-delesyon (indel) bölgeleri içermemesi kriterleri aranır (Hebert et al., 2003a, Trivedi et al., 2018)).

Hayvanlardaki mitokondrial DNA (mtDNA); sirküler yapıda bir çift-sarmal moleküldür. 13 protein kodlayan gen, 2 ribozomal ve birkaç tane de tRNA geni içermektedir. Bu genlerin içinden Sitokrom Oksidaz I (COI); hayvanlarda DNA barkod bölgesi olarak kullanılması için sunulmuştur (Trivedi et al., 2018). COI gen bölgesi, intron içermemesi, evrensel primerlerle çoğaltılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı böcekler için de ideal bir barkoddur (Trivedi et al., 2018). Mitokondrial genom; hızlı mutasyon oranı ve rekombinasyon olmamasından dolayı, tür seviyesinde evrimsel süreçlerin araştırılmasında uygun bir belirteç olarak ele alınmaktadır (Wilson et al., 1985; Avise, 1994; Airif & Khan, 2009; Strosio et al., 2011). Ayrıca bu genin evrimi; yakın türleri ayırt etmenin yanı sıra,

tek bir türdeki filocoğrafik grupları da belirleyebilecek kadar da hızlıdır (Cox and Hebert 2001; Wares and Cunningham 2001, Hebert et al. 2003b). Özellikle gen bölgesinin 5' ucunda bulunan 648 bç'lik kısa bölge, hayvan gruplarında tür düzeyinde ayrımın yapılabileceği bir barkod bölge olarak belirlenmiştir (Hebert et al., 2003a; 2003b; Vogler ang Monaghan, 2006; Trivedi et al., 2018).

Dolayısıyla mitokondrial Sitokrom Oksidaz I gen bölgesi, hayvanlarda en çok kullanılan barkod bölgesidir ve türlerin çoğunu tanımlayabildiği için “barcode of life” olarak belirlenmiştir. COI dışında barkod olarak kullanıla mitokondrial genler arasında; apocytochrome b (cob), sitokrom oksidaz II (cox2) sitokrom oksitaz III (cox3), nad1 ve 16S-rDNA sayılabilir (Trivedi et al., 2018)

Her ne kadar hayvan gruplarında uygun bir barkod bölgesi olsa da; COI geni bitkiler ve funguslar için iyi bir barkod değildir. Bitkilerde kloroplast DNA'sında bulunan; ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL) ve maturase K (matK) genleri standart barkod olarak kabul edilmiştir. Funguslarda ise ITS (Internal Transcribed Spacer) geni ana barkod bölgesi olarak kullanılmaktadır (Jinbo et al., 2011; Trivedi et al., 2018). Farklı organizmalarda gerçekleştirilen DNA barkodlama projeleri, bilinen dizilerin referans kütüphanelerinin oluşturulması ve dolayısıyla da bilinmeyen örneklerin kolaylıkla tanımlanmasını sağlar.

BOLD: Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) evrensel olarak kullanılan DNA barkod veri tabanıdır. Bu güne kadar yapılmış olan barkodlama çalışmalarının verileri burada depolanmaktadır. BOLD sistem yalnızca DNA barkod verilerini değil birçok canlı grubuyla ilgili coğrafi dağılım, morfolojik ve taksonomik bilgileri de içerebilmektedir (Ratnasingham and Hebert, 2007). Barkod İndeks Numarası (BIN:Barcode Index Number); türler olarak kabul edilebilen işlevsel taksonomik birimler oluşturmak için oturmuş algoritmalar kullanarak sekansları kümeleyen bir sistemdir. BIN'ler her bir cluster'a özgü olduğu için başka çalışmalarda aynı taksonlarla karşılaşılmca bunlar ortak bir BIN altında toplanırlar. Her yeni cluster için ona özgü bir kod verilir ve bu kodlar BOLD veri tabanında kayıtlı olarak bulunabilirler. Ayrıca geniş bir coğrafik

yayılış alanına sahip olan türlerde, aynı tür altında birden fazla BIN bulunabileceğini de rapor etmiştir (Scalercio et al., 2021).

ABGD yaklaşımında, barkod veri setindeki tüm diziler arasındaki ikili farklılıkların (pairwise differences) dağılımında, türler arası ve tür içi farklılaşmalar arasında bir boşluk görülebilir. Bu boşluk barkod boşluğu olarak tanımlanmıştır. Veri seti; iki uzak gruptan alınan diziler arasındaki uzaklık değeri, eşik uzaklık değerinden (barkod boşluğu) her zaman daha fazla olacak şekilde, maksimum sayıda gruba (türler) ayrılır (Puillandre et al., 2012). Yani ABGD yaklaşımı sadece ikili (pairwise) genetik uzaklıkları hesaplayarak, barkod boşluklarının dağılımını belirler. Bu boşluk tür içi ve türler arası uzaklıkların sınırını belirler. Bu boşluğa göre de veri seti varsayılan türler ayrılır. Tek bir veri setinde, farklı prior değerlerinin ortaya çıkarttığı birkaç farklı partition yani tür ayrımı sunulabilir (Puillandre et al., 2021).

GMYC analizi tür sınırlarının belirlenmesinde kullanılan popüler bir metottur. Ultrametrik ağaçlar kullanarak türler arası ve tür içi dallanmaları belirlemeye çalışır. Kökten değişim noktalarına kadar bütün soy hatlarının farklı bir tür olduğunu varsayarak çalışır (Zhang et al., 2013; Michonneau, 2016).

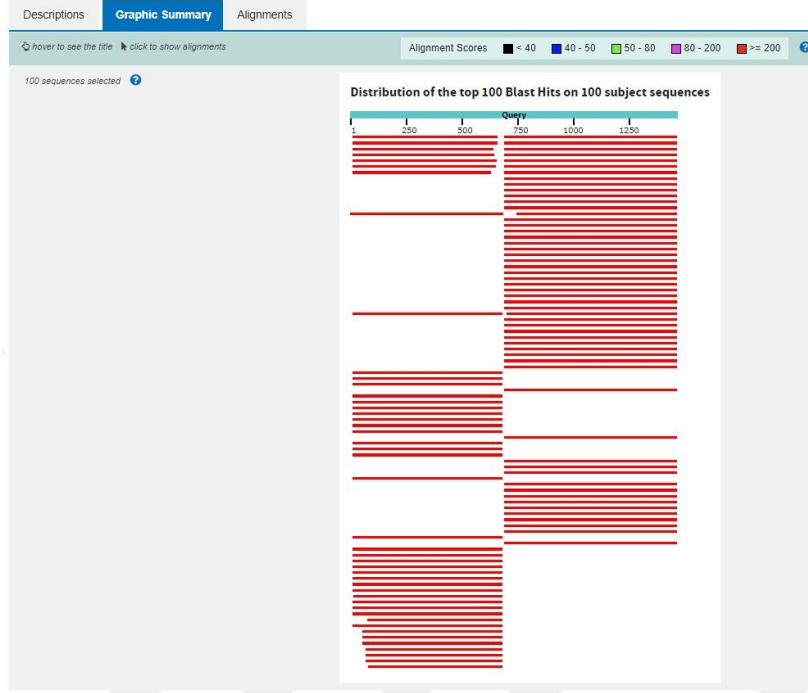
Bu analizler sonucunda elde edilen kümeler (cluster), geleneksel anlamdaki türleri temsil edebilmektedir. Ancak bu gruplandırmaların kesin ve doğru bir şekilde tür olarak tanımlanabilmesi için farklı moleküler veri setlerinin, belirleyici morfolojik karakterler ile bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir. Doksanlı yılların sonunda Mark Blaxter ve ekibi tarafından sunulan MOTU (molecular operational taxonomic unit: moleküler operasyonel taksonomik birim) kavramı, dizi benzerliklerine göre tanımlanan örneklerin kümelerini belirtmek için kullanılmaktadır. Organizmaların nükleer veya mitokondrial genomlarından elde edilen barkod bölgeleri kullanılarak, geleneksel “tür” kavramına benzerlik gösteren, MOTU’lar elde edilir. Taksonomik karakterlerin yetersiz ya da eksik kaldığı durumlarda; korunmuş barkod bölgeleri kullanılarak hızlı ve oldukça doğru bir taksonomik değerlendirme yapılabilir (Floyd et al., 2002; Blaxter, 2004; Gómez et al., 2015; Rosero-Garcia et al., 2017).

Böcekler dünya çapında geniş dağılışı alanına sahip 1 milyondan fazla tanımlanmış türe sahiptir. İnsanlar için hem yararlı (polinatör, biyolojik kontrol, çeşitli kimyasal ürünlerin eldesi vb.) hem de zararlı (hastalık vektörleri, tarım zararlısı, vb.) türleri içeren bir gruptur. Geleneksel olarak böceklerin tür tanımları deneyimli entomolojistler tarafından ve tanı anahtarlarından yararlanılarak yapılabilmektedir. Ancak, böceklerin gelişimleri boyunca morfolojik olarak birbirinden farklı yaşam evrelerine sahip olmaları, seksüel dimorfizm sergilemeleri gibi özelliklerden dolayı tür teşhislerinden bazen zorluklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca henüz tanımlanmamış olan bir çok böcek türü olduğu da düşünülmektedir. Bunun gibi morfolojik problemlerin DNA barkodlama yöntemi ile çözülebileceği ve türlerin kolaylıkla tanımlanabileceği düşünülmektedir (Trivedi et al., 2018).

Doksanlı yılların ortalarından itibaren *Pimelia* cinsi ile ilgili moleküler çalışmalar literatürde önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Sitokrom oksidaz I (COI) (Juan et al., 1995; Juan et al., 1996; Pons et al., 2002; Pons et al., 2004; Moya et al., 2006; Papadopoulou et al, 2010; Kergoat et al., 2014; Lopez et al., 2018; Mas-Peinado et al., 2018), sitokrom oksidaz II (COII) (Contreras-Diaz et al., 2003; Stroschio et al., 2011a; Stroschio et al., 2011b; Lopez et al., 2018;), sitokrom b (Cyt b) (Pons et al., 2004; Kergoat et al., 2014; Lopez et al., 2018;), 16S rRNA (Pons et al., 2004; Papadopoulou et al, 2010; Mas-Peinado et al., 2018) ve tRNA-leu (Juan et al., 1995) çalışılmış olan mitokondrial genlere örnek olarak verilebilir. Bunların yanı sıra nükleer genlerden; kas proteini Mp20 (Papadopoulou et al, 2010) internal transcribed spacer (ITS) (Juan et al., 1996; Mas-Peinado et al., 2018), wingless (Wg) (Kergoat et al., 2014; Mas-Peinado et al., 2018), 18S rDNA (Kergoat et al., 2014; Mas-Peinado et al., 2018) ve 28S rDNA (Pons et al., 2004; Papadopoulou et al, 2010; Kergoat et al., 2014) en çok çalışılmış olan genlerdir.

COI gen bölgesi ile ilgili, NCBI veri tabanında, yaklaşık 44 *Pimelia* türüne ait 186 adet kayıt mevcuttur. Veri tabanında bulunan dizilerin uzunlukları oldukça farklılık göstermektedir (829 bp-195 bp). Bu dizilerin, *Tribolium castaneum* tüm COI dizisiyle karşılaştırılması sonucunda, ortaya iki motif çıktığı söylenebilir. Dizilerin bir kısmı 1460 bp'lik COI gen bölgesinin baş kısmına (5') denk gelirken,

diğerleri genin arka kısmına (3') denk gelmektedir (Şekil 2.1). DNA barkod veri tabanı BOLD'da (The Barcode of Life Data System) ise cinse ait 411 kayıt, 104 BIN (Barcode Index Number) mevcuttur (Ratnasingham and Hebert, 2007).



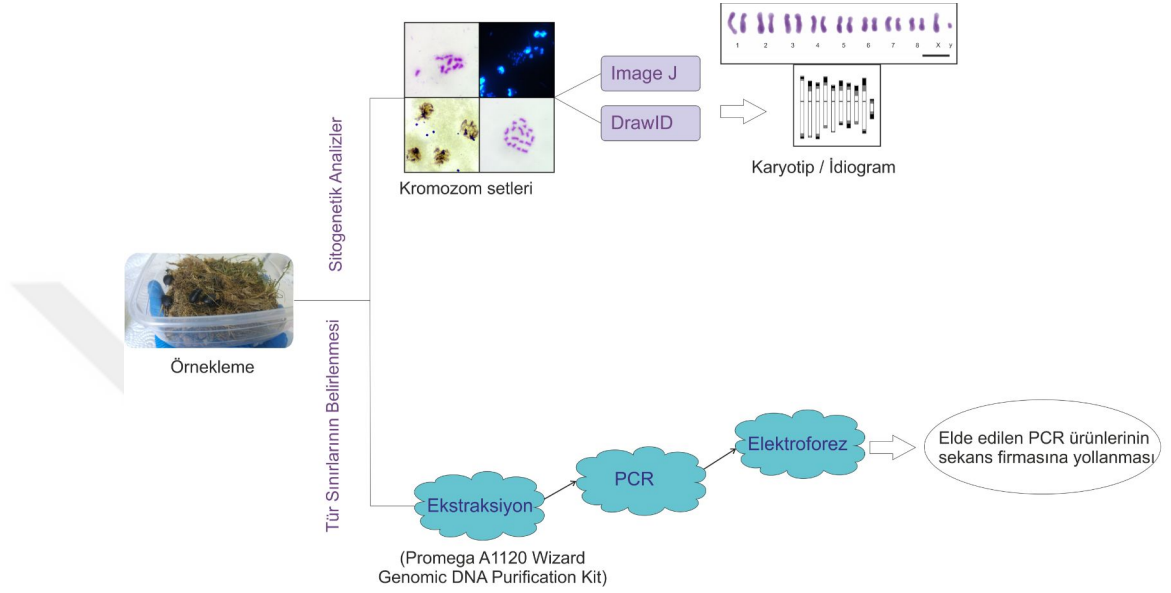
Şekil 2.1 NCBI veri tabanında COI geninin 5' ve 3' kısımlarına denk gelen dizilerin konumları.

Bu tez çalışmasının odağı olan *Camphonota* alt cinsine ait türlerden, yalnızca Girit'e endemik olan *Pimelia sericella*'ya ait sitogenetik veriler ($2n=18, 8+X_{yp}$) mevcuttur (Juan and Petitpierre, 1991; Blackmon et al., 2015). NCBI veri tabanında ve BOLD'da ise; *Camphonota* alt cinsinden sadece *P. subglobosa* türü ile ilgili veriler mevcuttur. *Pimelia subglobosa*'ya ait 56 COI dizisinden 11 tanesi Türkiye'de dağılış gösteren bireylere aittir.

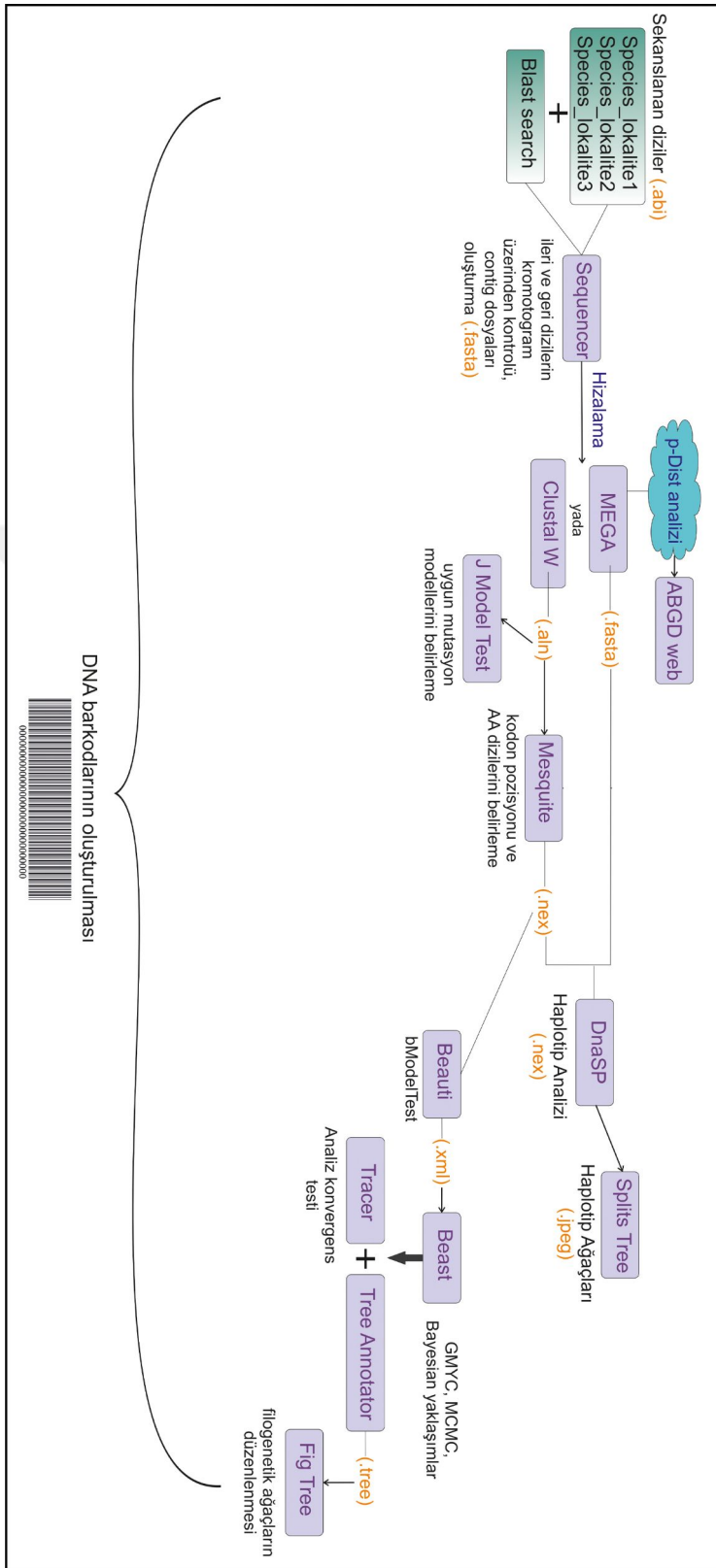
Bu tez kapsamında Türkiye *Pimelia* türlerinin; sitogenetik ve COI gen bölgesine ait DNA barkod verileri temelinde incelenerek, filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu amaç doğrultusunda tez çalışmasında izlenecek olan yol, örneklerin temin edilmesinden sonra gerçekleştirilecek olan laboratuvar çalışmaları (Şekil 3.1) ve biyoenformatik analizler (Şekil 3.2) için şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının laboratuvar aşamasını gösteren yol şeması.



Şekil 3.2. Tez çalışmasının biyoenformatik uygulamalarını gösteren yol şeması.

3.1 Arazi Çalışmaları ve Türlerin Temini

Tez materyalinin elde edilebilmesi için, bugüne kadar Türkiye’den verilmiş olan kayıtlar göz önünde bulundurularak (Kwieton, 1982; Ferrer and Soldati, 1999; Keskin, 1999; Fattorini, 2000; Leo and Fattorini, 2000; Tezcan et al., 2004) arazi çalışmaları planlanmıştır. 2018-2022 yılları arasında gerçekleştirilen arazi çalışmalarının düzenlendiği lokaliteler ve buralardan elde edilen türler Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Saha çalışmalarında; *Camphonota* alt cinsinin yanı sıra, haritada mavi işaretli yerlerden *Chaetotoma* (*P. cursor*) ve *Pimelia* (*P. b. solieri*) alt cinslerine dahil olan türler de toplanmıştır. Gündüz aktif olan bu türler; bahar aylarında, habitatları ile bağlantılı olarak zeminde yürürken yada taş altlarında gizlenirken bulunmuş ve uygun kaplara alınarak canlı olarak laboratuvara getirilmişlerdir. Yapılan arazi çalışmalarında toplanan örnekler Çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.3. *Pimelia* türlerinin örnekleme noktaları (kırmızı: *Pimelia akbesiana akbesiana**, beyaz: *Pimelia lendli*, sarı: *Pimelia subglobosa polita*, siyah: *Pimelia s. salaria*, mor: *Pimelia s. verruculifera*, turuncu: *Pimelia timarchoides*, yeşil: *Pimelia sp.*, mavi: *Pimelia bajula solieri* (Hatay), *Pimelia cursor* (Iğdır) (*Aedeagus yapısına göre bu bireylerin *P. a. akbesiana* olmadığı belirlenmiştir).

Meke Tuzlası, Konya'dan toplanan örnekler ilk olarak *P. a. akbesiana* alt türü olarak tanımlanıp analizlere de bu şekilde dahil edilmişlerdi. Ancak daha sonra aedeagus yapıları incelendiğinde, Meke Tuzlasında dağılışı gösteren

bireylerin, *P. a. akbesiana*'daki tipik aedeagus yapısına sahip olmadığı görülmüştür. Bu yüzden tezin devamında bu türden, Meke_Pim olarak bahsedilecektir. Bu durumun bir benzeri de moleküler analizler sonucunda ortaya çıkmıştır. Tür tanımlamaları, morfolojik ya da moleküler sonuçlar sonrasında değişmiş olan bireylerin ayırt edilebilmesi için tez metninde bu bireyler * işareti ile belirtilecektir.

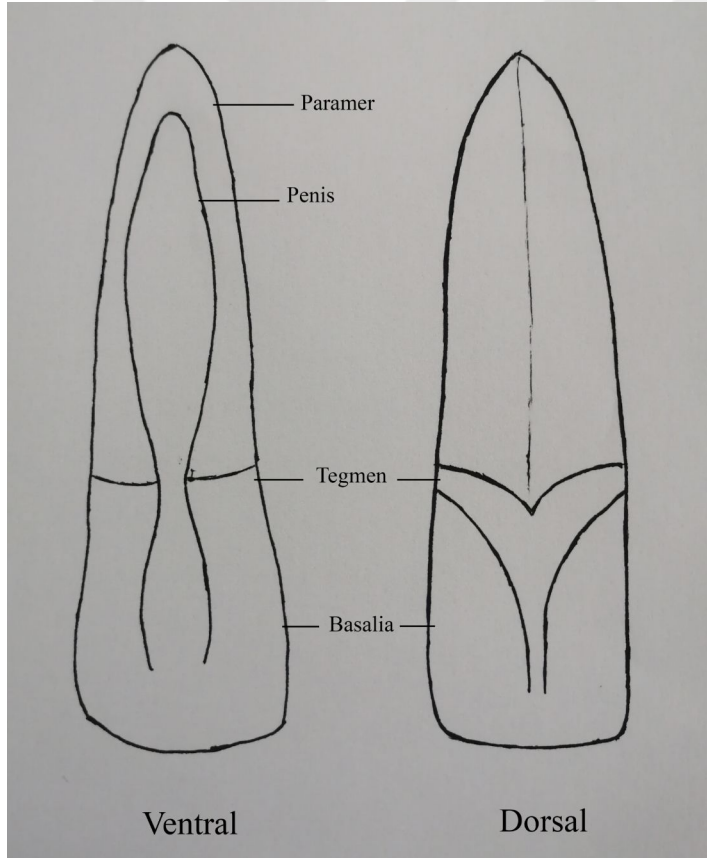
Çizelge 3.1. 2018-2021 yılları arasında toplanan *Pimelia* türleri ve lokaliteleri.

Tarihi	Örneklem Alanı	Koordinatlar	Tür
31/05/2018	Gödekli, Aralık, Iğdır	39,79519 N, 44,54984 E, 883m	<i>P. cursor</i>
31/05/2018	Taşkıran, Iğdır	39,980009 N, 44, 54984 E, 840m	<i>P. cursor</i>
25/04/2019	Davraz Dağı, Isparta	-	<i>P. s. verruculifera</i>
20/04/2019	Bozdağ, İzmir	-	<i>P. s. polita</i>
23/04/2019	Babadağ, Fethiye	36°32'7,47" N, 29°11'47" E, 1223m	<i>P. s. verruculifera</i>
28/04/2019	Sarıova, Burdur	37°36'20,25" N, 30°25'5,20" E, 1376m	<i>Pimelia sp.</i>
29/04/2019	Çamiçi, İzmir	38°30'57,32" N, 27°12'11,86" E, 512m	<i>P. s. verruculifera</i>
04/05/2019	Meke Tuzlası, Konya	37°41'37,71" N, 33°38'20,41" E, 1034m	<i>P. a. akbesiana*</i>
06/05/2019	Belen Geçidi, Hatay	36°28'52,71" N, 36°14'12,79" E, 734m	<i>P. b. solieri</i>
18/05/2019	Gürün, Sivas	38°49'17" N, 37°08'49" E, 1690m	<i>P. timarchoides</i>
18/05/2019	Gürün, Sivas	38°51'53" N, 36°52'36" E, 1830m	<i>P. timarchoides</i>
18/05/2019	Gürün, Sivas	38°51'53" N, 36°52'36" E, 1830m	<i>P. timarchoides</i>
20/05/2019	Erciyes Dağı, Kayseri	38°29'15" N, 35°32'03" E, 1960m	<i>P. lendli</i>
20/05/2019	Erciyes Dağı, Kayseri	38°29'15" N, 35°32'03" E, 2235m	<i>P. lendli</i>
22/03/2020	Doma Köyü, Çanakkale	39°46'43" N, 27°14'28" E	<i>P. s. verruculifera</i>
20/04/2021	Şeyhşaban Kayseri	38°27'26,21" N, 35°12'34,61" E, 1078m	<i>Pimelia sp.</i>
21/04/2021	Güre – Fener, Balıkesir	39°33'30" N, 26°50'19" E, 3m	<i>Pimelia sp.</i> <i>Pimelia s. salaria</i>
22/04/2021	Amasya, Paraşüt	-	<i>Pimelia sp.</i>
06/05/2021	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	39°36'51" N, 27°19'42" E, 537m	<i>Pimelia sp.</i>
21/05/2021	Berendi Karaman	37°15'20,01" N, 34°5'17,71" E, 2097m	<i>Pimelia sp.</i>
22/05/2021	Meke Tuzlası, Konya	-	<i>Pimelia sp.</i>
23/05/2021	Bolkar Dağları	37°25'49,29" N, 34°34'34,23" E, 2307m	<i>Pimelia sp.</i>
01/06/2021	Mazı kıran Geçidi, Gürün-Sivas	38°43'42,62" N, 37°8'56,71" E, 1798m	<i>P. timarchoides</i>

Sitogenetik çalışmalarda örneklerin canlılığı büyük önem arz ettiği için, detaylı morfolojik incelemeler diseksiyondan sonraya bırakılmıştır. Ayrıca böcekler fazla hareketli oldukları için, örneklerin diseksiyondan önce fotoğraflanmalarını mümkün olmamıştır. Hareketlerini yavaşlatabilmek için hayvanlar bir süre buzdolabında bekletilmiştir. Ancak bu sefer de, soğuktan dolayı vücutlarının kasılması fotoğraflama için uygun şeklin verilmesini engellemiştir. Dolayısıyla bireylerin morfolojik karakterlerine ait fotoğrafların çekimi de diseksiyon sonrasına bırakılmıştır.

Örneklerin genel vücut morfolojilerinin gösterilebilmesi için ayrılan bireylerin ve Ege Üniversitesi Omurgasızlar Müzesi koleksiyonunda bulunan ZDEU-Ent. (Zoology Department Ege University-Entomology) demirbaş numaralı *Pimelia* örneklerinin fotoğrafları; Olympus SZX7 stereomikroskop altında Olympus C7070 kamera ile çekilmiştir.

Tür tayininde sıklıkla kullanılan bir diğer karakter olan aedeaguslar da aynı şekilde fotoğraflanmıştır. Moleküler ve sitogenetik verilerle morfolojik verilerin ne derecede örtüştüğünü gösterebilmek için dizilemeye gönderilen bireylerin aedeagus yapıları stereomikroskop altında çıkartılarak incelenmiş ve fotoğraflandırılmıştır. *Pimelia* örneklerinin erkek üreme organı aedeagus yapısı, Şekil3.4’de şematize edilmiştir.



Şekil 3.4.Camphona alt cinsine dahil *Pimelia* örneklerinin aedeagus yapılarının şematik görünümü A-dorsal ve B-ventral

3.2 Sitogenetik Analizler

Sitogenetik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için; stereomikroskop altında disekte edilen hayvanların gonadları öncelikle % 0,65'lik KCl hipotonik solüsyon içerisine alınmıştır. Testisler bu solüsyon içinde 5 dakika, ovaryumlar ise 10 dakika kadar bekletildikten sonra, gonadlar 3:1 (alkol:asit) içinde, +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Diseksiyonu yapılan bireyler daha sonra DNA barkodlama aşamasında kullanılacağı için her bir böcek özel olarak etiketlenerek %100 etanol içeren tüplerde, -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Kromozom preparatları mikro yayma (Chandley et al., 1994) yönteminde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. 3:1 solüsyonu içinde muhafaza edilen gonadlar; lam üzerinde, 1 damla % 60'lık asetik asit içinde parçalanmışlardır. Elde edilen hücre süspansiyonu 45°C'lik ısıtma tablası üzerinde tüm lam yüzeyine yayılmıştır.

Örneklerin sitogenetik analizleri için 3 farklı boyama yöntemi uygulanmıştır. Rutin Giemsa (MacGregor and Varley, 1986) boyaması için preparatlar, Gurr Buffer'da (pH 6.8) çözündürülen % 4'lük Giemsa ile 20 dakika boyanmışlardır. Kromozomlar üzerinde aktif NOR'ların (nukleolus düzenleyici bölge) gösterilebilmesi için gümüş nitrat (AgNO_3) uygulaması Patkin and Sorokin (1983)'e göre yapılmıştır. Gümüş boyama için uygun olan preparatların üzerine, 60°C'lik etüv içerisinde, AgNO_3 çalışma solüsyonundan (2:1 - % 50'lik AgNO_3 : % 0,5 formik asit içeren % 2'lik gelatin) birkaç damla uygulanmıştır. Sarı-kahverengi rengine ulaşana kadar preparatlar yaklaşık olarak 5-10 dakika etüv içinde karanlıkta bekletilmişlerdir. Zemin boyaması için ise % 4'lük Giemsa ile 15 dakika boyama yapılmıştır. Rutin Giemsa ve gümüş nitrat uygulaması yapılan kromozom setlerinin fotoğrafları Zeiss Axio Scope A1 ışık mikroskobu ile çekilmiştir.

Türlerin genomlarında AT spesifik heterokromatin dağılımının belirlenmesi amacıyla, praparatların üzerine 30 μl DAPI (Sigma Fluoroshield with DAPI) floresan boya uygulaması yapılarak temiz bir lamel ile kapatılmış, boyanın solmasını engellemek için alüminyum folyo ile sarılıp yaklaşık 15 dakika kadar

buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda floresan sinyaller 90 HE LED (E) filtre setli Zeiss Axio Imager A2 mikroskobu ile belirlenerek fotoğraflanmışlardır.

Çalışmanın sitogenetik preparasyon ve ışık mikroskop incelemeleri Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Seroloji ve Genetik Laboratuvarında ve floresan mikroskop incelemeleri E.Ü. Biyoloji Bölümü Böcek Fizyolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Karyotip analizi için uygun olan mitotik metafaz setlerinde; Image J (Rasband, 1997-2015) programının Levan eklentisi (Sakamoto and Zacaro, 2009) ile kromozom kol ölçümleri yapılmıştır. Kromozomlar Levan et al.'a göre (1964) sınıflandırıldıktan sonra karyotipler oluşturulmuştur.

3.2 Genomik DNA Ekstraksiyonu ve COI Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Arazi çalışmaları tamamlandıktan sonra, Ege Üniversitesi Moleküler Sistemik Laboratuvarı (MSL) stoklarında bulunan *Pimelia* örnekleri ve filogenetik analizlerde dış grup olarak kullanılması kararlaştırılmış olan *Pachyscelis quadricollis* türü de çalışmaya dahil edilerek moleküler çalışmaların laboratuvar aşamasına geçilmiştir.

Toplamda 116 birey'in total DNA'sı, Promega Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification System kullanarak elde edilmiştir. DNA ekstraksiyonu için genellikle hayvanların boyutlarına göre; baş, baş + pronotum, bacaklar veya hayvanın tüm vücudu kullanılabilir. Bu çalışmada; elitrinin altında bulunan ve tüm iç organların üzerini örten dokunun yanı sıra (disekte edilen örneklerde), böceklerin boyutlarına göre baş veya metatorasik bacaklardan birinin koksal segmenti ekstraksiyonda kullanılmıştır. %100 alkol içinde muhafaza edilen böceklerin uygun dokuları, steril pens ve makaslar kullanılarak 2 ml hacme sahip ekstraksiyon kuyucuklarına aktarılmıştır. Böceklerin geri kalan vücut kısımları etiketlenerek %100 alkol içerisinde -20°C'de muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır. Ekstraksiyon kabının 96 hücresi de bu şekilde doldurulduktan sonra materyal, alkolün giderilmesi amacıyla vakum odacığında 15 dk bekletilmiştir.

Örnekler kuruma aşamasındayken her bir örnek için 200 µl "Nuclei Lysis Solution", 50 µl 0.5 M EDTA ve 20 µl "Proteanase K" karışımı içerecek şekilde

“Digestion Solution Master Mix” hazırlanmıştır. Kuruyan örnekler vakum odacığından çıkartıldıktan sonra her bir kuyucuğa 275µl “Digestion Solution Master Mix” eklenmiştir. Ekstraksiyon kabının üzeri steril alüminyum bant ile kapatıldıktan sonra 55°C’lik su banyosunda yaklaşık 20 saat kadar bekletilmiştir.

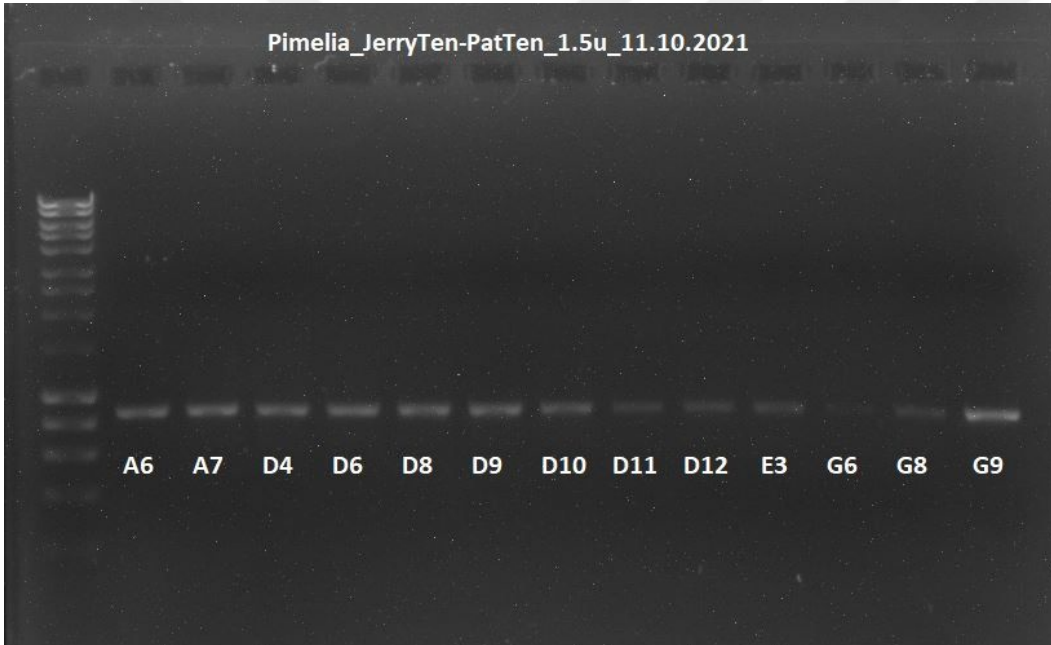
20 saatin sonunda inkübasyondan alınan örneklerin üzerine her bir kuyucuğa 250 µl olacak şekilde Lysis Buffer eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla iyice karıştırılan sıvının tamamı Binding kabının aynı numaralı kuyucuğuna aktarılmıştır. Binding kabı vakum manifolduna yerleştirilip sıvı geçişi olana kadar vakumlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 ml yıkama solüsyonu ilave edilip ve tekrar vakumlanmıştır. Bu işlem toplam 3 kez tekrar edildikten sonra örnekler son kuruma basamağı için 6 dk vakumlanmış ve 10 dk 37°C’lik etüvde bekletilmiştir. Son olarak manifoldun ikinci parçasına, düz tabanlı 96’lık plate bunun üzerine de aynı numaralı kuyucuklar denk gelecek şekilde binding plate yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa, 65°C’ye ısıtılmış 150 µl “Nuclease-Free Water” eklenerek 2 dk kadar inkübasyona bırakılır. Süre sonunda genomik DNA’nın binding kabından toplama kabına aktarılması için vakum yapılmıştır. Bu işlem toplamda iki kere tekrar edilerek her bir bireyin genomik DNA örneği iki ayrı elüsyonda elde edilmiştir. *Pimelia* cinsine dahil örneklerin genomik DNA’ları ‘MSL_Pim’ ile ‘MSL016’ koduyla etiketlenerek PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) analizlerine kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonları Ribera et. al., (2001, 2003)’e göre Applied Biosystem marka SimpliAmp Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Barkod olarak kullanılacak olan mitokondrial sitokrom oksidaz I (COI) geninin, 3’ ucuna yakın olan 829 bç’lik bölgesi; evrensel Jerry (C1-J-2183) - Pat (TL2-N-3014) (Simon et al., 1994) ve bu primerlerden elde edilmiş olan dejenere JerryTen - PatTen primerleri (Papadopoulou et al. 2009) kullanılarak çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Türkiye *Pimelia* türlerine ait COI gen bölgesine ait dizilerin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri.

Primer çifti	İleri yön (Forward) (5’-3’)	Geri yön (Reverse) (5’-3’)
Jerry – Pat	CAACATTATTTTGATTTTTGG	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA
JerryTen –PatTen	CAACACTTATTYTGATTYTTTGG	TCCAATGCACTAATCTGCCATAWTA

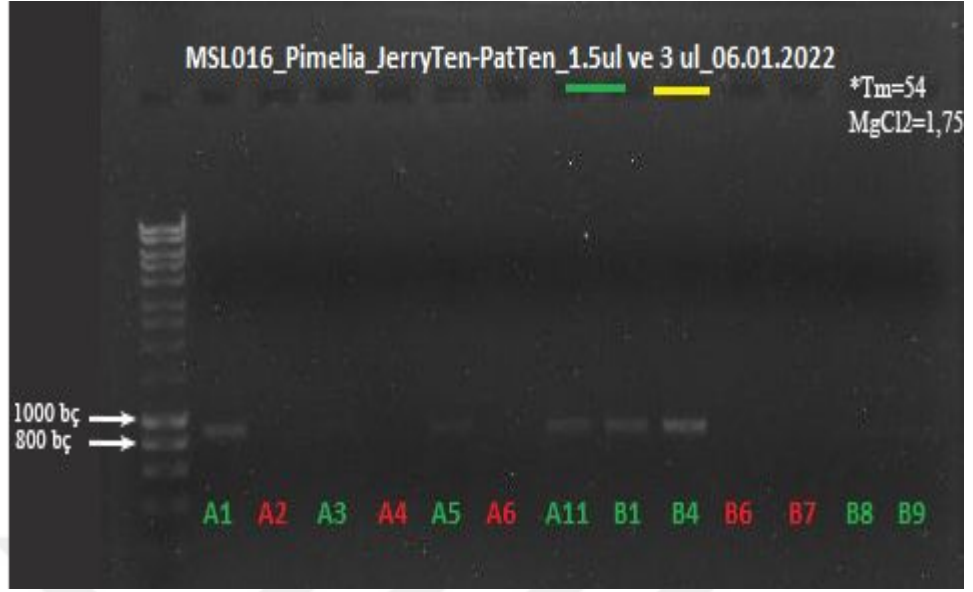
Örneklerden 25 ng/ μ l'lik gDNA (1-3 μ l) alınmış ve son hacim 25 μ l olacak şekilde Master Mix hazırlanmıştır. Her bir örnek için; 12 μ l Trehalose, 2,5 μ l NH_4 Buffer, 1,25 μ l MgCl_2 , 0,5 μ l ileri primer, 0,5 μ l geri primer, 0,5 μ l dNTP mix, 0,1 μ l Taq ve son hacme göre uygun miktarda ddH₂O eklenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) uygulanan reaksiyon koşulları şu şekildedir: 94°C'de 2 dk; 94°C'de 30 sn, 56°C'de 1 dk, 70°C'de 2,15 dk (32 cycle); 72 °C'de 10 dakika, 4°C'de ∞ . Elde edilen dizilerin istenilen bölgeye ait olup olmadığı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile test edilmiş ve jeller UV ışık altında SmartView Pro 1100 Imager System, UVCI-1100 görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.



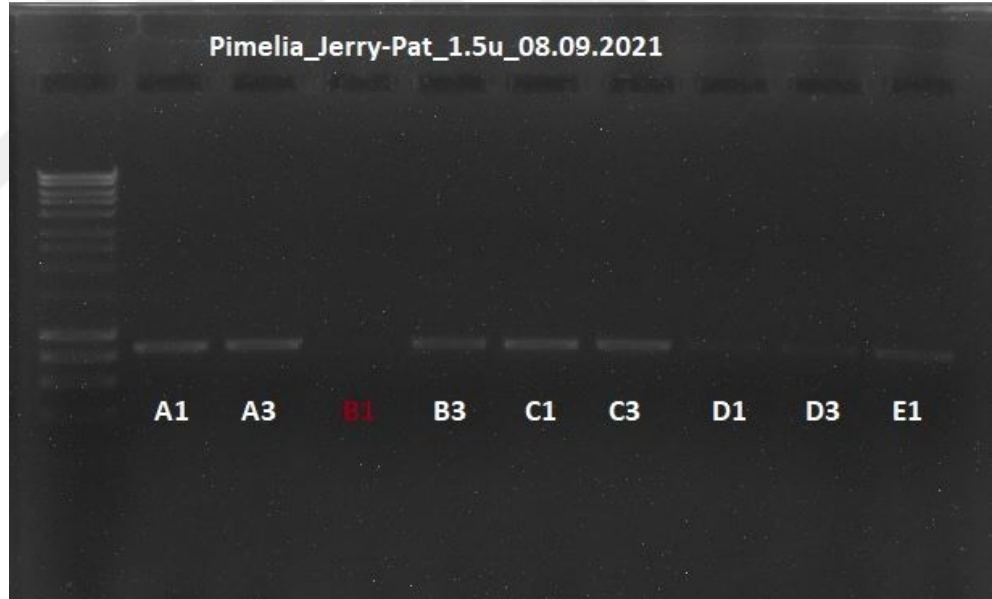
Şekil 3.5. JerryTen-PatTen primerleri kullanarak, COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.

Örneklerin büyük bir kısmının uygun reaksiyon koşulları altında, JerryTen – PatTen primerleri ile çoğaltılabildiği görülmüştür (Şekil 3.5). Uygun bantların görülemediği bireylerde DNA miktarları değiştirilerek veya reaksiyondaki erime sıcaklığı (T_m) 2°C düşürülüp, MgCl_2 miktarı 1,75'e çıkartılarak COI gen bölgeleri çoğaltılabilmektedir (Şekil 3.6). Bolkar Dağlarından toplanan örnekler ve dış grup olan *Pachyscelis quadricollis* ise; normal PCR koşulları altında, COI bölgesi için evrensel olan Jerry-Pat primerleri ile çoğaltılabilmektedir (Şekil 3.7).

Ekstraksiyonu yapılan 116 bireyden dizilemeye uygun olan 100 örneğin PCR ürünü, Eurofins firması aracılığıyla dizilenmiştir.



Şekil 3.6 JerryTen-PatTen primerleri kullanarak, erime sıcaklığı ve $MgCl_2$ miktarı modifikasyonları ile COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.



Şekil 3.7 Jerry-Pat primerleri kullanarak, COI gen bölgesinin PCR amplifikasyonu sonrasında elde edilen jel görüntüsü.

3.3 Veri Setinin Oluşturulması

Firmadan gelen ileri ve geri *.abi uzantılı dizi dosyaları ilk olarak Sequencher 5.01 programında karşılıklı getirilip kontrol edilerek, 829 baz çifti uzunluğundaki “contig” dosyaları oluşturulmuştur. Bu dosyanın içindeki dizilerin kaliteleri ve hatalı okumalar kromotogramları üzerinden kontrol edilmiştir. Her iki yönün dizisinin başında da kromotogramlar anlaşılır olmadığı için bu uç bölgeleri

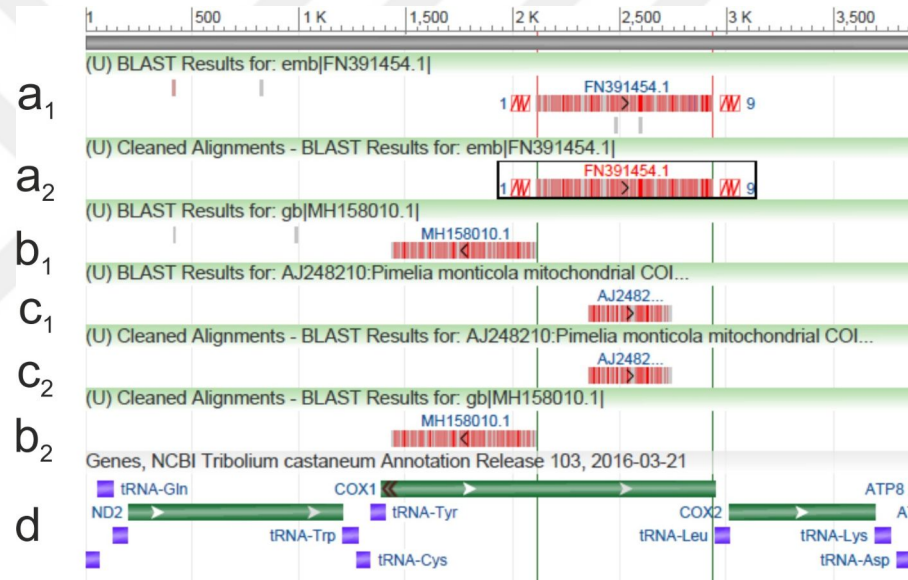
çıkartılıp karşısındaki dizinin kromotogram okumalarına göre düzenlenmişlerdir. Dizin baş kısımlarının yanı sıra orta kısımlarında da bazı problemlilerle karşılaşmıştır. Bazların hatalı ya da atlanarak okunması, iki yön arasında uyumsuzluklara yol açabilir. Bu sorun da her iki yönün de kromotogramlarının gözden geçirilmesi ile ortadan kaldırılmıştır. Çok düşük kaliteli olan ve karşılıklı getirilmesi mümkün olmayan 8 dizi, veri setine dahil edilmemiştir. Düzenleme işlemi tamamlanan diziler dışarıya FASTA (*.fas) dosyası olarak dışarıya aktarılmıştır.

Bu çalışma kapsamında Türkiye’de dağılışı gösteren *Pimelia* türlerine ait 91 COI dizisinin BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri NCBI platformunda “all GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences” veri tabanlarında tamamlanmıştır. BLAST aramaları, 91 *Pimelia*-COI dizisinin veri tabanlarında mevcut olan Tenebrionidae türlerine ait dizilerle %80 ile %90 arasında değişen oranlarda uyumlu olduğunu göstermiştir (Şekil 3.8). Bu çalışmada elde edilen *Pimelia* COI dizilerinin BLAST arama sonuçları, *P. subglobosa* türüne %90- %80 arasında benzerlik gösteren “*P. s. verruculifera* _Babadağ3” örneği üzerinden gösterilmiştir (Şekil 3.8).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
☐ select all 0 sequences selected	Description	GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1124	1124	99%	0.0	90.10%	829	FN391458.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1120	1120	99%	0.0	89.96%	829	FN391457.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1115	1115	99%	0.0	89.86%	829	FN391499.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1111	1111	99%	0.0	89.73%	829	FN391497.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1106	1106	99%	0.0	89.61%	829	FN391456.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1102	1102	99%	0.0	89.49%	829	FN391455.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1102	1102	99%	0.0	89.49%	829	FN391454.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1099	1099	98%	0.0	89.74%	819	FN391498.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1099	1099	100%	0.0	89.36%	829	FN391446.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1097	1097	99%	0.0	89.37%	829	FN391500.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1097	1097	99%	0.0	89.37%	829	FN391487.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1097	1097	99%	0.0	89.37%	829	FN391453.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1095	1095	100%	0.0	89.26%	829	FN391474.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1095	1095	100%	0.0	89.26%	829	FN391473.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1093	1093	99%	0.0	89.25%	829	FN391461.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1090	1090	100%	0.0	89.14%	829	FN391477.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1086	1086	100%	0.0	89.02%	829	FN391460.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1081	1081	100%	0.0	88.90%	829	FN391489.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1079	1079	99%	0.0	88.89%	829	FN391479.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1079	1079	99%	0.0	88.89%	829	FN391462.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1078	1078	100%	0.0	88.78%	829	FN391468.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1076	1076	100%	0.0	88.78%	829	FN391466.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1072	1072	100%	0.0	88.66%	829	FN391465.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1066	1066	99%	0.0	88.53%	829	FN391501.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1060	1060	96%	0.0	88.38%	800	FN391463.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1057	1057	99%	0.0	88.29%	829	FN391496.1
☐	Pimelia subglobosa mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I specimen	Pimelia subgl...	1054	1054	100%	0.0	88.18%	829	FN391486.1

Şekil 3.8. *P. s. verruculifera* örneğine ait COI dizisinin BLAST programı ile karşılaştırılması.

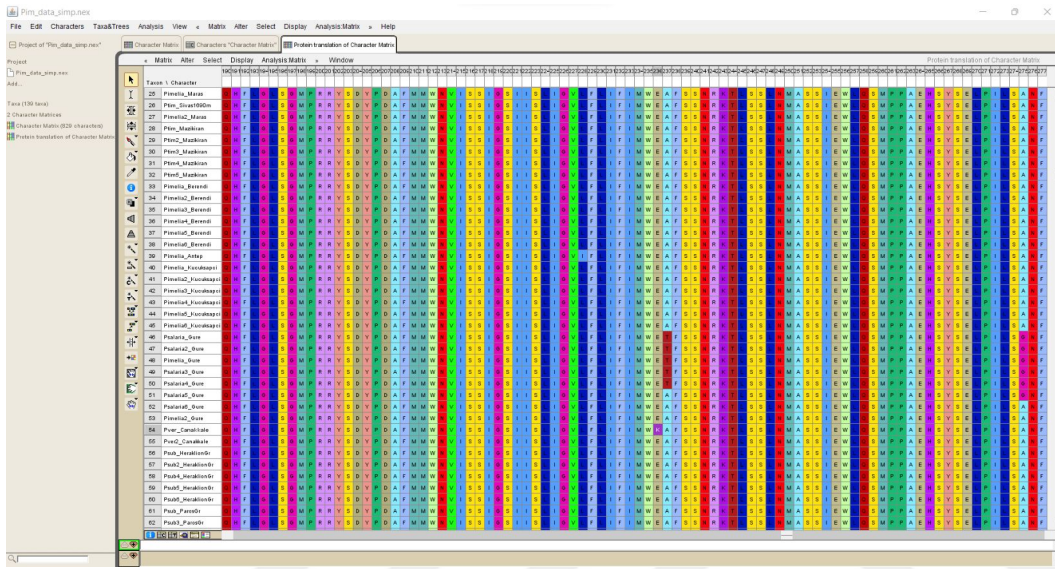
Ayrıca, NCBI platformunda “*Pimelia* AND COI” anahtar kelimeleri kullanılarak gerçekleştirilen taramalarda nukleotid koleksiyonunda farklı *Pimelia* türlerine ait 360bç, 670bç ve 820bç uzunluğunda 188 dizi belirlenmiştir (İlk erişim Ağustos 2018-Son erişim Ağustos 2022). Bu 3 farklı uzunluktaki dizileri temsilen *P. subglobosa* (829 bç), *P. laevisulcata* (669 bç) ve *P. monticola* (368 bç) türlerine ait diziler seçilerek *Tribolium castaneum* mitokondrial genomu üzerinden BLAST (Zhang et al., 2000) taramaları gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre yaklaşık 670 bç uzunluğundaki dizilerin COI gen bölgesinin 5’ ucundaki ön bölgesinde, yaklaşık 820 ve 360 bç uzunluğunda olan dizilerin ise 3’ ucunda yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. BLAST programı ile NCBI veri tabanındaki *Pimelia* COI dizilerinin *Tribolium castaneum* mitokondrial genomu ile karşılaştırılması.

Bu tez çalışmasında kullanılan primerler ve çoğaltılan bölge NCBI veri tabanındaki *P. subglobosa* türüne ait dizilerle benzerlik gösterdiği için veri setinin zenginleştirilmesi açısından, NCBI veri tabanındaki 47 adet *Pimelia subglobosa* COI dizisi (829 bç) FASTA (*.fas) formatında indirilerek analizlere dahil edilmiştir. FASTA formatındaki DNA dizilerinin çoklu hizalamaları Clustal W (Thompson et al., 1994) programı ile gerçekleştirilmiş ve *.aln uzantılı dosyalar elde edilmiştir. Hizalanan diziler, kodon pozisyonu ve amino asit ifadeleri Mesquite 3.70 (Maddison and Maddison, 2018) programında kontrol edildikten sonra filogenetik analizlerde kullanılacak Nexus (*.nex) formatındaki dosyalara dönüştürülmüştür. Bireylerin hepsinde, aminoasit ifadelerinin özellikle başlangıç

ve bitiş noktalarında oldukça benzerlik gösterdiği görülmüştür. Çoğaltılan bölgenin protein ifadesinin ‘HPEVYILIL’ ile başlayıp ‘SANF’ ifadesiyle bittiği belirlenmiştir. Güre, Balıkesir’den toplanan 8 bireyden 6 tanesinde ise protein ifadesi ‘SGNF’ ile biterek diğer dizilerden belirgin bir şekilde ayırt edilebilmektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. COI gen bölgesinin Mesquite programıyla elde edilmiş olan amino asit ifadeleri ('SGNF' olarak biten *P. s. salaria* örnekleri 46.-52. diziler arasında görülebilmektedir).

Filogenetik analizlerde dış grup olarak *Pachyscelis quadricollis* türü kullanılmıştır. Dolayısıyla, nihai veri seti, dış grup dahil da olmak üzere toplamda 139 dizi (Ek 1) içermektedir . Çalışma kapsamında elde edilen COI dizileri ile ilgili dosyalar BOLDSystems veri tabanına yüklenmiştir ve yayınlanma süreci devam etmektedir.

3.4 Filogenetik Analizler

Pimelia-COI dizilerinin haplotip ve nukleotid seviyesinde sergilediği genetik çeşitliliğe ait parametreler DnaSP v6 (Rozas et al., 2017) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca haplotipler arasındaki bağlantıların belirlenmesi amacıyla haplotip ağaçları SplitsTree 4.14.2 (Huson and Bryant, 2006) kullanılarak üretilmiştir.

DNA veri matrisine en uygun baz değişim modeli, Akaike enformasyon kriteri (AIC) ve Bayesian enformasyon kriteri (BIC) kullanılarak JModelTest

2.1.6 (Posada, 2008) programında belirlenmiştir. Filogenetik analizler, programın belirlediği modele göre sürdürülmüştür. Ayrıca, filogenetik analizlerin başlangıcında veri setine en iyi uyum sağlayan modelin seçilmesi için önerilen modele ait parametre değerleri, tekrarlı ağaç aramalarında kullanılmıştır. Tekrarlı ağaç aramalarına ait *.log dosyaları Tracer v1.6 (Rambaut ve Drummond, 2009) programında karşılaştırılarak, HKY ve GTR (ESS > 200) modelleri, ileri filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

3.4.1 Tür sınırlarının belirlenmesi

Anadolu’da dağılışı gösteren *Camphonata* alt cinsine dahil *Pimelia* örneklerinde filogenetik ilişkiler ve tür sınırları Otomatik Barkod Boşluğu Bulma (ABGD), Genel Karma Yule Koalesent (GMYC) ve Barkod İndeks Numarası (BIN) yaklaşımları altında sınanmıştır.

Tür sınırlarının, çoklu hizalanan dizilerin uzaklık matrisine dayanarak belirlendiği, ABGD (Puillandre et al. 2012) ve ASAP (Puillandre et al. 2021) analizleri, Jukes-Cantor ve Kimura 2-P uzaklık değerleri hesaplanarak, varsayılan ayarlarla programların web ara yüzleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>, erişim Ekim 2022, <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>, erişim Ekim 2022).

Tür sınırlarının ultrametric ağaçlar kullanılarak belirlendiği GMYC analizleri R ortamında (R Core Team, 2022) APE (Paradis and Schliep, 2019), PARAN (Dinno, 2018), RNCL (Michonneau et al., 2023) ve SPLITS (Ezard et al., 2021) paketleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GMYC analizleri için Bayesian filogenetik ağaç aramaları amprik nukleotid frekansları ve önerilen modelin parameter değerleri kullanılarak BEAST 2.7.1 (Bouckaert et al., 2014) platformunda gerçekleştirilmiştir. *Pimelia* türlerine ait COI dizileri; GTR ve HKY olmak üzere 2 farklı baz değişim modeli kullanılarak; türleşme (“yule” prior), tür içi çeşitlenme (“coalescence with constant population size” prior) ve esnek moleküler saat (“relaxed clock” prior) varsayımları altında test edilmiştir. Bayesian filogenetik analizler, her 1000 jenerasyonda örnekleme yapılarak, 10×10^6 jenerasyon boyunca sürdürülmüştür. Her bir analizin için posterior olasılık dağılımları ve model parametrelerinin yeterli Efektif Örneklem Büyüklüğü (ESS)

değerlerine (>200) ulaşmış ve ulaşmadığı, Tracer v1.6 (Rambaut ve Drummond, 2009) programıyla kontrol edilmiştir. Elde edilen ağaçların %10'u TreeAnnotator v1.8.4 (Rambaut ve Drummond, 2010) programında yakıldıktan sonra en uygun ağaç (maximum clade credibility tree) elde edilmiştir. “Yule”, “Coalescence with constant population size” ve “Relaxed clock” prior ayarı ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen ultrametrik ağaçların posterior olasılık değerleri FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016) programı ile kontrol edilerek GMYC analizlerinde kullanılmak üzere sırasıyla “yule_tree.nex”, “constant_coalescent_tree.nex” ve “relaxed_clock_tree.nex” olarak etiketlenmiştir. Elde edilen ultrametrik ağaçların R ortamında okunarak GMYC analizlerinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların çizdirilmesi için kullanılan komutlar “yule_tree.nex” örneği üzerinden Çizelge 3.3’te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Ultrametrik ağaçların R ortamında okunarak GMYC analizlerinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların çizdirilmesi için kullanılan kod

<code>install.packages(c("ape", "paran", "rnc1"))</code>	Zorunlu paketler
<code>install.packages("splits", repos = "http://R-Forge.R-project.org")</code>	
<code>library(rnc1)</code>	
<code>yule_tr <- read_nexus_phylo("../yule_tree.nex")</code>	
<code>coal_tr <- read_nexus_phylo("../constant_coalescent_tree.nex")</code>	Ağaç okumaları
<code>relclock_tr <- read_nexus_phylo("../relaxed_clock_tree.nex")</code>	
<code>library(splits)</code>	
<code>yule_gmyc <- gmyc(yule_tr)</code>	
<code>coal_gmyc <- gmyc(coal_tr)</code>	GMYC analizleri
<code>relclock_gmyc <- gmyc(relclock_tr)</code>	
<code>summary(yule_gmyc)</code>	GMYC küme sayısı
<code>plot(yule_gmyc)</code>	
<code>spec.list(yule_gmyc)</code>	Tür listeleri
<code>yule_support <- gmyc.support(yule_gmyc)</code>	Destek değerlerinin hesaplanması
<code>is.na(yule_support[yule_support == 0]) <- TRUE</code>	
<code>plot(yule_tr, cex=.6, no.margin=TRUE)</code>	GMYC ağacının çizdirilmesi
<code>node.labels(round(yule_support, 2), cex=.7)</code>	Destek değerlerinin ağaç üzerinde gösterilmesi

Ayrıca bu çalışma kapsamında elde edilen dizilerin, BOLD sistemde barkod indeks numarasına (BIN) sahip örneklerle benzerlikleri kontrol edilmiştir. Öncelikle, BOLDSystems (<https://www.boldsystems.org/>) platformunda, erişime açık olan örnek ve BIN veri tabanları “Pimelia” anahtar kelimesi kullanılarak taranmıştır. Çalışmada kullanılan dizilere ait barkod indeks numarası ve COI barkodlarının oluşturulması için, sistemde “Genus Pimelia diversity [PIMEU]” isimli bir proje oluşturularak çalışmada kullanılan örnekler ve ilişkili dizilerin sisteme aktarılması sağlanmıştır (erişim Ocak 2023).

3.4.2 Moleküler saat analizleri /zaman ağaçları

Pimelia -COI dizilerinin evrimsel süreçte homojen bir hızda değişim sergileyip sergilemedikleri, log-likelihood ratio testiyle (LRT; Huelsenbeck and Rannala, 1997) sınanmıştır. Bu test için, sabit saat hızı (strict clock) ve esnek saat hızı (uncorrelated log normal) altında gerçekleştirilen iki Bayesian analizden elde edilen -lnL değerleri χ^2 istatistiğiyle karşılaştırılmıştır.

Pimelia soy hatlarının divergens zamanlarının tahmin edilmesi amacıyla “strict clock” ve “Relaxed Clock Log Normal” ayarları kullanılarak iki ayrı filogenetik analiz BEAST 2.7.1 (Bouckaert et al., 2014) platformunda gerçekleştirilmiştir. *Pimelia* soy hatları için kalibrasyon noktası olarak kullanılabilecek fosil kayıtların bulunmaması nedeniyle, literatürdeki böcekler ve farklı tenebrionid gruplarında mitokondriyal belirteçler için hesaplanmış olan moleküler divergens hızları kullanılmıştır (Papadopoulou et al., 2010). Buna göre moleküler saat analizleri ortalama $2.39\% \text{ My}^{-1}$ mtDNA divergens hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MCMC (Markov chain Monte Carlo) Analizi, her 1000 jenerasyonda örnekleme yapılarak, 20×10^6 jenerasyon boyunca sürdürülmüştür.

Her bir analizin için posterior olasılık dağılımları ve model parametrelerinin yeterli Efektif Örneklem Büyüklüğü (ESS) değerlerine (>200) ulaşp ulaşmadığı, Tracer v1.6 (Rambaut ve Drummond, 2009) programıyla kontrol edilmiştir. Filogenetik ağaç inşası, her bir analizden elde edilen 20000 ağacın ilk %10’u yakıldıktan sonra TreeAnnotator v1.8.4 (Rambaut ve Drummond, 2010) programında gerçekleştirilmiştir. Nihai ağaçlar FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016) ile çizdirilmiştir.

4 BULGULAR

4.1 Türlerin Tayini, Genel Morfoloji ve Aedeagus Yapıları

Tez materyalinin tür tayinleri; Prof. Dr. Bekir KESKİN ile beraber, Reitter, 1915 ve Kaszab, 1938 kaynaklarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Tür teşhisleri yapılabilen örnekler; toplanma tarihleri, toplandıkları yer ve uygun tür isimlerine göre, tür teşhisi yapılamayan örnekler ise *Pimelia sp.* olarak etiketlenmişlerdir.

Sivas - Gürün *Pimelia* örnekleri aynı bölgeden 2 farklı yükseklikten (1690m, 1830m) toplanmıştır. Ancak 1830m'den toplanan bazı örneklerde; elitra üzerindeki karina ve tüberkül yapılarında, belirgin morfolojik farklılık gözleendiği için bunlar 2 ayrı kaba alınmıştır. Dolayısıyla örnekler toplam 3 farklı kaptan [1690m, 1830m(a) ve 1830m(b)] laboratuvara ulaştırılmıştır. Böceklerin diseksiyonu sırasında yapılan ilk incelemelerde; 1690m ile 1830m(a) örneklerinde elitra üzerindeki karina ve tüberküllerin yapısının benzer bir şekilde daha düz, 1830m(b) örneklerinde ise bu yapıların daha belirgin ve kubbeli olduğu gözlenmiştir. Bu morfolojik farklılıklardan dolayı; Sivas'tan 2 farklı tür toplanmış olabileceği düşünülmüştür. Literatüre göre Sivas'tan bugüne kadar sadece *Pimelia timarchoides* kaydı bulunmaktadır. *P. timarchoides* türünde 'mesotibianın sonu arka tarafta çıkıntılı' olması belirleyici bir özelliktir. Detaylı incelemeler, Sivas örneklerinin hepsinin bu karaktere sahip olduğunu göstermiştir. Önceden Sivas'tan yapılan literatür kaydı da göz önünde bulundurularak bu örneklerin *P. timarchoides* türüne ait olduğu belirlenmiştir.

Çamiçi, İzmir örneklerinde elitranın kubbeli kısmı humoral karinalara kadar devam etmektedir, lateral karinalar ise böceğin yanlarında kalmaktadır. Bu durum *P. subglobosa verruculifera* için belirleyici bir karakter olduğu için Çamiçi, İzmir örneklerinin tür tayinleri de bu doğrultuda yapılmıştır.

Çanakkale örneklerinde, Çamiçi, İzmir örneklerinde olduğu gibi elitranın kubbeli kısmı humoral karinalara kadar devam etmekte ve lateral karinalar böceğin yanlarında kalmaktadır. Dolayısı ile Çamiçi, İzmir ve Çanakkale örnekleri *P. s. verruculifera* olarak teşhis edilerek etiketlenmiştir. Benzer şekilde Babadağ

ve Davraz örnekleri de genel dış morfolojilerindeki bazı benzerliklere dayanarak *P. s. verruculifera* olarak etiketlenmiştir. Genel morfolojik değerlendirme sonrasında *P. s. verruculifera* olarak etiketlenen 4 farklı populasyon bulunmaktadır. *P. s. verruculifera* alt türüne dahil edilen bu örneklerde; elitra üzerindeki karina ve tüberkül yapılarının, popülasyonlar arasında varyasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bunlardan Babadağ popülasyonunda tüberküller oldukça yoğun ve kubbeli iken, diğer 3 popülasyonda tüberküller daha düzdür. Çanakkale popülasyonunda karinalar diğerlerine göre daha belirgin ve sert olarak gözlenmiştir.

Erciyes Dağı örnekleri, 1960 ve 2235 m olmak üzere iki farklı yükseklikten toplanmıştır. Farklı yüksekliklerden bireyler ayrı ayrı incelenerek genel dış morfolojileri ve aedeagus yapıları çerçevesinde *P. lendli* olarak teşhis edilmiş ve etiketlenmiştir.

Güre, Balıkesir'den toplanan bireylerin çoğunda elitra üzerindeki tüberküller arasında sık kılların bulunmasına dayanarak, bu örnekler *P. subglobosa salaria* olarak etiketlenmişlerdir. Ancak vücut üzerinde kıllara rastlanmamış olan 2 birey *Pimelia sp.* olarak etiketlenmişlerdir.

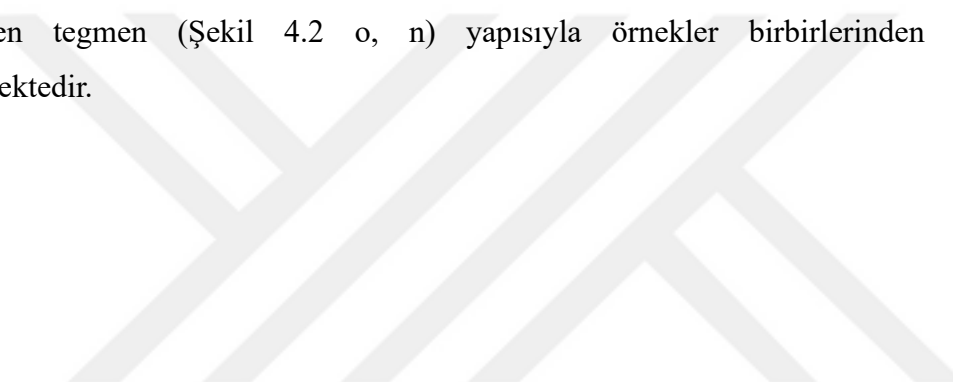
2019 yılında Meke Tuzlası, Konya'dan toplanan örnekler ilk olarak *P. a. akbesiana* olarak tanımlanmış ve bu şekilde etiketlenerek diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ancak bu örneklerin, tanı anahtarları yardımıyla dış morfolojik karakterleri ve aedeagus yapıları incelendikten sonra, Meke'den toplanan örneklerin *P. a. akbesiana* olmadığı belirlenmiştir. Tanı anahtarları, bu bireylerin hangi tür olduğu kesin olarak belirlemek için yeterli olmamıştır. Bu yüzden de 2021 yılında aynı lokaliteden tekrar toplanan örnekler *Pimelia sp.* olarak etiketlenmiştir.

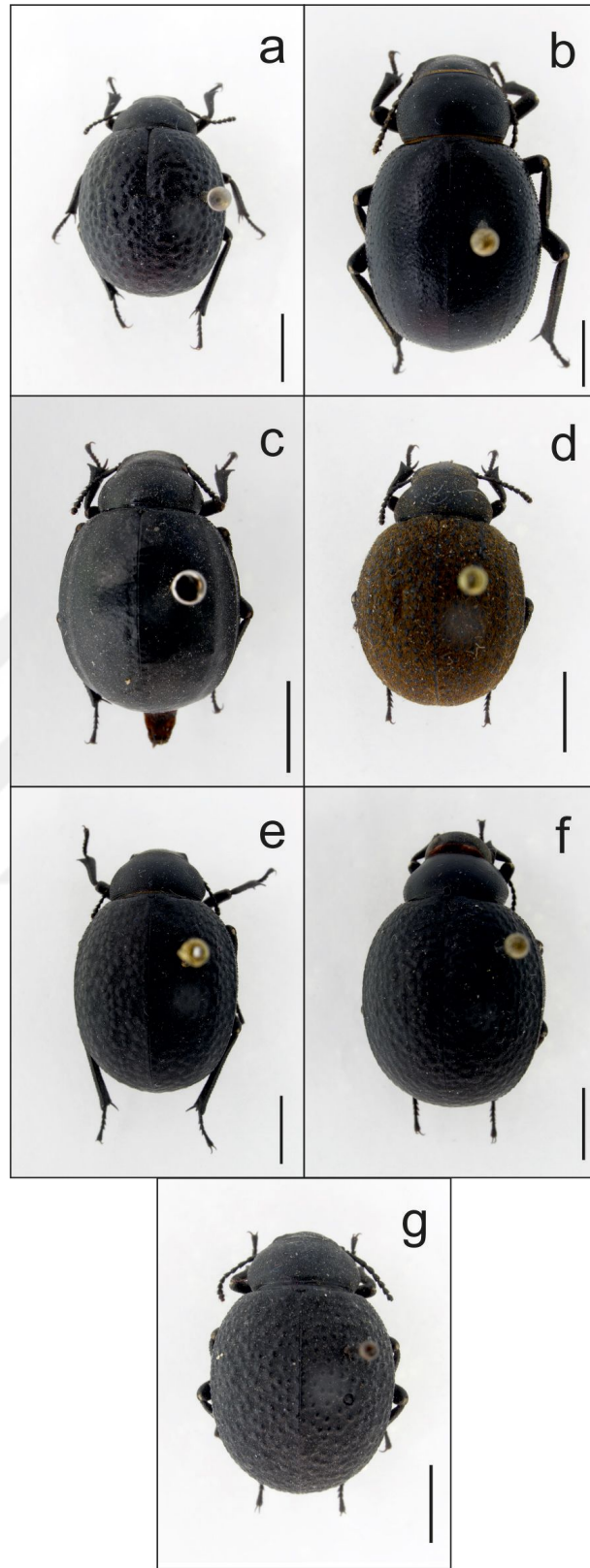
Literatür kayıtlarına göre Burdur'dan bu güne kadar *P. subglobosa salaria* ve *P. anatolica* türlerinin kaydı bulunmaktadır. Ancak elimizdeki Burdur örnekleri, tanı anahtarına uygunluk göstermemektedir. Bu yüzden örnekler, Burdur_Pimelia olarak ele alınmışlardır.

Tez çalışmasının son dönemlerinde toplanan Şeyhşaban-Kayseri, Amasya, Küçükşapçı Köyü-Balıkesir, Berendi-Karaman ve Bolkar Dağları-Niğde

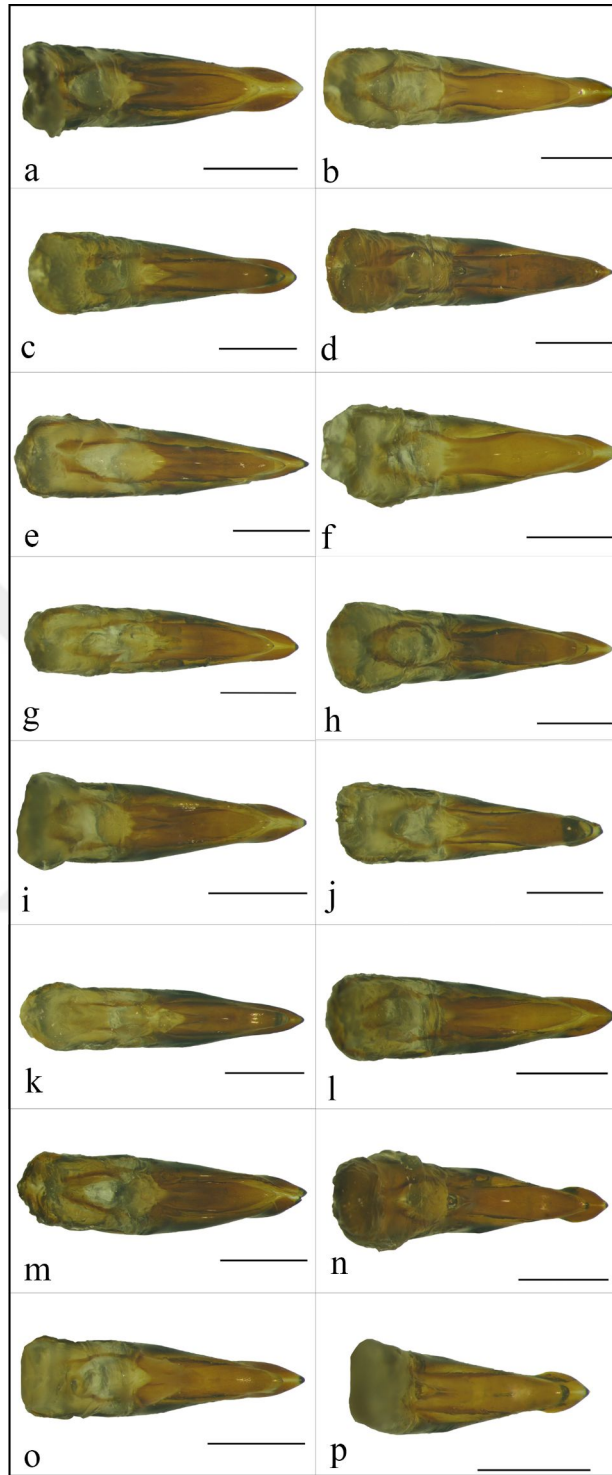
örnekleri; mevcut tanı anahtarları çerçevesinde kesin olarak teşhis edilemediklerinden dolayı *Pimelia sp.* olarak etiketlenmişlerdir.

ZDEU-Ent koleksiyonunda mevcut *Pimelia* türlerine ait örneklerin genel vücut görünüşleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Tez çalışmasında toplanan bireylere ait aedeagus yapıları Şekil 4.2’de görülmektedir.

Örneklere ait aedeagus morfolojileri incelendiğinde, bireylerin aedeagus yapılarının tegmen ve paramerik kılıf bölgelerinde çeşitli varyasyonlar gösterdiği görülmüştür. Özellikle apikalde girintili ve genişlemiş (Şekil 4.2 a, b, c, d, f, h, i, j, l, n, o, p) veya paralel (Şekil 4. 2e) uzanan paramerler ve belli oranda genişleme gösterebilen tegmen (Şekil 4.2 o, n) yapısıyla örnekler birbirlerinden ayrılabilir. 



Şekil 4.1 ZDEU-Ent koleksiyonunda bulunan türler a) *Pimelia akbesiana*, b) *Pimelia bajula*, c) *Pimelia polita*, d) *Pimelia salaria*, e) *Pimelia sublobosa*, f) *Pimelia testudo*, g) *Pimelia verruculifera* (Bar = 5mm).



Şekil 4.2 *Pimelia* örneklerinin aedeagus yapılarının ventral görünümü, a) *P.s. verruculifera* Davraz1, b) *P.s. verruculifera* Çamiçi1, c) Burdur_Pim3, d) *P. polita* Bozdağ2, e) *P.s. verruculifera* Babadağ2, f) *P.s. verruculifera* Çanakkale2, g) Amasya_Pim4 h) Küçükşapçı_Pim2, i) *P. timarchoides* Sivas1(1690m), j) *P.s. salaria* Gürel1, k) *P. timarchoides* Sivas1(1830m), l) Bolkar_Pim1, m) *P. timarchoides* Mazıkıran4, n) Meke_Pim9, o) Berendi_Pim1, p) Şeyhşaban_Pim1, (Bar = 5mm).

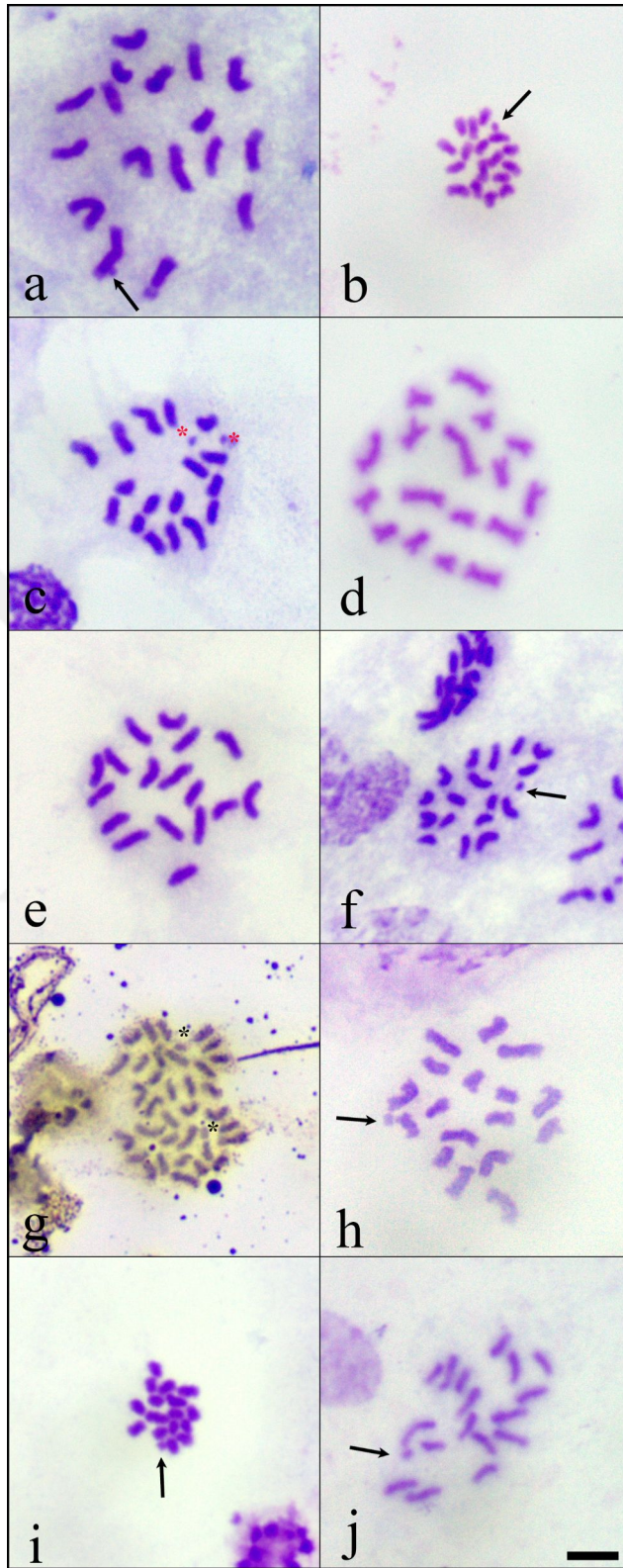
4.2 Kromozom Morfolojileri ve Sayısı

Pimelia türlerinin sitogenetik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla, ergin böceklerin gonadlarından elde edilen, mayotik ve mitotik setler incelenmiştir. Dişi bireylerin ovaryumlarında bölünür hücre sayısı az olduğundan, kromozomal analizler erkek bireylerin testislerinden elde edilen verilerle gerçekleştirilmiştir.

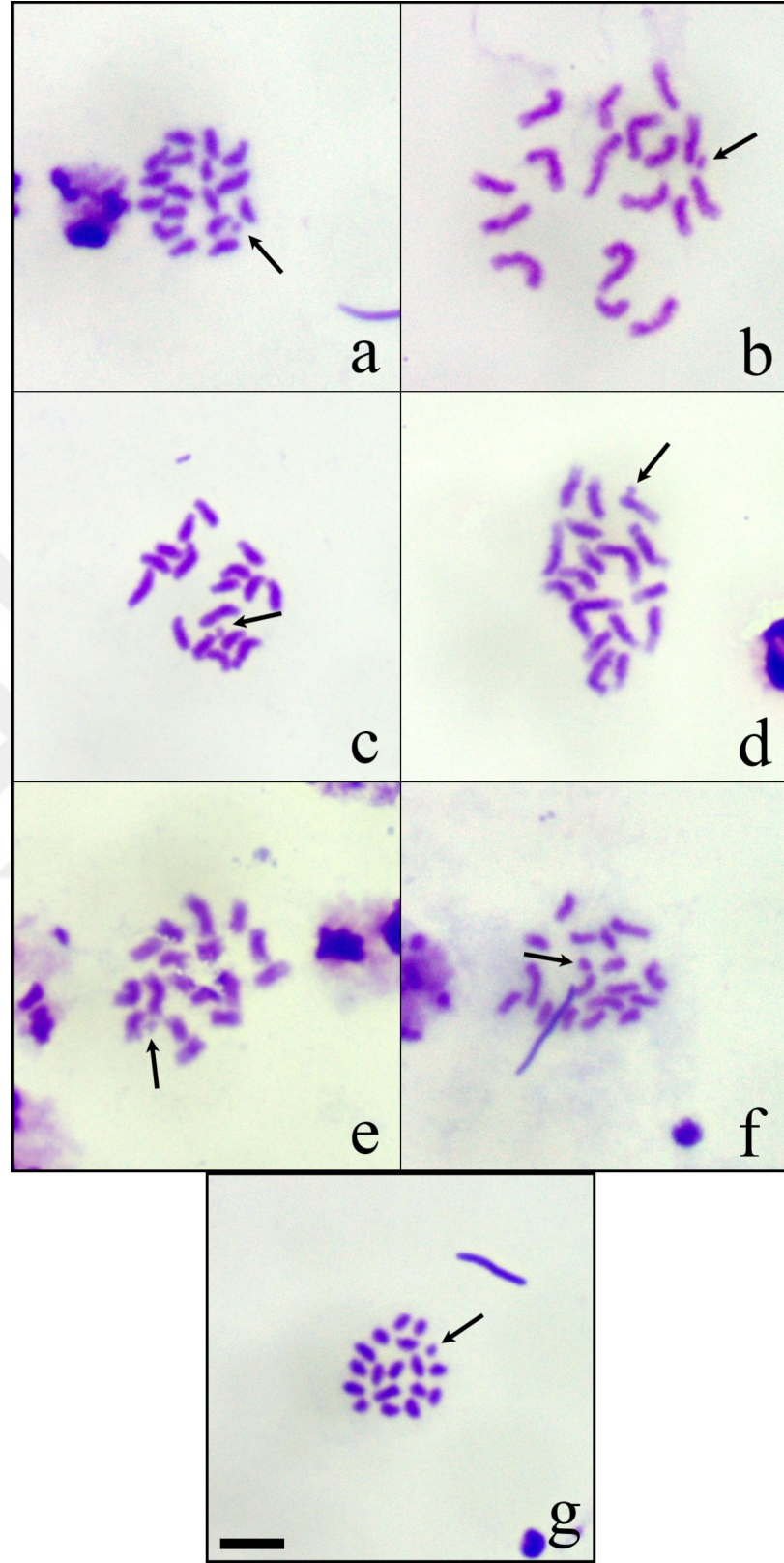
Arazi çalışmalarında toplanan örnekler, lokalitelerine göre 18 popülasyondan oluşmaktadır. Ancak moleküler veriler doğrultusunda Davraz'dan toplanan iki birey, ağaç üzerinde oldukça farklı yerlerde çıktığı için bunlar iki farklı popülasyon olarak ele alınmışlardır. Bu 19 popülasyondan tür tayinleri yapılabilenler; tür isimleri, lokaliteleri ve birey numarası (e.g. *P.timarchoides_Mazıkıran1*) ile kodlanmışlardır. Tür tayinleri yapılamamış olanlar ise, lokalite ve birey numaraları doğrultusunda isimlendirilmişlerdir (e.g. *Burdur_Pim1*).

Profaz, mayoz I, mayoz II ve mitotik metafaz setlerinin incelenebilmesi için hazırlanan preparatlara; rutin Giemsa, gümüş nitrat ve floresan DAPI boyaları uygulanmıştır. Üç boyama tekniği ve farklı evreler de göz önünde bulundurularak; örneklerin hepsinde diploid sayı $2n=18$ ve setin en küçük kromozomu y kromozomu olarak belirlenmiştir.

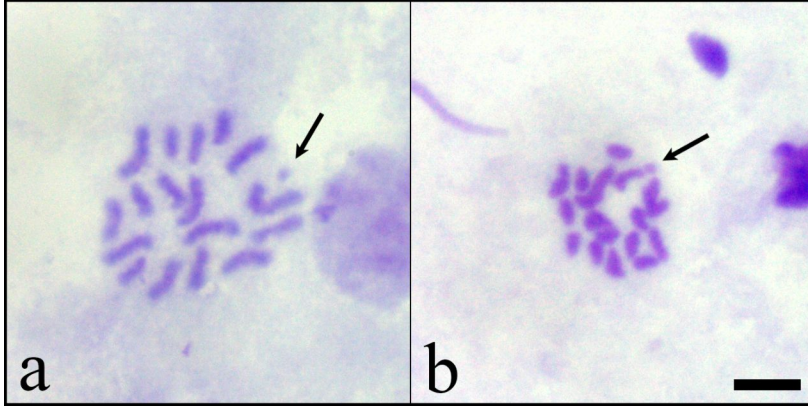
P.s.verruculifera_Çamiçi örnekleri dışında her popülasyonun mitotik metafaz setleri görüntülenebilmiştir (Şekil 4.3 – Şekil 4.5). Kimi popülasyonlarda oldukça küçük boyutlu ve nokta şekilli olan olan y, setteki diğer kromozomlarla karışıp sanki mitotik metafazda 17 kromozom varmış gibi bir görünüm yaratabilmektedir (Şekil 4.3d, e).



Şekil 4.3 Mitotik metafaz setleri a) *P.s. verruculifera*_Davraz1 b) *P.s. verruculifera*_Davraz2* c) Burdur_Pim3 +B kromozomu d) *P.s. verruculifera*_Babadağ2 e) Amasya_Pim5 f) *P. timarchoides*_Sivas1(1830m) g) *P. timarchoides*_Mazıkıran3 h) Berendi_Pim1 i) Bolkar_Pim1 j) Meke_Pim7 (siyah ok ve yıldız: y kromozomu, kırmızı yıldız: y ve B kromozomları, Bar = 5µm).



Şekil 4.4 Mitotik metafaz setleri a) *P.s.polita*_Bozddağ2 b) *P.s.verruculifera*_Çanakkale3 c) Küçükşapçı3_Pim d) Güre_Pim1 e) *P.s.salaria*_Güre1 f) *P.lendli*_Kayseri3 (1960m) g) Şeyhşaban_Pim1 (siyah ok y: kromozomu, Bar = 5μm).



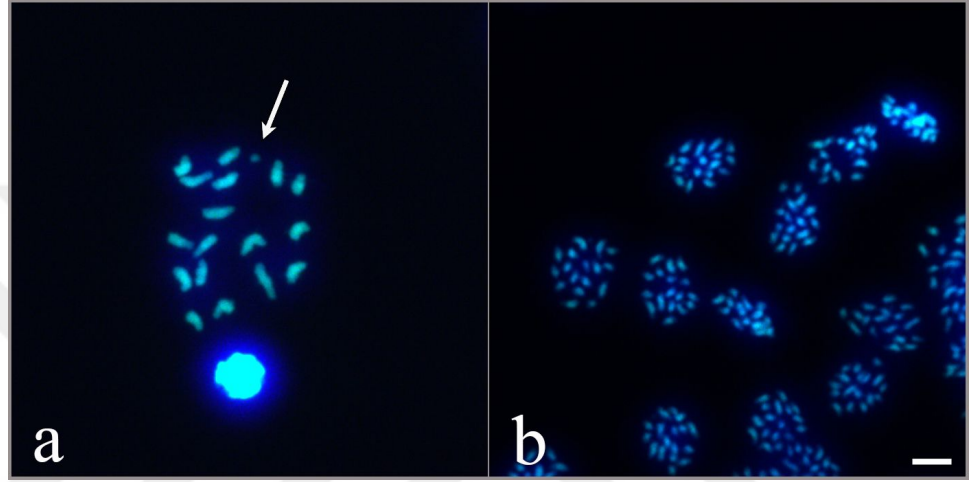
Şekil 4.5 a) *P.cursor_Iğdır4* ve b) *P.b.solieri_Hatay2* bireylerinin mitotik metafaz setleri (siyah ok: y kromozomu, Bar=5µm).

Kromozomların mitotik metafaz evresindeki şekil ve boyutlarının örnekler arasında oldukça farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Mitotik metafaz kromozomlarında, sentromer pozisyonları ve kol uzunlukları belirgin olan örneklerin karyotip analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6). Karyotipleri belirlenen 3 popülasyonda da submetasentrik X kromozomunun, setin en büyük kromozomu olduğu belirlenmiştir. y kromozomları bu üç popülasyonda da akrosentrik bir morfoloji sergilemesine rağmen *P.s.verruculifera_Babadağ2* bireyinde oransal olarak daha küçük boyutludur.



Şekil 4.6. a) *P.s.verruculifera_Babadağ2*, b) *Meke_Pim7*, c) *P.lendli_Kayseri3* (1960m) bireylerinin karyotipleri (Bar=5µm).

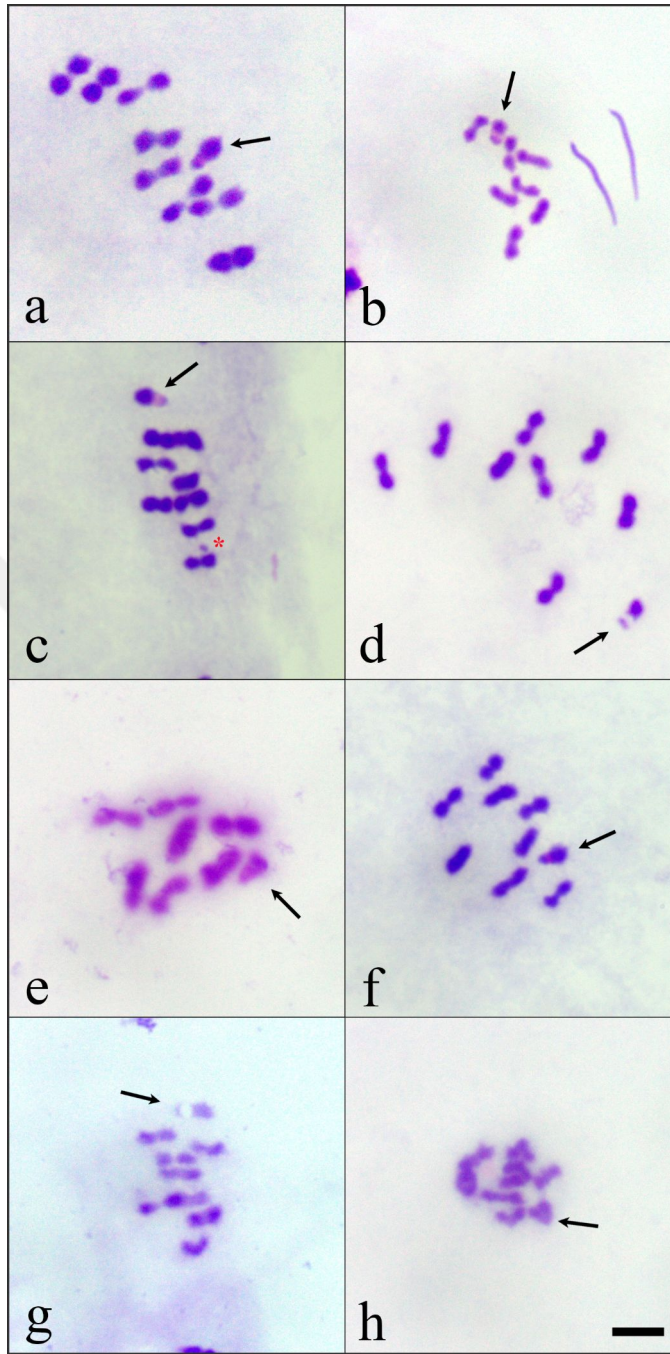
Amasya_Pim4 ve P.s.verruculifera_Çanakkale7 bireylerinin DAPI uygulamasında da mitotik metafaz setlerine rastlanmıştır. İlk bireyde nokta şekilli y dahil, tüm kromozomlar belirgin bir şekilde görülebilmektedir. P.s.verruculifera_Çanakkale7 bireyinde ise setin tamamı oldukça küçük boyutlu olduğu için nokta şekilli y fotoğraflanan setlerden yalnızca birinde çok silik bir şekilde görünmektedir (Şekil4.7).



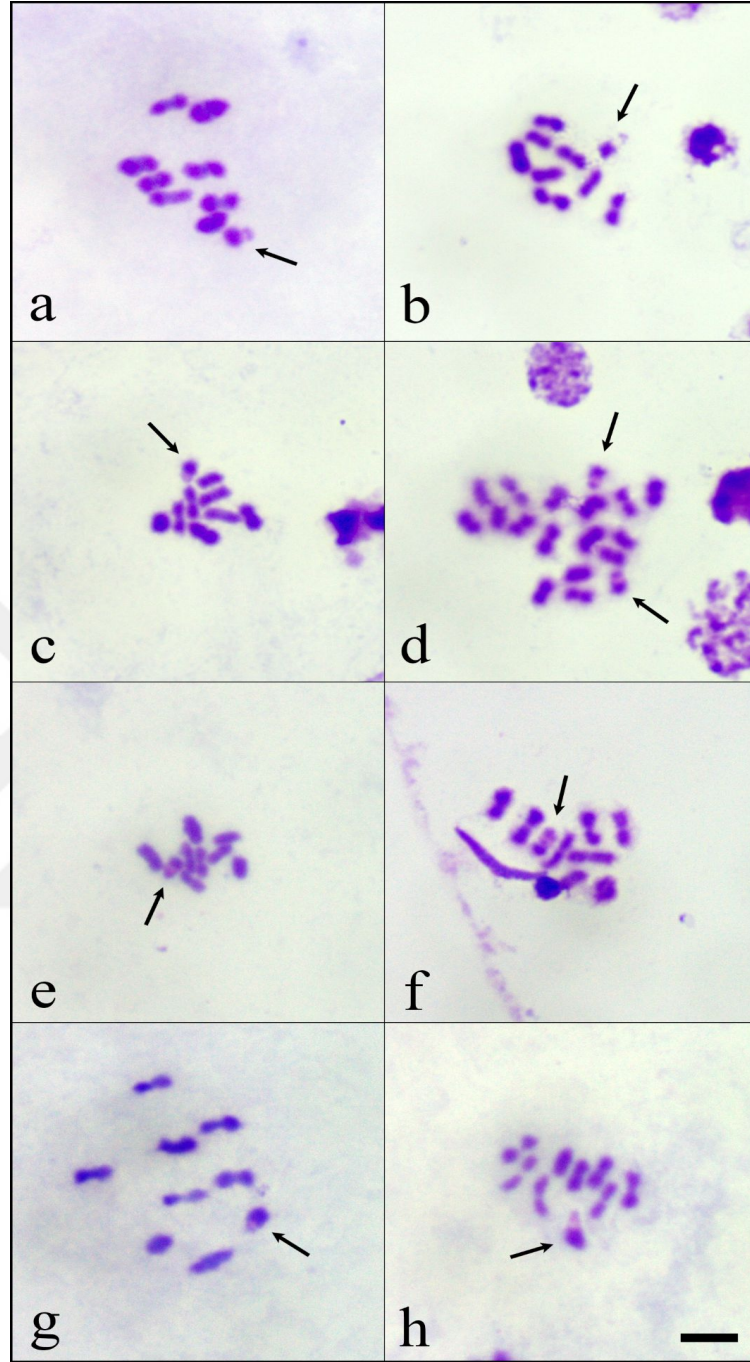
Şekil 4.7. a) Amasya_Pim4 ve b) P.s.verruculifera_Çanakkale7 bireylerinin DAPI ile boyanmış mitotik metafaz setleri (beyaz ok: y kromozomu Bar=5µm).

4.3 Cinsiyet Belirleme Sistemleri

Her bir popülasyondaki cinsiyet belirleme sistemi, metafaz I setlerinin incelenmesi sonucunda ortaya çıkartılmıştır. Bu evrede X ve y kromozomlarının sinapsis sırasındaki konfigürasyonları; çalışılan *Pimelia* türlerinde Xy_p sisteminin olduğunu göstermiştir.

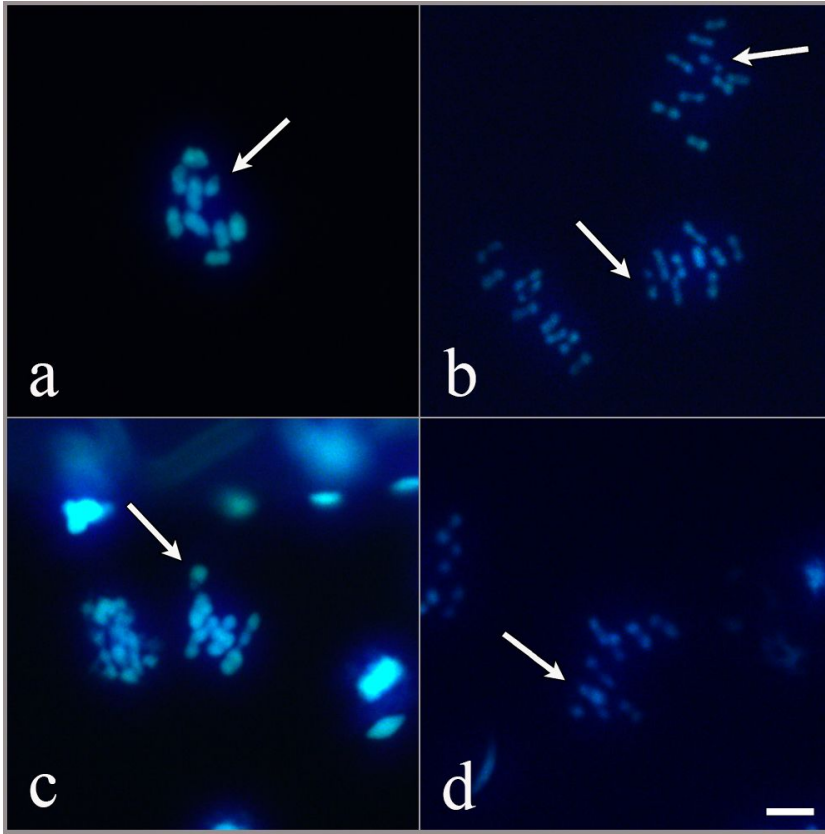


Şekil 4.8. Xy_p cinsiyet kromozomlarının gözlendiği Giemsa boyalı metafaz I setleri a) *P.s. verruculifera*_Davra1 b) *P.s. verruculifera*_Davra2 c) Burdur_Pim3 +B kromozomu d) Amasya_Pim 5 e) *P.s. verruculifera*_Babadağ2 f) *P. timarchoides*_Sivas1 (1830m) g) *P.s. verruculifera*_Çamiçil h) *P.s. polita*_Bozdağ2 (siyah ok: y kromozomu, kırmızı yıldız: B kromozomu, Bar=5µm).

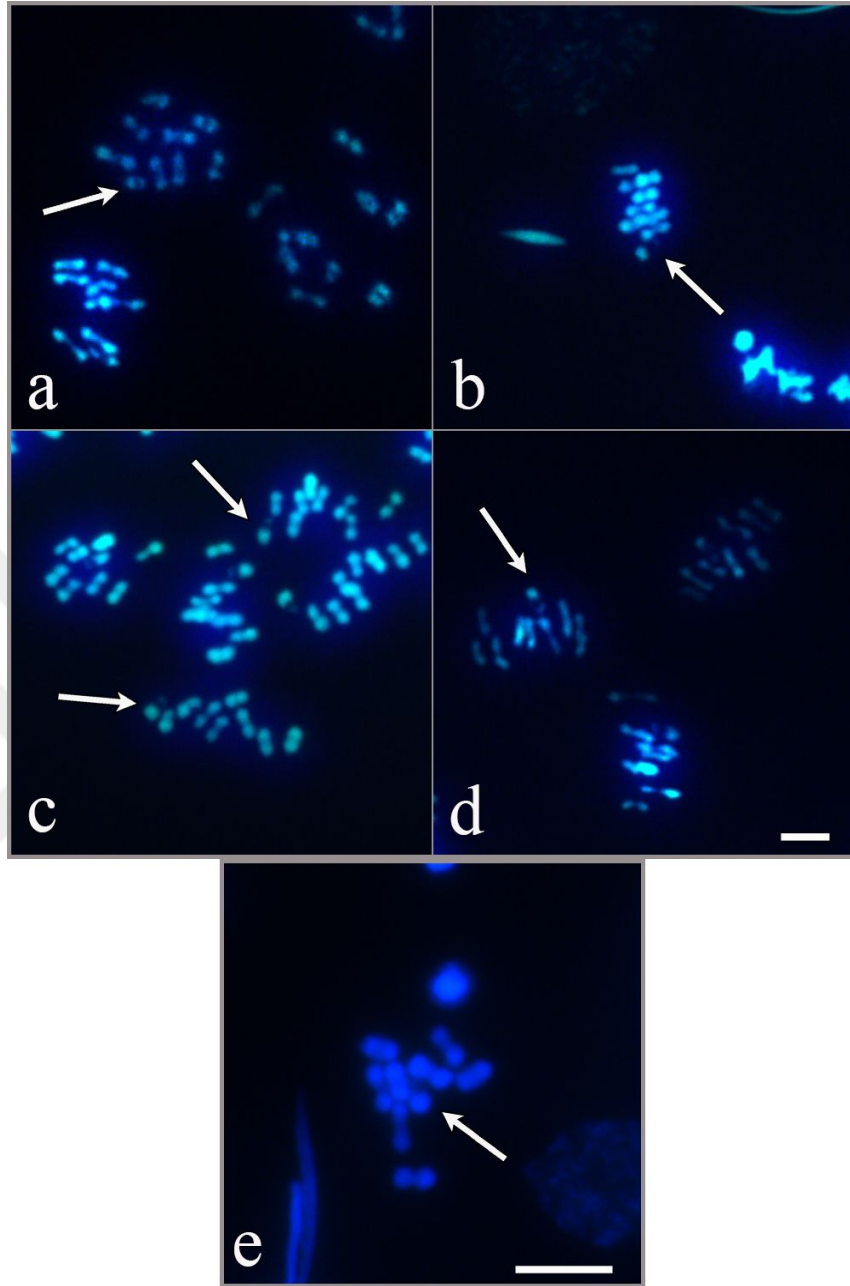


Şekil 4.9. Xy_p cinsiyet kromozomlarının gözlendiği Giemsa boyalı metafaz I setleri a) Küçükşapçı_Pim2 b) Güre_Pim1 c) P.s.salaria_Güre1 d) Bolkar_Pim1 e) P.lendli_Kayseri3 (1960m) f) Şeyhşaban_Pim1 g) P.cursor_Iğdır4 h) P.b.solieri_Hatay2 (siyah ok: y kromozomu, Bar=5µm).

Cinsiyet kromozomlarının ortaya çıkarttığı bu paraşüt benzeri yapı Giemsa (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9), gümüş nitrat (Şekil 4.23- Şekil 4.25) ve DAPI (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) boyama tekniklerinde belirgin bir şekilde görülmüştür.

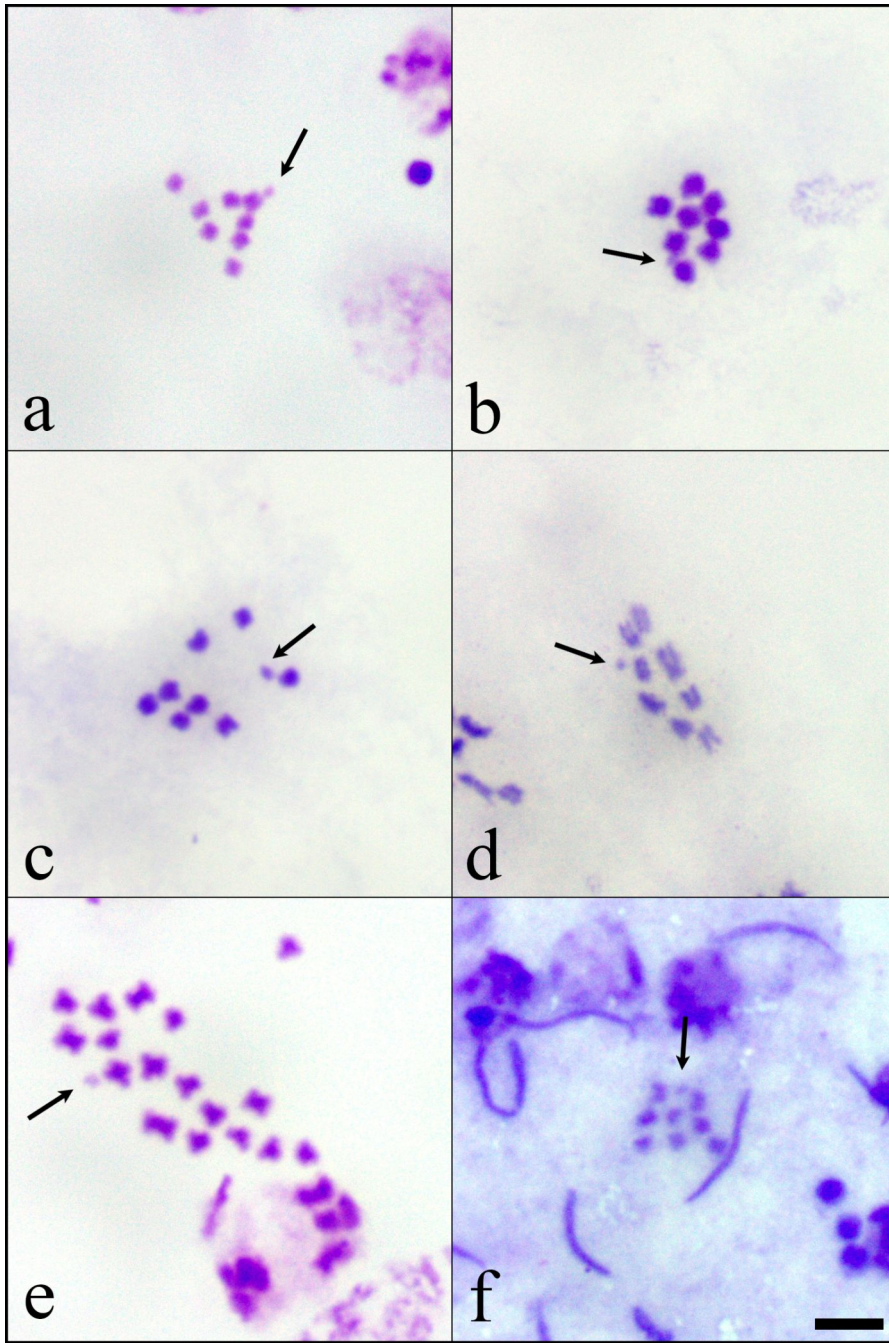


Şekil 4.10. Xy_p cinsiyet kromozomlarının gözlendiği DAPI işaretli Metafaz 1 setleri a) Amasya_Pim4 b) P.timarchoides_Mazıkıran4 c) Berendi_Pim5 d) P.s.verruculifera_Çamiçi3 (beyaz ok: y kromozomu, Bar=5µm).

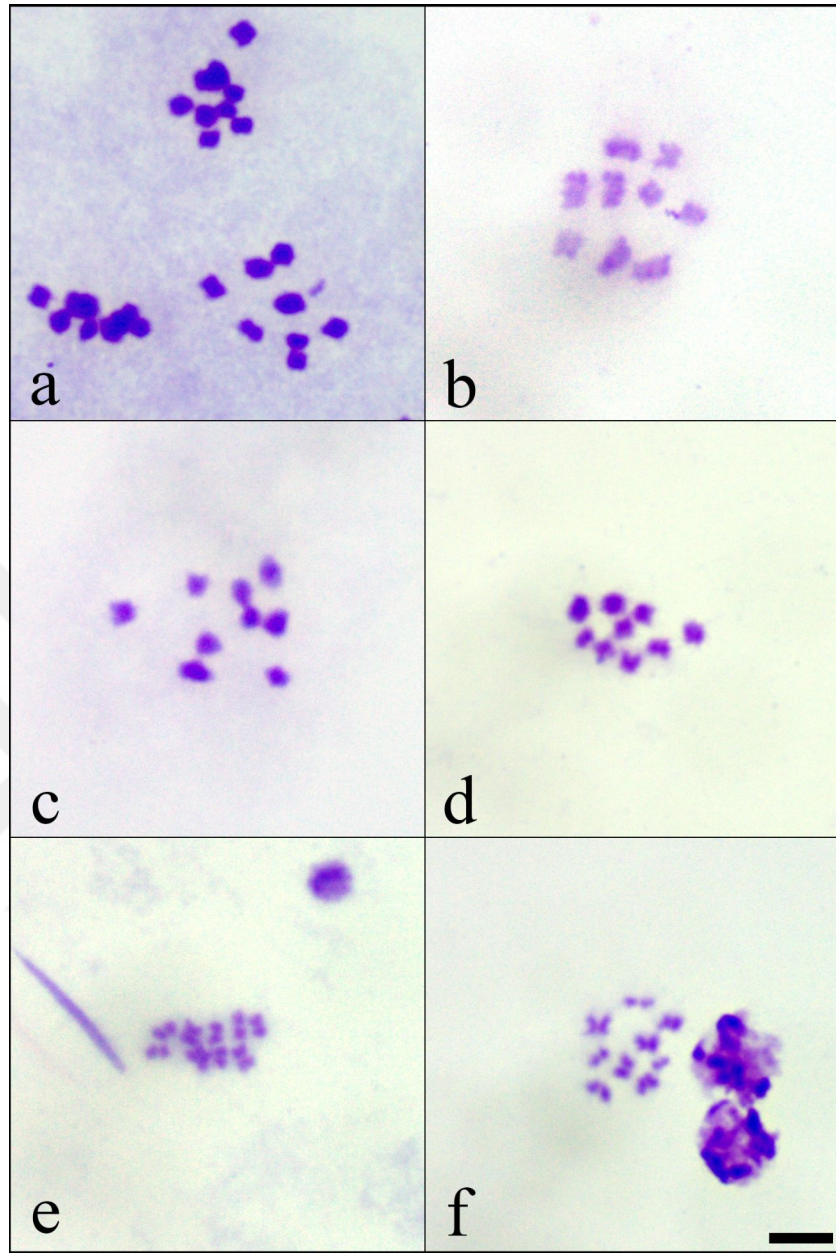


Şekil 4.11. Xy_p cinsiyet kromozomlarının gözlemlendiği DAPI işaretli Metafaz I setleri a) *P.lendli_Kayseri2* b) *P.s.verruculifera_Çanakkale7* c) *Küçükşapçı_Pim3* d) *Meke_Pim10* e) *P.s.polita_Bozdağ11* (beyaz ok: y kromozomu, Bar a-d=5 μ m, Bar e=5 μ m).

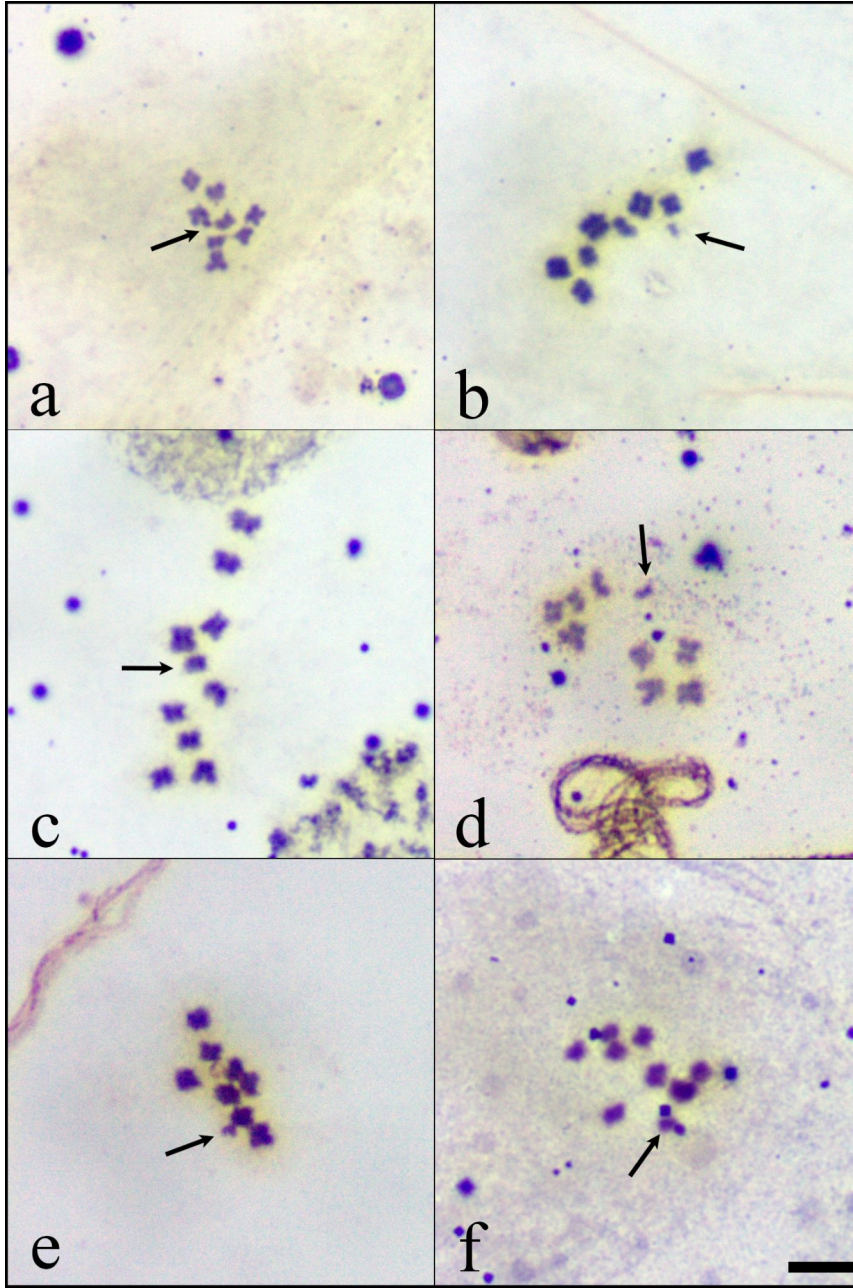
Birbirinden ayrılmış olan X ve y bivalentleri ise metafaz II evresinde, popülasyonların büyük bir çoğunluğunda görüntülenebilmiştir. X kromozomu boyut olarak otozomal kromozomlara benzerlik gösterdiği için ayırt edilemese de nokta şekilli y kromozomunu taşıyan setler Giemsa (Şekil 4.12, Şekil 4.13) ve gümüş nitrat (Şekil 4.14) boyanmış setlerde oldukça belirgindir.



Şekil 4.12. y kromozomu taşıyan metafaz II setlerinde Geimsa boyama a) *P.s. verruculifera*_Davraz2* b) *Amasya*_Pim5 c) *P. timarchoides*_Sivas1(1839m) d) *P.s. verruculifera*_Çamiçi4 e) *P.s. verruculifera*_Çanakkale2 f) *Meke*_Pim7 (siyah ok: y kromozomu, Bar = 5µm).

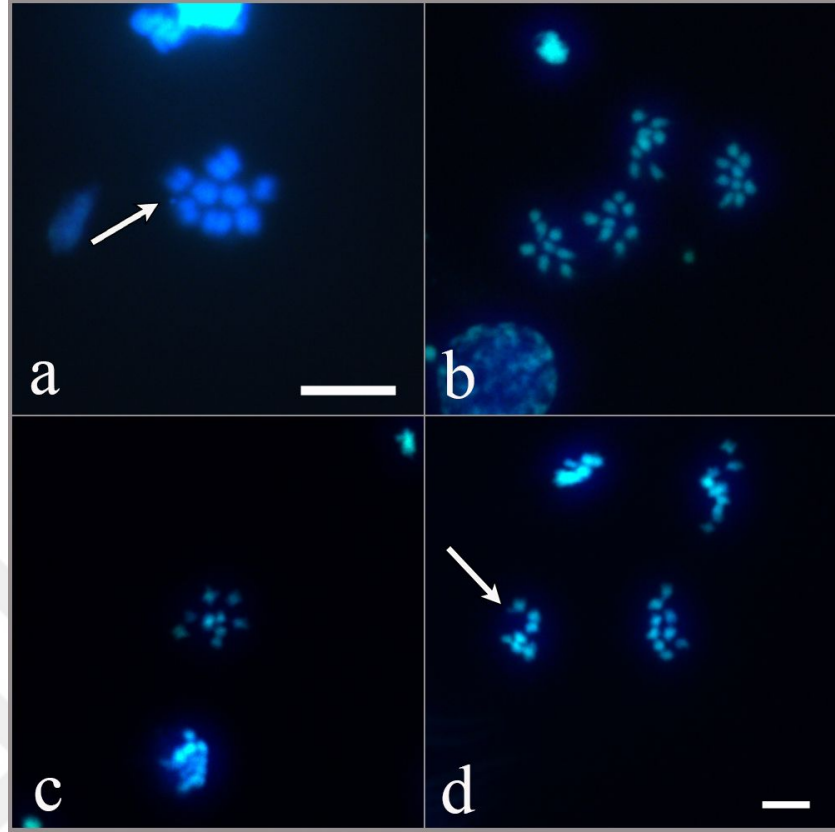


Şekil 4.13. X kromozomu taşıyan metafaz II setlerinde Geimsa boyama a) *P.s. verruculifera*_Davraz1 b) Berendi_Pim1 c) Küçükşapçı_Pim2 d) *P.s. salaria*_Güre1 e) *P.lendli*_Kayseri3 f) Şeyhşaban_Pim1 (Bar =5µm).

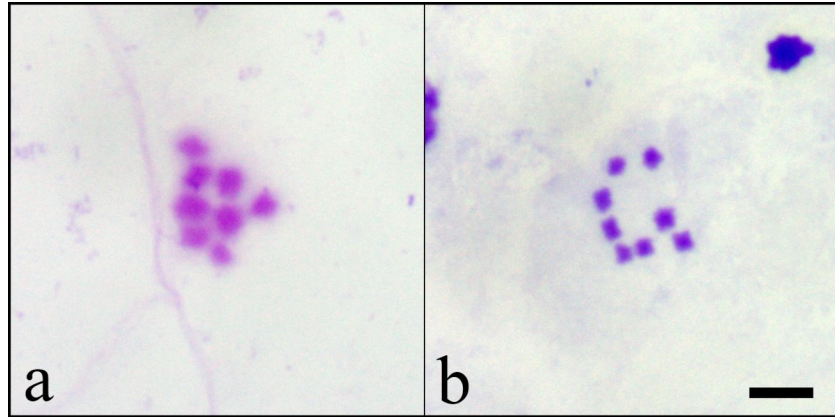


Şekil 4.14. Gümüş nitrat ile boyanmış metafaz II setleri a) *P.s. verruculifera*_Davraz2* b) *P.s. verruculifera*_Babadağ6 c) *P. timarchoides*_Sivas1 (1690m) +B kromozomu, d) *P. timarchoides*_Mazıkıran3 e) *P.s. verruculifera*_Çanakkale5 f) Güre_Pim1 (siyah ok: y kromozomu, Bar =5µm).

DAPI ile işaretlenen metafaz II setlerinde (Şekil 4.15), y kromozomu; küçük boyutlu olduğu ve diğer kromozomlara nazaran daha düşük sinyal yaydığından dolayı oldukça zor ayırt edilebilmektedir. Bunun yanı sıra Giemsa boyanmış 2 bireye ait metafaz II setlerinde de, bireylerin kromozom sayılarında herhangi bir anomali olmamasına rağmen; y kromozomları çok küçük boyutlu oldukları için kromozomların arasında kaybolmuş gibi görünmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Floresan DAPI ile işaretlenmiş metafaz II setleri a) *P.s.verruculifera*_Davraz1 b) *Amasya*_Pim4 c) *P.s.verruculifera*_Çanakkale7 d) *Küçükşapçı*_Pim3 (beyaz ok: y kromozomu, Bar =5µm; b-d aynı büyütmededir).

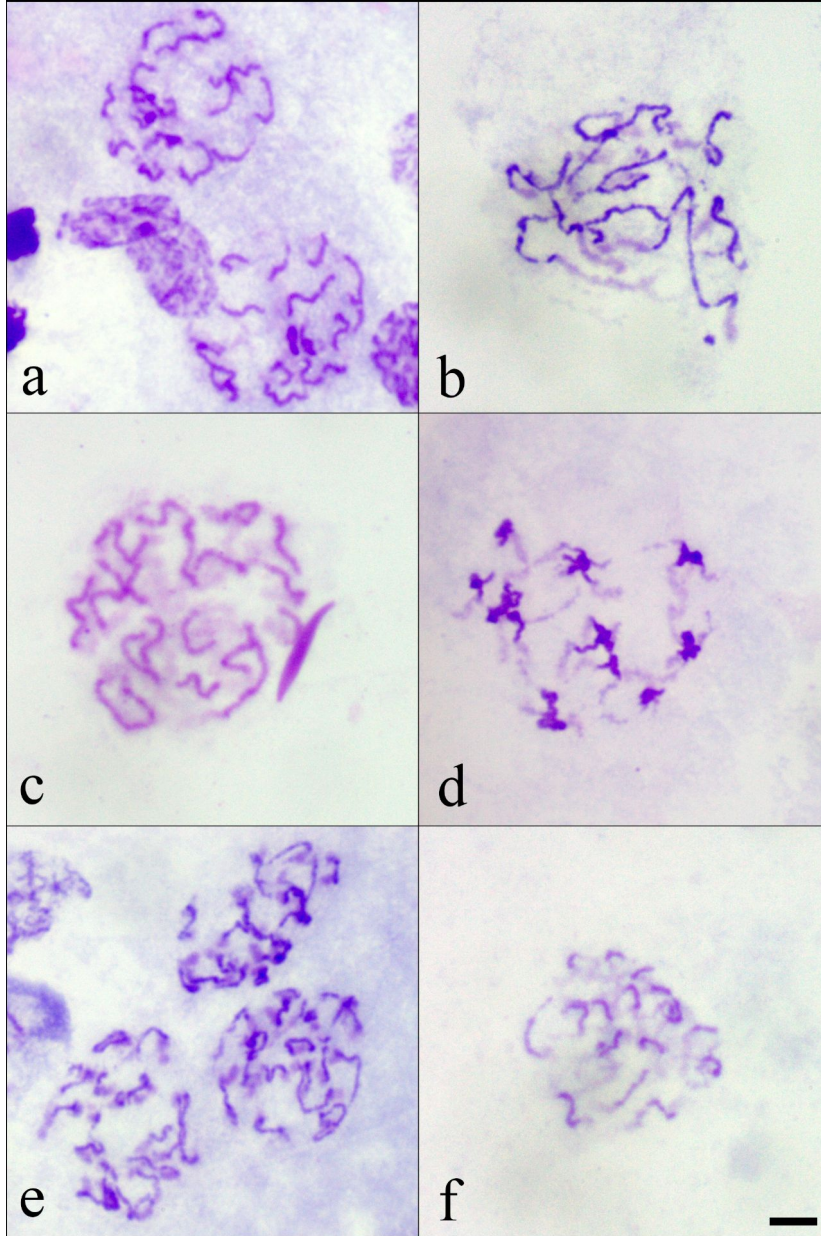


Şekil 4.16. Küçük boyutlu y kromozomu görülemediği için n=8 gibi görünen metafaz II setleri a) *P.s.verruculifera*_Babadağ2 b) *P.b.solieri*_Hatay2

4.4 Heterokromatin Dağılımları

Kromozomlardaki heterokromatin dağılımı; Giemsa, gümüş nitrat ve DAPI boyamalarıyla, profaz I evresinin pakiten ve leptoten gibi farklı alt evrelerinde gösterilmiştir.

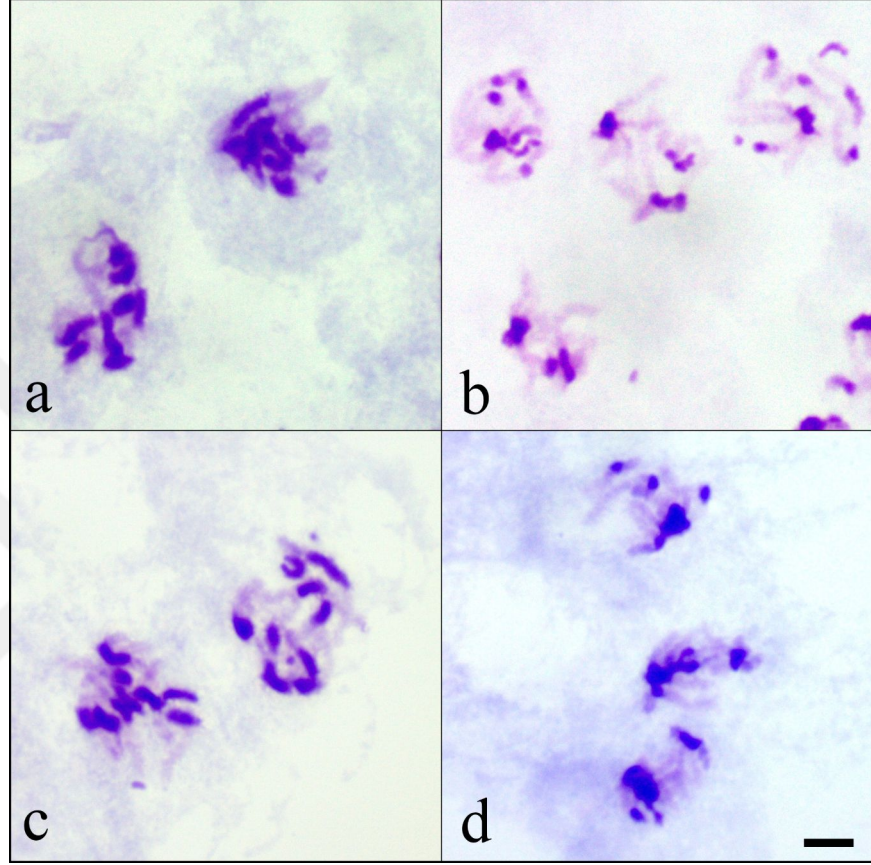
Giemsa boyanan örneklerin leptoten evrelerinde; 18 kromozomun neredeyse her biri, ince uzun ve ipliksi yapılarıyla, belirgin bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 4.17). Örneklerin çoğunda kromozomlar boylu boyunca, uniform bir şekilde boyanmış gibi görünse de, perisentromerik bölgelerin daha yoğun boyandığı özellikle Amasya_Pim5 (Bkz. Şekil 4.17d) söylenebilir.



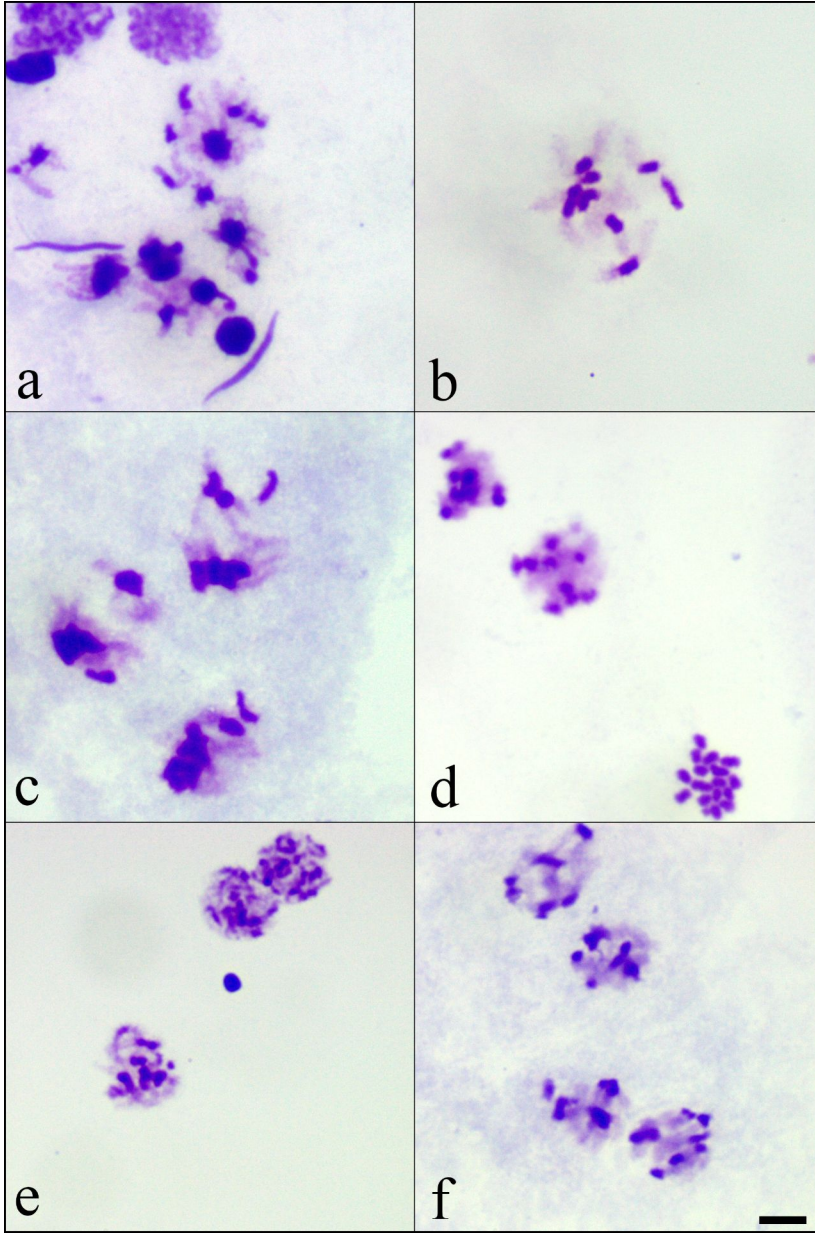
Şekil 4.17. Leptoten (profaz I) evresinde Giemsa boyama uygulaması a) P.s. verruculifera_Davraz1 b) Burdur_Pim c) P.s. verruculifera_Babadağ2 d) Amasya_Pim5 e) P.timarchoides_Sivas1(1830m) f) P.b. solieri_Hatay2 (Bar 5µm).

Homolog kromozomların eşleştiği pakiten evresinde (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19) kimi popülasyonlarda, 9 bivalentin de sentromerik bölgeleri belirgin

sinyaller vermişlerdir. Ancak bazılarında bivalentlerin bir araya toplanarak, oldukça belirgin ve yoğun 2-3 bölgede sinyal verdiği görülmüştür(Şekil 4.19a, 4.19c).

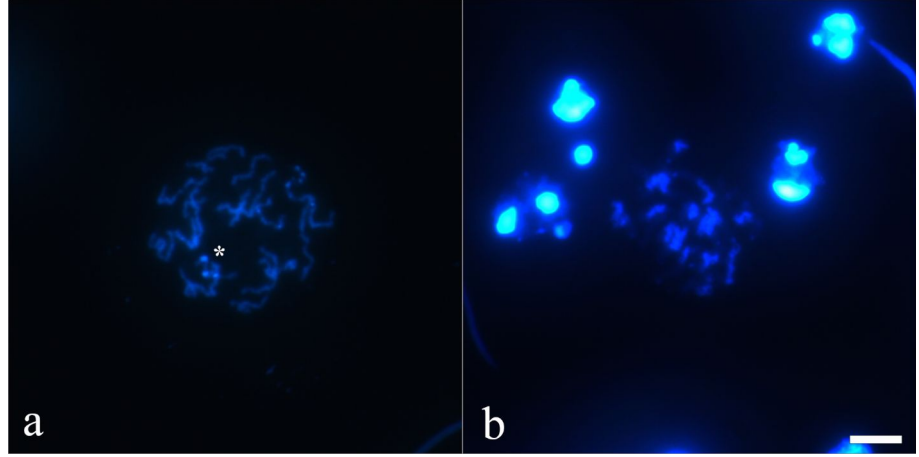


Şekil 4.18. Pakiten (profaz I) evresinde Giemsa boyama a) *P.s. verruculifera*_Davraz1 b) *P.s. verruculifera*_Davraz2* c) Burdur_Pim3 d) *P. timarchoides*_Sivas1(1830m) (Bar 5µm).

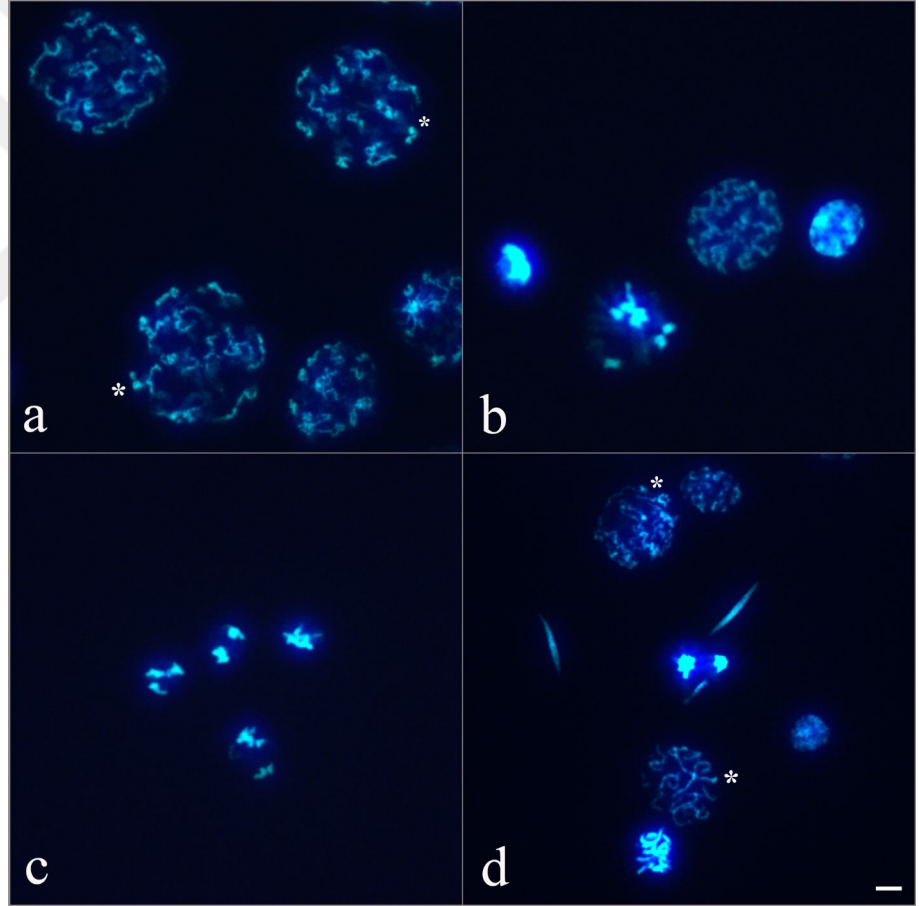


Şekil 4.19. Pakiten (profaz I) evresinde Giemsa boyama a) P.s.polita_Bozdağ2 b) P.s.verruculifera_Çanakkale2 c) Küçükşapçı_Pim2 d) Bolkar_Pim2 e) Şeyhşaban_Pim1 f) P.cursor_Iğdır4 (Bar 5µm).

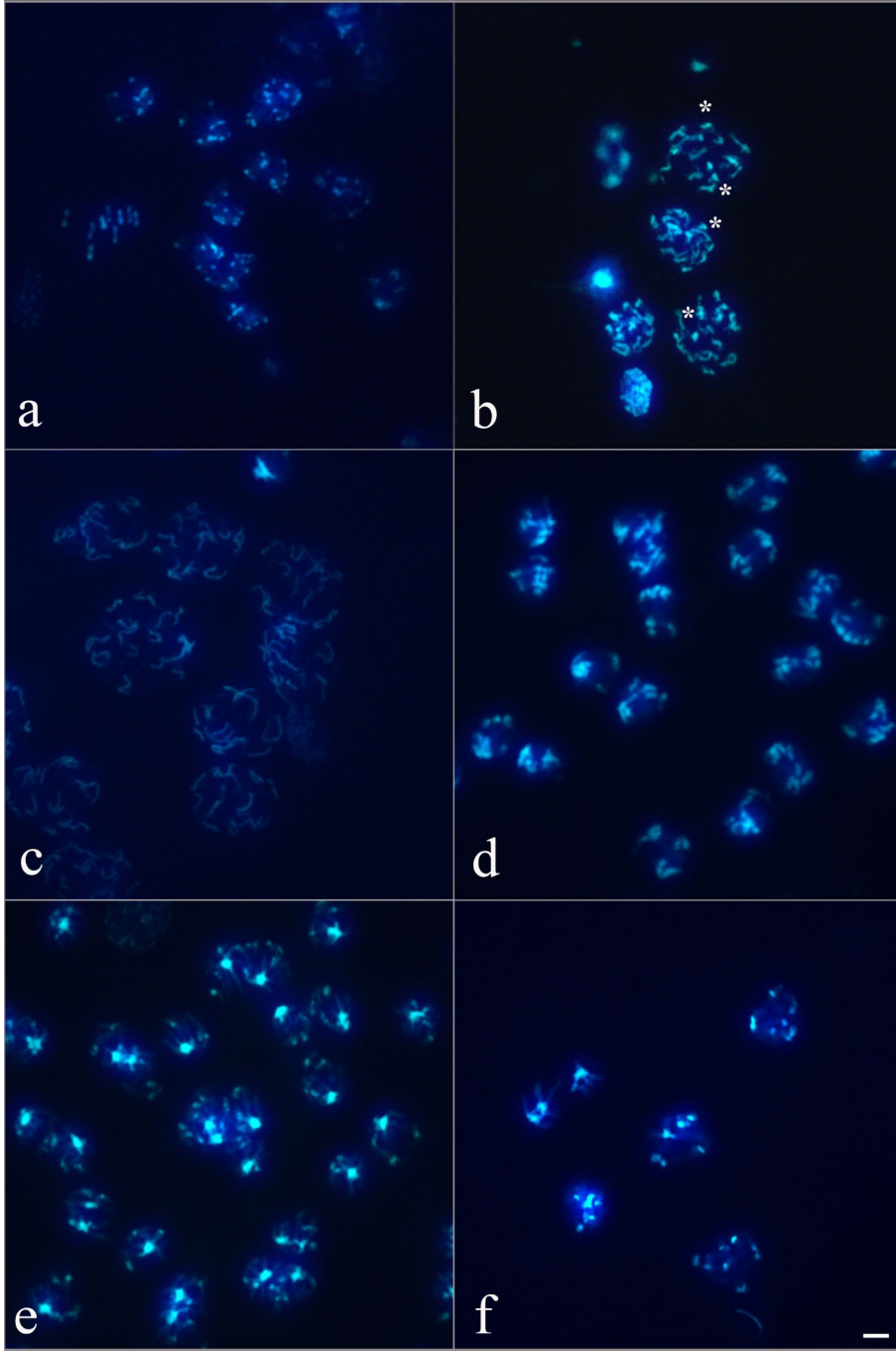
DAPI uygulanmış olan profaz I nukleuslarının pakiten evrelerinde de sentromerik bölgeler yoğun sinyaller vermişlerdir (Şekil 4.20 b, Şekil 4.21 b-d, Şekil 4.22a, Şekil 4.22 d-f). Leptoten evresinde ise bazı popülasyonlarda 1-2 adet belirgin DAPI sinyali yayan nokta gözlenmiştir (Şekil 4.20 a, Şekil 4.21 a, Şekil 4.21 d, Şekil 4.22 b).



Şekil 4.20. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a) *P.s.verruculifera*_Davraz1 ve b) *P.s.polita*_Bozdağ8 (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri, Bar 5µm).



Şekil 4.21. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a-b) *Amasya_Pim4* ve c-d) *P.s.verruculifera*_Çanakkale7 (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri, Bar 5µm).



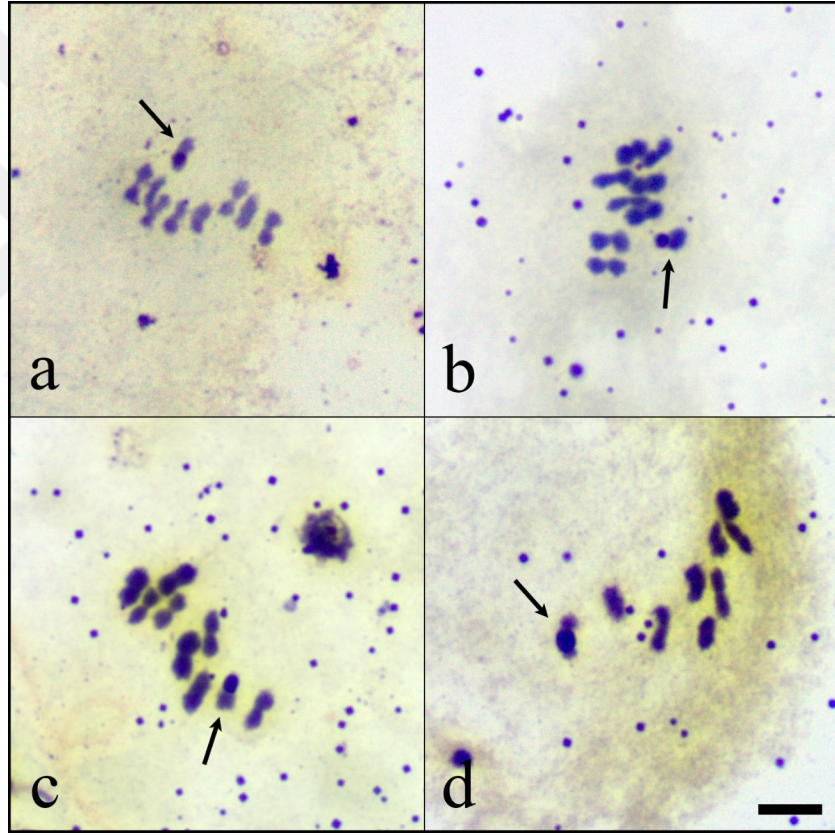
Şekil 4.22. Profaz I evresinde DAPI uygulaması a) P.timarchoides_Mazıkıran4 b) Berendi_Pim5 c) P.s. verruculifera_Çamiçi3 d) Küçükşapçı_Pim3 e) Meke_Pim10 f) P.lendli2 (2235m) (beyaz yıldız: yoğun DAPI sinyalleri, Bar 5µm).

Gümüş boyanan preparatlarda da Giemsa ve DAPI ile boyanmış setlerde olduğu gibi örneklerin büyük bir çoğunluğunda, perisentromerik bölgelerdeki heterokromatin, belirgin arjirofilik sinyaller vermiştir (Şekil 4.26 – Şekil 4.28). Farklı bir durum P.timarchoides_Sivas1(1690m) bireyinin diploten-diyakinez evresinde görülmüştür (Şekil 4.26 g). Bu evrede arjirofilik belirgin sentromerik

blokların yanı sıra telomerik bloklara sahip en az 4 çift kromozom olduğunu söylemek mümkündür.

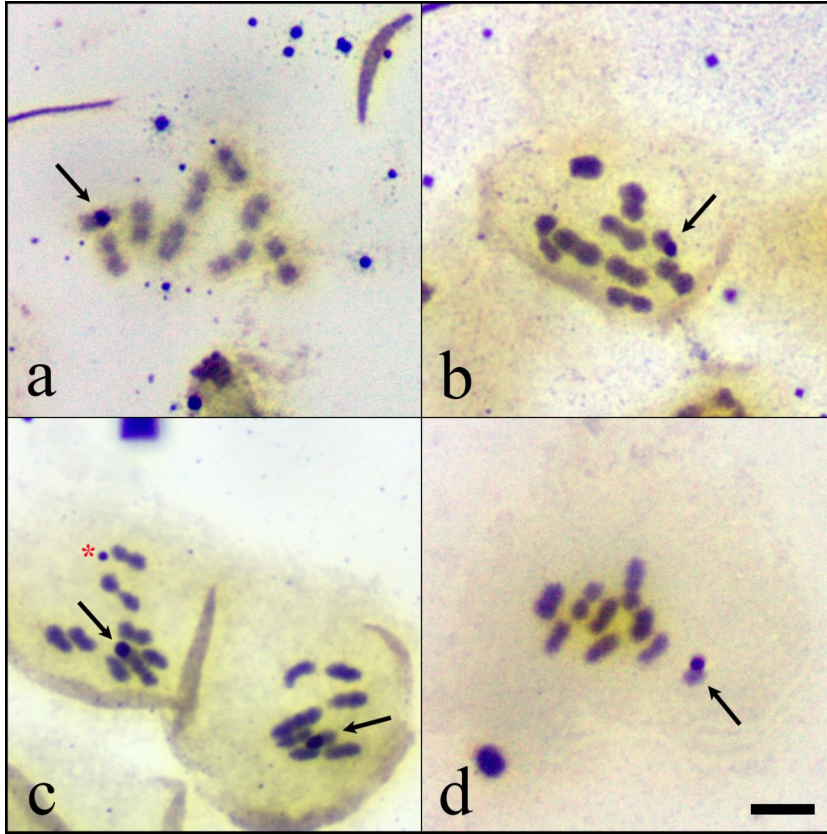
4.5 NOR Bölgeleri

Gümüş nitrat uygulaması yapılan 14 popülasyona ait preparatlar incelendiğinde; hepsinin metafaz I evresinde Xy_p bivalenti ile bağlantılı bir NOR varmış gibi görülmektedir (Şekil 4.23 – Şekil 4.25). Örneklerin çoğunda arjirofilik sinyal veren bölgeler genellikle bivalentin bir ucunda, özellikle de y kromozomunun üzerindeymiş gibi görünmektedir.

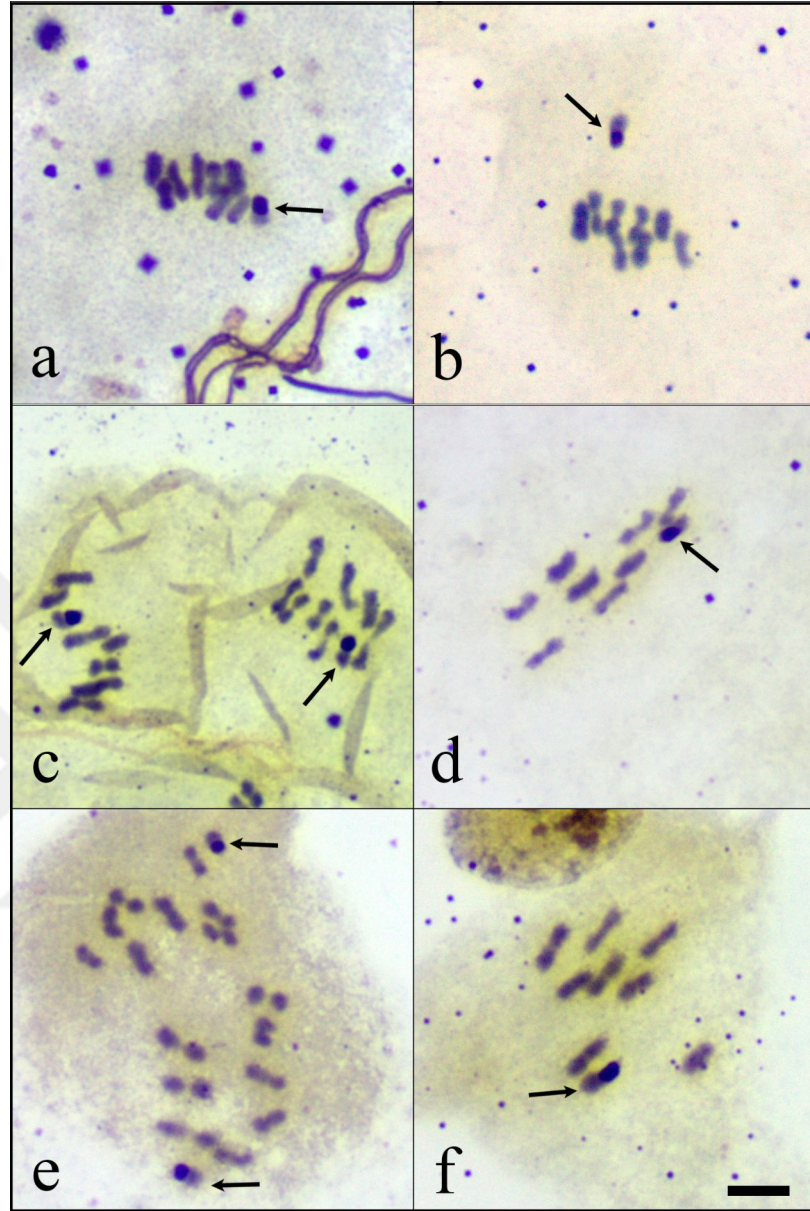


Şekil 4.23. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) *P.s. verruculifera*_Davraz2* b) *Burdur_Pim3* c) *P.s. verruculifera*_Babadağ6 d) *P.timarchoides*_Sivas1 (1690m) (siyah ok: Xy_p bivalenti, Bar 5µm).

*P.timarchoides*_Sivas1(1690m)'in metafaz I kromozomları (Bkz. Şekil 4.23 d) incelendiğinde ise yoğun sinyal veren bölgenin, X ile y arasında bir bölgeye denk geldiği görülmüştür.

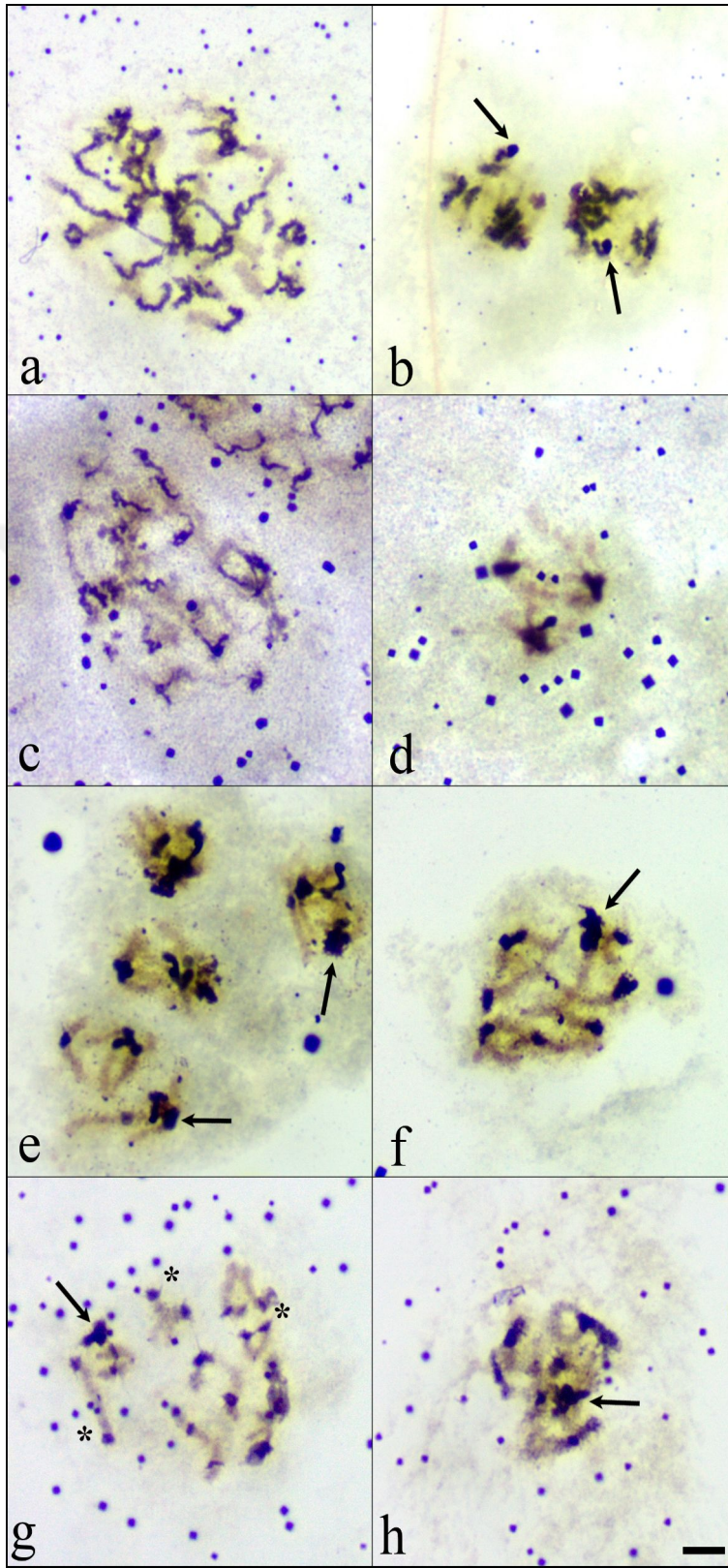


Şekil 4.24. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) *P.timarchoides*_Mazıkıran3 b) *P.s. verruculifera*_Çamiçi6 c) *P.s. polita*_Bozdağ3 +B kromozomu d) *P.s. verruculifera*_Çanakkale5 (siyah ok: Xy_p bivalenti, Bar 5 μ m).

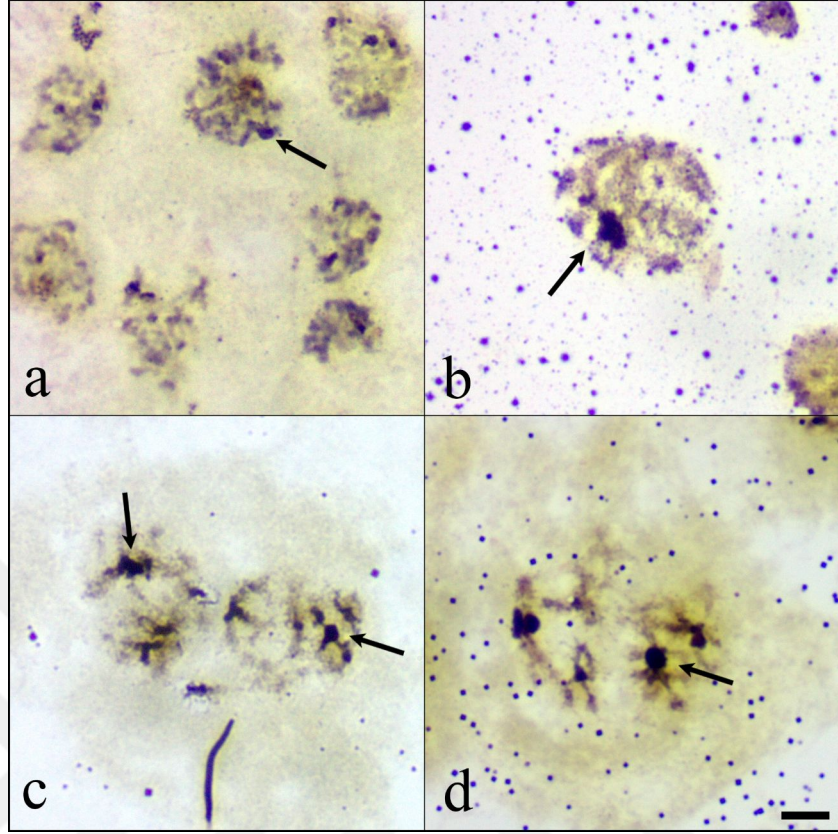


Şekil 4.25. Metafaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) Güre_Pim1 b) P.s.salaria_Güre3 c) Meke_Pim9 d) P.lendli5(1960m) e) P.cursor_Iğdır6 f) P.b.solieri_Hatay2 (siyah ok: X_y_p bivalenti, Bar 5µm).

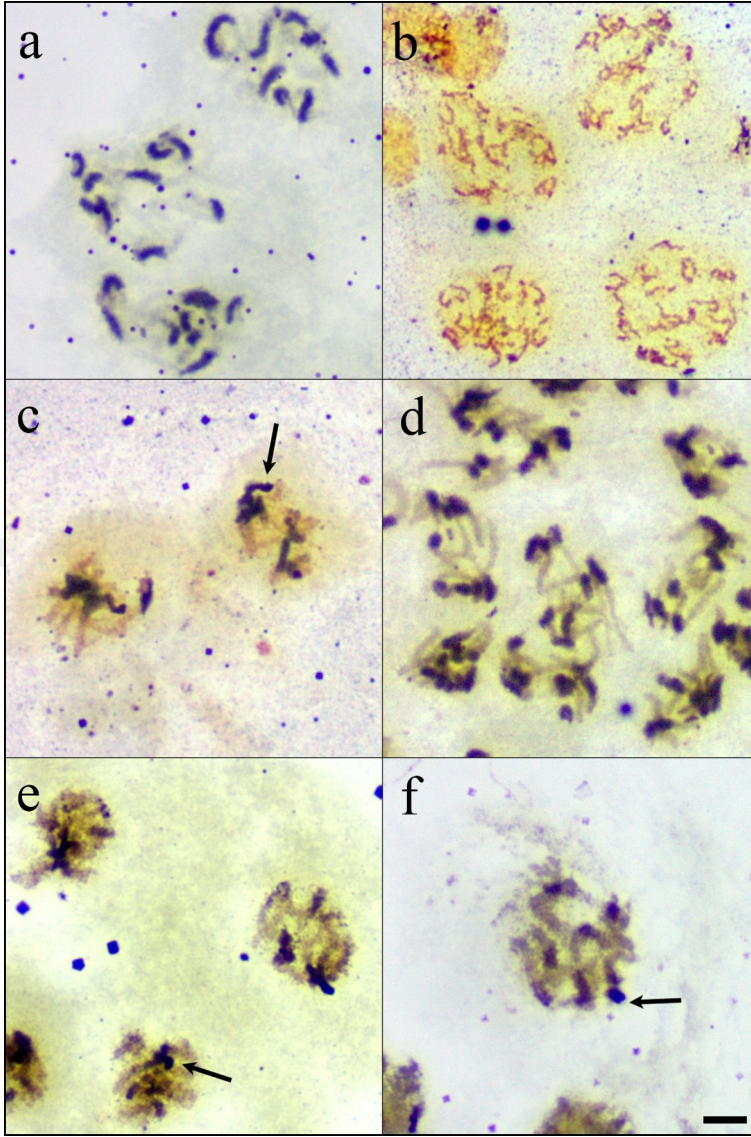
Örneklerin profaz I evrelerindeki arjirofilik, heterokromatik bölgelerin yanı sıra; setlerin birçoğunda, bir adet belirgin sinyal veren ve NOR olarak tanımlanabilecek bölgeye rastlanmıştır (Şekil 4.26 – Şekil 4.28).



Şekil 4.26. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a - b) *P.s. verruculifera* Babadağ6 c- d) Güre Pim1 e-f) *P.s. polita* Bozdağ3 g-h) *P. timarchoides* Sivas1(1690m) (siyah ok: olası NOR bölgesi, yıldız: telomerik heterokromatin, Bar 5µm)



Şekil 4.27. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) *P.s.verruculifera_Davraz2** b) *P.timarchoides_Mazıkıran3* c) *P.lendli_Kayseri5* (1960m) d) *P.b.solieri_Hatay2* (siyah ok: olası NOR bölgesi, Bar 5µm).



Şekil 4.28. Profaz I evresinde gümüş nitrat uygulaması a) Burdur_Pim3 b) Berendi_Pim4 c) *P.s. verruculifera*_Çamiçi6 d) *P.s. verruculifera*_Çanakkale5 e) Meke_Pim9 f) *P.cursor*_Iğdır6 (siyah ok: olası NOR bölgesi, Bar 5µm).

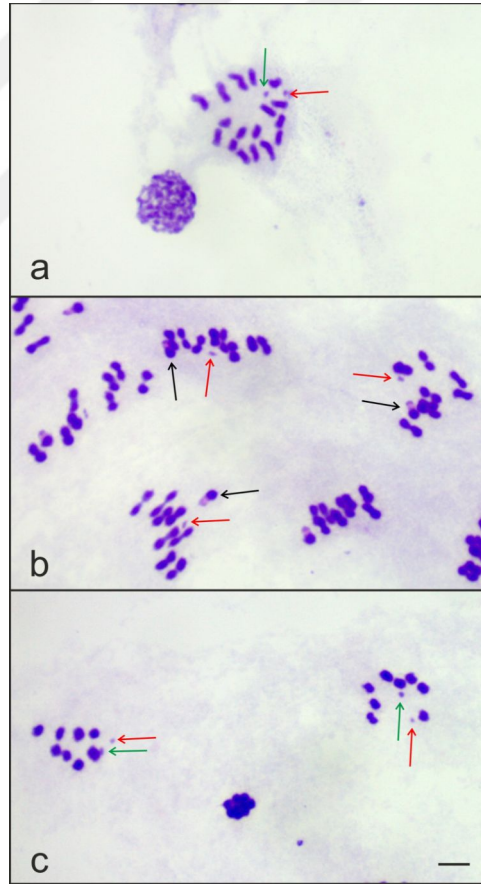
4.6 B Kromozomları

Bazı bireylere ait preparatlarda, normal kromozom sayısından sapmalar olduğu gözlemlenmiştir. Normal cinsiyet kromozomlarına ve Xy_p konfigürasyonuna sahip olan bu örneklerde, diploid sayı $2n > 18$ olarak belirlenmiştir. Bu bireylerin mitotik metafaz, metafaz I ve metafaz II evreleri incelendiğinde, setlerde ekstra kromozomal yapılar olduğu belirlenmiştir. Bu durum; Burdur_Pim3 (Şekil 4.29), *P.timarchoides*_Sivas1(1690m) (Şekil 4.30) ve

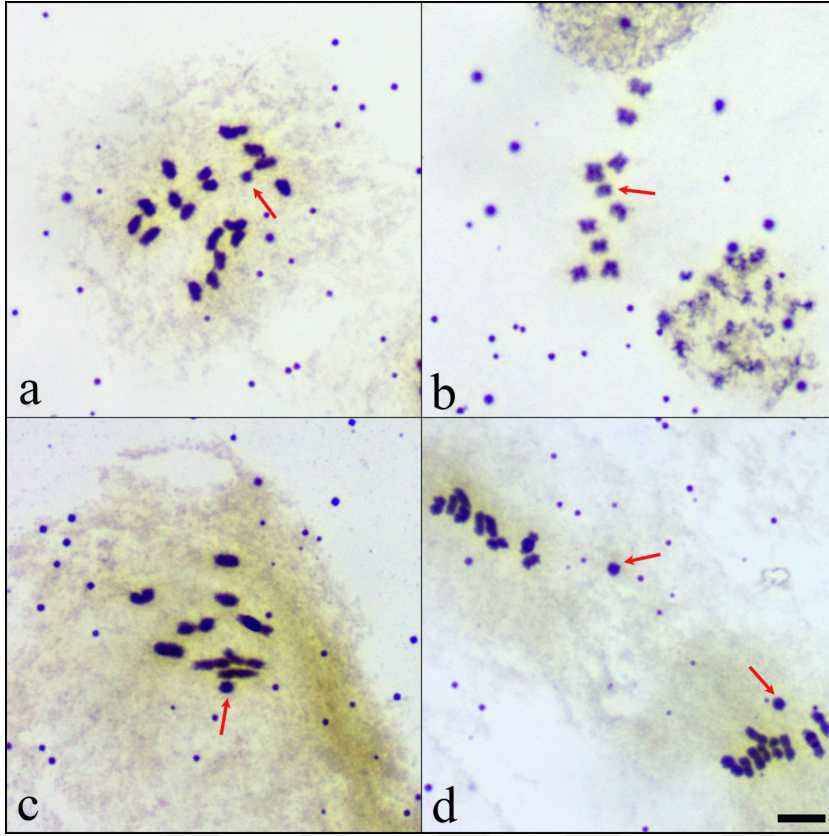
P.s.polita_Bozdağ3 (Şekil 4.31) bireylerinin farklı evrelerinde belirgin bir şekilde görülebilmektedir.

Öncelikle, benzer boyutlarda oldukları için bunların, anomali kaynaklı ikinci birer y kromozomu olabileceği düşünülmüştür. Ancak evreler dikkatli bir şekilde incelendiğinde, bu ekstra-kromozomal yapının, kimi örnekte y kromozomundan biraz daha küçük ve silik boyanmış olduğu gözlenebilmektedir. Ayrıca ekstra kromozomal yapıların, metafaz I evresinde seks bivalentlerinin (Xy_p) yapısına katılmaması da bunun ikinci bir y değil, B kromozomu olduğunu düşündürmüştür.

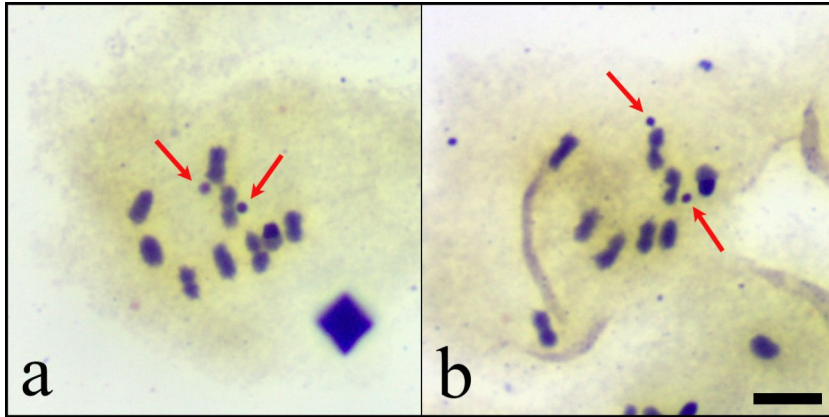
Bahsi geçen üç bireyden ilk ikisinde 1 adet ekstra-kromozomal yapı varken, P.s.polita_Bozdağ3 bireyinde 2 adet ekstra-kromozomal yapıya rastlanmıştır.



Şekil 4.29. Burdur_Pim3 bireyinde rutin Giemsa boyamasında B kromozomları a) mitotik metafaz, b) metafaz I, c) metafaz II evreleri (kırmızı ok: B kromozomu, yeşil ok: y kromozomu, siyah ok: Xy_p , Bar = 5µm).



Şekil 4.30. *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* bireyinde gümüş nitrat uygulamasında B kromozomları a) mitotik metafaz, b) metafaz II, c-d) metafaz I (kırmızı ok: B kromozomu, Bar = 5µm).



Şekil 4.31. *P.s.polita_Bozdağ3* bireyinde gümüş nitrat uygulamasında B kromozomları a-b) metafaz I (kırmızı ok: B kromozomu, Bar = 5µm).

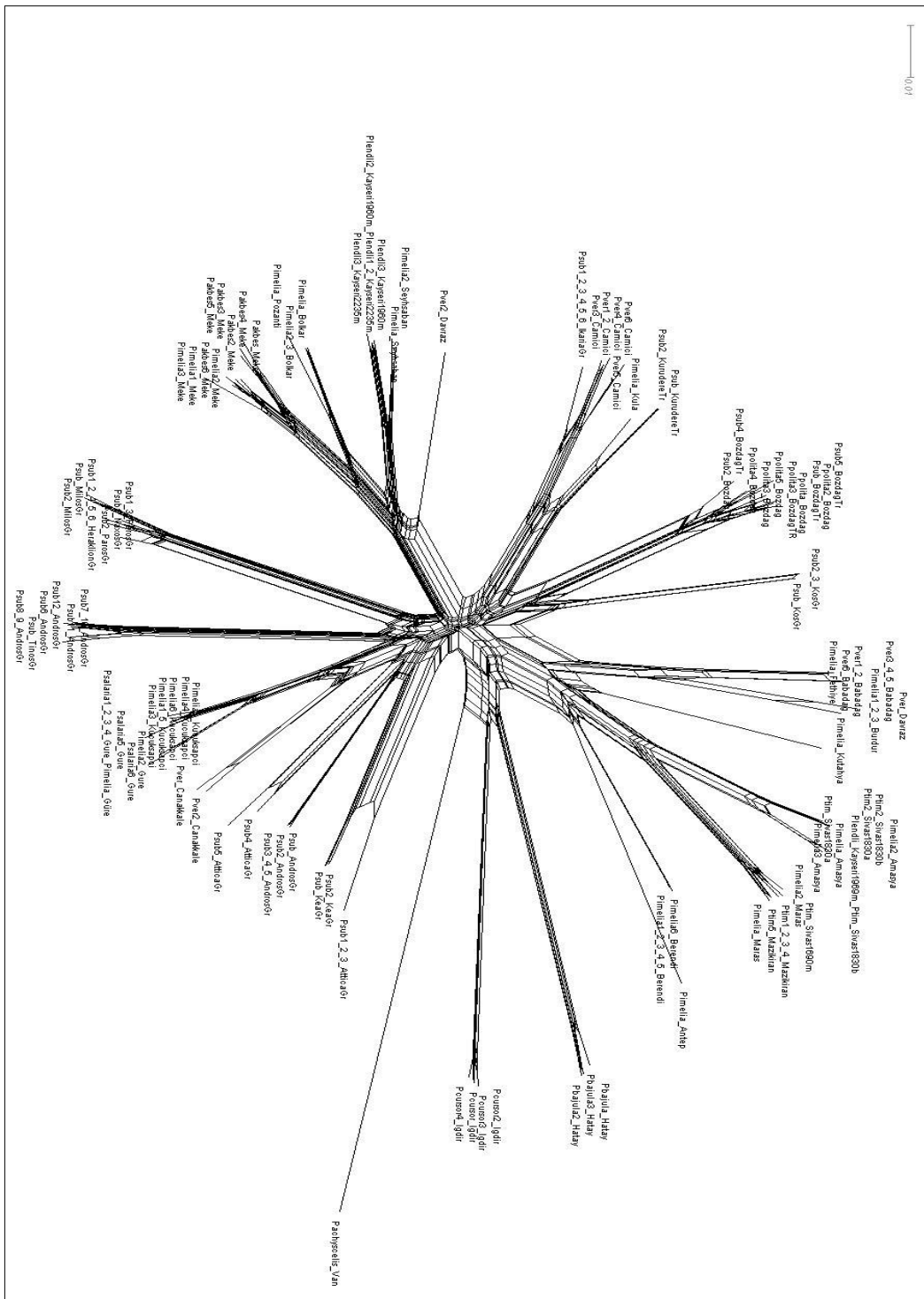
Dolayısıyla Burdur_Pim3 ve *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* için $2n=19$ (8+B+Xyp), *P.s.polita_Bozdağ3* bireyleri için ise $2n=20$ (8+2B+Xyp) formülü verilebilir. Örneklerde rastlanan B kromozomu yapılarından en büyük boyutlu olanı *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* bireyinde gibi görünmektedir.

4.7 Filogenetik Analizler

Pimelia örneklerinin 829 bç uzunluğundaki mtCOI gen bölgesi için en uygun baz değişim modelini belirlemek üzere JModelTest 2.1.6 (Posada, 2008) programında gerçekleştirilen analizlerde, AIC (Akaike information criterion) ve BIC (Bayesian information criterion) altında, TPM2uf+I+G modeli desteklenmiştir. Bu model altında baz substitüsyon oranları; R[AC]= 2.1762, R[AG]= 31.435, R[AT] = 2.176, R[CG] = 1.00, R[CT] = 31.435, R[GT] = 1.00 olarak, invaryant bölgelerin oranı (p-inv) = 0.6270 ve gamma=1.1450 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, filogenetik analizlerin başlangıcında veri setine en iyi uyum sağlayan modelin seçilmesi için önerilen modele ait parametre değerleri, tekrarlı ağaç aramalarında kullanılmıştır. Tekrarlı ağaç aramalarına ait *.log dosyaları Tracer v1.6 (Rambaut ve Drummond, 2009) programında karşılaştırılarak, HKY ve GTR (ESS > 200) modelleri, ileri filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

829 bç uzunluğundaki *Pimelia*- COI dizileri içinde toplam 302 segregasyon bölgesi ve 99 haplotip belirlenmiştir. Anadolu *Pimelia* türlerine ait 74 yeni haplotip Ege Adaları örnekleriyle paylaşılmamaktadır. Diziler içerisinde 265 parsimoni informative bölge ve 37 tane tekli değişim bölgesi bulunmaktadır. COI dizileri içerisinde toplamda 454 olarak belirlenmiş olan mutasyonların 282'si sinonim baz değişimleriyle ilişkilidir.

COI lokusu için oluşturulan haplotip ağacı (Şekil 4.32) toplam mutasyonların sayısına bağlı olarak kompleks bir yapılanma sergilemektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde aynı bölge ya da alandan toplanmış olan örneklerin birlikte kümелendiği belirlenmiş olsa da bazı örneklerin morfolojik tür tanımlamasından farklı şekilde diğer örneklerle bir arada kümелendiği gözlemlenmektedir. *P. s. verruculifera* olarak teşhis edilmiş olan Davraz örneklerinin haplotip ağacı üzerinde birbirlerin oldukça uzak iki ayrı soy hattında yer aldığı görülmektedir. Mevcut morfolojik tanı anahtarlarına göre teşhisi yapılamayarak *Pimelia sp* olarak etiketlenmiş olan örneklerden biri (Pim_Güre1), *P. s. salaria* olarak teşhis edilmiş olan örneklerle birlikte kümelenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. SplitsTree programında çizdirilen *Pimelia* örneklerinin haplotip ağacı.

4.7.1 Tür sınırlarının belirlenmesi

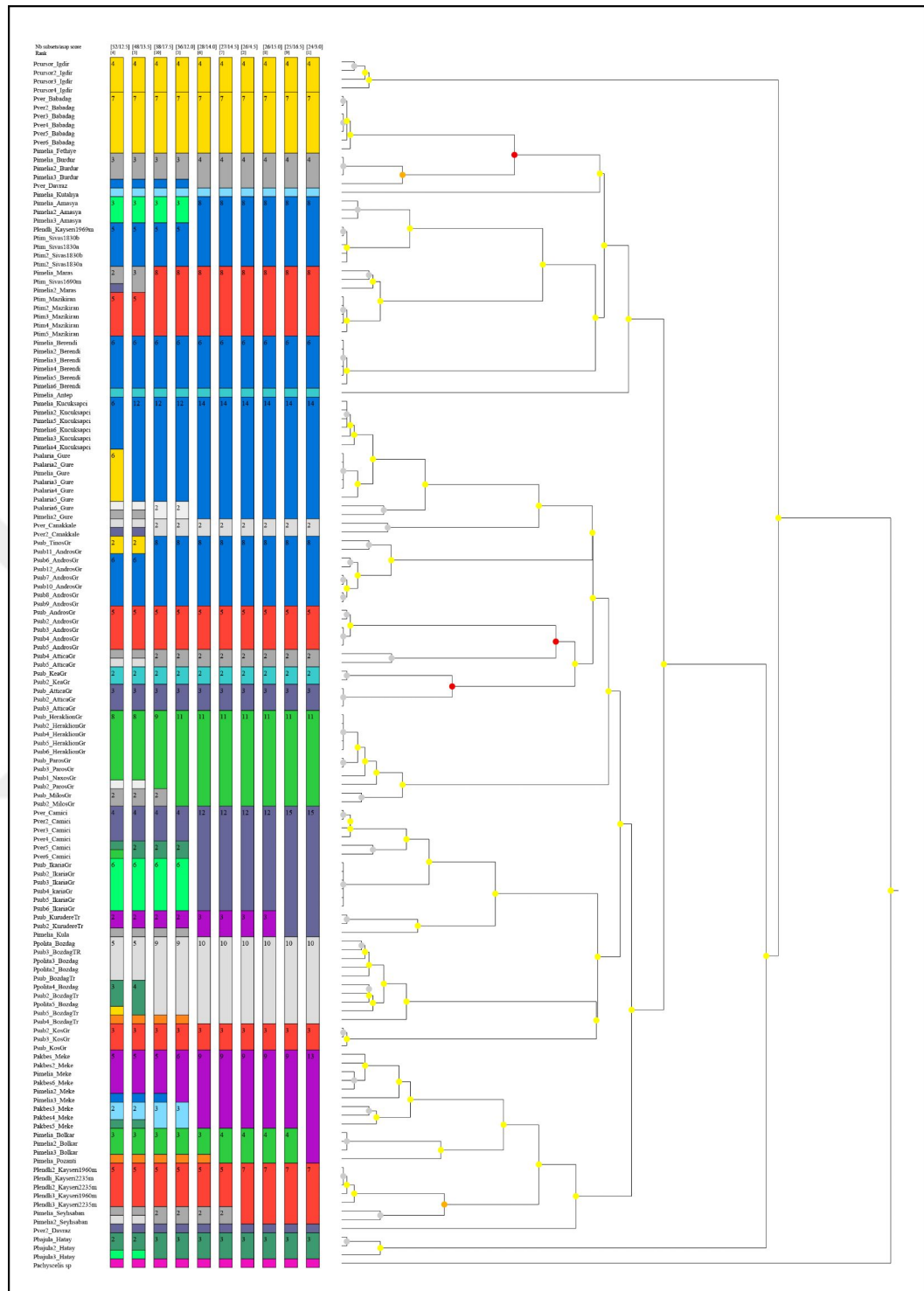
Anadolu’da dağılışı gösteren *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* örneklerinin filogenetik ilişkileri ve tür sınırlarını belirlemek üzere

gerçekleştirilen analizler soyhattı içerisinde farklı sayıda türlerin olabileceğini desteklemiştir. Analizlerin sunmuş olduğu türler, henüz morfolojik verilerle de desteklenmediği ve tür olarak atfedilen her küme için kesin bir tür ismi vermek mümkün olmadığı için, önerilen tür sınırları MOTU (moleküler operasyonel taksonomik birim) olarak ele alınacaktır. MOTU’lar bireylerin barkod dizileri arasındaki benzerliklere göre elde edilen olası tür sınırlarını temsil etmektedirler.

ABGD analizleri veri setini 9 alternatif gruplandırma şemasına göre 22-51 MOTU olarak ayırmıştır. Örnek bir gruplandırma ağacı Şekil 4.33’de sunulmaktadır.

ASAP analizleri 9 alternatif gruplandırma şemasına göre soy hattı içerisinde 21-49 MOTU olabileceğini desteklemektedir (Şekil 4.34).

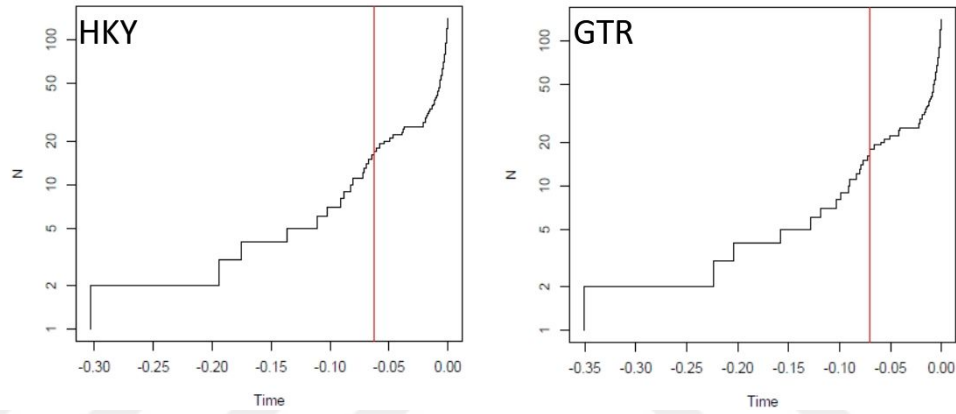
Tür sınırlarının belirlenmesi için yapılan GMYC analizleri; “yule”, “constant coalescent” ve “relaxed clock” priorleri kullanılarak, GTR ve HKY süstitüsyon modelleri altında gerçekleştirilmiştir. Bu analizler; hesaplanan tür sayısı, türleşme eşik değeri, tür sınırlarını gösteren ağaçlar bakımından benzer sonuçlar üretmiştir. Ancak, “yule” prior ayarlarıyla üretilen özet ağacın destek değerleri daha yüksek değerlerdedir. Her iki model altında “yule” prior ayarlarıyla gerçekleştirilen analizlerden üretilen ağaçların destek değerleri Ek 2 ve Ek 3’te verilmiştir.



Şekil 4.34. *Camphonota* alt cinsine dahil Anadolu *Pimelia* örneklerinin ASAP analizine göre belirlenen tür sınırları.

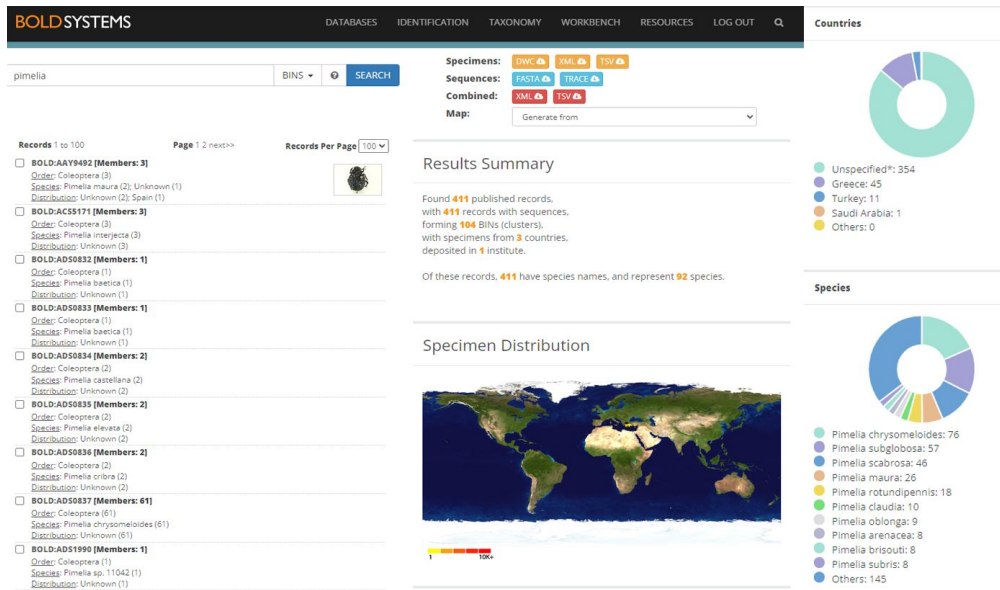
GMYC analizlerine göre; veri setindeki *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* örnekleri için, dış gruplar *Pachyscelis quadricollis*, *Pimelia bajula solieri* ve *Pimelia cursor* haricinde, 13 MOTU tespit edilmiştir (Şekil 4.35).

HKY ve GTR modelleri altında yürütülen analizler sonucunda soyhattının zaman içerisindeki çeşitlenmesine ait grafikler Şekil 4.36’te elde edilmiştir. Her iki modelde de belirlenen tür sayısı 13 olarak belirlenmiştir, ancak *Pimelia* türlerinin çeşitlenme zamanları iki model altında farklılık göstermiştir. HKY modeline göre soyhattı içerisindeki türleşme süreçlerinin günümüze daha yakın zamanda, GTR modeline göre türleşme süreçlerinin daha uzak bir zaman içinde gerçekleştiği görülmektedir. Her iki model altında da türleşme zaman eşiği (Şekil 4.36) benzer hesaplanmıştır

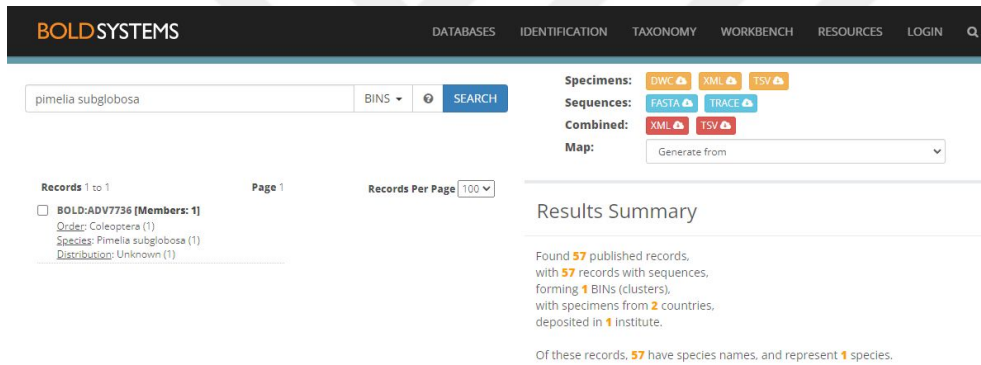


Şekil 4.36. COI gen dizilerinin HKY ve GTR modelleri altında yürütülen GMYC analizlerinin sunduğu zaman-soyhattı grafikleri (Vertikal kırmızı çizgi türler arası dallanma olaylarından tür içi dallanma olaylarına geçişle ilgili eşik değerini temsil etmektedir).

BOLD sisteminde, *Pimelia* cinsi ile ilgili BIN veri tabanında yapılan taramalarda 411 yayımlanmış dizi, bu dizilerle ilişkili 92 tür ve 104 adet BIN kaydı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.37). Türlerin büyük bir kısmı *Pimelia* cinsine dahil farklı alt cinslerden örneklerdir. BOLD sistemde, *Camphonota* alt cinsine dahil *P. subglobosa* türüne ait farklı uzunluklarda (531bç-829bç), 57 adet COI dizisi bulunmaktadır. Bu dizilerden yalnızca 1 tanesi COI gen bölgesinin 5’ ucuna aitken diğerleri 3’ ucundaki bölgeleri temsil ederler. Bu 57 diziden sadece; 5’ ucunu temsil eden, 658 bç uzunluğundaki barkod bölgesine BIN numarası atanmıştır (BOLD:ADV7736) (Şekil 4.38). Lokaliteleri tanımlanmış olan örneklerin büyük bir çoğunluğu Yunanistan ve Türkiye’ dendir.

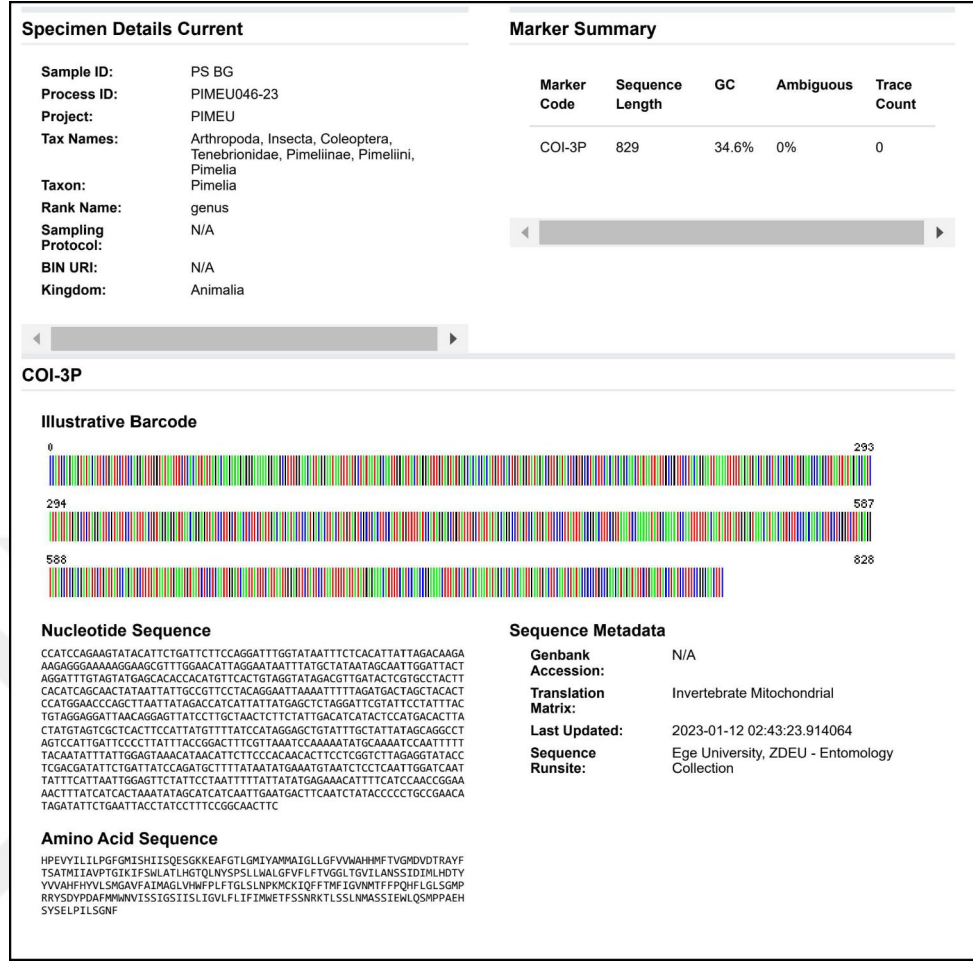


Şekil 4.37. BOLD sistemindeki *Pimelia* cinsine ait verilerin özeti.



Şekil 4.38. BOLD sistemindeki *Camphonota* alt cinsine ait verilerin özeti.

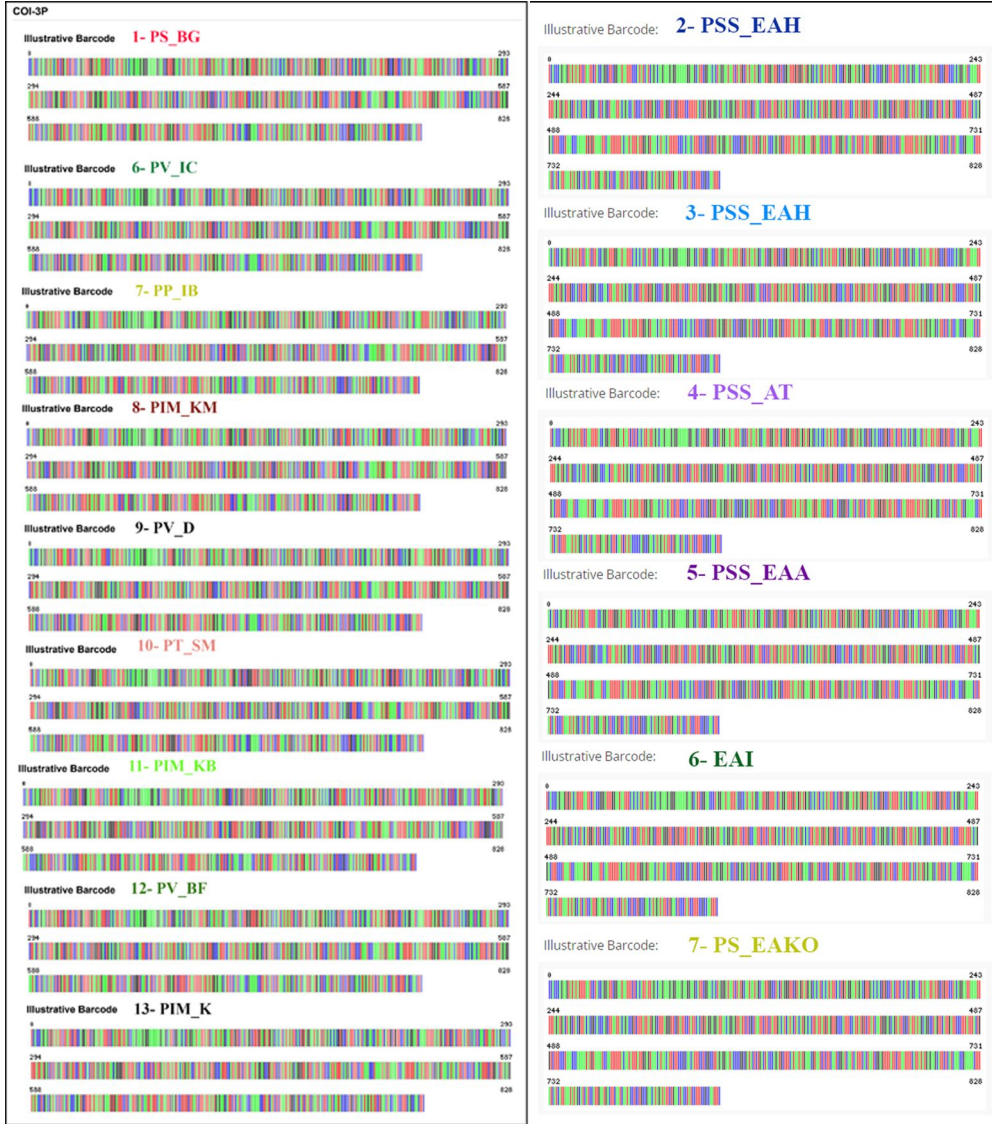
Türkiye’de dağılış gösteren *Pimelia* taksonlarına ait 91 adet 3’ COI dizisi, BOLD sistem üzerinden açılan “Genus *Pimelia* diversity [PIMEU]” isimli proje altında sisteme yüklenmiştir. BOLD sistemine yüklenen *Pimelia* örneklerinin barkod illüstrasyonları, her bir diziye özel oluşturulmuş olan Örneklem Kimliği (Sample ID) ve İşlem Kimliği (Process ID) kodlarının yanı sıra; gene ait nukleotid ve amino asit dizisi bilgilerini içeren sayfa Şekil 4.39’da görülmektedir.



Şekil 4.39. BOLD sistemine yüklenmiş olan P.s.salaria_Güre örneğinin barkod illüstrasyonları ve dizi bilgilerinin özeti.

GMYC analizinin sunmuş olduğu 13 MOTU'yu temsil edecek şekilde seçilen 15 bireyin barkod illüstrasyonları Şekil 4.40'ta karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

BOLD veri tabanında, COI gen bölgesinin sadece 5' ucuna ait BIN kayıtları olduğu için, bu tez çalışması kapsamında çoğaltılan 91 adet COI dizisinin (mtCOI 3'), sistemde herhangi bir BIN ile eşleşmesi gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.40. *Camphonota* alt cinsine dahil Anadolu *Pimelia* örneklerinin GMYC analizinin sunmuş olduğu 13 MOTU'yu temsilen seçilen örneklerin barkod illüstrasyonları, (Her bir MOTU numarası ve temsil ettiği birey kodu, barkod illüstrasyonlarının üstünde, GMYC ağacındaki renklere göre belirtilmiştir).

4.7.2 Moleküler saat analizleri /zaman ağaçları

Pimelia-COI dizilerinin evrimsel süreçte homojen bir hızda değişim sergileyip sergilemediklerini belirlemek üzere sabit ve esnek saat hızı varsayımları altında gerçekleştirilen iki Bayesian analiz -lnL değerlerinin χ^2 istatistiğiyle karşılaştırılması dizilerin esnek saat hızı altında evrildiğini destekler niteliktedir.

Şöyle ki sabit saat hızı -lnL = -8402.622 ve esnek saat hızı -lnL = -8380.536 olarak tespit edilmiştir. LRT için iki modelin -lnL değerlerinden $LR = 2 * (lnL1 - lnL2)$ formülüne göre $LR = 22.086$, $df = 5$ ve kritik χ^2 değeri

($P=0.05$)=11.07 olarak hesaplanmış ve sabit saat hipotezi reddedilmiştir. Ancak türlerin divergens zamanları her iki varsayım altında da değerlendirilmiştir.

Camphonota alt cinsine dahil *Pimelia* türlerinin divergens zamanlarının tahmin edilmesi için “strict clock” ve “Relaxed Clock Log Normal” saat ayarları altında oluşturulan zaman ağaçları örneklerin gruplandırılması açısından benzer topolojiler sergilemiştir (Şekil 4.41 ve Şekil 4.44). Ancak iki saat modeline göre ağaç uzunlukları farklı hesaplanmıştır. Sabit saat hızı ile *Pimelia* soy hattının dış gruptan 15.8 ± 2.36 My önce ve esnek saat hızı ile 45.72 ± 8.49 My önce ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.41 ve Şekil 4.44).

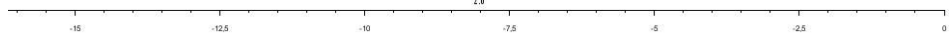
Zaman ağaçları GMYC analizi sonucunda önerilmiş tür sınırlarına göre numaralandırılıp ayrı renkler olarak işaretlenmiştir. Sabit saat hızı varsayımı altında, *Camphonota* alt cinsine dahil türlerin, *Chaetotoma* ve *Pimelia* alt cinslerinden yaklaşık 10.5 My önce ayrıldığı görülmektedir. *Camphonota* alt cinsine dahil türlerin yaklaşık 7-7.5 My öncesinde iki ana soy hattına (A ve B soy hatları) ayrıldığı görülmektedir. GMYC analizine göre 9 MOTU içeren “A” soyhattı, divergensleri 5.5-6 My öncesine dayanan “C” ve “D” kladlarından oluşur. Batı Anadolu ve Ege adalarından *Pimelia* türlerini içeren “C” dalı 5 küme içeren “G” ve 2 küme içeren “H” hatlarına ayrılır (4.5-5 My). “G” hattı içerisindeki 1. MOTU; *P. subglobosa salaria* ve *P. subglobosa verruculifera* olarak teşhis edilen Balıkesir ve Çanakkale örneklerini içermektedir. Batı Ege adalarından *P. subglobosa* olarak etiketlenmiş dizilerin 4 taksona ayrıldığı (2.-5. MOTU’lar) görülmektedir. “H” hattında 6. MOTU *P. subglobosa* ve *P. subglobosa verruculifera* olarak etiketlenmiş İzmir, Manisa ve İcaria adası örneklerini, 7. MOTU *P. subglobosa* ve *P. subglobosa polita* olarak etiketlenmiş İzmir ve Kos adası örneklerini içermektedir. Orta ve Güney Anadolu örneklerini içeren “D” dalı iki olası takson içermektedir. 8. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Konya, Niğde ve Adana ve *P. lendli* olarak etiketlenmiş olan Kayseri örneklerini içermektedir. 9. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Isparta-Davraz’dan tek bir örnek içermektedir.

“B” soyhattı, kendi içerisinde divergensleri 4 My öncesine dayanan “E” ve “F” kladlarına ayrılmaktadır. “E” kladı GMYC analizinden farklı olarak

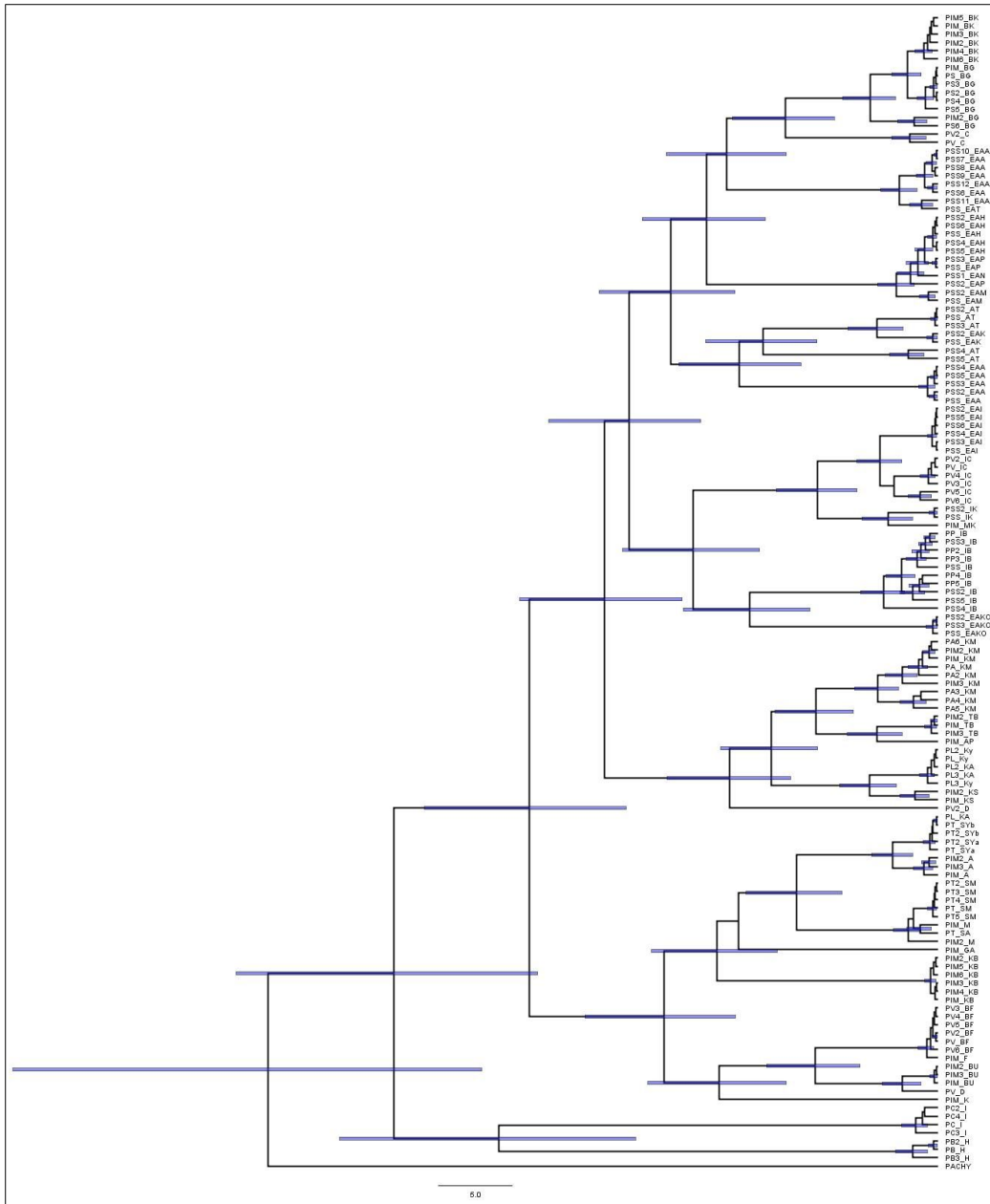
gruplandırıldığı görülmektedir. 10. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan ve *P. timarchoides* olarak etiketlenmiş Sivas, Amasya ve Maraş örneklerini, 11. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Konya-Berendi örneklerini içermektedir. 12. MOTU teşhisi tamamlanmamış Burdur ve *P. subglobosa verruculifera* olarak etiketlenmiş Muğla örneklerini, 13. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Kütahya'dan tek bir örnek içermektedir.

Esnek saat hızı varsayımı altında gerçekleştirilen Bayesian analizden üretilen majority rule consensus ağacının nod güven aralıkları ve posterior olasılık değerleri Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'de gösterilmektedir.

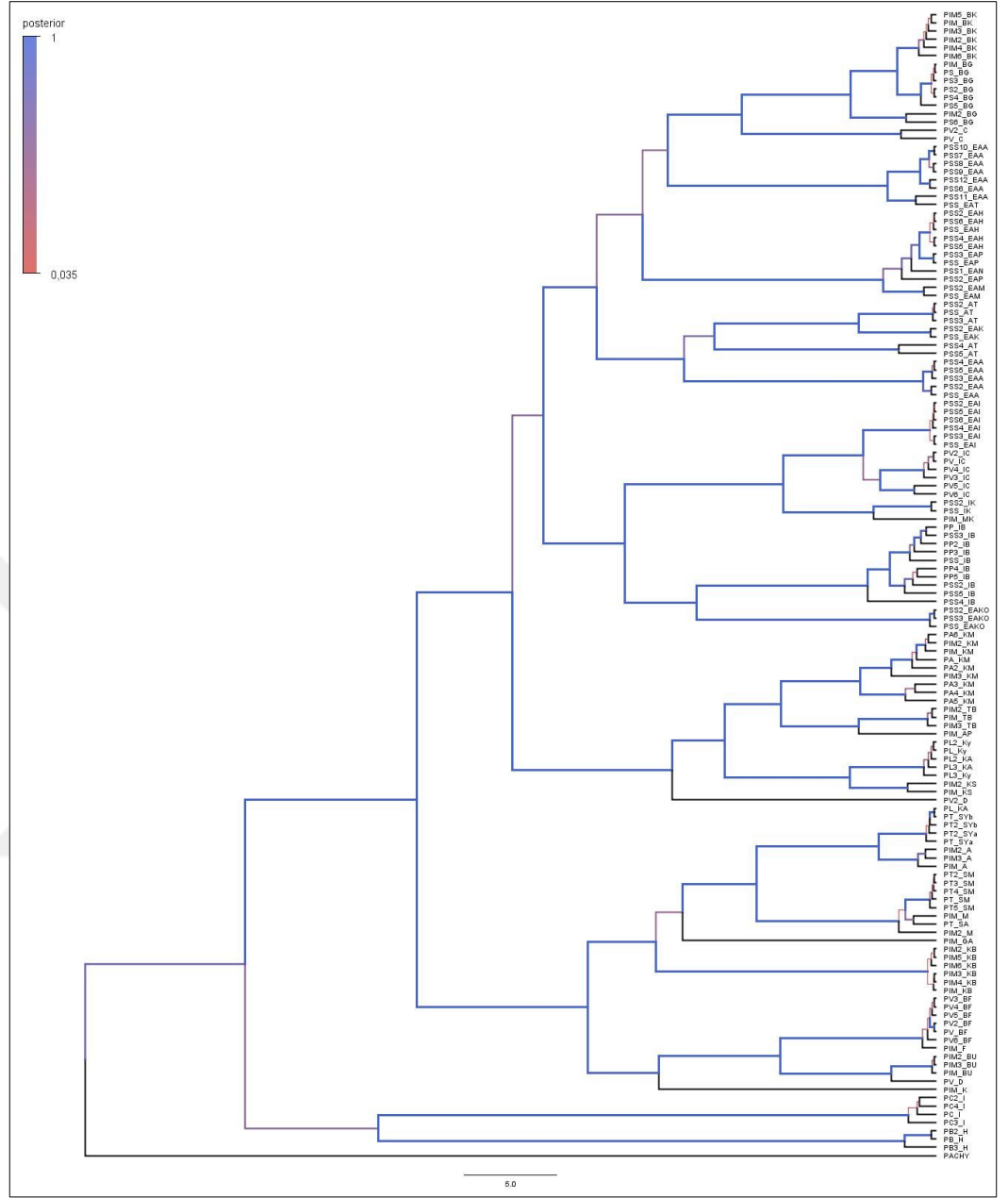




Şekil 4.41. Türkiye *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* türlerine ait mitokondriyal COI gen bölgesi zaman ağacı, “Strict-clock” (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My⁻¹ (Papadopolou et al., 2010).



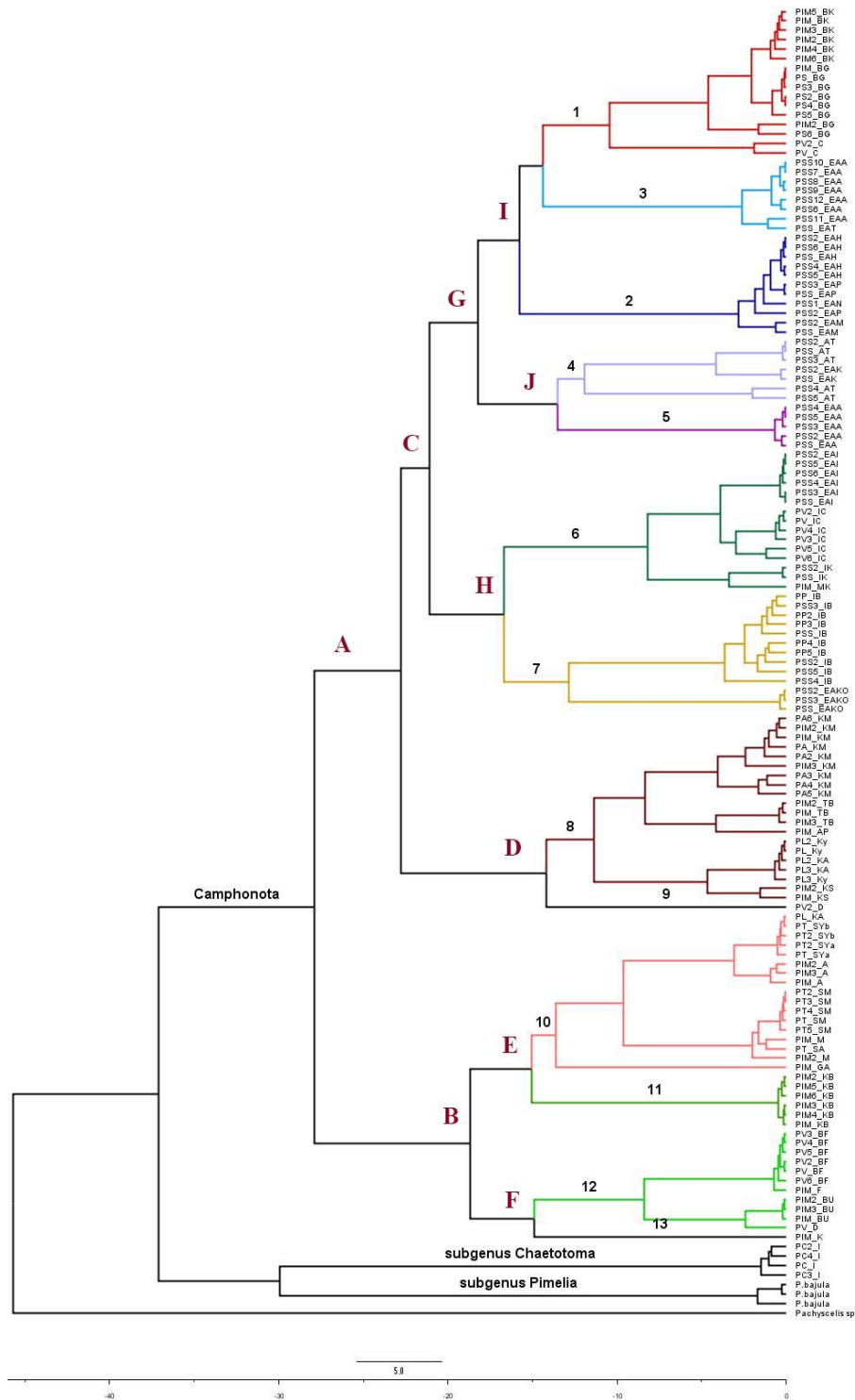
Şekil 4.42. Esnek saat hızı varsayımı altında majority rule consensus ağacının nod güven aralıkları (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).



Şekil 4.43. Esnek saat hızı varsayımı altında majority rule consensus ağacının posterior olasılık değerleri (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında, moleküler divergens hızı % 2.39 My⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).

Esnek saat hızı varsayımı altında, *Camphonota* alt cinsine dahil türlerin, *Pimelia* cinsinin *Chaetotoma* ve *Pimelia* alt cinslerinden yaklaşık 37-38 My önce ayrıldığı görülmektedir. *Camphonota* alt cinsine dahil türler yaklaşık 27-28 My öncesinde iki ana soy hattına (A ve B soy hatları) ayrılmaktadır. GMYC analizine göre 9 takson içeren “A” soyhattı, divergensleri 22-23 My öncesine dayanan “C” ve “D” kladlarından oluşur. “C” kladı tamamen Batı Anadolu ve Ege adalarından

Pimelia türlerini içermektedir. Bu klad da divergensleri yaklaşık olarak 20-21 My öncesine dayanan “G” ve “H” hatlarını içermektedir.



Şekil 4.44. Türkiye *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* türlerine ait mitokondriyal COI gen bölgesi zaman ağacı, “Relaxed Clock Log Normal” (HKY+I+G) substitüsyon modeli altında moleküler divergens hızı % 2.39 My⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010).

“G” hattı içerisinde 1. MOTU teşhisi tamamlanmamış ve *P. subglobosa salaria* olarak teşhis edilen Balıkesir örneklerini ve *P. subglobosa verruculifera* olarak teşhis edilen Çanakkale örneklerini içermektedir. Batı Ege adalarından *P. subglobosa* olarak etiketlenmiş dizilerin 4 taksona ayrıldığı (2.-5. MOTU’lar) görülmektedir. “H” hattı iki kardeş takson olarak ayrılmaktadır. 6. MOTU *P. subglobosa* olarak etiketlenmiş Ikaria adası örneklerini, *P. subglobosa verruculifera* olarak etiketlenmiş İzmir örneklerini ve teşhisi tamamlanmamış Manisa örneklerini içermektedir. 7. MOTU, *P. subglobosa* ve *P. subglobosa polita* olarak etiketlenmiş İzmir ve Kos adası örneklerini içermektedir. Orta ve Güney Anadolu örneklerini içeren “D” dalı iki olası takson içermektedir. 8. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Konya, Niğde ve Adana örneklerini ile *P. lendli* olarak etiketlenmiş örnekleri içermektedir. Tür teşhisi tamamlanmamış olan Isparta-Davraz’dan tek bir örnek 9. MOTU olarak ayrılmaktadır.

“B” soyhattı, kendi içerisinde divergensleri yaklaşık 18 My öncesine dayanan “E” ve “F” kladlarına ayrılmaktadır. 10. MOTU teşhisi tamamlanmamış olan Amasya ve Maraş örnekleri ile *P. timarchoides* olarak etiketlenmiş Sivas örneklerini, 11. MOTU da teşhisi tamamlanmamış olan Konya-Berendi örneklerini içermektedir. 12. MOTU teşhisi tamamlanmamış Burdur örnekleriyle *P. subglobosa verruculifera* olarak etiketlenmiş Muğla, Davraz örneklerini içermektedir. Tür teşhisi tamamlanmamış olan Kütahya’dan tek bir örnek 13. MOTU olarak ayrılmaktadır.

5 SONUÇ VE TARTIŞMA

Tür sınırlarını, birden fazla bağımsız veri setinin entegrasyonuna dayalı olarak test eden bütünleştirici taksonomi yaklaşımı (Dayrat, 2005, Carstens et al., 2013, Schlick-Steiner et al., 2010) tüm canlı gruplarına uygulanabilen ve yaygın kabul gören bir tür kavramının eksikliğini tamamlayabilecek bir potansiyel sağlamaktadır. Türler, tarihsel bir süreklilik içerisinde bağımsız evrimleşen soy hatları olarak değerlendirildiğinde, her bir türe özgün sayısız farklı karakter açısından varyasyonlarla karşılaşabilmek mümkündür. Bu açıdan, bağımsız veri setlerinin entegrasyonuna dayalı bir yaklaşım, soy hatlarının zamansal sürekliliğini yansıtan daha gerçekçi tür sınırlarının çizilmesine önemli destek sağlayacaktır.

Pimelia cinsi; dünyada geniş bir dağılışı sergilemesi ve çok sayıda tür / alt tür içermesinden dolayı, taksonomik çalışmaların (Ferrer and Soldati, 1999; Doğan, 2020; Bouchard et al., 2021; Nabozhenko et al., 2022) yanı sıra, moleküler sistematik (Moya et al., 2006; Papadopoulou et al., 2010; Mas-Peinado et al., 2018) , sitogenetik (Juan and Petitpierre, 1988; Pons, 2004; Bruvo-Madarić et al., 2007) ve ekolojik (Katılmış, 2004; Tezcan et al, 2004a; Doğan 2020) çalışmalara konu olmuştur.

Palearktık ve Afrotropikal bölgenin kuzey çöllerinde geniş bir dağılışa sahip *Pimelia* cinsi yaklaşık 320 tanımlanmış tür ile temsil edilmektedir. *Pimelia* türleri morfolojileri, iklim, yükseklik ve habitat tercihleri açısından geniş varyasyonlar sergilemektedir (Antoine 1949; Español, 1954; Machado, 1979; Pierre, 1985; Oromí, 1990; Soldati, 2009; Caro-Pintos, 2015). *Pimelia* cinsi, türlerin sergilediği geniş çeşitlilik, tür ayrımında sağlam diagnostik karakterlerin bulunmayışı, cinsin tüm türlerini içeren kapsamlı bir sistematik revizyonun henüz yapılmamış olması ve bazı tip materyallerinin kullanışsız ya da kayıp olması nedeniyle taksonomik açıdan karmaşık bir grup oluşturur. Grup için önemli problemlerden birisi, tanımlanmış olan türlerin farklı alt türlerinin coğrafik olarak ayırt edilememesinden kaynaklanmaktadır. Genellikle yanlış kayıt ya da teşhisten kaynaklanan bu durum literatür bilgilerinde önemli tutarsızlıklar ve karışıklıklar yaratmaktadır. Alt tür kavramı; aynı türün, aralarında coğrafi izolasyon olan ve

belirgin karakter farklılaşmaları gösteren popülasyonlarını tanımlamakta kullanılır. Genel anlamda kullanışlı bir kategori olsa da alt türleri tanımlamak zorludur. Araştırmacıların alt tür oluşumu için kabul ettikleri karakter farklılaşma oranı değişkenlik gösterebilmektedir (Mayr, 1982; Demirsoy, 2018).

Pimelia cinsiyle ilgili bu problemlerin üstesinden gelmek üzere bazı tür gruplarına ait moleküler filogenetik çalışmalar bulunmaktadır (Juan et al., 1995, 1996, 1997; Contreras-Díaz et al., 2003; Bruvo et al., 2003; Bruvo-Madaric' et al., 2007; Pons et al., 2002, 2004; Pons, 2004; Stroschio et al., 2011a, 2011b; Mas-Peinado et al., 2018). Akdeniz havzasının batısında dağılışı gösteren 60 *Pimelia* türünü içeren kapsamlı bir filogenetik çalışma (Mas-Peinado et al., 2018) yapılmış olsa da grubun tür sayısı dikkate alındığında *Pimelia* cinsine dahil alt cins ve türlerin %80'i arasındaki filogenetik ilişkilerin halen belirsizliğini koruduğu söylenebilir. Ayrıca, çalışmaya dahil edilen *Camphonota* alt cinsine dahil 2 türün az sayıda örneği üzerinden tüm alt cinsin temsil edilebilmesi mümkün değildir. Bu açıdan alt cinsin tanımlanmış olan taksonlarının %60'ını içeren Türkiye *Pimelia* soy hatları, grubun biyoçeşitliliğini yönlendiren süreçlerin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir.

Camphonota alt cinsine dahil 22 tür Doğu Avrupa ve Batı Asya'da dağılışı göstermektedir (Löbl et al., 2008; Leo and Fattorini, 2000). *Camphonota* alt cinsi içinde tanımlanmış türler, “karakteristik dış görünüşleri” nedeniyle bazı kaynaklarda (Solier, 1836; Kraatz, 1865; Sénac, 1887; Reitter, 1915; Kwieton, 1981, 1982; Mas-Peinado et al., 2018) morfolojik olarak homojen bir grup olarak bahsediliyor olsa da mevcut tanı anahtarları Anadolu'da dağılışı gösteren örneklerin teşhis edilmesinde yetersiz kalmıştır. Bu açıdan *Camphonota* alt cinsinin bağımsız veri setleriyle yeniden değerlendirilmesi ve kullanılan örneklerin DNA barkodlarının oluşturulması *Pimelia* soy hattı filogenisindeki önemli bir boşluğu tamamlayacaktır.

Tez çalışması kapsamında, ülkemizin deniz seviyesindeki kumul alanlarından yüksek dağ zonlarının soğuk iklimine kadar oldukça geniş bir alandan örneklenen *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* türleri, sitogenetik ve moleküler sistematik veri setleriyle yeniden değerlendirilmiştir. Ayrıca, çalışma

kapsamında üretilen filogenetik ağaçlar, örneklerin aedeagus yapıları dikkate alınarak morfolojik olarak da desteklenmiştir.

Pimelia cinsine ait tanı anahtarlarının yetersiz kaldığı için bazı örneklerin tür tayinleri bu tez kapsamında yapılamamıştır. Elde edilen moleküler veriler ışığında ve ileride gerçekleştirilecek olan detaylı morfolojik incelemeler sonucunda, bu örneklerin de tür tanımlamalarının yapılması planlanmaktadır.

Morfolojik farklılaşmanın zayıf olduğu ya da mevcut tanı anahtarlarının tür teşhislerinde yetersiz kaldığı gruplarda, filogenetik ilişkilerin tahmininde DNA dizileri, yaygın olarak kullanılmaktadır (Diaz-Tapia et al., 2018; Funk et al., 2012; Garg et al., 2016; Janzen et al., 2017; Keskin et al. 2017b; Martinsson and Erséus, 2017). Bu çalışmada, Anadolu’da dağılışı gösteren *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* örneklerinin filogenetik ilişkileri ve tür sınırları COI gen dizileri kullanılarak belirlenmiştir. Tür sınırlarını belirlemek üzere uzaklık ve ağaç temelli yaklaşımlar kullanılmıştır.

Genetik uzaklık temelli yaklaşımlarda, takson sayısı ve belirlenen mesafe eşik değerine bağlı olarak aynı veri setinden farklı sayıda gruplandırma yapılabilmesi nedeniyle, hesaplanan grup sayısının her zaman tür düzeyindeki farklılıkları veya gerçek ilişkileri yansıtmayabileceği belirtilmektedir. (Bergsten et al., 2012; Fregin et al., 2012; Knowles and Carstens, 2007; Wiemers and Fiedler, 2007; Will et al., 2005; Yang and Rannala, 2017).

Son yıllarda geliştirilen ağaç aramasına dayalı GMYC (Pons et al., 2006; Reid and Carstens, 2012) ve mPTP (Kapli et al., 2017) yaklaşımları, tür sınırlandırmasında tek bir lokusun kullanılmasına olanak tanımaktadır (Camargo and Sites, 2013; Fujita et al., 2012; Rannala, 2015). Tek lokusa dayalı olarak elde edilmiş gen ağaçlarının her zaman tür ağaçlarıyla tam bir uyum sağlamadığı yönündeki eleştiriler (Edwards, 2009; Maddison, 1997; Page and Charleston, 1998; Talavera et al., 2013) bulunmasına rağmen, COI gen bölgesinin GMYC analizleri birçok farklı grupta tür sınırlandırmasında sağlam bir araç olarak kullanılmaktadır (Pons et al., 2006; Leliart et al., 2009; Hamilton et al., 2011; Esselstyn et al., 2012; Gu et al., 2020; Guimarães et al. 2022). Bu açıdan, Anadolu *Pimelia* türleri ile ilgili AGBD, ASAP ve GMYC analizlerinin önerdiği

gruplandırmalar sitogenetik ve aedeagus morfoloji verileri çerçevesinde tartışılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında ele alınan ve Türkiye’de dağılışı gösteren 19 *Pimelia* popülasyonunda diploid sayı $2n=18 (8+Xy_p)$ olarak belirlenmiştir (Bkz 4.1-4.11). Bu sayı Tenebrionidae ailesinin çalışılmış türlerinin çoğunda görülen ve model kabul edilen diploid sayı $2n=20$ ’ye uymamaktadır. Aile içindeki türlerin kromozom sayıları 14 ila 38 arasında değişebilirken, Xy_p cinsiyet belirleme sisteminin yanı sıra Xy_r , XY, XO, NeoXY ve çoklu cinsiyet kromozomları gibi seks bivalentlerinin kaydı da verilmiştir (Blackmon et al., 2015).

Pimelia türleri ele alındığında ise sitogenetik olarak çalışılmış olan türlerin yaklaşık %77’sinde, $2n=18 (8+Xy_p)$ formülü görülmektedir. Cins içinde ayrıca $2n=20 (9+Xy_p)$ ve $2n=18 (8+ Xy_r)$ formüllerini gösteren türlerin de olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra cinsin dahil olduğu Pimeliini tribüsünde de yoğunlukla $8+Xy_p$ mayotik formül gözlemlendiği belirtilmiştir (Pons, 2004).

Her bir popülasyonun diploid sayı ve cinsiyet belirleme sistemleri benzerlik gösterse de kromozom morfolojileri açısından küçük farklılıklar görülebilmektedir. Tenebrionidae ailesinin yanı sıra birçok organizmadaki evrimsel sürecin bir parçası olan kromozomal yeniden düzenlenmeler, ağırlıkla perisentrik inversiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (Juan and Petitpierre, 1991, Sumner, 2003). *Pimelia* örneklerinde, özellikle y kromozomlarının relatif uzunlukları popülasyonlar arasında farklılık göstermiştir. Kimi popülasyonda oldukça küçük, nokta şekilli olan y (Bkz. 4.3d, 4.3e), set içinde kromozomlar arasında kaybolabilirken, kimisinde göreceli olarak daha büyük boyutlu olduğu için daha rahatça seçilebilmektedir (Bkz. 4.3b, 4.3f, 4.3h). Nokta şekilli y kromozomunun, Tenebrionidae ailesi içinde oldukça sık rastlandığı söylenebilir. Heteromorfik cinsiyet kromozomlarından bir diğeri olan X kromozomu ise metasentrik ve akrosentrik arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Holecova et al., 2008). Karyotip analizleri yapılan *P.s.verruculifera*_Babadağ2, *Meke_Pim7* ve *P.lendli_Kayseri3(1960m)* bireylerinde setin en büyük kromozomu submetasentrik morfoloji gösteren X olarak belirlenmiştir (Bkz 4.6). Karyotip analizleri yapılmış olan Meke-Konya ve Kayseri örnekleri, GMYC analizi

sonuçlarına göre aynı takson (8. MOTU) içerisinde bulunmaktadır. Otozomal ve cinsiyet kromozom morfoloji ve büyüklüklerinde görülen benzerlikler temelinde (Bkz. 4.6b-c) bu durumun karyotipler seviyesinde de desteklendiği görülmektedir. GMYC analizi sonuçlarına göre 12. MOTU içerisinde yer alan Babadağ-Fethiye örnekleri submetasentrik X kromozom morfolojisi ile bu 8. MOTU'dan ayrılmaktadır.

Çalışılan bireyler içerisinde $2n=18$ diploid sayısına uymayan 3 bireye (Burdur_Pim3, P.timarchoides_Sivas1(1690m) ve P.s.polita_Bozdağ3) rastlanmıştır (Bkz. Şekil 4.29-4.31). Bunlardan ilk ikisinde birer, sonuncusunda ise 2 adet B kromozomu olduğu belirlenmiştir. Bireysel bir kromozomal varyasyon olan bu durumun, COI dizileri açısından da bir farklılık gösterip göstermediği incelenmiştir. B kromozomu taşıyan üç birey de kendi popülasyonları içerisinde karşılaştırıldığında, P.timarchoides_Sivas1(1690m) örneğinde belirgin bir farklılık görülmüştür. B kromozomu taşıyan birey ile diğerlerinin aminoasit dizilerinde bir farklılık olmamasına karşın, barkod illüstrasyonlarındaki küçük varyasyonlar, renk skalasındaki değişimle anlaşılabilir. COI dizilerindeki bu farklılık örneklerin GC oranlarına da yansımış gibi görünmektedir. B kromozomu yapısına sahip olan bireyin GC oranı diğer örneklerle göre daha yüksek çıkmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 B kromozomu taşıyan birey (sol üstte belirtilmiş) ile aynı popülasyonda bulunan bireylerin barkod verilerinin karşılaştırılması.

Ancak diğer iki bireyin kendi popülasyonları içinde değerlendirilmesinde, dizilerin GC oranları ya da barkod illüstrasyonlarında belirgin bir farklılıkla karşılaşılmamış olduğundan, *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* bireyinin dizilerindeki bu varyasyonun kesin olarak B kromozomlarının bulunuşuyla korelasyon gösterdiğini söylemek mümkün değildir.

B kromozomları nükleustaki normal kromozomlara (A kromozomu) ek olarak bulunan aksesuar kromozomlardır. Kabul edilen genel kaniya göre karyotipteki A kromozomlarından ya da cinsiyet kromozomlarından köken alarak ortaya çıktıkları düşünülmektedir. Karyotip evrimi sürecinde ortaya çıkan bir yan ürün olarak da değerlendirilmiştir (Camacho et al., 2000). B kromozomları normal setteki A kromozomları ile rekombinasyon ya da eşleşme gösteremezler. B kromozomlarının varlığı, tür içinde veya popülasyonu oluşturan bireyler arasında varyasyon gösterilmektedir (Camacho et al.; Maryanska-Nadachowska, 2004;

Ahmad and Martins; 2019; Hoy, 2019; Baron et al. 2020). Genellikle fonksiyonel genler içermedikleri düşünülen B kromozomlarının transkripsiyonel aktivite gösterdiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Camacho et al., 2000; Banaei-Moghaddam et al., 2015)

Coleoptera takımında B kromozomlarının varlığı, özellikle Scarabaeidae, Buprestidae, Cicindelidae, Curculionidae gibi ailelere dahil olan yaklaşık 80 türde gözlenmiştir (Holecova et al., 2005; Gomes de Oliveira et al., 2012). Sitogenetik olarak çalışılmış olan Tenebrionidae türlerinde ise sadece; *Laena reitteri*, *Tribolium audax* ve *Tribolium madens* türlerinde B kromozomu kaydı verilmiştir (Blackmon et al., 2015). Dolayısıyla bu çalışmada *Pimelia* cinsinde görülen ilk B kromozomu kayıtları verilmiştir.

Kromozomların transkripsiyona kapalı olan heterokromatik bölgeleri, sıkı paketlenmiş yapılarından dolayı farklı boyama yöntemlerinde yoğun sinyaller verebilmektedirler. Konstitütif heterokromatini işaretleyen C-bantlama tekniği yaygın olarak kullanılsa da bu bölgeler; Rutin Giemsa, gümüş nitrat ve DAPI boyaarıyla da belirlenebilmektedir (Rozek, 1998; Lachowska et al., 2005; Karagyan et al., 2012). Heterokromatik bölgelerin Adenin ve Timin açısından zengin bölgeler olduğu bilinmektedir. Floresan DAPI boyası da kromozom üzerinde bu bazların yoğun bulunduğu yerleri işaretlediğinden, bu bölgelerin belirlenebilmesi için kullanışlı bir yöntem olarak önerilmektedir (Moura et al., 2003; Schneider et al., 2006; Lachowska et al., 2008; Karagyan et al., 2012). Hatta bu durum Scarabeidae familyasında gerçekleştirilen sitogenetik bir çalışmada (Colomba et al., 2006); Guanin ve Sitozin bazlarınca zengin bölgeleri işaretleyen CMA₃ (Chromomycin A₃) ile boyanan kromozomlardaki negatif sinyaller ile de doğrulanmıştır. Gümüş nitrat empregnasyonu ile de kromozomlar üzerindeki heterokromatinlerin saptanabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Bione et al., 2005; Colomba et al., 2006; Silva et al., 2009; Şendoğan and Alpagut Keskin, 2016; Şendoğan et al., 2019; Ögren et al., 2022; Çalışan and Alpagut Keskin, 2023).

Bu çalışmada *Pimelia* kromozomlarının heterokromatin yapıları; her üç boyama metodunda da yoğun olarak perisentromerik bölgelerde gözlenmiştir ve

popülasyonlar arasında belirgin bir farklılıktan söz etmek mümkün değildir. Ancak diferansiyel boyalardan DAPI ile işaretlenmiş olan setlerde perisentromerik bölgelerin yanı sıra yoğun sinyal veren 1-2 nokta daha gözlemlenmiştir (Bkz. 4.20-4.22). *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* bireyinin diploten-diyakinez evresinde (Bkz. 4.26g) ise yaklaşık 4 kromozom çiftinin telomer bölgelerinde arjirofilik belirgin sinyallere rastlanmıştır.

Kınkanatlı böceklerin sitogenetik çalışmalarında bizim bulgularımızla uyumlu olarak; genellikle perisentromerik bölgelerde heterokromatin blokları gözlenmiş olsa da (Rozek, 1998; Pons et al., 2004; Bione et al., 2005; Lachowska et al., 2005; Şendoğan and Alpagut Keskin, 2016) bazı türlerde telomerik blokların varlığı da belirlenmiştir (Bione et al., 2005; Şendoğan et al., 2019).

Kromozomlar üzerindeki NOR bölgeleri; iyi sonuç veren ve kolay uygulanabilir olan gümüş nitrat (AgNO_3) tekniği ile ortaya çıkartılmıştır (Goodpasture and Bloom, 1975; Howell and Black, 1980; Rufas et al., 1982, Sumner, 2003; Kavalco and Pazza, 2004). Transkripsiyonel olarak aktif olan NOR; rDNA'nın etrafındaki nukleolar proteinlerin gümüş partikülleri ile işaretlenmesi sonucunda belirlenir (Medina et al., 1983; Jordan, 1987; Vitturi et al., 1999; Kavalco and Pazza, 2004; Dutrillaux and Dutrillaux 2007).

Metafaz I kromozomları açısından ele alındığı zaman; *P.timarchoides_Sivas1(1690m)* dışındaki tüm popülasyonlarda, y ile ilişkili bir NOR varlığı gözlenmiştir (Bkz. 4.23-4.25). Bu bireyde ise seks bivalentleri üzerindeki arjirofilik sinyal, X ile y kromozomu arasında bir yere denk gelmekte gibi görünmektedir. Popülasyonların profaz I evrelerindeki de NOR olarak tanımlanabilecek bir adet belirgin sinyal veren ve bölgeye rastlanmıştır (Bkz. 4.26-4.28).

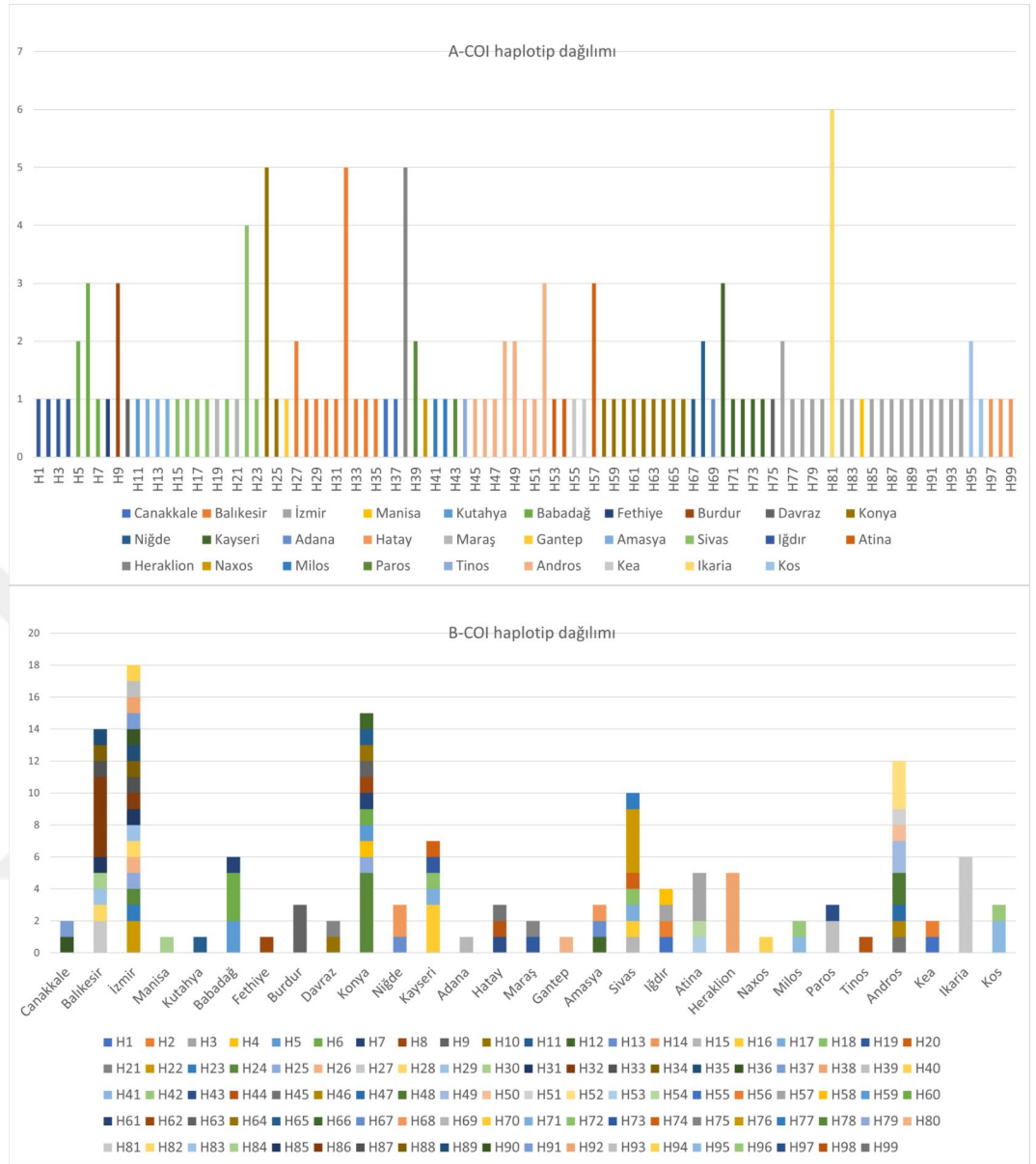
NOR'un cinsiyet kromozomlarında tam olarak nerede bulunduğunu söyleyebilmek bu evrede mümkün değildir. Zira böceklerde kromozomlar oldukça küçük boyutlu olmakla beraber, metafaz I evresinde bivalent eşleşmesinden dolayı daha yoğunlaşmış ve küçük görünürler. Coleoptera takımında Xy_p ile ilişkili arjirofilik bölgelerin varlığı bizim çalışmalarımız da dahil olmak üzere literatürde bir çok çalışmada belgelenmiştir (Almeida et al., 2000; Dutrillaux et al., 2007;

Lira- Neto et al., 2012, Şendoğan and Alpagut Keskin 2016, Şendoğan et al., 2019). Bu arjirofilik bölgelerin NOR'dan bağımsız olarak, Xy_p konfigürasyonu ve ayrılmasında etkili faktörler olabileceği de öne sürülmüştür (Dutrillaux and Dutrillaux, 2007; Lachowska et al., 2008; Lira- Neto et al., 2012). İşaretli problemler kullanılarak (rDNA-FISH) kromozomlar üzerinde ribozomal DNA ile ilişkili olan yerler spesifik olarak belirlenerek bu bölgelerin NOR'lar ile ilişkisi daha kesin bir şekilde ortaya konulabilir (Juan et al., 1993; Bruvo-Maderic et al., 2007).

Genel olarak, Anadolu *Pimelia* örnekleri, X kromozom morfolojisi, B kromozomlarının varlığı, y kromozomunun büyüklüğü, NOR lokalizasyonu açısından bazı küçük sitogenetik varyasyonlar sergiliyor olsa da, $2n=18$ kromozom sayısı bütün örneklerde korunmuştur. Buna karşın örnekler, COI gen dizileri açısından büyük bir varyasyon sergilemektedir (Şekil 5.2). COI gen dizilerinin genetik çeşitlilik analizleri, veri seti içerisinde toplam 99 haplotip ve Anadolu *Pimelia* örneklerine özel 74 yeni haplotipin bulunduğunu göstermektedir.

Uzaklık temelli ABGD ve ASAP analizleri veri seti içerisinde 9 farklı gruplandırma şemasına göre 21-52 MOTU olduğunu desteklemiştir. Genetik uzaklık temelli bu analizlerde her bir popülasyon farklı birer MOTU olarak belirlenmiştir (Bkz. 4.33, 4.34). Bayesian ağaç aramalarına dayalı GMYC analizleri ise veri seti içerisinde 13 MOTU'nun var olduğunu desteklemiştir. Diploid sayı ve cinsiyet belirleme sistemleri açısından bir varyasyon göstermeyen örneklerin, uzaklık ve ağaç temelli yaklaşımlarla belirlenmiş olan tür sınırları, aedeagus morfolojileri ile de karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır.

Tür sınırlandırma analizleri sonucunda; İzmir, Davraz ve Konya örnekleri haricinde aynı popülasyon ya da bölgeden toplanmış olan örnekler, genel olarak birlikte kümelenme göstermiştir. En yüksek haplotip çeşitliliğini sergileyen İzmir örnekleri GMYC (6. ve 7. MOTU'lar) ve ASAP analizlerine göre iki ayrı soyhattında yer almaktadır. ABGD analizlerinde ise İzmir örnekleri üç soyhattına bölünmektedir (Bkz. 4.33-4.35, Tablo 5.1).

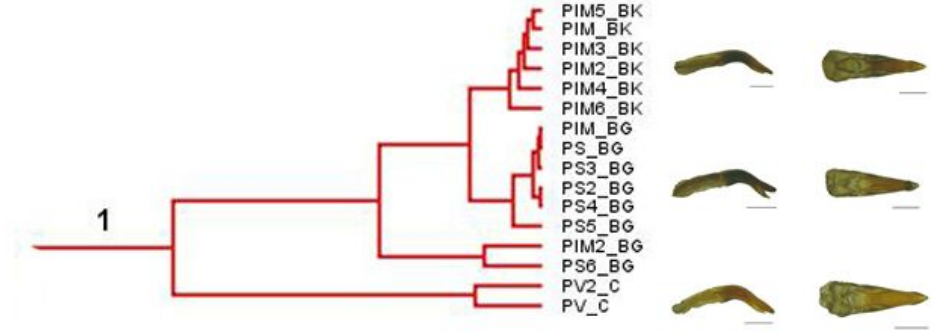


Şekil.5.2 *Camphonota* alt cinsine dahil *Pimelia* türlerinin A) mitokondriyal COI haplotiplerinin dağılımı, B) bölgesel haplotip dağılımı.

Benzer şekilde, Davraz ve Konya örnekleri hem uzaklık hem de ağaç temelli analizlerde iki ayrı soyhattında yer almışlardır. *P. subglobosa verruculifera* olarak tanımlanmış olan 2 Davraz örneği, filogeninin yaklaşık olarak 25-27 My önce ayrılmış olan iki ana soyhattında bulunurlar (Bkz. 4.44). Bu iki örneğin morfolojik yeniden değerlendirilmesi bazı karakterler açısından varyasyonlar sergilediklerini ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, mevcut tanı anahtarlarına göre isimlendirilememiş olan Konya örnekleri birbirinden ayrılarak “A” ve “B” ana soyhattında yer almıştır. COI gen ağaçları, bu lokalitelerde iki ayrı türün bulunabileceğini desteklese de Davraz ve Konya örneklerinin taksonomik

durumunun, tip materyalini de içine alan kapsamlı bir revizyonla anlaşılabilceğı düşünölmektedir.

Güre-Balıkesir'den toplanmış olan *P. subglobosa salaria* ve Güre_Pim olarak etiketlenen örnekler ile *P. s. verruculifera* olarak teşhis edilmiş Çanakkale ve Küçükşapçı_Pim örnekleri, GMYC analizine göre 1. MOTU içerisinde bir arada bulunurken, ABGD ve ASAP analizleri Çanakkale örneklerini farklı bir MOTU olarak ayırmıştır (Tablo 5.1). Bu örnekler morfolojik olarak ele alındığında, her birinde elitra üzerindeki karina yapıları küçük boyutlu tüberküllerin oluşturduğu bir hat olarak görölebilmektedir. Ancak elitranın üzerindeki tüberküllerin yoğunluk ve büyüklüklerinin bireyler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Küçükşapçı_Pim örneklerinde elitra üzerindeki tüberküller oldukça hafif olmakla beraber diğer 2 popölasyondaki örneklere göre daha yoğundur. *P. subglobosa salaria*_Güre ve *P. s. verruculifera*_Çanakkale örneklerinde elitra üzerinde daha büyük tüberküller ve bunların aralarında bulunan mikro-oyuklar mevcuttur. Güre-Balıkesir'den toplanan örneklerin bir kısmında, *P. subglobosa salaria* için ayırt edici bir özellik olan, elitra üzerindeki tüberküller arasında bulunan sık kıllar mevcutken, kimisinde elitrada kıllar bulunmadığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla aynı alandan toplanan örneklerden elitral kıllara sahip olanlar *P. subglobosa salaria* olarak etiketlenmiştir. *P. subglobosa salaria* örneklerinde elitral kılların bulunmayabileceğı daha önceden de kaydedilmiş bir durumdur (Nabozkenho et al. 2022). Bu 3 popölasyona ait örneklerin aedeagus yapıları (Bkz 4.2 f, h ve j) incelendiğinde; apikalde hafif genişlemiş ve sivri sonlanan bir tegmene sahip oldukları görölmektedir. Küçükşapçı örneğinin aedeagusu diğer iki örneğe nazaran daha sivri sonlanan paramerlere sahip olsa da, penis ve tegmen morfolojileri de göz önünde bulundurulduğunda, 3 popölasyonun genel olarak benzer aedeagus morfolojileri sergiledikleri ve bu durumun GMYC analizi sonuçlarını desteklediğı söylenebilir (Şekil 5.3). Bu örneklerde görölen aedeagus yapısı; Kweiton, (1982)'un çalışmasında sinonim olarak verilen *P. subglobosa salaria* ve *P. anatolica* türlerine ait aedeagus çizimlerine benzerlik göstermektedir. Bu durum, GMYC analizlerinde 1. MOTU olarak ayrılan soy hattının *P. subglobosa salaria* veya *P. anatolica* ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.



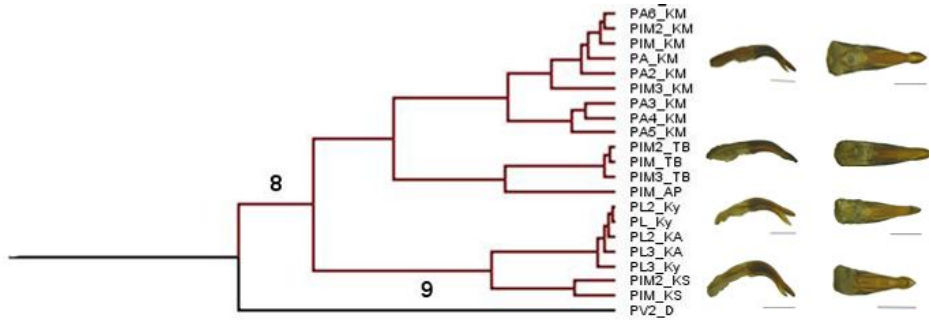
Şekil 5.3. *Camphonota* alt cinsine dahil Anadolu *Pimelia* örneklerinin GMYC analizine göre 1. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri.

GMYC (6. MOTU) ve ASAP analizleri; *P. s. verruculifera* olarak tanımlanan Çamiçi-İzmir örnekleri, tür tanımlaması yapılmamış olan Kula-Manisa ile COI dizileri NCBI veri tabanından alınmış olan Kurudere-İzmir ve İkaria Adası *P. subglobosa* örneklerini aynı takson içerisinde vermiştir. ABGD analizi ise bu örneklerin tür sınırlarını iki farklı grup olarak belirlemiştir (Tablo 5.1). Çamiçi-İzmir örneklerinin aedeagus yapıları incelendiğinde paramerlerin apikalde hafif bir girinti yaptıktan sonra genişleyerek uzandıkları görülebilmektedir (Bkz 4.2b). Bu durum *P. verruculifera* türünün, paralel uzanan ve apikalde girintili olmayan paramerler (Kaszab, 1938) ile karakterize olan aedeagus tanımına uymamaktadır.

Bozdağ-İzmir'den toplanmış olan ve tüberkül taşımayan pürüzsüz elitraları ile kolaylıkla diğer türlerden ayırt edilebilen örnekler *P. s. polita* olarak tanımlanmışlardır. GMYC analizleri bu örnekleri, COI dizileri NCBI veri tabanından temin edilmiş olan Kos Adası örnekleriyle birlikte 7. MOTU içerisinde belirlemişken, uzaklık temelli yaklaşımlar bu örnekleri iki farklı soyhattında vermiştir (Tablo 5.1). *P. s. polita* alt türü aedeagus morfolojisiyle de bu çalışmadaki diğer örneklerden belirgin bir şekilde ayrılabilir (Bkz 4.2d).

GMYC analizine göre 8. MOTU; *P. lendli* olarak tanımlanmış olan Erciyes Dağı-Kayseri örnekleri ile Şeyhşaban-Kayseri, Meke-Konya, Bolkar Dağları-Niğde ve Adana örneklerini içermektedir. ABGD ve ASAP analizleri bu örneklerin tür sınırlarını, sırasıyla 3 ve 2 taksona bölerek sunmuşlardır. (Bkz. 4.33-4.35, Tablo 5.1). Elde edilen ağaçlarda bu grup içerisinde bulunan böceklerde, elitra üzerindeki tüberküllerin yoğunluğu ve karinaların sertliğinin

aynı popülasyondaki bireyler arasında dahi varyasyon gösterebildiği gözlemlenmiştir. Ancak belirgin olarak Meke-Konya örneklerinin diğer popülasyonlara göre daha mat bir vücuda sahip oldukları söylenebilir. Aedeagus yapıları fotoğraflanmış olan Bolkar Dağları-Niğde (Bkz 4.2 l), Meke-Konya (Bkz 4.2 n) ve Şeyhşaban-Kayseri (Bkz 4.2 p) örnekleri incelendiğinde; Meke ve Şeyhşaban örneklerinde paramerlerin apikalde belirgin bir şekilde genişleyerek neredeyse bir topuz oluşturduğu görülmektedir. Ancak Meke örneklerinde aedeagusun tegmen kısmı medyanda genişleyerek üçgenimsi bir görünüm sergiler ve Şeyhşaban örneklerinden farklılık gösterirler. *P. lendli* olarak tanımlanan Erciyes Dağı-Kayseri ve Bolkar Dağları-Niğde örneklerinde ise apikaldeki bu genişleme diğer iki örnekteki kadar güçlü değildir. Ayrıca, aedeagusların lateral görünüşleri de popülasyonlar arasında varyasyon göstermektedir (Şekil 5.4). Kwieton, (1982)'da *P. lendli* türünün *P. testudo*'dan elitral marjinde kaybolmuş tüberküller ve distal olarak genişlememiş paramerler ile ayrıldığı, onun dışında iki türün morfolojik olarak birbirlerine çok benzediği belirtilmektedir. Meke ve Şeyhşaban örnekleri distalde genişlemiş olan paramerler ile Kwieton, (1982)'da *P. testudo* türü için verilen aedeagus tanımı ve çizimine benzerlik gösterirken, Bolkar ve Erciyes Dağı-Kayseri örnekleri *P. lendli* için verilen tanım ve çizimlere benzerlik göstermiştir. Ancak popülasyonlar, uzaklık ve ağaç temelli analizler sonucunda, aedeagus morfolojilerindeki bu varyasyonu yansıttak şekilde dallanmamışlardır (Şekil 5.4). Bu nedenle, soy hattının, *P. lendli* ve *P. testudo* olarak iki ayrı türü temsil edebileceği ya da aedeagus morfolojisinde gözlenen farklılıkların intraspesifik varyasyonlar olarak ele alınabileceği yönünde iki alternatif durumun geçerli olabileceğini düşündürmektedir.



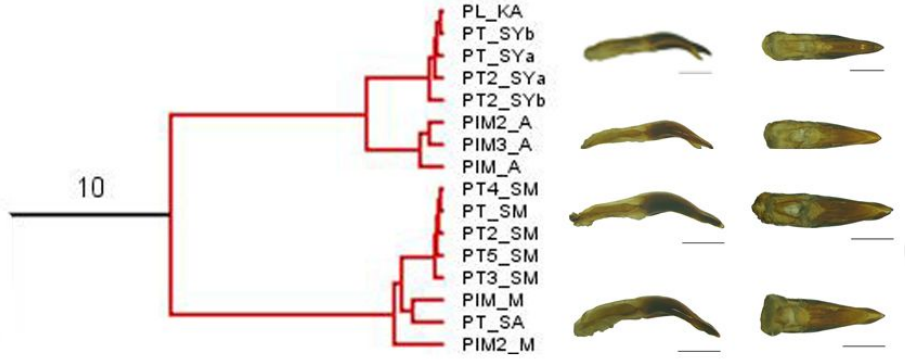
Şekil. 5.4 *Camphonota* alt cinsine dahil Anadolu *Pimelia* örneklerinin GMYC analizine göre 8. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri.

Tablo 5.1. Ağaç ve uzaklık temelli yaklaşımlarla elde edilen tür sınırlandırmaları ve öneriler.

	GMYC	ABGD	ASAP	İçerilen Taksonlar/Öneriler
Pimelia_Güre-Balıkesir				<i>P. subglobosa salaria</i> - <i>P. subglobosa verruculifera</i> ?
Pimelia_Kucuksapci-Balıkesir				İlgili tip materyalleri incelenmeli, tür sınırları moleküler ve morfolojik olarak değerlendirilerek revize edilmeli
Psalaria_Güre-Balıkesir				
Pver_Canakkale				Aedeagus morfolojisi <i>P. s. verruculifera</i> 'yı desteklememekte
Psub_ParosGr				
Psub_NaxosGr				<i>P. subglobosa</i>
Psub_HeraklionGr				
Psub_MilosGr				
Psub_AndrosGr				<i>P. subglobosa</i>
Psub_TinosGr				
Psub_AtticaGr				<i>P. subglobosa</i>
Psub_KeaGr				
Psub_AtticaGr				<i>P. subglobosa</i>
Psub_AndrosGr				
Psub_AndrosGr				<i>P. subglobosa</i>
Pimelia_Kula-Manisa				<i>P. subglobosa</i> - <i>P. subglobosa verruculifera</i> ?
Psub_Kurudere-İzmir				İlgili tip materyalleri incelenmeli, tür sınırları moleküler ve morfolojik olarak değerlendirilerek revize edilmeli
Psub_IkariaGr				Aedeagus morfolojisi <i>P. s. verruculifera</i> 'yı desteklememekte
Pver_Camici-İzmir				
Psub_Bozdağ-İzmir				
Ppolita_Bozdağ-İzmir				<i>P. subglobosa</i> - <i>P. subglobosa polita</i>
Psub_Bozdağ-İzmir				İlgili tip materyalleri incelenmeli, tür sınırları moleküler ve morfolojik olarak değerlendirilerek revize edilmeli
Psub_KosGr				
Psub_KosGr				
Pimelia_Meke-Konya				
Pimelia_Meke-Konya				
Pakbes_Meke_Konya				<i>P. lendlii</i> ? - <i>P. testudo</i> ?
Pimelia_Pozanti-Adana				İlgili tip materyalleri incelenmeli, tür sınırları moleküler ve morfolojik olarak değerlendirilerek revize edilmeli
Pimelia_Bolkar-Niğde				
Pimelia_Seyhsaban-Kayseri				
Plendli_Kayseri1960m				
Plendli_Kayseri2235m				
Pver_Davraz-Isparta				<i>P. s. verruculifera</i> - Tür tanımı için kapsamlı bir revizyona ihtiyaç var
Pimelia_Amasya				
Ptim_Sivas1830b				Morfolojik veriler bu MOTU'nun <i>P. timarchoides</i> olabileceğini desteklemekte
Pimelia2_Maras				
Ptim_Mazikiran-Sivas				
Ptim_Sivas1690m				
Pimelia_Antep				<i>Pimelia</i> sp
Pimelia6_Berendi-Konya				Tür tanımı için kapsamlı bir revizyona ihtiyacı var
Pver_Davraz-Isparta				<i>P. subglobosa verruculifera</i> ??
Pimelia_Burdur				İki ayrı aedeagus yapısı mevcut
Pver4_Babadag-Muğla				Taksonomik durum, tip materyalini de içine alan kapsamlı bir revizyonla ele alınmalı
Pimelia_Fethiye-Muğla				
Pimelia_Kutahya				<i>Pimelia</i> sp. - Tür tanımı için kapsamlı bir revizyona ihtiyacı var

GMYC analizinin sunduğu 10. MOTU içerisindeki, Kweiton, (1982)'a göre *P. timarchoides* olarak etiketlenmiş olan Gürün-Sivas, Mazikiran-Sivas ve teşhisi tamamlanmamış olan Amasya örnekleri için uzaklık temelli yaklaşımlar 2 farklı takson önermişlerdir (Bkz 4.33-4.35, Tablo 5.1). Aedeagus yapılarının ventral ve

lateral fotoğrafları incelendiğinde, uzaklık temelli yaklaşımların sonuçlarına uygun olarak Amasya ve 1830m yükseklikten toplanan Gürün-Sivas örneklerinin aedeagusları benzer morfolojiler sergilemiştir. Mazıkıran-Sivas ve 1690m yükseklikten toplanan Gürün-Sivas örnekleri ise apikalde biraz daha genişlemiş olan paramerler diğer iki örnekten ayrılabilirler (Bkz 4.2, Şekil 5.5).



Şekil. 5.5 *Camphonota* alt cinsine dahil Anadolu *Pimelia* örneklerinin GMYC analizine göre 10. MOTU'da bulunan örneklerin lateral ve ventral aedeagus morfolojileri.

GMYC analizleri sonucunda Berendi-Konya örnekleri, Gaziantep örnekleriyle beraber 11. MOTU içerisinde belirlenmişlerdir. ABGD analizleri de benzer bir sonuç verirken, ASAP analizi bu örnekleri iki farklı grup olarak ele almıştır. Elitra üzerinde belirgin karınalar ve büyük tüberküllere sahip olan Berendi örneklerinin, aedeagus morfolojileri diğer örneklerle göre varyasyon gösterse de mevcut tanı anahtarlarıyla kesin ve doğru bir tür tanımlaması yapılması mümkün olmamıştır.

P. s. verruculifera olarak etiketlenmiş Babadağ-Muğla ve Davraz örnekleri ile teşhisi tamamlanmamış olan Burdur örnekleri GMYC analizine göre bir takson altında (12. MOTU) bulunmaktadır. ABGD ve ASAP analizleri ise; Babadağ-Muğla örnekleri ayrı bir grupta olacak şekilde, iki farklı takson sunmuşlardır. Bu üç popülasyonun aedeagus yapıları incelendiğinde; Babadağ-Muğla örneklerinde paramerlerin paralel uzandığı ve apikal kısımda diğer iki örneğe nazaran oldukça sivri sonlandığı görülmüştür. Kaszab, (1938)'e göre *P. verruculifera*'da aedeagus paramerleri paralel uzanır ve apikalde girintili değildir. Babadağ-Muğla örneklerinin aedeagus yapıları bu tanıma benzerlik gösterse de Davraz ve Burdur örneklerinin aedeagusları apikalde girintilidir.

Kwieton 1982’de gerçekleştirdiği çalışmada; *Pimelia polita*, *P. verruculifera* ve *P. salaria* türlerini *P. subglobosa* türünün altına alarak bunları alt türler statüsüne getirmiştir. Ancak, *P. subglobosa* içerisinde önerilmiş olan bu alt türlerin ağaç üzerinde parafiletik bir durum sergilemesi *Pimelia polita*, *P. verruculifera* ve *P. salaria* türlerinin bağımsız soyhatları olarak birbirinden ayrıldığını destekler niteliktedir. Bu üç soyhattının birbirlerinden yaklaşık olarak 25-27 My öncesinde ayrıldığı gözlenmektedir (Bkz. 4.44).

Pimelia örneklerinin DNA barkodlamasında kullanılabilmek üzere mtCOI geninin 3’ ucunda bulunan 829 bp’lik diziler çoğaltılmıştır. Tenebrionidler içerisinde, gen bölgesinin hem baş hem de son kısmı yaygın olarak çoğaltılan ve tür sınırlarının belirlenmesinde kullanılan diziler olarak kullanılmaktadır (Papadopoulou et al., 2009; Papadopoulou et al., 2010; Gunter et al., 2014; Hebert et al., 2016). Ancak COI gen bölgesi için barkod olarak seçilen ve BIN numarası atanan bölge, genin 5’ ucundaki bir yere denk gelmektedir. Dolayısıyla elde edilen *Pimelia* dizilerinin veri tabanındaki BIN ile eşleştirilmesi mümkün olmamıştır. Ancak, bu tez çalışması kapsamında Anadolu *Pimelia* örneklerine ait yeni haplotiplerle ilişkili 74 COI3P barkodu oluşturulmuştur. Ayrıca, bu dizilerin, BOLDSystems veri tabanındaki dizilerle birlikte gerçekleştirilen filogenetik analizleri, 13 türün varlığını desteklemiştir

COI gen bölgesinin DNA barkodlaması ile çeşitli böcek gruplarındaki tartışmalı durumların çözümlendiği görülmüştür. Örneğin; Türkiye *Culex* (Ordo: Diptera) faunasında morfolojik olarak önceden tanımlanmış olan 9 tür kaydı bulunurken, Gunay et al.’in (2015) gerçekleştirdiği barkodlama çalışması ile aslında bunların 13 farklı tür olduğu belirlenmiştir. Benzer bir şekilde seksüel dimorfizm gösteren kelebek türlerinde çeşitli belirsizliklerin ortadan kaldırılmasında ya da tür tanımlarının pekiştirilmesinde DNA barkodlama yöntemi kullanılmıştır (Janzen et al., 2005; Nakahara et al., 2017).

Pimelia cinsi, milyonlarca yıllık evrimsel tarihi boyunca çeşitlenerek çok sayıda bağımsız soyhattını içeren çok eski ve karmaşık bir grup oluşturur. Daha önce yapılan *Pimelia* cinsiyle ilgili filogenetik analizler, cinsin atasal popülasyonlarının Kuzey Afrika’da 31.2 My öncesine dayandığını göstermektedir

(Mas-Peinado et al., 2018). Ancak Tenebrionidae familyasıyla ilgili moleküler filogenetik analizler cinsin divergensinin 56-65 My öncesine dayandığı belirtilmektedir (Kergoat et al., 2014). Daha önce *Camphonota* alt cinsinin diğer *Pimelia* alt cinslerinden yaklaşık 16 My önce ayrıldığı hesaplanmıştır (Mas-Peinado et al., 2018). Ancak, 22 farklı tür içeren *Camphonota* alt cinsi ile ilgili hesaplanan bu divergens tarihi, *P. subglobosa* ve *P. longula* türlerinden sadece 5 örnek üzerinden elde edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında, moleküler filogenetik analizler *Camphonota* alt cinsine dahil türlerin Türkiye’den 16 ve Yunanistan / Ege Adalarından 10 lokaliteden elde edilen COI dizileriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, veri setine *Pimelia* alt cinsine dahil *P. bajula*, *Chaetotoma* alt cinsine dahil *P. cursor* ve dış grup olarak *Pachyscelis quadricollis* örnekleri eklenerek *Pimelia* ve *Camphonota* soyhatlarının divergens zamanları tahmin edilmiştir. *Pimelia* soy hattının divergensi 45.72 ± 8.49 My, *Camphonota* soyhattının divergensi de 37-38 My öncesi olarak hesaplanmıştır. *Camphonota* alt cinsinin yaklaşık 27-28 My öncesinde iki ana soy hattına (A ve B soy hatları) ayrılarak çeşitlendiği görülmektedir. Bu farklı divergens tahminlerinin, yüksek tür çeşitliğine sahip olan grubun filogenetik çalışmalarda nispeten az türle ve az sayıda örnekle temsil edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada Türkiye’de dağılışı gösteren *Pimelia* türlerine ait ilk sitogenetik ve mtCOI gen bölgesine ait barkod verileri elde edilmiş ve cinse ait filogenetik çıkarsamalar gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, Anadolu *Pimelia* örnekleri, bazı küçük sitogenetik varyasyonlar sergiliyor olsa da, $2n=18$ kromozom sayısı bütün örneklerde korunmuştur. Buna karşın örnekler, COI gen dizileri açısından büyük bir varyasyon sergilemektedir. İlerleyen dönemlerde gerçekleştirilecek karşılaştırmalı moleküler sitogenetik analizler, *Pimelia* türlerinin genom evriminde etkili mekanizmaların anlaşılmasında büyük katkı sağlayacaktır. Ayrıca, filogenetik analizlerin nükleer belirteçler dahil edilerek genişletilmesi ve örneklerin tip materyali ile karşılaştırılarak incelenmesi Türkiye’de dağılışı gösteren *Pimelia* taksonlarının sınırlarının daha net olarak belirlenmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adhearn, G.A.**, 1970, The control of water loss in desert tenebrionid beetles, *Journal of Experimental Biology* 53, 573–595p.
- Abdurakhmanov G.M. and Nabozhenko, M.V.**, 2011, *Keys and catalogue to darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae s. str.) of the Caucasus and south of European part of Russia*, 361p.
- Airif, I.A. and Khan, H.A.**, 2009, Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32: 9–17p.
- Ahmad, S. F., and Martins, C.**, 2019, The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses, *Cells*, 8(2), 1–26p. <https://doi.org/10.3390/cells8020156>.
- Allander, T., Emerson, S. U., Engle, R. E., Purcell, R. H. and 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 614p.
- Almeida, M.C., Zacaro, A.A. and Cella, D.M.**, 2000, Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques, *Hereditas*, 133:147–157p.
- Antoine, M.**, 1949, Notes d'entomologie marocaine XLVIII. Tableaux de détermination des Pimelia du Maroc (Col. Tenebrionidae), *Annales de la Société entomologique de France*, 116, 17–58p.
- Avise, J.C.**, 1994, Molecular Markers, *Natural History and Evolution*, New York, NY: Chapman and Hall.
- Banaei-Moghadda, A.M., Martis, M.M., Macas, J., Gundlach, H., Himmelbach, A., Altschmied, L., Mayer, K.F. and Houben, A.**, 2015, Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. *Biochim Biophys Acta*, 1849(1):64-70p. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.11.007.
- Bergsten, J., Bilton, D. T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M. T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G. N., Ribera, I., Nilsson, A. N., Barraclough, T. G., and Vogler, A. P.**, 2012, The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding, *Systematic Biology*, 61(5), 851–869p. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys037>
- Bione, E., Camparoto, M.L. and Simões and Z.L.P.**, 2005, A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocoprins inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques, *Genetics and Molecular Biology*, 28:111–116p. doi:10.1590/S1415-47572005000100019

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blackmon, H., and Demuth, J.P.**, 2015, Coleoptera Karyotype Database, *The Coleopterists Bulletin* 69:1, 174-175p.
- Blaxter, M.L.**, 2004, The promise of a DNA taxonomy, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359, 669–679p. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Aalbu, R. L., Alonso-Zarazaga, M. A., Merkl, O., and Davies, A. E.**, 2021, Review of genus-group names in the family tenebrionidae (Insecta, Coleoptera), *ZooKeys*, 2021(1050), 1–633p. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1050.64217>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. and Drummond, A.J.**, 2014, BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis, *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537
- Brower, A.V. Z.**, 1994, Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 6491–6495p. doi:10.1073/pnas.91.14.6491
- Bruvo, B., Pons, J., Ugarkovic, D., Juan, C., Petitpierre, E. and Plohl, M.**, 2003, Evolution of low-copy number and major satellite DNA sequences coexisting in two *Pimelia* species-groups (Coleoptera), *Gene*, 312, 85–94
- Bruvo-Madaric, B., Plohl, M. and Ugarkovic, D.**, 2007, Wide distribution of related satellite DNA families within the genus *Pimelia* (Tenebrionidae), *Genetica*, 130:35-42p.
- Camargo, A., and Sites, J. Jr.**, 2013, Species delimitation: a decade after the renaissance. In I. Y. Pavlinov (Ed.), *The Species Problem – Ongoing Issues*, Published: February 6 2013 under CC by 3.0 license. ISBN: 978-953-51-0957-0. <https://doi.org/10.5772/52664>
- Canpolat, D. and Hasbenli, A.**, 2012, New records of Tenebrioninae and Pimeliinae (Coleoptera: Tenebrionidae) from Turkey, *Journal of the Entomological Research Society*, 14(1):15–20 p.
- Caro-Pintos, F.**, 2015, Descripción de una especie nueva del género *Pimelia* Fabricius, 1775 (Coleoptera, Tenebrionidae) de la Península Ibérica, *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 57, 165–174p.
- Chandley, A.C., Speed, R.M. and Ma, K.**, 1994, Meiotic Chromosome Preparation. Chromosome Analysis Protocols. Ed: J. R. Gosden, Methods in Molecular Biology, Vol 29:27-40 p.
- Colomba, M.S., Vitturi, R., Libertini A., Gregorini A. and Zunino, M.**, 2006, Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera: Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies, *Micron*, 37:47–51p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Contreras-Diaz, H.G., Moya, O., Oromi, P., and Juan, C., 2003,** Phylogeography of the Endangered Darkling Beetle Species of *Pimelia* Endemic to Gran Canaria (Canary Islands), *Molecular Ecology*, 12: 2131–43 p.
- Cox, A. J. and Hebert, P. D. N., 2001,** Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean, *Mol. Ecol.*, 10, 371–386p.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., and Beukeboom, L. W., 2000,** B-chromosome evolution, *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*, 355, 163–178p.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M. and Satler, J.D., 2013,** How to fail at species delimitation, *Mol. Ecol.*, 22(17), 4369–4383p. <https://doi.org/10.1111/mec.12413>.
- Cuvier, B.G. and Latreille, P.A., 1834,** The Animal Kingdom, Arranged According to Its Organization. Serving as a Foundation for the Natural History of Animals and a Introduction to Comparative Anatomy. With Figures Designed after Nature: The Crustacea, Archnides and Insecta. Latreille. G. Henderson, London.
- Çalışan, U. and Alpagut-Keskin, N., 2023,** Cytogenetic analysis on *Turkonalassus quercanus* Keskin, Nabozhenko et Alpagut-Keskin, 2017 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini), *Caucasian Entomological Bulletin*, 19(1), 15–21. <https://doi.org/10.23885/181433262023191-1521>
- da Silva, G. M., Bione, E. G., Cabral-de-Mello, D. C., de Moura, R. D. C., Simões, Z. L. P., and de Souza, M. J., 2009,** Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae), *Genetics and Molecular Biology*, 32, 276–280p. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000040>
- Dayrat, B., 2005,** Towards integrative taxonomy: integrative taxonomy, *Biol. J. Linn.Soc.*, 85(3), 407–415p. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>.
- Demirsoy, A., 2018,** Tür Tanımında ve Filogenetik Soy Ağacında Bitmeyen Tartışma, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(2), 58–64s.
- Díaz-Tapia, P., Maggs, C.A., Macaya, E.C. and Verbruggen, H., 2018,** Widely distributed red algae often represent hidden introductions, complexes of cryptic species or species with strong phylogeographic structure, *J. Phycol.*, 54, 829-839p. <https://doi.org/10.1111/jpy.12778>
- Dinno, A., 2018,** paran: Horn's Test of Principal Components/Factors. R package version 1.5.2, <<https://CRAN.R-project.org/package=paran>>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Doğan, D.**, 2020, Iğdır İlinde Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) Türleri Üzerinde Faunistik ve Sistematik Çalışmalar, Atatürk Üniversitesi, Erzurum (yayınlanmamış).
- Drummond, A.J. and Rambaut, A.**, 2007, BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees, *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214 p.
- Dutrillaux, A.M., Xie, H. and Dutrillaux, B.**, 2007, Nucleolus and chromosome relationships at pachynema in four Scarabaeoidea (Coleoptera) species with various combinations of NOR and sex chromosomes, *Chromosome Research*, 15:417–427p. doi:10.1007/s10577-007-1133-2
- Edwards, S.V.**, 2009, Is a new and general theory of molecular systematics emerging?, *Evolution*, 63,1–19p.
- Español, F.**, 1954, Los tenebriónidos (Col.) de Baleares, *Trabajos del Museo de Ciencias Naturales de Barcelona (nueva serie zoológica)*, 1, 1–96p.
- Esselstyn, J. A., Evans, B. J., Sedlock, J. L., Anwarali Khan, F. A. and Heaney, L. R.**, 2012, Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1743), 3678-3686p.
- Ezard, T., Fujisawa, T. and Barraclough, T.**, 2021, _splits: SPecies' LImits by Threshold Statistics_. R package version 1.0-20/r56, <<https://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>>.
- Fattorini, S.**, 2000, Dispersal, vicariance and refuges in the Anatolian Pimeliinae (Coleoptera, Tenebrionidae): remarks on some biogeographical tenets, *Biogeographia*, XXI(December), 355–398p. <https://doi.org/10.21426/B6110103>
- Ferrer, J., and Soldati, L.**, 1999, Contribution a l'étude des Tenebrionidae de Turquie (Insecta, Coleoptera), *Entomofauna*, 20(4), 53–92p.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. and Blaxter, M.**, 2002, Molecular barcodes for soil nematode identification, *Molecular Ecology*, 11, 839–850. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>
- Fregin, S., Haase, M., Olsson, U. and Alström, P.**, 2012, New insights into family relationships within the avian superfamily Sylvioidea (Passeriformes) based on seven molecular markers, *BMC Evol Biol*, 12, 157 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-157>
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., and Moritz, C.**, 2012, Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy, *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 480–488p. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.04.012>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A., and Allendorf, F.W.,** 2012, Harnessing genomics for delineating conservation units, *Trends in Ecology and Evolution*, 27(9), 489–496p. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012>
- Garg, K.M., Tizard, R., Ng, N.S.R., Cros, E., Dejtardol, A., Chattopadhyay, B., Pwint, N., Päckert, M. and Rheindt, F.E.,** 2016, Genome-wide data help identify an avian species-level lineage that is morphologically and vocally cryptic, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 102, 97–103p. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.028>.
- Gomes de Oliveira, S., Cassia de Moura, R., and Martins, C.,** 2012, B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences, *BMC Genetics*, 13(1), 96p. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-96>
- Gómez, G.F., Bickersmith, S.A., González, R., Conn, J.E. and Correa, M.M.,** 2015, Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical *arribalzagia* series, *PLoS ONE*, 10(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119488>
- Goodpasture, C. and Bloom, S.E.,** 1975, Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining, *Chromosoma*, 53:37-50p.
- Gu J, Jiang B, Wang H, Wei T, Lin L, Huang Y and Huang, J.,** 2020, Phylogeny and species delimitation of the genus *Longgenacris* and *Fruhstorferiola viridifemorata* species group (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) based on molecular evidence, *PLoS ONE*, 15(8): e0237882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237882>
- Guimarães, K. L. A., Lima, M. P., Santana, D. J., de Souza, M. F. B., Barbosa, R. S. and Rodrigues, L. R. R.,** 2022, DNA barcoding and phylogeography of the *Hoplias malabaricus* species complex, *Scientific Reports*, 12(1), 1–15p. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09121-z>
- Gunter, N. L., Levkaničová, Z., Weir, T. H., Ślipiński, A., Cameron, S. L., and Bocak, L.,** 2014, Towards a phylogeny of the Tenebrionoidea (Coleoptera), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 305–312p. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.028>
- Gunay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A. and Linton, Y.M.,** 2015, Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors, *Acta Trop*, 143:112–120 p.
- Gündoğan, B.,** 2015, *Cephalostenus elegans* Brulle, 1832 (Coleoptera: Tenebrionidae: Scaurini) türünde kromozom özelliklerinin belirlenmesi, Ege Üniversitesi, İzmir, 57s (yayımlanmamış).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hamilton, C.A., Formanowicz, D.R. and Bond, J.E.,** 2011, Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American Tarantulas, *PLoS ONE*, 6, e26207.
- Holecová, M., Rozek, M., and Lachowska, D.,** 2008, The First Cytogenetic Report on *Laena reitteri* Weise, 1877 with Notes on Karyotypes of Darkling Beetles, *Folia Biologica (Kraków)*, 56(3–4), 213–217p. <https://doi.org/10.3409/fb.56>
- Hamels, J., Gala, L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammattéo, N. and Remacle, J.,** 2001, Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance, *BioTechniques*, 31, 1364–1372p.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R.,** 2003a, Biological Identifications through DNA Barcodes, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313–21p.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., and DeWaard, J. R.,** 2003b, Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270, 96–99p. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., Zakharov, E. V., Telfer, A. C., Levesque-Beaudin, V., Milton, M. A., Pedersen, S., Jannetta, P., and Dewaard, J. R.,** 2016, Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371(20150333). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0333>
- Holecová, M., Rozek, M., and Lachowska, D.,** 2005, Evidence of B-chromosomes in the Karyotype of *Barypeithes pellucidus* Boheman 1834 (Coleoptera, Curculionidae, Entiminae) from Central Europe, *Folia Biologica*, 53(1), 65–68p. <https://doi.org/10.3409/1734916054663500>
- Howell, W.M. and Black, D.A.,** 1980, Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method, *Experientia*, 36:1014-1015.
- Huelsenbeck, J.P. and Rannala, B.,** 1997, Phylogenetic methods come to age: testing hypotheses in an evolutionary context, *Science* 276, 227–232p.
- Huson, D.H. and Bryant, D.,** 2006, Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267 p.
- Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Burns, J. M., Hallwachs, W., Remigio, E., and Hebert, P. D. N.,** 2005, Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1835–1845p. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1715>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Janzen, D. H., Burns, J. M., Cong, Q., Hallwachs, W., Dapkey, T., Manjunath, R., Hajibabaei, M., Hebert, P. D. N., and Grishin, N. V.,** 2017, Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), 8313–8318p. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621504114>
- Jinbo, U., Kato, T., and Ito, M.,** 2011, Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology, *Entomological Science*, 14(2), 107–124p. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>
- Juan, C., and Petitpierre, E.,** 1988, A Chromosome Survey of North African and Eastern Mediterranean Tenebrionids (Coleoptera), *Cytobios*, 54, 85–94p.
- Juan, C., and Petitpierre, E.,** 1991, Chromosome numbers and sex determining systems in Tenebrionidae, *Advances in Coleopterology*, 167–176p.
- Juan, C., Vazquez, P., Rubio, J.M., Petitpierre, E. and Hewitt, G.M.,** 1993, Presence of highly repetitive DNA sequences in Tribolium flour-beetles, *Heredity*, 70(July 1991), 1–8p.
- Juan, C., Oromi, P. and Hewitt, G.M.,** 1995, Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus Pimelia (Tenebrionidae), *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 261:173–180p.
- Juan, C., Ibrahim, K.M., Oromi, P. and Hewitt, G.M.,** 1996, Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Pimelia darkling beetles on the island of Tenerife (Canary Islands), *Heredity*, 77:589–598p.
- Juan, C., Oromí, P. and Hewitt, G.M.,** 1997, Molecular phylogeny of darkling beetles from the Canary Islands: comparison of inter island colonization patterns in two genera, *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 121–130p.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., and Flouri, T.,** 2017, Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo, *Bioinformatics*, 33(11), 1630–1638p. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>
- Karagyan, G., Lachowska, D. and Kalashian, M.,** 2012, Karyotype analysis of four jewel-beetle species (Coleoptera, Buprestidae) detected by standard staining, C-banding, AgNOR-banding and CMA3/DAPI staining, *Comparative Cytogenetics*, 6(2):183–97p. doi:10.3897/CompCytogen.v6i2.2950
- Katılmış, Y.,** 2016, Dalaman Sahili'nde İribaş Kaplumbağa (*Caretta caretta*) Yuvalarında Görülen Omurgasız İstilas Üzerine Araştırmalar, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 64s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaszab, Z.**, 1938, Beiträge zur Kenntnis der Tenebrioniden-Fauna Kleinasien. *Folia Entomologica Hungarica*, 5 (1-4): 2-7p
- Kavalco, K.F. and Pazza, R.**, 2004, A rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes, *Genetics and Molecular Biology*, 27(2):196–198p.
- Kaya, R.**, 2015, Bazı Tentyria Latreille, 1802 (Coleoptera:Tenebrionidae) Türlerinde Kromozom Sayılarının Belirlenmesi ve Karyotip Analizi, Ege Üniversitesi, İzmir, 37s.
- Kergoat, G. J., Soldati, L., Clamens, A.-L., Jourdan, H., Jabbour-Zahab, R., Genson, G., Bouchard, P., and Condamine, F. L.**, 2014, Higher level molecular phylogeny of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae), *Systematic Entomology*, 39(3), 486–499p. <https://doi.org/10.1111/syen.12065>
- Keskin, B.**, 1999, Balçova Barajı (İzmir; Türkiye) civarı Tenebrionidae (Coleoptera) faunası. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 23(3), 211–224p.
- Keskin, B. and Nabozhenko, M.V.**, 2012, Idahelops alpagutae (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini): a new genus and species from the Aegean region of Turkey, *Zootaxa*, 3207:63–67 p.
- Keskin, B. and Nabozhenko, M.V.**, 2015, The New Genus Taurohelops Keskin and Nabozhenko (Coleoptera: Tenebrionidae) from Anatolia, Turkey, *The Coleopterists Bulletin*, 69(mo4):83-92 p.
- Keskin, B., Nabozhenko, M.V. and Alpagut Keskin, N.**, 2017a, Eustenomacidius egeuniversitatis sp.n. – the first record of the tenebrionid genus in Turkey (Insecta: Coleoptera), *Turk J Zool*, 41: 237-240 p.
- Keskin, B., Nabozhenko, M., and Alpagut-Keskin, N.**, 2017, Taxonomic Review of the Genera Nalassus Mulsant, 1854 and Turkonalassus gen. nov. of Turkey (Coleoptera: Tenebrionidae), *Annales Zoologici*, 67(4), 725–747p. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2017.67.4.009>
- Knowles, L.L. and Carstens, B.C.**, 2007, Delimiting Species without Monophyletic Gene Trees, *Systematic Biology*, 56(6), 887–895p.
- Kraatz, G.**, 1865, Revision der Tenebrioniden der alten Welt aus Lacordaire's Gruppen der Erodiides, Tentyriides, Akisdes, Pimeliides, und der europäischen Zophosis-Arten, 393 pp. G. Pathey, Berlin.
- Kwieton, E.**, 1981, Insects of Saudi Arabia. Coleoptera: Fam. Tenebrionidae, Tribe Pimeliini, *Fauna of Saudi Arabia*, 3, 402–407p.
- Kwieton, E.**, 1982, Contributions ultérieures à la connaissance du genre Pimelia F. (Col., Tenebrionidae), *Annotationes Zoologicae et Botanicae*, No:145
- Lachowska, D., Roz, M., and Holecova, M.**, 2005, C-banding karyotype and NORs analyse in eight species of Barypeithes Duval from Central Europe (Coleoptera , Curculionidae , Entiminae). *Caryologia*, 58(3), 274–280p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lachowska, D., Rozek, M. and Holecová, M.,** 2008, Cytotaxonomy and karyology of the tribe Otiorhynchini (Coleoptera: Curculionidae), *European Journal of Entomology*, 105:175–184p.
- Leliart, F., Verbruggen, H., Wysor, B and De Clerk, O.,** 2009, DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: Algorithmic species delimitation in the Boodlea complex (Chlorophyta: Cladophorales), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 122–133p.
- Latreille, P.A.,** 1802, Histoire naturelle, générale et particulière des Crustacés et des Insectes. Ouvrage faisant suite à l'Histoire naturelle générale et particulière par Leclerc et de Buffon et partie du cours complet d'Histoire naturelle rédigé par C.S. Sonini. Dufart, Paris. Vol. 10: i-xii + 415p.
- Leo, P., and Fattorini, S.,** 2000, The Zoogeographical Composition and Distribution of the Anatolian Pimeliini (Coleoptera, Tenebrionidae), *Biogeographia*, XXI, 400–427.
- Levan, A., Fredga, K. and Sonberg, A.,** 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas* 52:201–220p.
- Lidén, M.,** 1990, Replicators, hierarchy, and the species problem, *Cladistics*, 6, 183–186p.
- Lillig, M., Barthet, H.B. and Mifsud, D.,** 2012, An Identification and Informative Guide to the Tenebrionidae of Malta (Coleoptera), *Bulletin of the Entomological Society of Malta*, 5:121–160 p.
- Lira-Neto, A.C., Silva, G.M., Moura, R.C. and Souza, M.J.,** 2012, Cytogenetics of the Darkling Beetles Zophobas aff. confusus and Nyctobates gigas (Coleoptera, Tenebrionidae), *Genetics and Molecular Research*, 11(3):2432–2440 p.
- Lopez, J.A.R., Husemann, M., Schmitt, T., Kramp, K. and Habel, J.C.,** 2018, Mountain Barriers and Trans-Saharan Connections Shape the Genetic Structure of Pimelia Darkling Beetles (Coleoptera: Tenebrionidae), *Biological Journal of the Linnean Society*, 124 (3): 547–56 p.
- Löbl, I. and Smetana, A.,** 2008, Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 5, Tenebrionoidea, Stenstrup: Apollo Books, 670 p.
- Macgregor, H.C. and Varley, J.M.,** 1986, Working with Animal Chromosomes, Moscow. 272 p.
- Machado, A.,** 1979, Consideraciones sobre el género Pimelia (Col. Tenebrionidae) en las Islas Canarias y descripción de una nueva especie, *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 3, 119–127p.
- Maddison, W.P.,** 1997, Gene Trees in Species Trees, *Systematic Biology*, 46(3), 523–536p. <https://doi.org/10.1093/sysbio/46.3.523>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martinsson, S. and Erséus, C.**, 2017, Cryptic speciation and limited hybridization within *Lumbricus* earthworms (Clitellata: Lumbricidae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 18-27p.
- Maryanska-Nadachowska, A.**, 2004, B chromosomes in Sternorrhyncha (Hemiptera, Insecta), *Cytogenet Genome Res*, 106, 210–214p. <https://doi.org/10.1159/000079289>
- Mas-Peinado, P., Buckley, D., Ruiz, J. L., and García-París, M.**, 2018, Recurrent diversification patterns and taxonomic complexity in morphologically conservative ancient lineages of *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Systematic Entomology*, 43(3), 522–548p. <https://doi.org/10.1111/syen.12291>
- Matthews, E.G., Lawrence, J.F., Bouchard, P., Steiner, W.E. and Silipinski, S.A.**, 2010, 11.14. Tenebrionidae Latreille, 1802, Handbook of Zoology, A Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom, Vol. IV – Arthropoda: Insecta. Part 38, Coleoptera, Beetles, Vol. 2: Systematics (Part 2) (ed. by R.A.B. Leschen, , R.G. Beutel and J.F. Lawrence), Walter de Gruyter, Berlin, 574–659p.
- Mayr, E., 1982, Of What Use Are Subspecies?, *The Auk*, 99(3), 593–595p.
- Medina, F.J., Risueno, M.C., Sanchez-Pina, M.A. and Fernandez-Gomez, M.E.**, 1983, A study of nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology, *Chromosoma*, 88:149-155p
- Michonneau, F.**, 2016, Using GMYC for species delination, Zenodo. DOI: 10.5281/zenodo.838260
- Michonneau, F., Bolker, B., Holder, M., Lewis, P. and O'Meara, B.**, 2023, `rncl`: An Interface to the Nexus Class Library, R package version 0.8.7, <<https://CRAN.R-project.org/package=rncl>>.
- Moura, R.C., Souza, M.J., Melo, N.F. and Lira-Neto, A.C.**, 2003, Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH), *Hereditas*, 138:200–206p.
- Moya, Ó., Contreras-Díaz, H. G., Oromí, P., and Juan, C.**, 2006, Using statistical phylogeography to infer population history: Case studies on *Pimelia* darkling beetles from the Canary Islands, *Journal of Arid Environments*, 66, 477–497p. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.01.008>
- Nabozhenko, M. V., Doğan, D., and Yıldırım, E.**, 2022, Additions to the knowledge of the diversity of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) from Turkey with new records and taxonomic notes, *J. Insect Biodiversity*, 032(1), 5–25p. <https://doi.org/https://doi.org/10.12976/jib/2022.32.1.2>
- Nanney, D. L.**, 1982, Genes and phenes in Tetrahymena, *Bioscience* 32, 783–788p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakahara, S., Zacca, T., Huertas, B., Neild, A., Hall, J., Lamas, G., Holian, L., Espeland, M., and Willmott, K.R., 2017,** Remarkable sexual dimorphism, rarity and cryptic species: a revision of the ‘aegrota species group’ of the Neotropical butterfly genus *Caeruleptychia* Forster, 1964 with the description of three new species (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae), *Insect Syst Evol.*, 27 July 2017.
- Oromí, P., 1990,** Una nueva especie del género *Pimelia* de la isla de Gran Canaria (Coleoptera, Tenebrionidae), *Vieraea*, 19, 245–249p.
- Pace, N. R., 1997,** A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science*, 276, 734–740p.
- Page, R. D. and Charleston, M. A., 1998,** Trees within trees: phylogeny and historical associations, *Trends in Ecology & Evolution*, 13(9), 356-359p.
- Paradis, E. and Schliep, K., 2019,** _ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35: 526-528p.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Keskin, B. and Vogler, A.P., 2009,** Comparative Phylogeography of Tenebrionid Beetles in the Aegean Archipelago: The Effect of Dispersal Ability and Habitat Preference, *Molecular Ecology*, 1-15 p.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., and Vogler, A. P., 2010,** Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration, *Molecular Biology and Evolution*, 27(7), 1659–1672. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq051>
- Pierre, F., 1985,** Sur quelques *Pimelia* recueillis par le Pr. A. Hollande dans le Haut Atlas Marocain (Coleoptera, Tenebrionidae), *Nouvelle Revue d'Entomologie*, 3, 287–297p.
- Patkin, E.L. and Sorokin, A.V., 1984,** Nucleolus-Organizing Regions Chromosomes in Early Embryogenesis of Laboratory Mice, *Bull. Exp. Biol. Med. (USSR)*, 96:92-94 p.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., and Achaz, G., 2012,** ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877p. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Puillandre, N., Brouillet, S., and Achaz, G., 2021,** ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21, 609–620p. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pons, J.**, 2004, Evolution of diploid chromosome number, sex-determining systems, and heterochromatin in Western Mediterranean and Canarian species of the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(September 2003), 81–85p. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2003.00247.x>
- Pons, J., Petitpierre, E., and Juan, C.**, 2002, Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera), *Molecular Biology and Evolution*, 19(8), 1329–1340p. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004194>
- Pons, J., Bruvo, B., Petitpierre, E., Plohl, M., Ugarkovic, D., and Juan, C.**, 2004, Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): Random differential amplification from a common “satellite DNA library., *Heredity*, 92(5), 418–427p. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800436>
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J et al.**, 2006, Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects, *Systematic Biology*, 55, 595–609p.
- Posada, D.**, 2008, jModelTest: Phylogenetic Model Averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256 p.
- R Core Team**, 2022, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut A.**, 2016, FigTree v1.4.3 Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/FigTree>.
- Rambaut, A. and Drummond, A.J.**, 2009, Tracer version 1.6, <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J.**, 2010, TreeAnnotator version 1.8.4, <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Rannala, B.**, 2015, The art and science of species delimitation, *Current Zoology*, 61(5), 846–853p. <https://doi.org/10.1093/czool o/61.5.846>
- Rasband, W.S.**, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.
- Ratnasingham, S., and Hebert, P. D. N.**, 2007, BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org), *NPR Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364p. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reid, N. M., and Carstens, B. C.,** 2012, Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: A Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model, *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-196>
- Reitter, E.,** 1915, Bestimmungs-Tabelle der echten Pimeliiden aus der palaearktischen Fauna, *Wien. Ent. Zeitung.*, 34(1-2), 1-63p.
- Ribera, I., Barraclough, T.G., and Vogler, A.P.,** 2001, The effect of habitat type on speciation rates and range movements in aquatic beetles: inferences from species-level phylogenies, *Molecular Ecology*, 10 (3): 721–735p.
- Ribera, I., Bilton, D.T., Balke, M. and Hendrich, L.,** 2003, Evolution, mitochondrial DNA phylogeny and systematic position of the Macaronesian endemic *Hydrotarsus Falkenström* (Coleoptera: Dytiscidae), *Systematic Entomology*, 28, 493-508p.
- Rosero-Garcia, D., Bickersmith, S.A., Suaza-Vasco, J.D., Porter, C., Correa, M.M., Conn, J.E. and Uribe-Soto, S.,** 2017, Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of Antioquia, Colombia, *Zootaxa*, 4277(3), 369-385p. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.3.3>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., and Sanchez-Gracia, A.,** 2017, DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets, *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302p. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Rozek, M.,** 1998, C . bands and NORs on chromosomes in four species of the genus *Trechus* Clairv. (Coleoptera, Carabidae), *Caryologia*, 51, 189–194p.
- Rufas, J.S., Iturra P., Souza, W. and Esponda, P.,** 1982, Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy, *Arch Biol*, 93:267-276p.
- Sakamoto, Y. and Zacaro, A.A.,** 2009, LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes, Initial version, An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- Schlick-Steiner, Birgit C., Steiner, Florian M., Seifert, Bernhard, Stauffer, Christian, Christian, Erhard, Crozier and Ross H.,** 2010, Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity, *Annu. Rev. Entomol.*, 55(1), 421–438p. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085432>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scalerccio, S., Infusino, M., Huemer, P., and Mutanen, M.** 2021, Pruning the Barcode Index Numbers tree: Morphological and genetic evidence clarifies species boundaries in the *Eupithecia conterminata* complex (Lepidoptera: Geometridae) in Europe, *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59, 1962– 1981p. <https://doi.org/10.1111/jzs.12568>
- Schneider, M.C., Almeida, M.C., Rosa, S.P., Costa, C. and Cella, D.M.,** 2006, Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA 3/DA/DAPI staining, *Genetica*, 128:333–346p. doi:10.1007/s10709-006-7101-5
- Sénac, H.,** 1884, Essai monographique sur le genre *Pimelia* (Fabricius). Première partie. Espèces a tarses postérieurs et intermédiaires comprimés, Nouvelle Librairie Médicale et Scientifique, Ancienne et Moderne de J. Lechevalier, Paris. 106 p
- Sénac, H.,** 1887, Essai monographique sur le genre *Pimelia* (Fabricius). Deuxième et dernière partie. Espèces a tarses postérieurs et intermédiaires non comprimés, Nouvelle Librairie Médicale et Scientifique, Ancienne et Moderne de J. Lechevalier, Paris, 160 p.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A. Crespi, B., Liu, H. and Flook, P.,** 1994, Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Annals of the Entomological Society of America*, 87:6, 651-701p
- Soldati, L.,** 2009, The Darkling Beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) of Qatar, *Natura Optima Dux Foundation*, Warszawa.
- Solier, A.J.,** 1836, Essai sur les collaptérides (suite), *Annales de la Société Entomologique de France*, 5, 5–200p
- Stroscio, S., Baviera, C., Frati, F., Lo Paro, G., and Nardi, F.,** 2011a, Deep genetic divergence in the darkling beetle *Pimelia rugulosa* (Coleoptera, Tenebrionidae) reflects Plio-Pleistocene paleogeographic history of Sicily. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(3), 196–203p. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2011.00617.x>
- Stroscio, S., Baviera, C., Frati, F., Lo Paro, G. and Nardi, F.,** 2011b, Colonization of the Aeolian Islands by *Pimelia Rugulosa* *Rugulosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Tenebrionidae) Inferred from the Genetic Structure of Populations: Geological and Environmental Relations, *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 29–37 p.
- Sumner, A.T.,** 2003, Chromosomes: Organization and Function, Blackwell Publishing, Oxford, 294p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şendoğan, D. and Alpagut Keskin, N.,** 2016, Karyotype and sex chromosome differentiation in two *Nalassus* species (Coleoptera, Tenebrionidae), *Comp Cytogenet*, 10(3):371–385 p.
- Şendoğan, D., Gündoğan, B., Nabozhenko, M. V., Keskin, B., and Alpagut Keskin, N.,** 2019, Cytogenetics of *Accanthopus velikensis* (Piller et Mitterpacher, 1783) (Tenebrionidae: Helopini), *Caryologia*, 72(3), 97–103p. <https://doi.org/10.13128/caryologia-771>
- Talavera, G., Dinca, V. and Vila, R.,** 2013, Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey, *Methods Ecol. Evol.*, 4, 1101–1110p.
- Tezcan, S., Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Keskin, B., and Ferrer, J.,** 2004a, Contributions to the knowledge of the Tenebrionidae (Coleoptera) from Turkey Part I. Lagrinae, Pimeliinae, Bolitophaginae, Diaperinae, *Türk. Entomol. Derg.*, 28(2), 99–114p.
- Tezcan, S., Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Keskin, B., and Ferrer, J.,** 2004b, Contributions to the knowledge of the Tenebrionidae (Coleoptera) from Turkey Part II. Opatrinae, Tenebrioninae, Adeliinae., *Türk. Entomol. Derg.*, 28(3), 163–180p.
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C. and Ghosh, S.K.,** 2018, DNA Barcoding and Molecular Phylogeny, Springer, Switzerland, 442p.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.,** 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673–4680 p.
- Öğren, C., Şendoğan, D., & Alpagut-Keskin, N.,** 2022, Cytogenetics of *Helops glabriventris* Reitter, 1885 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini), *Caucasian Entomological Bulletin*, 18(2), 299–304p. <https://doi.org/10.23885/181433262022182-299304>
- Vitturi, R., Colomba, M.S., Barbieri, R. and Zunino, M.,** 1999, Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization, *Chromosome Research*, 7(1):255–260p. doi:10.1023/A:1009270613012
- Vogler, A. P., and Monaghan, M. T.,** 2007, Recent advances in DNA taxonomy, *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 1–10p. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00384.x>
- Wares, J. P. and Cunningham, C. W.,** 2001, Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal, *Evolution*, 12, 2455–2469p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wiemers, M. and Fiedler, K.**, 2007, Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae), *Front Zool*, 4(8). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-8>
- Will, K.W., Mishler, B.D. and Wheeler, Q.D.**, 2005, The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy, *Systematic Biology*, 54(5), 844–851p, <https://doi.org/10.1080/10635150500354878>
- Wilson, A.C., Can, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. and Stoneking, M.**, 1985, Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics, *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375–400p.
- Yang, Z. and Rannala, B.**, 2017, Bayesian species identification under the multispecies coalescent provides significant improvements to DNA barcoding analyses, *Mol Ecol*, 26, 3028-3036p. <https://doi.org/10.1111/mec.14093>
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., and Stamatakis, A.**, 2013, A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements, *Bioinformatics*, 29(22), 2869–2876p. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve bana her konuda destek tez danışmanı hocam Prof. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e; çalışma materyalinin toplanması ve tanımlanmasında büyük emeği olan Prof. Dr. Bekir KESKİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın başından sonuna kadar gerek arazi çalışmalarında gerekse laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım; Duygu KAN, Elif ÇEKER, Utku ÇALIŞAN ve Coşku ÖĞREN'e teşekkür ederim.

Çalışma materyalinin toplanmasında emeği geçen Doç. Dr. Sinan ANLAŞ ve ekibine ayrıca Kaan YILMAZ'a teşekkürlerimi iletirim. Floresan boyama görüntülerinin çekilebilmesi için bana laboratuvarlarının kapısını açan, başta Prof. Dr. Nesrin Ebru GÖNCÜ olmak üzere Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Böcek Fizyoloji Laboratuvarı ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da hayatımın her adımında yanımda oldukları gibi tez çalışmam boyunca da yanımda olup desteklerini esirgemeyen canım aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından FDK-2019-20600 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doktora programı; YÖK – 100/2000 Doktora Bursu-Biyoenformatik Alanı (Şubat 2016 -Şubat 2022) ve TÜBİTAK, 2211/A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı (Haziran 2019 – Eylül 2022) ile desteklenmiştir.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZGEÇMİŞ

Dirim ŞENDOĞAN, ilköğrenimini İzmir Özel Çakabey Okulları'nda, lise öğrenimini de İzmir Özel Saint Joseph Fransız Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 2009-2013 yılları arasında lisans, 2013-2016 yılları arasında da yüksek lisans eğitimlerini Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirmiştir. Aynı programda YÖK – 100/2000 Doktora Bursu ve TÜBİTAK, 2211/A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile desteklenerek doktora eğitimini tamamlamıştır. Doktora programı boyunca çalışma konusuyla ilgili araştırmalarını sürdürürken, bir yandan da Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nın lisans derslerinin laboratuvar derslerinde asistanlık yapmıştır.

Yayınları

Sendogan D. and Alpagut-Keskin N., 2016, Karyotype and sex chromosome differentiation in two *Nalassus* species (Coleoptera: Tenebrionidae), *Comparative Cytogenetics*, 10(3): 371-385.

Şendoğan D., Gündoğan B., Nabozhenko M., Keskin B. and Alpagut Keskin N., 2019, Cytogenetics of *Accanthopus velikensis* (Piller et Mitterpacher, 1783) (Tenebrionidae:Helopini), *Caryologia*, 72(3):97-103.

Öğren, C., Şendoğan, D., and Alpagut-Keskin, N., 2022, Cytogenetics of *Helops glabriventris* Reitter, 1885 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini), *Caucasian Entomological Bulletin*, 18(2), 299–304.

Sözlü sunumları

“Molecular and morphological evidence for two well supported *Nalassus* (Coleoptera, Tenebrionidae) lineages from Turkey” - 13th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, 7-11 October 2015, Irakleio, Crete, Greece.

“Is *Turkonalassus* Keskin, Nabozhenko et Keskin, 2017 (Tenebrionidae, Helopini) a new genus? A molecular insight!” - 5th International Tenebrionoidea Symposium, March 5-6th 2018, Prague, Czech Republic.

“Karyological Variations in Tenebrionidae” - 5th International Tenebrionoidea Symposium, March 5-6th 2018, Prague, Czech Republic.

“Türkiye *Pimelia* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Tenebrionidae) Türlerinin Barkodlanması” – 5. Ulusal Zooloji Kongresi, 2-3 Aralık 2022, online.

EKLER

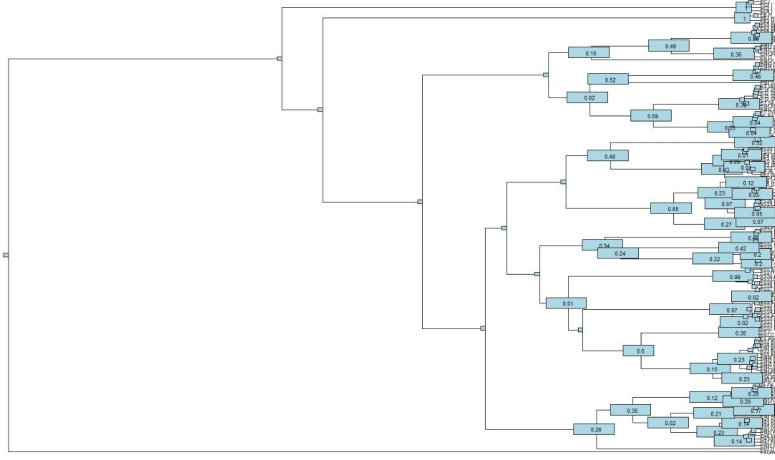
Ek 1. Veri seti

Örnek No.	Plate Kodu / Accession Number	Genus - Species	Toplanma Yeri	Veri Seti Kodu
1	Pim_A1	<i>Pimelia cursor</i>	Gödekli, Aralık - IĞDIR	PC_I
2	MSL_016_A10	<i>Pimelia cursor</i>	Gödekli, Aralık - IĞDIR	PC2_I
3	Pim_A3	<i>Pimelia cursor</i>	Taşkıran, Iğdır	PC3_I
4	Pim_A4	<i>Pimelia cursor</i>	Taşkıran, Iğdır	PC4_I
5	Pim_A5	<i>P. bajula solieri</i>	Belen Geçidi, Hatay	PB_H
6	Pim_A6	<i>P. bajula solieri</i>	Belen Geçidi, Hatay	PB2_H
7	Pim_A7	<i>P. bajula solieri</i>	Belen Geçidi, Hatay	PB3_H
8	Pim_A8	<i>P. s. verruculifera</i>	Davraz Dağı, Isparta	PV_D
9	Pim_A9	<i>P. s. verruculifera</i>	Davraz Dağı, Isparta	PV2_D
10	MSL_016_B12	<i>Pimelia sp.</i>	Huzurlu, G.Antep	PIM_GA
11	MSL_016_B9	<i>Pimelia sp.</i>	Fethiye	PIM_F
12	MSL_016_A11	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV_BF
13	Pim_B3	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV2_BF
14	Pim_B4	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV3_BF
15	Pim_B5	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV4_BF
16	Pim_B6	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV5_BF
17	Pim_B7	<i>P.s. verruculifera</i>	Babadağ, Fethiye	PV6_BF
18	Pim_B8	<i>P.s. verruculifera</i>	Doma Köyü, Çanakkale	PV_C
19	Pim_C1	<i>P.s. verruculifera</i>	Doma Köyü, Çanakkale	PV2_C
20	MSL_016_A12	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV_IC
21	Pim_C3	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV2_IC
22	Pim_C4	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV3_IC
23	Pim_C5	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV4_IC
24	Pim_C6	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV5_IC
25	Pim_C7	<i>P.s. verruculifera</i>	Çamiçi, İzmir	PV6_IC
26	Pim_C8	<i>P. s. polita</i>	Bozdağ, İzmir	PP_IB
27	Pim_C9	<i>P. s. polita</i>	Bozdağ, İzmir	PP2_IB
28	Pim_C10	<i>P. s. polita</i>	Bozdağ, İzmir	PP3_IB
29	Pim_C11	<i>P. s. polita</i>	Bozdağ, İzmir	PP4_IB
30	Pim_C12	<i>P. s. polita</i>	Bozdağ, İzmir	PP5_IB
31	Pim_D1	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA_KM
32	MSL_016_B1	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA2_KM
33	Pim_D3	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA3_KM
34	Pim_D4	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA4_KM
35	Pim_D5	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA5_KM
36	Pim_D6	<i>P. a. akbesiana</i>	Meke Tuzlası, Konya	PA6_KM
37	Pim_D7	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM_KB
38	Pim_D8	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM2_KB
39	Pim_D9	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM3_KB
40	Pim_D10	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM4_KB
41	Pim_D11	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM5_KB
42	Pim_D12	<i>Pimelia sp.</i>	Berendi Karaman (yayla)	PIM6_KB
43	MSL_016_C2	<i>Pimelia sp.</i>	Kula	PIM_MK
44	MSL_016_B2	<i>Pimelia sp.</i>	Meke Tuzlası, Konya	PIM_KM
45	Pim_E4	<i>Pimelia sp.</i>	Meke Tuzlası, Konya	PIM2_KM
46	Pim_E7	<i>Pimelia sp.</i>	Meke Tuzlası, Konya	PIM3_KM

47	MSL_016_A1	<i>Pimelia sp.</i>	Amasya, Paraşüt	PIM_A
48	MSL_016_A3	<i>Pimelia sp.</i>	Amasya, Paraşüt	PIM2_A
49	MSL_016_A5	<i>Pimelia sp.</i>	Amasya, Paraşüt	PIM3_A
50	Pim_E9	<i>Pimelia timarchoides</i>	Gürün, Sivas(1690m)	PT_SA
51	Pim_E10	<i>Pimelia timarchoides</i>	Gürün, Sivas(1830m)	PT_SYa
52	Pim_E11	<i>Pimelia timarchoides</i>	Gürün, Sivas(1830m)	PT2_SYa
53	Pim_E12	<i>Pimelia timarchoides</i>	Gürün, Sivas(1830m)	PT_SYb
54	Pim_F1	<i>Pimelia timarchoides</i>	Gürün, Sivas(1830m)	PT2_SYb
55	MSL_016_B3	<i>Pimelia timarchoides</i>	Mazıkıran Geçidi, Gürün-Sivas	PT_SM
56	Pim_F3	<i>Pimelia timarchoides</i>	Mazıkıran Geçidi, Gürün-Sivas	PT2_SM
57	Pim_F4	<i>Pimelia timarchoides</i>	Mazıkıran Geçidi, Gürün-Sivas	PT3_SM
58	Pim_F5	<i>Pimelia timarchoides</i>	Mazıkıran Geçidi, Gürün-Sivas	PT4_SM
59	Pim_F6	<i>Pimelia timarchoides</i>	Mazıkıran Geçidi, Gürün-Sivas	PT5_SM
60	Pim_F7	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(1960m)	PL_KA
61	Pim_F8	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(1960m)	PL2_KA
62	Pim_F9	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(1960m)	PL3_KA
63	Pim_F10	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(2235m)	PL_Ky
64	Pim_F11	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(2235m)	PL2_Ky
65	Pim_F12	<i>Pimelia lendli</i>	Erciyes Dağı, Kayseri(2235m)	PL3_Ky
6	Pim_G1	<i>Pimelia sp.</i>	Şeyhşaban Kayseri	PIM_KS
67	MSL_016_B4	<i>Pimelia sp.</i>	Şeyhşaban Kayseri	PIM2_KS
68	Pim_G4	<i>Pimelia sp.</i>	Pozantı, Adana	PIM_AP
69	MSL_016_C5	<i>Pimelia sp.</i>	Sabuncupınar, Kütahya	PIM_K
70	Pim_G6	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS_BG
71	Pim_G7	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS2_BG
72	Pim_G8	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS3_BG
73	Pim_G9	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS4_BG
74	Pim_G10	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS5_BG
75	Pim_G11	<i>Pimelia s. salaria</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PS6_BG
76	Pim_G12	<i>Pimelia sp.</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PIM_BG
77	Pim_H1	<i>Pimelia sp.</i>	Güre – Fener, Balıkesir	PIM2_BG
78	MSL_016_B5	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM_BK
79	Pim_H3	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM2_BK
80	Pim_H4	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM3_BK
81	Pim_H5	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM4_BK
82	Pim_H6	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM5_BK
83	Pim_H7	<i>Pimelia sp.</i>	Küçükşapçı Köyü, Balıkesir	PIM6_BK
84	Pim_H8	<i>Pimelia sp.</i>	Sarıova, Burdur	PIM_BU
85	Pim_H9	<i>Pimelia sp.</i>	Sarıova, Burdur	PIM2_BU
86	Pim_H10	<i>Pimelia sp.</i>	Sarıova, Burdur	PIM3_BU
87	Pim_H11	<i>Pimelia sp.</i>	Çerkezuşağı, Elbistan, K.Maraş	PIM_M
88	Pim_H12	<i>Pimelia sp.</i>	Çerkezuşağı, Elbistan, K.Maraş	PIM2_M
89	MSL_016_A7	<i>Pimelia sp.</i>	Bolkar Dağları	PIM_TB
90	MSL_016_A8	<i>Pimelia sp.</i>	Bolkar Dağları	PIM2_TB
91	MSL_016_A9	<i>Pimelia sp.</i>	Bolkar Dağları	PIM3_TB
92	FN391466.1	<i>P. subglobosa</i>	HeraklionGr	PSS_EAH
93	FN391467.1	<i>P. subglobosa</i>	HeraklionGr	PSS2_EAH
94	FN391469.1	<i>P. subglobosa</i>	HeraklionGr	PSS4_EAH
95	FN391470.1	<i>P. subglobosa</i>	HeraklionGr	PSS5_EAH
96	FN391471.1	<i>P. subglobosa</i>	HeraklionGr	PSS6_EAH
97	FN391473.1	<i>P. subglobosa</i>	ParosGr	PSS_EAP
98	FN391475.1	<i>P. subglobosa</i>	ParosGr	PSS3_EAP
99	FN391477.1	<i>P. subglobosa</i>	NaxosGr	PSS1_EAN
100	FN391479.1	<i>P. subglobosa</i>	MilosGr	PSS_EAM

101	FN391480.1	<i>P. subglobosa</i>	MilosGr	PSS2_EAM
102	FN391474.1	<i>P. subglobosa</i>	ParosGr	PSS2_EAP
103	FN391478.1	<i>P. subglobosa</i>	TinosGr	PSS_EAT
104	FN391495.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS_EAA
105	FN391490.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS2_EAA
106	FN391496.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS3_EAA
107	FN391491.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS4_EAA
108	FN391494.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS5_EAA
109	FN391492.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS6_EAA
110	FN391493.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS7_EAA
111	FN391453.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS8_EAA
112	FN391454.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS9_EAA
113	FN391487.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS10_EAA
114	FN391488.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS11_EAA
115	FN391489.1	<i>P. subglobosa</i>	AndrosGr	PSS12_EAA
116	FN391485.1	<i>P. subglobosa</i>	AtticaGr	PSS4_AT
117	FN391486.1	<i>P. subglobosa</i>	AtticaGr	PSS5_AT
118	FN391455.1	<i>P. subglobosa</i>	KeaGr	PSS_EAK
119	FN391456.1	<i>P. subglobosa</i>	KeaGr	PSS2_EAK
120	FN391481.1	<i>P. subglobosa</i>	AtticaGr	PSS_AT
121	FN391482.1	<i>P. subglobosa</i>	AtticaGr	PSS2_AT
122	FN391483.1	<i>P. subglobosa</i>	AtticaGr	PSS3_AT
123	FN391446.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS_EAI
124	FN391447.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS2_EAI
125	FN391449.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS3_EAI
126	FN391450.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS4_EAI
127	FN391451.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS5_EAI
128	FN391452.1	<i>P. subglobosa</i>	IkariaGr	PSS6_EAI
129	FN391497.1	<i>P. subglobosa</i>	KurudereTr	PSS_IK
130	FN391499.1	<i>P. subglobosa</i>	KurudereTr	PSS2_IK
131	FN391462.1	<i>P. subglobosa</i>	BozdagTR	PSS_IB
132	FN391460.1	<i>P. subglobosa</i>	BozdagTR	PSS2_IB
133	FN391501.1	<i>P. subglobosa</i>	BozdagTR	PSS3_IB
134	FN391461.1	<i>P. subglobosa</i>	BozdagTR	PSS4_IB
135	FN391500.1	<i>P. subglobosa</i>	BozdagTR	PSS5_IB
136	FN391458.1	<i>P. subglobosa</i>	KosGr	PSS_EAKO
137	FN391459.1	<i>P. subglobosa</i>	KosGr	PSS2_EAKO
138	FN391457.1	<i>P. subglobosa</i>	KosGr	PSS3_EAKO
139	Pim_G5	<i>Pachyscelis quadricollis</i>	Kuskunkıran Geçidi, Van	PACHY

Ek 2. GMYC Analizinde GTR Yaklaşımıyla “yule prior” Destek Değerleri



Ek 3. GMYC Analizinde HKY Yaklaşımıyla “yule prior” Destek Değerleri

