

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

GÜNEYBATI ANADOLU *Gunarus* DES GOZİS,1886

(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE:HELOPINI)

TÜRLERİNDE MOLEKÜLER SİSTEMATİK

ARAŞTIRMALAR

Aliye Evrim ERÇETİN

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Nurşen ALPAGUT KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.04.00

Sunuş Tarihi: 09.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

Aliye Evrim Erçetin tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan ‘Güneybatı Anadolu *Gunarus* Des Gozis 1886 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini) Türlerinde Moleküler Sistemik Araştırmalar’ başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve 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	:	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Güneybatı Anadolu *Gunarus* Des Gozis 1886 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini) Türlerinde Moleküler Sistemik Araştırmalar” 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.

.... / / 2015

İmzası

Aliye Evrim ERÇETİN

ÖZET

**GÜNEYBATI ANADOLU *GUNARUS DES GOZIS*, 1886
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: HELOPINI) TÜRLERİNDE
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ARAŞTIRMALAR**

ERÇETİN, Aliye Evrim

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç.Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN
Ocak 2015, 30 sayfa

Bu çalışma, 2008-2012 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları ile Akdeniz Bölgesi'nin çeşitli yerlerinden toplanan ve muhafaza edilen tenebrionid örnekleriyle gerçekleştirilmiştir.

Gunarus Des Gozis, 1886 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini) cinsine bağlı olan ve yeni tanımlanmış *Gunarus gayirbegi* Nabozhenko and Keskin, 2009 ve *Gunarus korkutelensis* Nabozhenko and Keskin, 2009 türlerinin, morfolojik olarak belirlenen tür sınırları, moleküler ve filogenetik araçlar kullanılarak test edilmiştir.

Filogenetik analizlerin değerlendirilmesi sonucunda *Gunarus gayirbegi* ve *Gunarus korkutelensis* türlerinin kardeş türler olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, analizler sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar farklı bir soy hattı olarak ayrılan Davraz Dağı, Isparta ve Yarpuz, Antalya örneklerinin *Gunarus* cinsi için yeni bir tür olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Tenebrionidae, Helopini, filogenetik, mtDNA, *cox1*.

ABSTRACT

**A MOLECULAR SYSTEMATIC RESEARCH OF *GUNARUS*
DES GOZİS, 1886 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE: HELOPINI)
SPECIES OF SOUTHWESTERN ANATOLIA**

ERÇETİN, Aliye Evrim

MSc in Biology

Supervisor: PhD. Nurşen ALPAGUT KESKİN

January 2015, 30 pages

This study was carried out with tenebrionid samples that was gathered and preserved through field studies at various locations of Mediterranean areas between 2008 – 2012.

Morphologically determined species boundaries of the newly defined species *Gunarus gayirbegi* Nabozhenko and Keskin, 2009 and *Gunarus korkutelensis* Nabozhenko and Keskin, 2009, which belong to *Gunarus* Des Gozis, 1886 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini), were tested with molecular and phylogenetic tools.

As a result of the evaluation of phylogenetic analysis, *Gunarus gayirbegi* and *Gunarus korkutelensis* are considered sibling species. Furthermore, Davraz Dağı, Isparta and Yarpuz, Antalya samples which split as a different lineage branch in obtained phylogenetic trees concludes that these can be a new species for *Gunarus* genus.

Key Words: Tenebrionidae, Helopini, phylogenetic, mtDNA, *cox1*.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Nurşen ALPAGUT KESKİN'e, tez konumun belirlenmesinde fikir ve bilgileriyle destek olan Sayın Doç. Dr. Bekir KESKİN'e, Maxim Nabozhenko ve Svetlana Nabozhenko'ya, sabır ve sevgileriyle her zaman yanımda olan çok sevgili aileme, Kerem IŞIK'a ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

108 T467 numaralı proje ile destekleyen TUBİTAK'a, 2009 BİL 005 numaralı proje ile destekleyen Ege Üniversitesi'ne, sekanslama işlemi için hizmet sunan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ	1
2.MATERYAL VE METOD	7
2.1 Örnekleme ve İzolasyon	7
2.2 Amplifikasyon ve Görüntüleme	7
2.3 Purifikasyon ve Sekanslama	9
2.4 Sekans Düzenleme ve Hizalama	9
2.5 Haplotip ve Nükleotid Çeşitlilik	9
2.6 Filogenetik Analizler	10
3.BULGULAR	12
3.1 Haplotip ve Nükleotid Çeşitlilik	12

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2 Filogenetik Analizler.....15

4.TARTIŞMA VE SONUÇ21

KAYNAKLAR DİZİNİ25

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>Gunarus</i> cinsine dahil türlerin dünya geneli dağılım haritası	4
2.1 Örneklerin bir kısmına ait jel görüntüleri	8
2.2 mtDNA baz dizilerinin Clustal X programında hizalanması	9
3.1a SplitsTree4 13.1 programında inşaa edilen haplotip ağı	13
3.1b <i>Gunarus</i> türlerine ait haplotip lokasyon haritası	13
3.2 MEGA6 programında inşaa edilen NJ ağacı	15
3.3 PAUP 4.06.10b programında mtDNA <i>cox1</i> gen bölgesi için inşaa edilen MP ağacı.....	17
3.4 PAUP 4.06.10b programında mtDNA <i>cox1</i> gen bölgesi için inşaa edilen ML ağacı.....	17
3.5 Beast v1.6.2 programında oluşturulan zaman ağacı ve nod barları.....	18
3.6 MrBayes 3.2 programı ile oluşturulan Brower (1994)'e göre (solda) ve Papadopoulou et al. (2010)'a göre (sağda) zaman ağaçları.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>Gunarus</i> cinsine dahil türlerin isim (mavi) ve sinonim isim (açık mavi), lokalite ve yazar listesi	4
2.1 mtDNA gen bölgelerinin çoğaltmak için kullanılan PCR prosedürü	8
3.1 DNAsp 4.50.3 programında oluşturulan haplotip listesi	12
3.2 <i>Gunarus</i> türlerinin MEGA 6 programında Kimura-2 uzaklık parametresi ile oluşturulan intragenerik genetik uzaklık değerleri.	14

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
-	Eksi işareti
+	Artı işareti
%	Yüzde işareti
°C	Santigrat derece
μl	Mikro litre
π	Pi işareti
<u>Kısaltmalar</u>	
cox1	Sitokrom Oksidaz 1 (Cytochrome Oxydase I)
GTR	General Time Reversible
ML	Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
MP	Maksimum Parsimoni (Maximum Parsimony)
mtDNA	Mitokondriyal DNA (Mitochondrial DNA)
my	Milyon Yıl
NJ	Komşu Bağlama (Neighbour Joining)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
TBR	Tree Bisection Reconnection

1. GİRİŞ

Akdeniz iklim kuşağı pek çok endemik takson ile birlikte tür açısından oldukça zengin biyocoğrafik bir bölgedir. Bu kuşak içerisinde yer alan Türkiye’de yaklaşık 800 Tenebrionidae türü bulunmaktadır. Tenebrionidae familyası, yaklaşık 20.000 türü ile dünya genelinde dağılım gösteren Coleoptera takımının en fazla tür sayısına sahip familyalarından biridir. Yaklaşık 8.000 tür Palearktik Bölge’de bulunurken, bunlardan 1.800’ü Avrupa’da dağılım gösterir (Watt, 1974; Aalbu et al., 2002; Bouchard et al., 2005; Löbl and Smetana, 2008).

Tenebrionidae familyası isminin kökü Latince ‘tenebrio’ kelimesinden oluşmuş olup, karanlığı seven anlamına gelir. Böceklerin çoğu geceleri ve kuytu yerleri severler (Lodos, 1991).

Tenebrionidae, Tenebrionoidea superfamilyasının en gelişmiş ve farklı tür çeşitliliğine sahip familyasıdır. Familyaya ait ayırdedici karakterler şu şekilde sıralanabilir; ergin birey tipik olarak sert vücutlu, anten 11 segmentlidir ve alnın yan genişliğinin altından çıkar; prokoksal boşluk kapalı; abdomenin görünen sternitlerinden 1. – 3. sternitler kaynaşmış, 4. ve 5. sternitler ise serbest; tarsal formül 5 – 5 – 4 olup nadiren değişik formüller de görülebilir; larva genellikle silindirik, baş frontoklipeal süturludur (Aalbu et al., 2002).

Türlerinin zenginliği, Kretase döneminde yaşanan jeolojik ve iklimsel değişikliklerle Angiosperm ve/veya memelilerle birlikte geniş alanlara dağılmalarına ve bu şekilde çok uç noktalarda morfolojik, ekolojik ve davranışsal çeşitlilik gösteren adaptasyonlar geliştirebilmeleriyle ilişkilidir (Hunt et al., 2007). Bu yüzden, tenebrionidlerin şekil, boyut ve habitat tercihleri de oldukça değişkenlik gösterir. Genellikle bitki kaynaklı polen, yaprak döküntüsü ve odun ile birlikte, fungal ve algal substratlarla da beslenirler. Bazıları leş ile beslenirken, çok az sayıda tür de özellikle ağaç zararlısı olan kınkanatlı türlerinin predatörleridir. Bazı türler depolanmış besinlerle ilişkili olduklarından kozmopolit zararlılar olarak değerlendirilirler (Lillig et al., 2012a).

Tenebrionidae türleri özellikle kurak ve yarı kurak karasal ekosistemlerin göze çarpan elemanlarıdır (Soldati, 2009) ve çevresel kalitenin yararlı birer indikatörleri olarak değerlendirilebilirler. Bundan dolayı, varlıkları bulundukları alanın kısmen daha korunmuş olduğunun belirteci olarak kabul edilebilir (De Los Santos et al., 2000; Ghahari et al., 2010).

Gunarus cinsi, Tenebrioninae altfamilyasının Helopini tribüsü içinde yer alır. Helopini tribüsüne bağlı türler temel olarak Palearktik Bölgede geniş dağılım gösterir. Doğudaki tüm Helopini türleri belli derecede metalik renklenmeye sahiptir ve diğer tribüslerin bireylerinden şu karakterlerle ayrılırlar; ergin bireyde tipik olarak pronotumun bazalı, elitranın kaidesinden daha kısadır, elitranın kaidesi çok yüksek ve dik değildir, omuz köşeleri yuvarlaktır, ön tibianın iç kenarlarında dişsi çıkıntılar bulunabilir (Latreille, 1802; Steiner, 2009)

Ergin bireylerin ağaç kabuklarının üzerindeki likenlerle beslendikleri gözlenmiştir. Dişi bireyler ağaç kabuklarının girinti yaptıkları yerlere yumurtalarını bırakırlar, genç larvalar gelişimlerinin başında toprağa doğru yönelirler ve ölü ağaç kalıntılarıyla beslenirler. Tüm larval ve pupal evrelerini toprakta geçirirler. Ergin bireyler tüm bir yıl boyunca canlı kalmazlar, genellikle univoltin türlerdir. Baharda ve yaz aylarının başlarında geceleri ağaç üzerinden toplanabilirler. Gün boyunca yaprak döküntülerinin altında veya ağaç etrafında yosun kaplı az nemli odun parçalarının altında saklanırlar (Steiner 1995, 1999).

Günümüzde dünyada Helopini tribüsüne bağlı 45 cins bulunmaktadır. Palearktik Bölgede 700'den fazla tür, Nearktik ve Neotropikal Bölgelerde 80 ve diğer bölgelerden de 3 tür Helopini grubuna dahildir (Purchart and Nabozhenko, 2012).

Palearktik Bölgede Helopini tribüsü, iki alttribüs ile tanımlanır: Cylindrinotina ve Helopina (Nabozhenko, 2001).

Palearktik Bölge genelinde *Gunarus* cinsine ait 9 tür bulunmaktadır (Löbl and Smetana, 2008).

Rusya ve Bulgaristan'da dağılışı gösteren *Gunarus* cinsine dahil olan *G. tantillus*, *G. bogatshavi* ve *G. bulgaricus* türleri *Ectromopsis* cinsine (Helopini: Cylindrinotina) transfer edilmiştir (Nabozhenko, 2005).

Yunanistan, Santorini Adası'nda gerçekleştirilen fosil araştırması sırasında bulunan arkeolojik botanik materyal arasında az da olsa böcek kalıntılarına da rastlanılmıştır. Bu kalıntıların içinde bu adaya endemik olarak tanımlanmış olan *G. kaszabi* Grimm, 1981 de listelenmiştir, ancak örneğin baş ve toraks kısımlarının türe özgü tanımı genişletmek için uygun olmadığı vurgulanmıştır (Buckland, 1991).

G. parvulus Lucas, 1846, Grimm tarafından 1986 yılında Malta, Mellieha sahil şeridinde akasya ağacı kabuğunun altından alınan tek bir örnek temel alınarak tanımlanmıştır, ancak holotip kaybolmuştur ve yeniden değerlendirilememesine rağmen aksi bir kanıt da bulunamadığı için hala Malta faunasına dahil edilmektedir (Lillig et al., 2012b). *G. parvulus* Lucas, 1846 türünün Tunus, Cezayir, Fas, Sicilya ve İspanya adalarından da kayıtları bulunmaktadır.

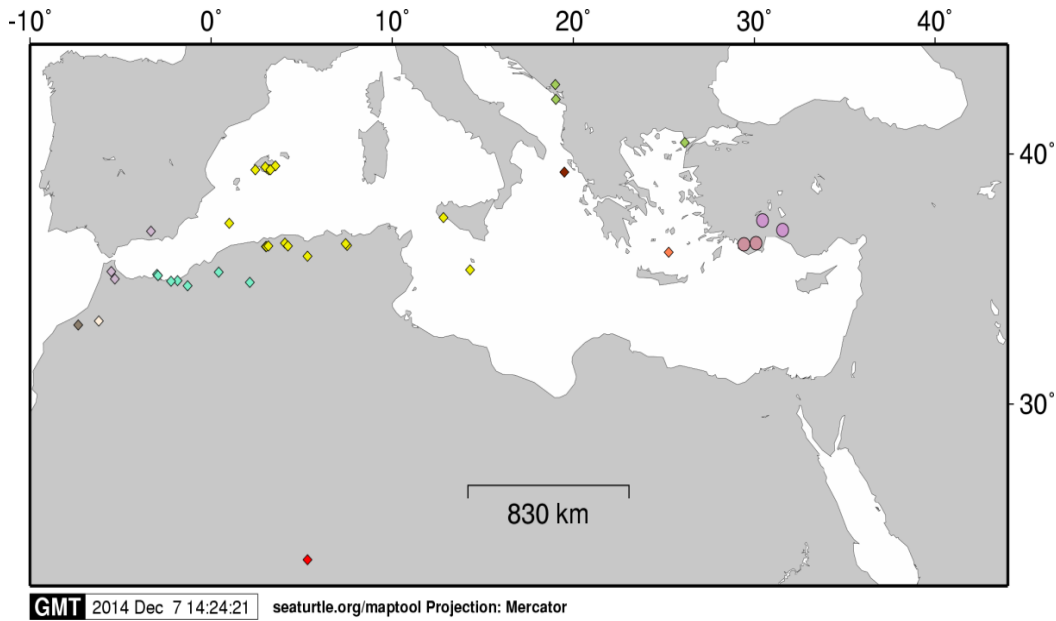
G. arenicola Antoine, 1949 ve *G. bremondi* Antoine, 1949 türleri sırasıyla Fas'ta Kazablanka ve Rabat bölgelerine endemik olarak görünmektedir. *G. hirtulus* Reiche, 1862 da geniş alanda dağılım gösteren bir türdür; Cezayir, Fas ve İspanya'dan kayıtları bulunmaktadır. *G. ovipennis* Allard, 1877, Yunanistan, Korfu Adası ve çevresinde yapılan örneklemelerle endemik bir tür olarak kayıt altına alınmıştır. İspanya, Granada örnekleri *G. laeviusculus* Kraata, 1883 olarak kayda geçilmiş olsa da morfolojik özellikleri incelendiğinde *G. tingitanus* Allard, 1877 sinonim türü olarak değiştirilmiştir. *G. tingitanus* bundan önce Fas'a özgün bir tür olarak kayıtlarda yer almaktadır. *G. lapidicola* Kuster, 1850 Yugoslavya ve Türkiye, Trakya Bölgesinden toplanan örnekler üzerinden tanımlanmışlardır (Español and Comas, 1987). Ancak, hazırlanan son Palearktik Bölge kataloğunda Türkiye faunasından çıkartılmıştır.

G. nodicornis Reitter, 1922 Cezayir' in Tahat Dağı örneklerine göre tanımlanmış endemik bir türdür (Reitter, 1922).

2009 yılına kadar tanımlanmış *G. hirtulus*, *G. parvulus*, *G. tingitanus*, *G. arenicola*, *G. bremondi*, *G. ovipennis*, *G. lapidicola* türlerinin tip örnekleri Barcelona Zooloji Müzesi (Zoology Museum of Barcelona)'nde bulunmaktadır. *G. nodicornis* türünün tip örneği Viyana Doğa Tarihi Müzesi (K.K. Naturhistorischen Hofmuseum)'nde bulunmaktadır. *G. kaszabi* tip örneği Bavarion Eyaleti Zooloji Koleksiyonu, Zooloji Sistemik Araştırma Enstitüsü (Zoologische Staatssammlung, München)'nde bulunmaktadır. 2009 yılında tanımlanmış *G. gayirbegi* ve *G. korkutelensis* tip örnekleri St-Petersburg Zooloji Enstitüsü (Zoological Museum of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences) ve Zooloji Bölümü Ege Üniversitesi (Zoology Department of Ege University) koleksiyonuna eklenmiştir. Türler tanımlandıktan sonra yeniden bildirimleri olmamıştır.

Çizelge 1. *Gunarus* cinsine dahil türlerin isim (mavi) ve sinonim isim (açık mavi), lokalite ve yazar listesi.

	Tür	Yazar/Yıl	Lokalite	Endemik
◆	<i>Gunarus arenicola</i>	Antoine, 1949	Fas; Kazablanka	e
◆	<i>Gunarus bremondi</i>	Antoine, 1949	Fas; Rabat	e
◆	<i>Gunarus nodicornis</i>	Reitter, 1922	Cezayir; Tahat Dağı	e
◆	<i>Gunarus ovipennis</i>	Allard, 1877	Yunanistan; Korfu Adası	e
◆	<i>Gunarus kazsabi</i>	Grimm, 1981	Yunanistan; Santorini Adası	e
◆	<i>Gunarus hirtulus</i>	Reiche, 1962	Cezayir, Fas, İspanya	
	<i>Gunarus minutus</i>	Mulsant, 1870		
◆	<i>Gunarus parvulus</i>	Lucas, 1846	Tunus, Cezayir, Fas, Sicilya,	
	<i>Gunarus interspersus</i>	Kuster, 1850		
	<i>Gunarus nanus</i>	Kuster, 1850		
	<i>Gunarus heydeni</i>	Allard, 1876		
◆	<i>Gunarus tingitanus</i>	Allard, 1877	Fas, İspanya	
	<i>Gunarus laeviusculus</i>	Kraata, 1883		
◆	<i>Gunarus lapidicola</i>	Kuster, 1850	Yugoslavya	
	<i>Gunarus rufescens</i>	Kuster, 1851		
	<i>Gunarus splendidus</i>	Schaufuss, 1876		
●	<i>Gunarus gayirbegi</i>	Nabozhenko and Keskin, 2009	Türkiye; Fethiye	
●	<i>Gunarus korkutelensis</i>	Nabozhenko and Keskin, 2009	Türkiye; Korkuteli	



Şekil 1 *Gunarus* cinsine dahil türlerin dünya geneli dağılım haritası. Harita üzerindeki işaretlemeler Çizelge 1.1’de açıklanmıştır.

G. gayirbegi ve *G. korkutelensis* oldukça yakın ilişkili türlerdir ancak aynı bölgede dağılım gösterebilirler de birbirlerinden Akdağ' da yer alan çorak ve ağaçsız geniş bir alandan dolayı izole olmuşlardır. Boyları 6-9 mm arasında değişen küçük boyutlu böceklerdir ve 1000 metrenin üzerindeki yüksekliklerde kurakçıl ormanlık alanlarda bulunurlar, sırasıyla kızıl ardıç (*Juniperus oxycedrus*) ve kermes meşesi (*Quercus coccifera*) üzerlerindeki likenlerle beslenirler. Baş ve pronotum, anten, ön tarsus ve erkek birey genital organı aedeagus gibi morfolojik ayrımsal anlamda güçlü karakterlerin incelenip karşılaştırılmasının ardından yeni türler olarak tanımlanmışlardır (Nabozhenko and Keskin, 2009). Bu tez çalışmasında, morfolojik karakterler üzerinden ayrı türler olarak tanımlanmış *G. gayirbegi* ve *G. korkutelensis* türlerinin, tür sınırlarının moleküler ve filogenetik yöntemler kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Böceklerde evrimsel ağaçlar oluşturulurken hem morfolojik verilerden hem de DNA verilerinden en iyi şekilde yararlanılmalıdır (Gurney et al., 2000).

Korunmuş PCR primerlerinin tanımlanması, geçmiş yıllarda evrimsel çalışmalarda da kullanımını arttırmıştır. Bu durum moleküler biyoloji geçmiş olan araştırmacıları filogenetik ve populasyon genetiği konusunda moleküler seviyede çalışmaya cesaretlendirmiştir, verilerin toplanması hızlanmış ve sonuç olarak mtDNA sekanslarının moleküler evrimi hakkındaki bilgilerimiz de artmıştır (Zhang and Hewitt, 1997).

Mitokondriyal DNA, özellikle metazoan hayvanların filogenetik ve populasyon genetiği çalışmalarında yaygın bir şekilde moleküler belirleyici olarak kullanılır (Caterino et al., 2000). Yüksek mutasyon oranı, haploid kalıtımı, intronlarının bulunmaması, maternal kalıtları ve rekombinasyonun olmayışının yanı sıra amplifikasyonlarının kolay olması mitokondriyal genom çalışmayı uygun kılar (Zardoya and Meyer, 1996; Orsini, 2007; Baviera et al., 2011). Bu özelliklerinden dolayı böcek filogeni çalışmaları için en yaygın kullanıma sahip DNA bölgeleridir.

Genomdaki farklı DNA bölgeleri yaklaşık olarak aynı oranlarda spontan mutasyonlar geçirir, ancak mutasyonun nerede gerçekleştiği önemlidir. Temel genlerde meydana gelen mutasyonlar genellikle öldürücü olduklarından kalıcı olmaz ya da nadiren kalıcı olan bu mutasyonlar yavaş biriktirilir. Eksprese edilmeyen veya temel olmayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sessiz

olduklarından kalıcıdırlar ve evrimsel saatleri çok daha hızlıdır. Bu nedenlerden dolayı evrimsel saatleri yavaş olan genler daha çok uzak ilişkili taksonlar arasındaki filogenetik ilişkileri çıkarsamak için kullanılırken, evrimsel saatleri hızlı olan genler yakın taksonlar arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya konulmasında daha etkin kullanılmaktadır (Gurney et al., 2000). Farklı evrimsel süreçlere tabi olduklarından dolayı farklı moleküllerin filogenetik resolüsyonları da çeşitlilik gösterir. Mitokondriyal genlerin 100 milyon yıla kadar olan zaman aralığındaki filogenetik problemlerin çözümünde daha kullanışlı olduğu ortaya konmuştur (Ridley, 2004).

Filogenetik ağaçlar, gen duplikasyonlarını, evrimsel oranları, polimorfizmleri, rekombinasyonu, kuşaklar arası çeşitlenmeyi ve populasyon demografi analizlerini olanaklı kılar. Temel ağaç oluşturma metodlarından olan Komşu Bağlama (Neighbour Joining), Maksimum Parsimoni (Maximum Parsimony) ve Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood), Bayesian istatistiksel yaklaşımlarıyla birlikte nükleotid evriminin istatistiksel modellerine göre çalışırlar (Bos and Posada, 2004). Mevcut olan bütün evrimsel ağaçlar, morfolojik tanımlamaları ile birlikte DNA verilerine göre şekillendirilmektedir.

Bu çalışmayla iki önemli soruya dikkat çekilmektedir; i) *Gunarus* türlerine ait örneklerin moleküler analizleriyle elde edilen veriler, morfolojik karakterlere göre oluşturulan taksonomik ilişkiyi destekliyor mu? ii) Cins içindeki filogenetik ilişki düzeyi nasıl tanımlanabilir?

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Örnekleme ve İzolasyon

Gunarus Des Gozis, 1886 cinsine dahil örnekler 2008-2012 tarihleri arasında 4 farklı lokaliteden toplanmıştır. Güneybatı Anadolu *Gunarus* türlerinin kendi aralarındaki ve Helopini tribüsü içerisindeki filogenetik konumunu test edebilmek için çalışmaya *Cylindronotina* alttribüsüne dahil *Cylindrinotus* Faldermann, 1837 ile birlikte Helopina alttribüsüne dahil *Helops* Fabricius, 1775 cinsine dahil *Helops cyanipes*, *Catomus* Allard, 1876, *Raiboscelis* Allard, 1876 (GenBank: NCBI BMNH 829634, BMNH 829633, BMNH 829632) ve *Probatiscus* Seidlitz, 1896 cinslerine dahil tanımsız örnekler de eklenmiştir. Çalışmaya *Zophosis punctata* Brullé, 1832 (GenBank: NCBI BMNH 792241) ve *Zophosis dilatata* Deyrolle, 1867 (GenBank: NCBI BMNH 795836, BMNH 795837) türleri dış grup olarak dahil edilmiştir.

Toplandıktan sonra %99'luk alkol içerisinde muhafaza edilen örnekler, DNA ekstraksiyonu için steril bir ortama alınmıştır. Penset yardımıyla baş ve protoraks kısımları kırılarak 2 ml hacimli ekstraksiyon kuyucuklarına yerleştirildikten sonra materyalin içerdiği alkolün uzaklaşması için etüve konulmuştur. Örneklerin DNA izolasyonları Wizard® Genomic DNA Purification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2 Amplifikasyon ve Görüntüleme

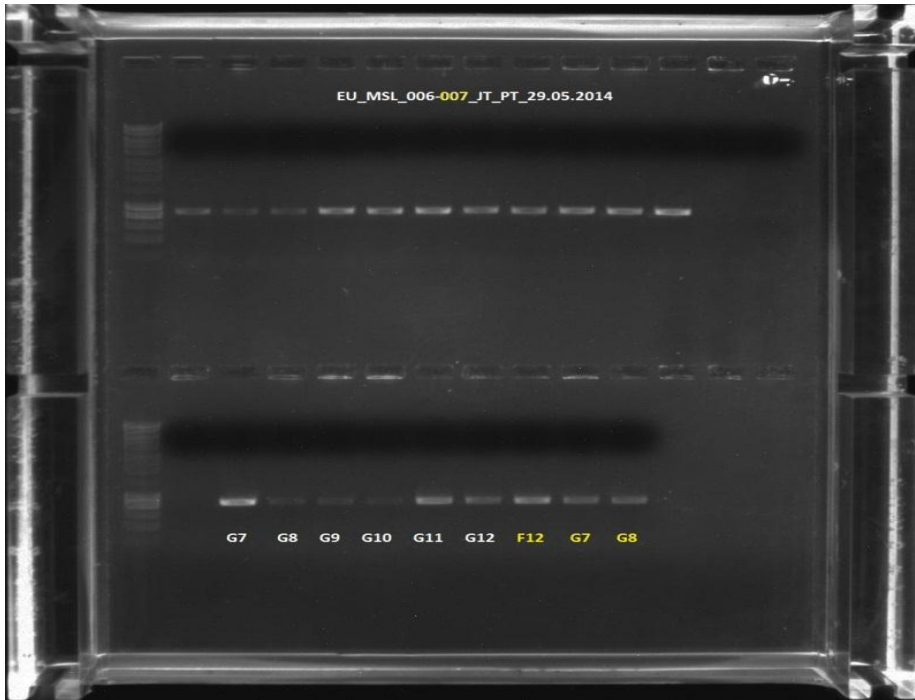
DNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin, mitokondriyal DNA *cox1* gen bölgesi için PCR uygulaması gerçekleştirilmiştir. PCR işlemleri (Ribera et al., 2003) Applied Biosystem marka GeneAmp 9700 model kademeli Thermal cycler cihazı kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi için hazırlanan her bir reaksiyon hacmi 50 µl olmakla beraber solüsyon içeriği şu şekildedir: 24 µl Trehaloz, 12.3 µl ddH₂O, 5 µl NH₄, 2.5 µl MgCl, 1 µl dNTP, 1 µl Jerry-Ten, 1 µl Pat-Ten, 1.2 µl Taq DNA polimeraz, 3 µl gDNA.

Çizelge 2.1 mtDNA gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PCR prosedürü.

İlk Denatürasyon	2 dk	94°C	35 tekrar
Denatürasyon	30 sn	94°C	
Primer Bağlanma	60 sn	56°C	
Uzama	2.15 dk	70°C	
Son Uzama	10 dk	70°C	
Bekleme	∞	4°C	

C1-J-2183 (Jerry) ve TL2-N-3014 (Pat) standart oligonüklotid primerlerinin (Simon et al., 1994), tenebrionidler için özel olarak modifiye edilmiş dejenere primerler Jerry-Ten (5'-CAACACTTATTYTGATTYTTTGG-3') ve Pat-Ten (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATAWTA-3') kullanılarak mitokondriyal DNA *cytochrome oxydase I* gen bölgesinden 829 bp uzunluğunda fragmentler çoğaltılmıştır (Papadopoulou et al., 2009).

PCR ürünleri, SafeView™ DNA Stains ile boyanmış ve %1'lik agaroz jel elektroforezi ile 45 dakika 80 voltta yürütülmüştür. DNA konsantrasyonunu belirlemek için işaretleyici olarak HyperLadder™ kullanılmıştır. Jel SmartView Pro 1100 image system cihazı ile görüntülenmiştir.



Şekil 2.1 Örneklerin bir kısmına ait jel görüntüleri.

2.3 Purifikasyon ve Sekanslama

PCR ürünlerinin görüntülenmesinin ardından, başarılı bir şekilde çoğaltıldığına kanaat getirilen örnekler, saflaştırılması ve sekanslanması için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne gönderilmiştir.

2.4 Sekans Düzenleme ve Hizalama

Tüm sekanslar, Sequencher 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) programı kullanılarak düzenlenmiş ve Clustal X (Larkin et al., 2007) programı yardımıyla hizalanmıştır.



Şekil 2.2 mtDNA baz dizilerinin Clustal X programında hizalanması.

2.5 Haplotip ve Nükleotid Çeşitlilik

Her tür için haplotip çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği değerleri DNAsp 4.50.3 (Librado & Rozas, 2009) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerin COI gen bölgesi için haplotip ağları SplitsTree4 13.1 (Huson and Bryant, 2006) programı yardımıyla oluşturulmuştur.

Gunarus tür örneklerinin arasındaki genetik uzaklık analizleri MEGA6 (Tamura et al., 2013) programı ile Kimura-2 uzaklık parametresi seçilerek gerçekleştirilmiştir.

2.6 Filogenetik Analizler

Veri setinde yer alan sekanslarda, kayıp (missing) veya boşluk (gap) bulunmamaktadır. Hizalanan veri seti dosyası, PAUP*, Beast ve MrBayes filogenetik analiz programlarında kullanılmak üzere NEXUS formatına dönüştürülmüştür.

Maksimum Parsimoni, Maksimum Olasılık ve Bayesian çıkarsamalı yaklaşım analizleri kullanılarak veri setinin filogenisi hakkında değerlendirilecek bilgiler elde edilmiştir.

Veri setine en iyi uyan evrim modelini belirlemek için jModelTest (Posada, 2008) 2.1.6 (Darriba et al., 2012) versiyonu kullanılmıştır.

MEGA6 programında Kimura-2 parametresi altında GTR modeli seçilmiş, transisyon ve transversiyonlarla birlikte kodon pozisyonlarının tümü dahil edilerek Komşu Bağlama (NJ) analizi yürütülmüştür.

Maksimum Parsimoni yaklaşımı, rastgele 100 replikasyon ve deneysel (heuristik) arama ayarlarında TBR dal değişimi seçilerek PAUP* 4.0b10 (Swafford, 2002) ile test edilmiştir. Ağaçta dal desteklerine ulaşabilmek için toplamda 1000 bootstrap replikasyon ile her biri için rastgele 10 ek kopya ileri ayarları eklenmiştir.

PAUP* 4.0b10 programı kullanılarak Maksimum Olasılık yaklaşımı için GTR+I+G modeli seçilmiş ve deneysel arama altında 5 replikasyon ile TBR dal değişim ayarlarında analiz gerçekleştirilmiştir.

Bayesian çıkarsamalı analizler, Beast v1.6.2 (Drummond and Raumbaut, 2007) programında Strict Clock Model ve MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011) programında Relaxed Clock Model seçilerek gerçekleştirilmiştir. Beast v1.6.2 ile gerçekleştirilen analizlerde *cox1* gen divergens oranı böcek mitokondriyal saat için % 3.54 olarak ayarlanmış ve dış gruba ait saptanan olası yaş aralığı (8.89-12.94) ile zaman kalibrasyonu yapılarak her 1000 jenerasyonda örnekleme yapacak şekilde 10000000 jenerasyon yürütülmüştür. (Papadopoulou et al., 2010) Prior ve posterior olasılık değerleri Tracer v1.4.1 (Drummond and Raumbaut, 2007) programı kullanılarak ayarlanmış ve filogenetik zaman ağaçları elde edilmiştir.

MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011) ile gerçekleştirilen analizler, her 1000 jenerasyonda örnekleme yapacak şekilde toplam 10000000 jenerasyon olarak sürdürülmüştür. *cox1* gen divergens oranı standart mitokondriyal saat için % 2.3 ve böcek mitokondriyal saat için % 3.54 olarak ayarlanarak iki farklı analiz yürütülmüştür (Brower, 1994; Papadopoulou et al., 2010). 10001 aa ile sonuçlanan analizde, analizin durağanlaştığı evre sonrasındaki veriyi korumak için burnin komutu ile 2500 aa ekarte edilmiştir.

Bütün analizler Mac OS X 10.9.5 bilgisayarında gerçekleştirilmiştir ve analizler sonucunda elde edilen tüm ağaçlar FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007) programında çizdirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Haplotip ve Nükleotid Çeşitlilik

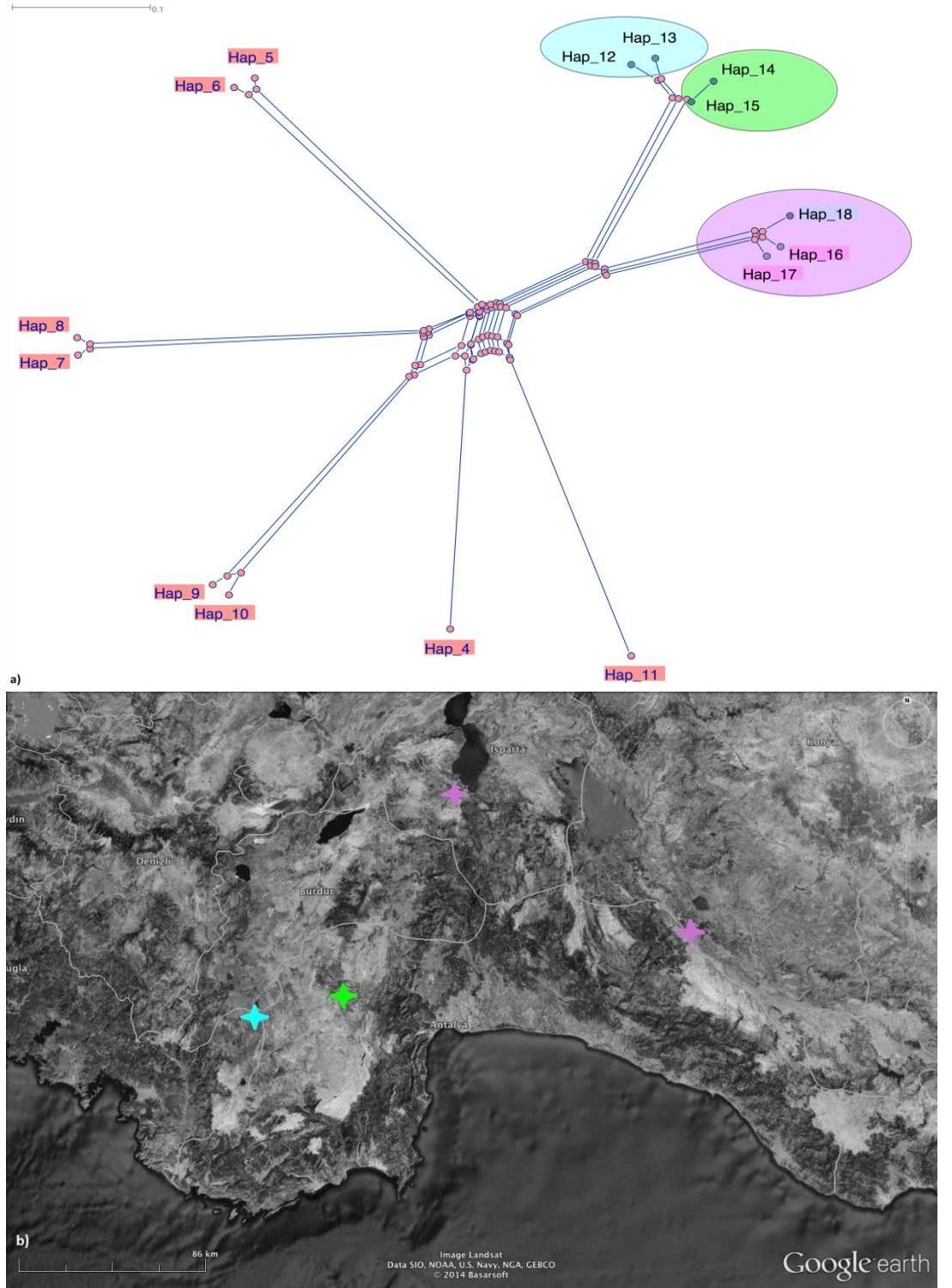
cox1 gen lokusunda genetik çeşitlilik, segregasyon gösteren bölgelerin sayısı (s), haplotip sayısı (h), haplotip çeşitliliği (HD) ve nükleotid çeşitliliği (π) parametreleriyle belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen türlerin mitokondriyal *cox1* gen lokusunda haplotip ve nükleotid çeşitlilik değerleri sırasıyla 0.9763 ve 0.1599 çıkmıştır. 829 baz çifti uzunluğundaki dizinin analizi, toplam 231 segregasyon bölgesi ve 3 tanesi dış grup olmak üzere toplamda 18 haplotipin varlığını açığa çıkarmıştır.

Çizelge 3.1 DNAsp 4.50.3 programında oluşturulan haplotip listesi.

Haplotip	Tür	Lokale
H_1	<i>Zophosis punctata</i>	Sifnos, Yunanistan
H_2	<i>Zophosis dilatata</i>	Efes, İzmir
H_3	<i>Zophosis dilatata</i>	Efes, İzmir
H_4	<i>Cylindrinotus</i> sp., <i>Cylindrinotus</i> sp.	Palandöken, Erzurum
H_5	<i>Probaticus</i> sp.	Babadağ, Muğla
H_6	<i>Probaticus</i> sp.	Babadağ, Muğla
H_7	<i>Catomus</i> sp.	Buğlan, Muş
H_8	<i>Catomus</i> sp.	Buğlan, Muş
H_9	<i>Raiboscelis</i> sp.	Sifnos, Yunanistan
H_10	<i>Raiboscelis</i> sp., <i>Raiboscelis</i> sp.	Sifnos, Yunanistan
H_11	<i>Helops cyanipes</i> , <i>Helops cyanipes</i>	Toros, Mersin
H_12	<i>Gunarus korkutelensis</i> , <i>Gunarus korkutelensis</i> , <i>Gunarus korkutelensis</i>	Korkuteli, Antalya
H_13	<i>Gunarus korkutelensis</i>	Korkuteli, Antalya
H_14	<i>Gunarus gayirbegi</i>	Fethiye, Muğla
H_15	<i>Gunarus gayirbegi</i>	Fethiye, Muğla
H_16	<i>Gunarus</i> sp.	Davraz Dağı,
H_17	<i>Gunarus</i> sp.	Davraz Dağı,
H_18	<i>Gunarus</i> sp.	Yarpuz, Antalya

İncelenen *Gunarus* sp. örneklerinin neredeyse hepsi birbirlerinden farklı haplotip grupları oluşturarak ayrılmışlardır. Sadece *Gunarus korkutelensis* türüne ait 3 örnek aynı haplotip grubunun altında toplanmıştır ve 2'si yakın olmakla birlikte 3 farklı haplotip grubunun varlığı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 a) SplitsTree4 13.1 programında inşaa edilen haplotip ağı.
b) *Gunarus* türlerine ait haplotip lokasyon haritası.

MEGA6 programı ile hesaplanan *Gunarus* türlerinin intragenerik genetik uzaklık değerleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Bu değerler türler arasında ikili karşılaştırmaların yapılabilmesi için üç gruba ayrılarak incelenmiştir: *G. gayirbegi*-*G. korkutelensis*, *G. gayirbegi*-*Gunarus sp.*, *G. korkutelensis*-*Gunarus sp.*. *G. gayirbegi* ve *G. korkutelensis* türlerinin genetik uzaklık değerlerinin düşük olduğu görülmektedir.

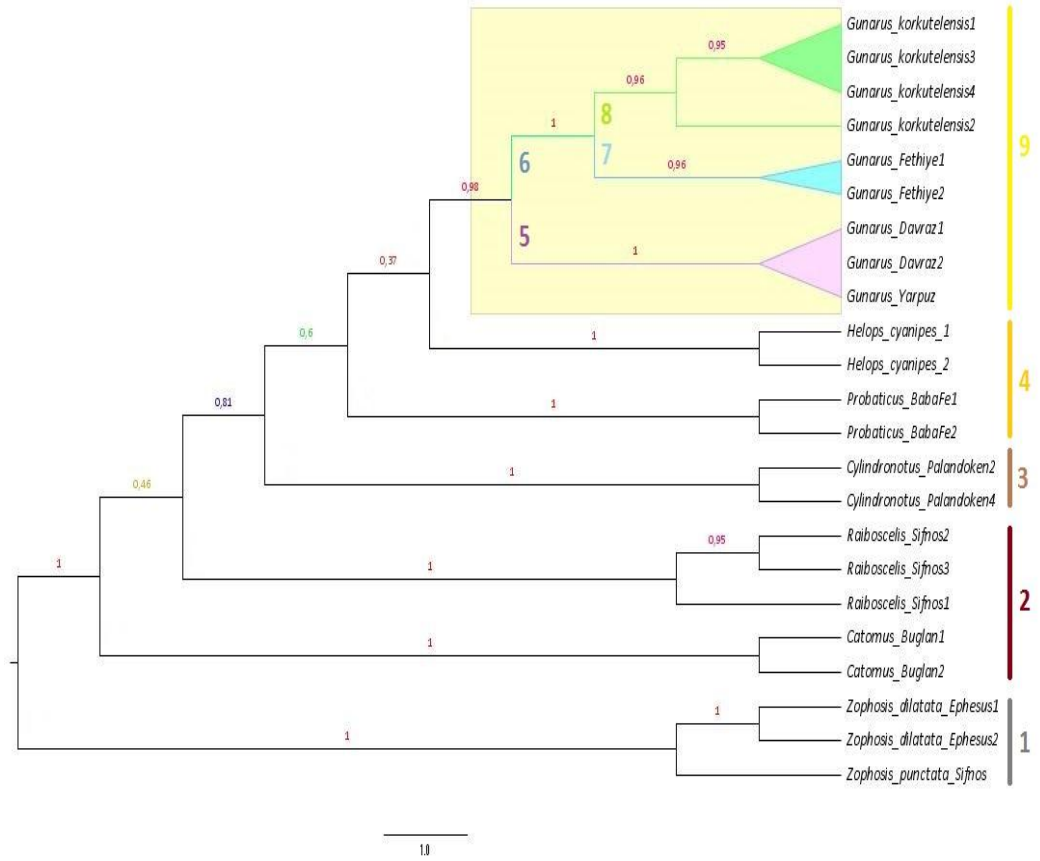
Çizelge 3.2 *Gunarus* türlerinin MEGA 6 programında Kimura-2 uzaklık parametresi ile oluşturulan intragenerik genetik uzaklık değerleri.

X	<i>G. korkutelensis</i>				<i>G. gayirbegi</i>		<i>Gunarus sp.</i>		
<i>G. korkutelensis</i>									
	0								
	0,007	0,007							
	0	0	0,007						
<i>G. gayirbegi</i>	0,016	0,016	0,016	0,016					
	0,017	0,017	0,017	0,017	0,001				
<i>Gunarus sp.</i>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,121	0,122			
	0,123	0,123	0,123	0,123	0,119	0,121	0,010		
	0,128	0,128	0,128	0,128	0,123	0,125	0,015	0,010	

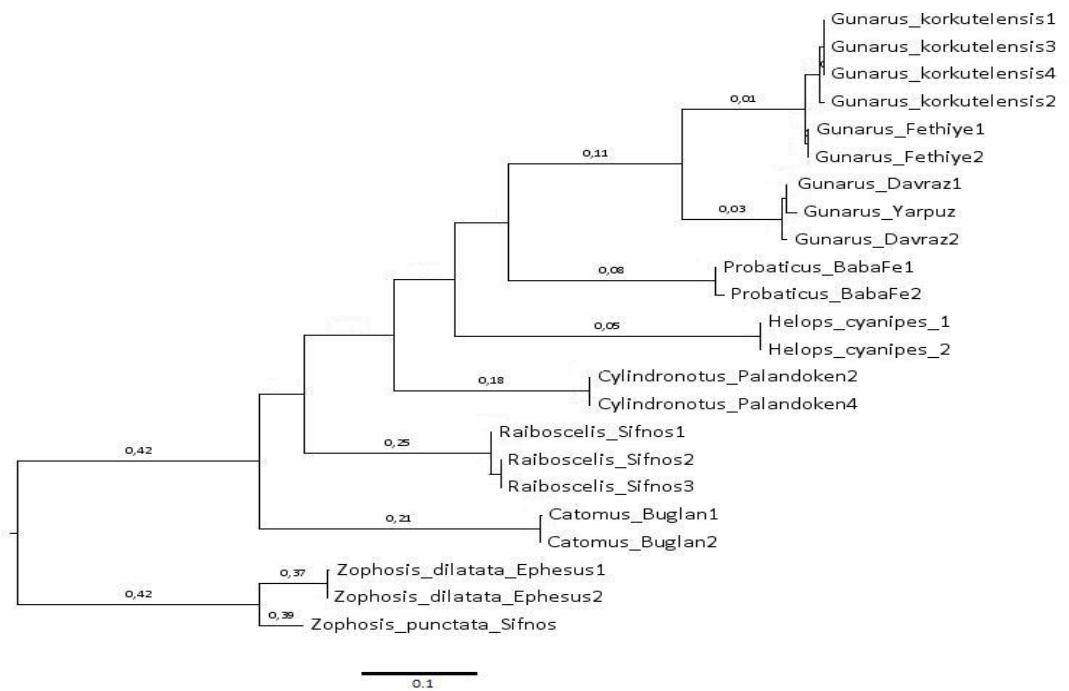
PAUP* 4.0b10 programı kullanılarak mitokondriyal DNA *cox1* gen bölgesi için deneysel arama ile çizdirilen Maksimum Parsimoni ağacının topolojisine bakıldığında farklı cinslere dahil tür örneklerinin dal ayrımları ve destekleri ile Seç-Bağla (Bootstrap) analizi sonucunda elde edilen parsimoni ağaç Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Analiz sonucunda tutarlılık endeks(CI) değeri 0.5995, homoplazi endeks(HI) değeri 0.4005 ve birikim endeks(RI) değeri 0.8308 çıkmıştır. Ağaçta 1 numara ile gösterilen soy hattı dış gruptur.

Analizin sonucunda, %98 desteklenen 9 numaralı soy hattı, 5 ve 6 numara ile gösterilen iki farklı soy hattına ayrılan *Gunarus* cinsine dahil örnekleri göstermektedir. 5 numaralı soy hattı Davraz,İsparta ve Yarpuz,Antalya örneklerini içerir ve bu ayrım %100 olarak desteklenmiştir. 6 numaralı soy hattı Fethiye, Muğla ve Korkuteli, Antalya örneklerini içerir. 7 ve 8 numaralı soy hatları ise Fethiye, Muğla ve Korkuteli, Antalya örneklerinin birbirlerinden ayrımlarını göstermektedir ve bu ayrım iki dalda da %96 olarak desteklenmiştir.

PAUP* 4.0b10 programı kullanılarak mitokondriyal DNA *cox1* gen bölgesi için heuristik arama ile inşaa edilen Maksimum Olasılık ağacının topolojisine bakıldığında (Şekil 3.4) tür gruplarına ait örneklerin parsimoni ağacına benzer şekilde konumlandığı görülmektedir. Ağacın dal ayrımlarında, maksimum benzerlik olasılıklarına göre soy hatlarının birbirlerinden uzaklıkları gösterilmiştir. Buna göre, *Gunarus* türüne ait örneklerin oldukça benzedikleri ve temel olarak iki farklı soy hattına ayrıldıkları görülmektedir.



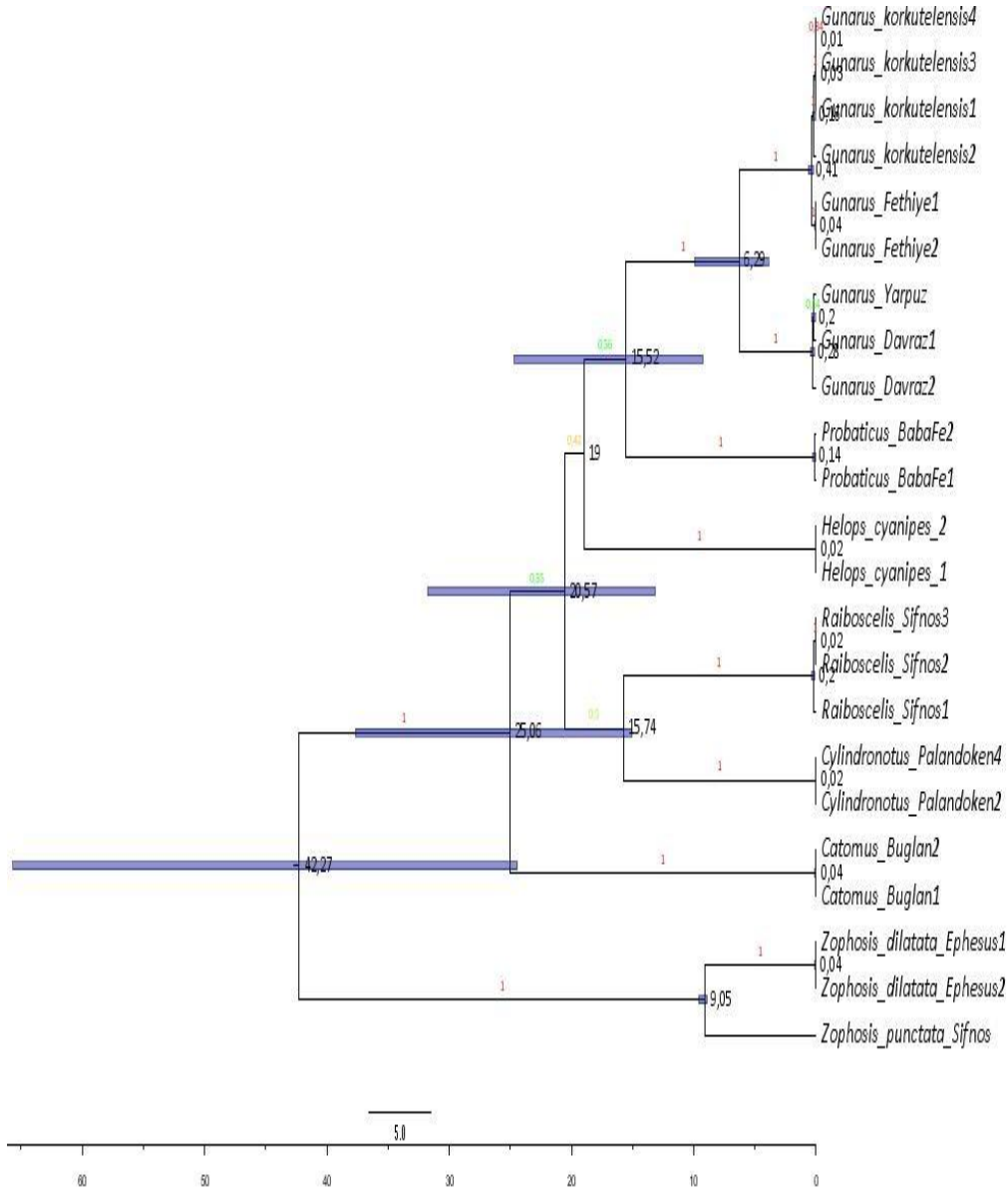
Şekil 3.3 PAUP 4.06.10b programında mtDNA *cox1* gen bölgesi için inşaa edilen MP ağacı.



Şekil 3.4 PAUP 4.06.10b programında mtDNA *cox1* gen bölgesi için inşaa edilen ML ağacı.

Beast v1.6.2 programı ile gerçekleştirilen analiz sonucunda oluşturulan zaman ağacı Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Gunarus cinsine ait örnekler mevcut taksonomik konumlarına uygun olarak *Helopina* alttribüsü içerisindeki en genç soy hattı olarak gözükmektedir. En yakın *Probaticus* örneklerine ait soy hattından 15.52 my önce ayrılmışlardır ve bu ayrım %50'nin üzerinde bir posterior olasılık değeri ile desteklenmektedir. *Gunarus* türleri 6.29 milyon yıl önce kendi içinde iki farklı soy hattına ayrılmıştır ve bu ayrım posterior değer olarak %100 desteklenmektedir. Korkuteli, Antalya ve Fethiye, Muğla örnekleri iki farklı soy hattına ayrılmıştır ancak bu ayrım 410 bin yıl gibi oldukça yakın bir zamanda gerçekleşmiş olarak görünmektedir.



Şekil 3.5 Beast v1.6.2 programında oluşturulan zaman ağacı ve nod barları.

Şekil 3.6'da mitokondriyal DNA *cox1* gen bölgesi için MrBayes 3.2 programı ile Relaxed Clock Model kurularak, Brower (1994) ve Papadopoulou et al. (2010)'a göre divergens oranları kullanılarak oluşturulan ağaçlar karşılaştırılmıştır. Her iki analiz için de dış grubun yaş kalibrasyonu yapılmıştır. Kalibrasyon ile elde edilen ağaçlarda, veri setinde bulunan tüm tür ve tür grupların ayrımlarının benzer şekilde düzenlendiği görülmektedir.

Brower (1994)'a göre divergens oranı ve dış grup için 5.79-8.39 my yaş aralığı kalibrasyonu ile oluşturulan ağacın kök yaşı 24.02 my gösterirken, Papadopoulou'ya (2010) göre divergens oranı ve dış grup için 8.89-12.94 my yaş aralığı kalibrasyonu ile oluşturulan ağacın yaşı ise 30.27 my olarak görülmektedir. *Gunarus* soy hattının ayırım nodlarının yaşı sırasıyla 15.7 ve 19.91 my olarak bulunmuştur. *Gunarus* türlerinin kendi içinde iki klada ayırım yaşı Brower (1994) değerlerine göre 7.6 my iken Papadopoulou (2010) değerlerine göre 9.93 my olarak gözükmemektedir. Korkuteli ve Fethiye örneklerinin ayırım yaşları sırasıyla 0.9 ve 1.4 my olarak bulunmuştur. *Gunarus gayirbegi* ve *Gunarus korkutelensis* türleri kardeş türler veya türleşmekte olan popülasyonlar olarak değerlendirilebilirler.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gunarus cinsine dahil türler Akdeniz havzasında kıyı şeridi boyunca ve adalarda dağılım göstermektedir. Bugüne kadar yapılmış olan kayıtlar göz önünde bulundurulduğunda, türlerin özellikle Kuzey Afrika kıyıları ve İspanya adalarında yoğunlaştığı görülmektedir. Bu açıdan bu grup için esas türleşme merkezinin Akdeniz havzasının güney sahilleri olduğu söylenebilir. Ancak *Gunarus* türleri ile ilgili güncel ve kapsamlı çalışmaların bulunmaması grubun filogenisini ve türler arası ilişkileri tartışmayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca, katalog bilgilerinde (Reitter, 1922; Löbl and Smetana, 2008) yer alan *Gunarus* türlerinin ilk tanımlanmalarının ardından yeni kayıtların bulunmayışı, türlerin gerçek dağılım sınırlarının belirlenmesini güçleştirmektedir.

Türkiye'nin de dahil olduğu Akdeniz iklim kuşağı pek çok endemik takson ile birlikte tür açısından oldukça zengin biyocoğrafik bir bölgedir (Myers et al., 2000). Son 20 yıl içerisinde tanımlanmış endemik/subendemik taksonlar ve yeni kayıtlar Tenebrionidae faunasını Türkiye biyoçeşitliliğinin önemli bir bileşeni olarak ön plana çıkarmaktadır (Tezcan et al., 2004; Novák, 2006; Canpolat, 2007; Nabozhenko and Keskin, 2009; Keskin and Nabozhenko, 2010; Keskin and Nabozhenko, 2011; Nabozhenko, 2011; Canpolat, 2012; Nabozhenko and Keskin, 2014).

Gunarus cinsi, Tenebrioninae subfamilyasının Helopini tribüsü içinde yer alır. Helopini temel olarak Palearktik Bölgede geniş dağılım gösterir. Helopini cins topluluğu içinde yer alan bireylere, tayga ve tundra dışında, neredeyse her türlü yer şekli ve yüksek rakımlı zonlarda rastlanır. Habitat tercihi bakımından cins topluluğu genel olarak 3 farklı sınıfta toplanabilir; ağaç türleri, ağaç geçiş türleri ve toprak türleri, hatta jeofilik türler de bulunmaktadır. *Gunarus* cinsine dahil türler genellikle geçiş formlarıdır (Nabozhenko, 2007). Beslenmek için hava karardıktan sonra ortaya çıktıkları ve soğuk havaları tercih ettikleri, bununla birlikte beslendikten sonra kendilerini bıraktıkları ve toprağa düştükten sonra ağacın köküne veya ağaç kabuklarının arasına doğru hareket ettikleri gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında *G. gayirbegi* ve *G. korkutelensis* türlerinin farklılaşma sınırları mt *cox1* gen bölgesi belirteci kullanılarak moleküler ve filogenetik araçlar ile test edilmiştir. Çalışmada primer olarak, yeni tanımlanmış olan türler arasındaki ayrımın moleküler verilerle desteklenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca cinsin bazı türlerinin *Cylindronotina* alttribüsü içine aktarılması (Nabozhenko, 2005) nedeniyle bu alttribüsün tip cinsine dahil *Cylindronotus* sp. tip tür örneği ve Helopina alttribüsüne dahil *Helops cyanipes*, *Probatiscus* sp., *Raiboscelis* sp. ve *Catomus* sp. örnekleri analize eklenmiştir.

Mitokondriyal *cox1* gen bölgesi haplotip ağında bulunan *Gunarus* sp. örneklerinin neredeyse hepsi ayrı haplotipler olarak ayrılmışlardır. Haplotip ağında (Şekil 3.1) belirgin olarak üç ayrı grup görülmektedir. 1. ve 2. grup H_12-15 ve 3. grup H_16-18 haplotip gruplarının birbirlerinden bağımsız olarak ayrılmaları tür gruplarının tamamen birbirlerinden izole olmuş olmaları ve türler arasındaki gen akışının kesilmiş olmasıyla açıklanabilir. H_12-13 ve H_14-15 haplotiplerin iki ayrı grup şeklinde ayrıldığı ancak popülasyonlar arasındaki genetik farklılığın çok derin olmadığı saptanmıştır. Haplotip veri analizi sonuçları, bu tür grubunun zengin bir genetik çeşitliliğe sahip olduğuna işaret etmiştir (Çizelge 3.1). Genetik uzaklık analizi de bu çıkarımı destekler niteliktedir (Çizelge 3.2).

Komşu Bağlama (NJ) analizinde *Gunarus* cinsine dahil örneklerin çok yüksek Seç-Bağla (Bootstrap) değerleri ile desteklendiği ve tür gruplarının birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir (Şekil 3.2). NJ ağacı, özellikle yüksek takson gruplarının ayrımlarında elde edilmiş olan düşük destek değerleri nedeniyle, veri setinde bulunan örneklerin filogenetik ilişkileri hakkında sadece bir ön değerlendirme yapılmasına olanak sağlamaktadır.

NJ, MP (Şekil 3.3) ve ML (Şekil 3.4) ağaçları birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, *Gunarus* türlerine ait örneklerin birbirlerinden ayrımları benzer topolojiye sahip ve dal destekleri oldukça yüksek değerlerle elde edilmiştir. Ancak, tür üstü seviyedeki dal ayrımlarının her bir ağaçta farklı olduğu görülmektedir. Bu açıdan, veri setinin özellikle nükleer belirteçler ve morfolojik verilerle birleştirilerek diğer türleri/cinsleri içerecek şekilde genişletilmesi, Helopini tribüsüne dahil tür ve cinsler arası filogenetik ilişkilerin anlaşılmasında büyük katkı sağlayacaktır.

Bayesian yaklaşımlı analizle Beast v1.6.2 programı ile oluşturulan zaman ağacında *Catomus* cinsi, Helopina alttribüsüne dahil olmasına rağmen bütün grupların dışında yer almıştır. Diğer analizler sonucunda elde edilen filogenetik ağaçlara benzer şekilde *Raiboscelis* sp. örnekleri de diğer Helopina alttribüsüne dahil örneklerle gruplanmamışlardır ve hatta Beast ağacında *Cylindronotus* sp. ile aynı kladda yer almışlardır. *Helops cyanipes* ve *Probaticus* sp. örneklerinin ayrımları da diğer filogenetik ağaçlarla topolojik ayrımları bakımından benzerlik göstermektedir (Şekil 3.5).

MrBayes 3.2 programında *Gunarus* türlerinin ayrılma yaşı tahminleri iki farklı yaş kalibrasyonu ve divergens oranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Davraz ve Yarpuz örneklerinin Fethiye ve Korkuteli örnekleri ile olan ayrım yaşları her iki ağaçta da bu ayrımın uzun zaman önce gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir. Genetik uzaklık analizleri ve haplotip gruplaşmaları da bu durumu destekler niteliktedir. Bu sonuç, Davraz ve Yarpuz örneklerini barındıran bu kladın ayrı bir tür olabileceği düşüncesini güçlendirmiştir. Fethiye

ve Korkuteli örneklerinin ise daha yakın zamanlara denk gelen ayrımları, morfolojik açıdan farklı türler olarak tanımlanmalarını da göz önünde bulundurulduğunda kardeş türler olabilecekleri düşünülmüştür.

Sibling (kardeş) türler başka hiçbir tür ile paylaşılmayan bir ortak atadan kökenlenen türlerdir ve türleşme sürecinde evrimsel gelişmelerin çalışılmasında önemli modellerdir. Yakın ilişkili türlerin arasındaki farklılaşma paternini tanımlamanın önemi doğal seleksiyon ile evrimi anlamamanın temelini oluşturur (Darwin C., 1859). Kardeş türler bazen simpatrik olarak ortaya çıkarlar veya hibrit dağılım gösteren alanlar paylaşabilirler ki bu durum türler arasındaki genetik ve ekolojik etkileşimleri keşfetme olanağı sağlar (Barracough and Vogler, 2000). Bununla beraber, çoğu türün atasal türlerden coğrafi olarak izole popülasyonların çeşitlenerek allopatriyle evrimleştiğine inanılır. Allopatrik türleşme gen akışını engelleyen bariyerlerden dolayı, yeni bir kolonileşme ile veya kardeş türlerle simpatri oluşturma ile sonuçlanabilir (Mayr E., 1963). *Gunarus gayirbegi* ve *Gunarus korkutelensis* türlerinin durumuna benzer şekilde *Onthophagus taurus* ve *Onthophagus illyricus* bok böceği türleri de morfometrik çalışmalarla ayrı türler olarak tanımlanmışlar ve moleküler analizlerle desteklenen bu tür ayrımlarının Pliyosen Çağı'nın yakın dönemlerine denk geldiği ortaya konmuştur (Pizzo et al., 2006).

Bu sonuçların dışında, analiz sürecinde şaşırtıcı olarak Davraz Dağı ve Yarpuz Dağı örnekleri *Gunarus* cinsine bağlı yeni bir türün varlığını ortaya çıkarmıştır. Ayrı bir tür olarak görünen bu kladın morfolojik incelemesi yapılmamıştır. Tüm ağaçlarda birlikte görülen Davraz1 ve Yarpuz örnekleri dikkat çekmiştir. Sekans verileri tekrar incelendiğinde, Davraz1-Yarpuz örnekleri arasında 8 nükleotid substitüsyonu bulunurken, Davraz1-Davraz2 örnekleri arasında 10 nükleotid substitüsyon bulunmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, haplotip ağlarına bakıldığında Davraz örneklerinin paylaşılan mutasyonlar üzerinden farklı haplotiplere ayrıldıkları görülmektedir (Demirsoy, 2002).

Gunarus soy hattının ayırım yaşı ortalama 16 my yıl olarak çıkmaktadır ve bu da Orta Miyosen başına denk gelmektedir. Bu dönemde, Batı Akdeniz'in Atlantik Okyanusu ile bağlantısı koptuğundan, yoğun buharlaşma nedeniyle Akdeniz kurumaya başlamıştır. Bu süreçte Afrika, İspanya ve Sicilya kara köprüleriyle birbirlerine bağlanmışlardır. Batı Anadolu levhası batıya doğru kaymaya başlamıştır ve Orta Anadolu'daki sığ deniz birçok lagün oluşturarak kurumaya başlamıştır. Batı Toroslar oluşmaya başlamıştır.

Gunarus sp. soy hattının iki klada ayrılma yaşı ortalama 7.5 my yıl olarak çıkmaktadır ve bu da Üst Miyosen ortalarına denk gelmektedir. Akdeniz Bölgesi doğudan köken alan, kuraklığa dayanıklı ve her daim yeşil kalan vejetasyon örtüsüyle değişmiştir. Yarı kurak

iklim, devrin sonuna doğru kuraklaşmaya başlamıştır. Orta Anadolu şekillenmeye başlamıştır (Demirsoy, 2002).

Gunarus cinsinin genel biyocoğrafik ve filogenetik tür sınırlarının daha net bir şekilde çözümlenebilmesi için Avrupa ve Türkiye’de yer alan müze materyallerinin tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, *G. kaszabi* türüne ait bir fosil kaydının olması, grubun filogenisinin anlaşılmasında ve yaş kalibrasyonunda büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada belirlenen varyasyon sınırlarının, daha fazla sayıda morfolojik, moleküler (nuklear/mitokondriyal) ve ekolojik belirteçler temelinde popülasyon genetiği, sitogenetik ve filogenetik araçlarla test edilmesi grubun evrimsel gelişimi ve taksonomik konumun aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Güneybatı Anadolu *Gunarus* türleri kardeş türler olabileceklerinden, biyocoğrafya ve ekolojik çalışmalar için iyi birer model takson olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aalbu, R. L., Tripplehorn, C. A., Campbell, J. M., Brown, K. W., Somerby, R. E., and Thomas, D. B.,** 2002, Tenebrionidae Latreille, 1802, American Beetles: Polyphaga: Scarabaeidae through Curculionidae, 2, 463-509pp.
- Barraclough T. G. and Vogler A. P.,** 2000, Detecting the geographical pattern of speciation from the species-level phylogenies, American Naturalist, 155, 19–434pp.
- Baviera, C., Stroschio, S., Frati, F., Lo Paro, G., and Nardi, F.,** 2011, Deep genetic divergence in the darkling beetle *Pimelia rugulosa* (Coleoptera, Tenebrionidae) reflects Plio-Pleistocenic paleogeographic history of Sicily, Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 49(3), 196–203pp.
- Bos, D. H., and Posada, D.,** 2005, Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees, Developmental and Comparative Immunology, 29(3), 211–227pp.
- Bouchard, P., Lawrence, J. F., Davies, A. E., and Newton, A. F.,** 2005, Synoptic classification of the world Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) with a review of family-group names, Annales Zoologici, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, 55, 4, 499-530pp.
- 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, 6491–6495pp.
- Buckland, P. C.,** 1991, Insect pests of stored products from Late Bronze Age Santorini, Greece, J. Stored Prod. Res., 27(3), 179–184pp.
- Canpolat, D.,** 2007, *Accanthopus velikensis* new to the Turkish fauna (Coleoptera; Tenebrionidae), Zoology in the Middle East, 42, 104–105pp.
- Canpolat, D.,** 2008, Gazi Üniversitesi Zooloji Müzesi'nde Bulunan Tenebrionidae Örneklerinin Faunistik ve Sistemik Değerlendirilmesi, Gazi University.
- Canpolat, D.,** 2012, New Records of Tenebrioninae and Pimeliinae (Coleoptera : Tenebrionidae) from Turkey, J. Entomol. Res. Soc., 14(1), 15–20pp.
- Caterino, M. S., Cho, S., and Sperling, F. A. H.,** 2000, The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel, Annu. Rev. Entomol., 45, 1–54pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D.,** 2012, jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing, *Nature methods*, 9(8), 772-772pp.
- Darwin C.,** 1859, *On the origin of the species by means of natural selection*, London: Murray.
- De Los Santos, A., Gómez-González, L. A., Alonso, C., Arbelo, C. D., and De Nicolás, J. P.,** 2000, Adaptive trends of darkling beetles (Col. Tenebrionidae) on environmental gradients on the island of Tenerife (Canary Islands), *Journal of Arid Environments*, 45(1), 85-98pp.
- Demirsoy, A.,** 2002, *Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası*, Hayvan coğrafyası, Meteksan Yayınları, Ankara, 1007.
- Drummond, A. J., and Rambaut, A.,** 2007, BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees, *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Espanol, F. and Comas, J.,** 1987, Les Espèces del Genere *Gunarus* Gozis, de la Colleccio del Museu de Zoologia de Barcelona, *Misc. Zool.*, 11(1956), 165–171pp.
- Ghahari, H.,** 2010, Contribution to the knowledge of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) from Iranian rice fields and surrounding grasslands, *Polish Journal of Entomology*, 79, 81–90pp.
- Gurney, T., Elbel, R., Ratnapradipa, D., and Bossard, R.,** 2000, Introduction to the Molecular Phylogeny of Insects. In *Proceedings of the 21st Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 63–79pp.
- Hunt, J. W.,** 2007, PS 16-170: Surface-active beetles as indicators of habitat change in riparian restoration along the Sacramento River, California, USA.
- Huson, D. H., and Bryant, D.,** 2006, Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254–67pp.
- Keskin, B., and Nabozhenko, M. V.,** 2010, A New Species and New Records of the Genus *Nalassus* Mulsant, 1854 (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini) from Turkey, *Annales Zoologici*, 60(1), 23–28pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Keskin, B., and Nabozhenko, M. V.,** 2011, Review of the Genus *Odocnemis* Allard, 1876: O. Korbi Species-Group (Coleoptera: Tenebrionidae: Helopini), *Annales Zoologici*, 61(2), 339–354pp.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H. and Higgins, D. G.,** 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948pp.
- Latreille, P.A.,** 1802, Histoire naturelle, générale et particulière des Crustacés et des Insectes. Tome 3, F. Dufart, Paris, 176-180pp.
- Librado, P., and Rozas, J.,** 2009, DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452pp.
- 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, 121–160pp.
- Lillig, M., Mifsud, D., and Grimm, R.,** 2012, Faunistic and taxonomic updates on the Tenebrionidae of Malta (Coleoptera), *Bulletin of the Entomological Society of Malta*, 5, 111–119pp.
- Lodos, N.,** 1991, Türkiye Entomolojisi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, İzmir, Bornova, 130-142pp.
- Löbl, I., Ando, K., Bouchard, P., Egorov, L. V., Iwan, D., Lillig, M., and Smetana, A.,** 2008, Family Tenebrionidae Latreille, 1802. *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*, 5, 105-352pp.
- Mayr E.,** 1963, *Animal species and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., and Kent, J.,** 2000, Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, 403(6772), 853-858pp.
- Nabozhenko, M. V.,** 2001, On the classification of the tenebrionid tribe Helopini, with a review of the genera *Nalassus* Mulsant and *Odocnemis* Allard (Coleoptera, Tenebrionidae) of the European part of CIS and the Caucasus, *Entomological Review*, 81(8), 909-942pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Nabozhenko, M. V.**, 2005, Review of darkling beetles of the genus *Ectromopsis* Antoine, 1947 (Coleoptera , Tenebrionidae) of former USSR, *Caucasian Entomological Bull.*, 1(2), 123–128pp.
- Nabozhenko M.V.**, 2007, Landscape-Biotopic Distribution and Trophic Links of Tenebrionid Beetles of the Tribe Helopini (Coleoptera, Tenebrionidae) in the Caucasus and Pre-Caucasus, *Studies of the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences Issue 3: Biodiversity and Transformation of Mountain Ecosystems of Caucasus*, SSC RAS Publishing, P., 242–252pp.
- Nabozhenko, M. V., and Keskin, B.**, 2009, Two new species of the genus *Gunarus* Des Gozis, 1886 from Southern Turkey, *Zootaxa*, 2170, 53–60pp.
- Nabozhenko, M. V.**, 2011, Two New Species of the Tribe Helopini (Coleoptera: Tenebrionidae) from Artvin Province, Turkey. *Annales Zoologici*, 61(2), 335–338pp.
- Nabozhenko, M. V., and Keskin, B.**, 2014, New data about “ nalassoid ” genera from south-eastern Anatolia with description of a new species of *Zophohelops* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 54(1), 243–249pp.
- Novák, V.**, 2006, *Megischina bozdaglariensis* from Turkey. *Taxonomical Series*, 2(1-2), 99–104pp.
- Orsini, L., Koivulehto, H., and Hanski, I.**, 2007, Molecular evolution and radiation of dung beetles in Madagascar, *Cladistics*, 23(2), 145-168pp.
- 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*, 18(11), 2503–17pp.
- 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), 1659–72pp.
- Pizzo, A., Roggero, A., Palestini, C., Cervella, P., Del Pero, M., and Rolando, A.**, 2006, Genetic and morphological differentiation patterns between sister species: the case of *Onthophagus taurus* and *Onthophagus illyricus* (Coleoptera, Scarabaeidae), *Biological Journal of the Linnean Society*, 89(2), 197-211pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Posada, D.**, 2008, jModelTest: phylogenetic model averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–6pp.
- Purchart, L., and Nabozhenko, M. V.**, 2012, Description of larva and pupa of the genus *Deretus* (Coleoptera : Tenebrionidae) with key to the larvae of the tribe Helopini *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 52(supplementum 2), 295–302pp.
- Rambaut, A.**, 2007, FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Reitter, E.**, 1922, Bestimmungstabelle der palaearktischen Helopinae (Col. Tenebrionidae).
- 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(4), 493-508pp.
- Ridley, M.**, 2004, *Evolution*. Third Edition. Blackwell Publishing company, 751pp.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J., and Teslenko, M.**, 2011, Draft MrBayes version 3.2 manual: tutorials and model summaries. Distributed with the software from <http://brahms.biology.rochester.edu/software.html>.
- 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), 651-701pp.
- Steiner W. E.**, 1995, Structures, behavior and diversity of the pupae of Tenebrionidae (Coleoptera), *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera, Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*, 504-539pp.
- Steiner, W. E.**, 1999, Flightless beetles in Appalachian “deserts”: studies on the distribution and localized habitats of some species of Tenebrionidae (Coleoptera), *Virginia Museum of Natural History Special Publication*, 7, 125-144pp.
- Steiner W. E.**, 2009, The Helopini (Coleoptera: Tenebrionidae) of Virginia, *A lifetime of contributions to myriapodology and the natural history of Virginia, Papers celebrating the 80th birthday of Richard L. Hoffman*, 331-339pp.
- Soldati, L.**, 2009, *The Darkling Beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) of Qatar*, Warszawa, Poland: Natura optima dux Foundation, 120p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Swafford, D. L.**, 2002, PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other models). Version 4.0 b10 for macintosh, Sunderland, Mass: Sinauer Associates Inc.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S.**, 2013, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Molecular biology and evolution, 30(12), 2725-2729pp.
- Tezcan, S., Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Keskin, B., and Ferrer, J.**, 2004, Contributions to the knowledge of the Tenebrionidae (Coleoptera) From Turkey, Part I. Lagriinae, Pimeliinae, Bolitophaginae, Diaperinae. Türk. entomol. derg, 28(2), 99-114pp.
- Watt, J. C.**, 1974, New Zealand Journal of Zoology A revised subfamily classification of Tenebrionidae (Coleoptera), New Zealand Journal of Zoology, 1(4), 381–452pp.
- Zardoya, R., and Meyer, A.**, 1996, Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates, Molecular Biology and Evolution, 13(7), 933-942pp.
- Zhang, D. X., and Hewitt, G. M.**, 1997, Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects, Insect Molecular Biology, 6(2), 143-150pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ERCETİN, Aliye Evrim

Doğum Tarihi ve Yeri : 19.04.1990 / Denizli

Telefon : 0 (507) 417 06 78

e-mail : a.evrin.ercetin@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Adnan Menderes Anadolu Lisesi	2008

Yabancı Dil

İngilizce

İlgi Alanları: Evrimsel biyoloji, spor aktiviteleri, sinema