EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Cytochrome Oxidase 1 (*cox1*) MOLEKÜLER BELİRTECİ KULLANILARAK *Accanthopus* DEJEAN, 1821 (TENEBRIONIDAE, HELOPINI) CİNSİNİN TAKSONOMİK DURUMUNUN BELİRLENMESİ

Ayşe Nur PEKTAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bekir KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.04.00
Sunuş Tarihi: 09/ 01/ 2015

Bornova-İZMİR

2015

Ayşe Nur PEKTAŞ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "*CyctochromeOxidase* 1 (*cox1*) Moleküler Belirteci Kullanılarak *Accanthopus* Dejean, 1821 (Tenebrionidae, Helopini) Cinsinin Taksonomik Durumunun Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma E. Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09/01/2015tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri		**İmza**
Jüri Başkanı	: Doç. Dr. Bekir KESKİN	**.....**
Raportör Üye	: Doç. Dr. Nurşen KESKİN	**.....**
Üye	: Prof. Dr. Serdar TEZCAN	**.....**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "*Cytochrıme Oxidase* 1 (*cox1*) Moleküler Belirteci Kullanılarak *Accanthopus* Dejean, 1821 (Tenebrionidae, Helopini) Cinsinin Taksonomik Durumunun Belirlenmesi" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, döküman, 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.

09/ 01 / 2015

Ayşe Nur PEKTAŞ

ÖZET

Cytochrome Oxidase 1 (*cox1*) MOLEKÜLER BELİRTECİ KULLANILARAK *Accanthopus* Dejean, 1821 (Tenebrionidae, Helopini) CİNSİNİN TAKSONOMİK DURUMUNUN BELİRLENMESİ

PEKTAŞ, Ayşe Nur

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bekir KESKİN
Ocak 2015, 27 sayfa

Bu çalışmada, Helopini aşiretine bağlı *Accanthopus* Dejean, 1821 cinsinin mitokondriyal DNA gen bölgesi *cox1* dizileri kullanılarak, Tenebrionidae ailesi içindeki yeri ve diğer cinslerle olan filogenetik ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çeşitli filogenetik analizler bir arada kullanılarak elde edilen veriler doğrultusunda cinsin bu soy hattındaki konumu tartışılmıştır.

Sunulan veriler, *Accanthopus* Dejean, 1821 cinsinin Helopini aşiretinin atasal üyesi olduğunu ortaya koymuştur. Cinsin filogenisi hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmesi için moleküler verilerin artırılmasına yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

Anahtar sözcükler: Tenebrionidae, Helopini, filogenetik, mtDNA, *cox*1.

ABSTRACT

USING THE MOLECULAR MARKER *Cytochrome Oxidase 1* (*cox1*) TO IDENTIFY THE TAXANOMIC POSITION OF GENUS *Accanthopus* Dejean, 1821 (Tenebrionidae; Helopini)

PEKTAŞ, Ayşe Nur

MSc. in Biology
Supervisior: PhD. Bekir KESKİN
January, 2015, 27pages

In this study, the phylogenetic relationships with other genera of Tenebrionidae family and its place within by phylogenetic analyzes using mitochondrial DNA gene area *cox*1 sequences of *Accantophus* Dejean, 1821 belonging to tribe Helopini. According to data gathered by various phylogenetic analyzes were discussed to reveal the place of this genus within the strain line.

The study revealed that Accanthopus Dejean, 1821 genus was an ancestral member of the tribe Helopini. Future studies are planning which aimed at increasing molecular data for obtaining more detailed information about the phylogeny of the genus.

Key words: Tenebrionidae, Helopini, phylogenetic, mtDNA, *cox*1.

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince bilgileri ile beni destekleyen, deneyimleri ile yol gösteren Danışman Hocam Doç. Dr. Bekir Keskin'e ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nurşen Alpagut Keskin'e teşekkürü borç bilirim. Arazi çalışmaları sırasındaki katkılarından dolayı Maxim Nabozhenko ve Svetlana Nabozhenko'ya teşekkür ederim.

Eğitimimin bir dönemini geçirdiğim Cumhuriyet Üniversitesi'ndeki hocalarıma, ev arkadaşım Özgül Doğan'a, yakın arkadaşım Burcu Temel'e ve Sivas'ta bulunduğum dönem boyunca yalnız hissettirmeyen tüm arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Fikirleri ile dik durmamı sağlayan babam ve her zaman desteğim olan anneme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

TEŞEKKÜR xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ xix

1. GİRİŞ 1

1.1 Helopini Latreille, 1802 Aşiretinin Sistematik Yeri 2

2. MATERYAL ve YÖNTEM 5

2.1 Materyalin Elde Edilmesi 5

2.2 Moleküler Analizler 6

2.2.1 Total genomik DNA izolasyonu 6

2.2.2 *cox1* gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması 6

2.2.3 Gen fragmanlarının dizilenmesi ve hizalanması 7

2.2.4 Veri analizi 8

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. BULGULAR.....11

3.1 Filogenetik Analizler.....12

4.TARTIŞMA ve SONUÇ.....19

KAYNAKLAR DİZİNİ.....23

ÖZGEÇMİŞ.....27

EKLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

1.1 *Accanthopus* Dejean, 1821 a) Dorsal görünüm (Gabris, 2011'den) b) epipleura yapısı c) klipeus yapısı d) mentum yapısı (Orijinal) 3

1.2 *Accanthopus* cinsi üyelerinin yayılış alanı *Accanthopus velikensis* (Piller and Mitterpacher, 1783)♦ *Accanthopus reitteri* (Brenske, 1884)..... 4

2.1 Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü 7

2.2 Sequencher programında dizilerin kromatogram görünümü ve contig dosyası haline getirilmesi 7

2.3 McClade programında amino asit ifadelerinin gösterilmesi 8

3.1 K-2P parametresi ile oluşturulan komşu-bağlama (NJ) ağacı 12

3.2 Maksimum parsimoni analizi ile elde edilen filogenetik ağaç 14

3.3 Maksimum olasılık(ML) prensibi ile elde edilen filogenetik ağaç 15

3.4 Bayesiyan yalaşımı ile Mr. Bayes programında elde edilen filogenetik ağaç 16

3.5 Yaş bilgisi girilmeden farklılaşma zamanlarını gösteren filogenetik ağaç 17

3.6 Dış grup için yaş bilgisi girilerek elde edilen filogenetik zaman ağacı... 18

3.7 SplitsTree programında elde edilen haplotip ağı 18

4.1 Morfolojik verilere göre yapılmış sınıflandırmaların ağaç üzerinde karşılaştırılması 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇizelgeSayfa

1.1 Helopini Latreille, 1802 aşiretinin sistematik yeri 2

2.1 Moleküler analizlerde kullanılan materyal örneklem alanları 5

3.1 Sinonim ve sinonim olmayan mutasyonların oranı 11

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
-	Eksi
+	Artı
%	Yüzde
ºC	Santigrat derece
µl	Mikro litre
α	Alfa

Kısaltmalar

AIC	Akaike Bilgi Kıstası
BIC	Bayesiyan Bilgi Kıstası
BI	Bayesiyan Çıkarsama
cox1	Sitokrom Oksidaz 1
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
GTR	Genel Zaman Dönüşümlü
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
ML	Maksimum Likelihood
MP	Maksimum Parsimoni
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NJ	Komşu Bağlama
nst	Nükleotid değişim pozisyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBR	Tree Bisection Reconnection

1.GİRİŞ

Biyolojik çeşitliliği ele alan sistematik, çevremizdeki organizmaları tanıma ve tanımlamamızı, sınıflandırmamızı, benzeri diğer gruplarla karşılaştırarak, birbirleriyle olan evrimsel akrabalık ilişkilerini anlamamızı sağlar. Biyolojik çeşitliliğin organizasyonu ise taksonomidir ve bir taksonun evrimsel tarihi, onun filogenisini oluşturur.

Aristo ile temeli atılan ampirik sınıflandırma sistemi, Linne'nin çalışmalarıyla hiyerarşik, öngörücü ve modern bir sınıflandırma sistemine dönüşmüştür (Minelli and Contrafatto, 2009).Özellikle de 18.yy da Fabricius'un yaptığı çalışmalar, bugün kullandığımız böcek sistematiğinin zeminini oluşturur(Tuxen, 1967).

Moleküler biyoloji alanının gelişimi ile morfolojik karşılaştırmalara dayanan taksonomi çalışmalarının, aynı zamanda DNA bilgisi ile desteklenmesi ve tartışılması, sınıflandırma sistemi için yeni bakış açıları getirmiştir. DNA yapısının keşfedilmesi (Watson and Crick, 1953), hemen sonrasında mitokondriyal DNA'nın keşfi (Nass and Nass, 1968) ile moleküler biyolojiyle desteklenen filogeni çıkarsamaları yapılmaya başlanmış ve moleküler filogeni dediğimiz alan ortaya çıkmıştır. Bugün bu alandaki ilerlemeler aracılığıyla, DNA'ya dayalı yöntemler kullanılarak mevcut sistematik problemlerin üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır (Avise, 1994).

Böcekler, dünya üzerindeki üç milyar yıllık yaşam süresi içinde Geç Siluryen'den bu yana 400 milyon yıllık geçmişleri ile canlılar arasında en yaygın ve en fazla tür sayısına sahip gruptur (Grimaldi and Engel, 2005). Dünyada en fazla türe sahip olan böceklerin, evrimsel ilişkileri ve yaşamın evrimini anlamak için anahtar oldukları düşünülmektedir (Trautwein et al., 2012). Günümüzde bilinen yaklaşık bir milyon tür sayısı ile böcekler, kutuplardan ekvatora, sulak alanlardan dağların zirvelerine kadar çok çeşitli alanlarda dağılım göstermektedir. Toplam tür sayısının ise iki buçuk milyon ile on milyon arasında olduğu tahmin edilmektedir (Grimaldi and Engel, 2005). Dolayısıyla moleküler filogeni alanının en çok uğraştığı gruplar da böcekler olmuştur.

Coleoptera (Kınkanatlılar) takımı, böcek grupları içerisinde 350.000 tür ile temsil edilmekte ve tüm böceklerin %40 ını oluşturmaktadır (Grimaldi and Engel, 2005). Unkurtları ailesi (Tenebrionidae) ise, kınkanatlılar içinde 15.000 den fazla

tür sayısı ile en büyük ailelerden biridir (Bouchard et. al., 2005; Watt, 1974). Tenebrionidae ailesi ismini, Latince "tenebrio" kelimesinden alır ve bu "karanlığı seven" anlamına gelir. Bu gruptaki böceklerin çoğu gececildir ve kuytu yerleri sever (Lodos, 1991). Bu aile içerisinde yer alan Helopini Latreille, 1802 (Tenebrionidae: Tenebrioninae) aşiretinin evrimi, orman alanlarından, kurak ve yarı kurak alanlara geçiş ile yakından ilişkilidir (Nabozhenko, 2005). Bu nedenle bu aşiretin üyelerine, tayga ve tundra dışında (Nabozhenko, 2005), neredeyse her türlü yer şekli ve yüksek rakımlı zonlarda çok çeşitli habitatlarda rastlanmaktadır (Nabozhenko, 2007b).

1.1 Helopini Latreille, 1802 Aşiretinin Sistematik Yeri

Çizelge 1.1 Helopini Latreille, 1802 aşiretinin sistematik yeri

Şube	Arthropoda (Eklembacaklılar)
Alt Şube	Hexapoda (Altıbacaklılar)
Sınıf	Insecta (Böcekler)
Alt Sınıf	Pterygota (Kanat taşıyanlar)
Takım	Coleoptera (Kın Kanatlılar)
Alt Takım	Polyphaga
Üst Aile	Tenebrionoidea
Aile	Tenebrionidae Latreille, 1802
Alt Aile	Tenebrioninae Leatreille, 1802
Aşiret	Helopini Latreille, 1802

Helopini aşireti Palearktik Bölge'de 39 cinse dahil olan 553 tür ile temsil edilmektedir. Bugüne kadar oluşturulan kataloglar içerisinde (Gebien, 1910-1911; Winkler, 1924-1932; Löbl and Smetana, 2008) Türkiye faunasından Helopini aşiretinedahil17 cins (*Accanthopus* Dejean,1821; *Armenohelops* Nabozhenko, 2002; *Catomus* Allard,1876; *Cylindronotus* Faldermann,1837; *Entomogonus* Solier, 1848; *Euboeus* Boieldieu, 1865; *Gunarus* Des Gozis, 1886; *Hedyphanes* Fischer von Waldheim, 1820*; Helopelius* Reitter, 1922; *Helops* Fabricius, 1775; *Nalassus* Mulsant, 1854; *Odocnemis* Allard, 1876; *Probaticus* Seidlitz, 1896; *Pseudoprobaticus* Nabozhenko,2001; *Raibosceles* Allard, 1876; *Stenomax* Allard, 1876; *Xanthomus* Mulsant,1854) bildirilmiştir. Son yapılan çalışmalarda katalogtan sonra tanımlanan *Zophohelops* Reitter, 1902, *Microdocnemis* Nabozhenko and Keskin, 2010 ve*Idahelops* Keskin and Nabozhenko, 2012 cinsleri ile birlikte bu sayı 20 olmuştur.

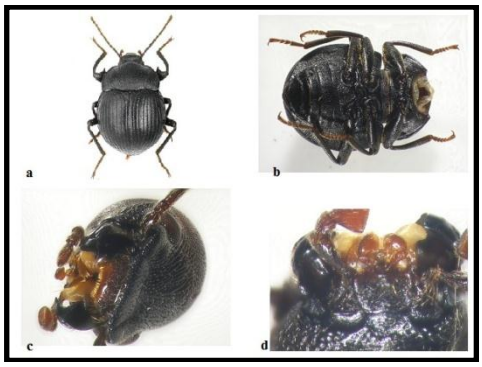
Tenebrionidae ailesi farklı dış morfolojiye sahip grupları içermekle birlikte, Helopini aşireti üyeleri benzer karakteristik özellikleri taşır. Bu grup diğer cins

topluluklarından, ön kenarı sarı, parlak bir deri parçasına sahip bir klipeusun bulunuşu ile ayrılmıştır. Ancak Allard (1876) çalışmasında bu aşiretin üyelerini morfotiplerine göre herhangi bir adlandırma yapmadan iki divisioya ayırmıştır. Sonrasında Reitter (1922a) bu divisioları dört alt aşirete bölerek; Enoplopina, Hedyphanina, Helopina ve Nephodina olarak ayırmıştır. Helopini aşireti üzerinde son yapılan çalışma Nabozhenko (2001)' de ise türler Cylindrinotina ve Helopina alt aşiretleri dahilinde sınıflandırılmıştır.

Yakın zamana kadar Reitter (1922a) sistemindeki, Enoplopina alt aşiretine bağlı *Accanthopus* Dejean, 1821 (= *Enoplopus* Solier, 1848), Hedyphanina alt aşiretine bağlı *Hedyphanes* ve *Catomus*cinsleri ile aynı sistemdeki Helopina (sensu Nabozhenko and Löbl, 2008) alt aşiretine; Helopina (sensu Reitter, 1922a) alt aşiretine bağlı *Zophohelops* ve *Cylindronotus* cinsleri ile Nephodina alt aşiretine bağlı cinsler, Cylindronotina alt aşiretine aktarılarak yeni bir sistem oluşturulmuştur (Nabozhenko and Löbl, 2008).

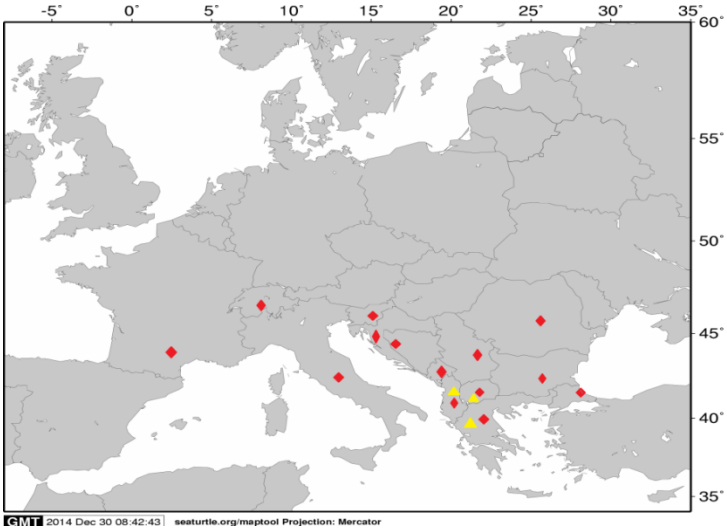
Accanthopus Dejean, 1821 cinsiPalearktik bölgede *Accanthopus velikensis* (Piller and Mitterpacher, 1783) ve*Accanthopus reitteri* (Brenske, 1884) olarak isimlendirilmiş iki tür ile temsil edilir. Türler habitat seçimi olarak genellikle kayın, kestane, meşe ve gürgen ormanlarında, ağaç kabuklarının altında yaşarlar. (Canpolat ve ark., 2007)

*Accanthopus*Dejean, 1821 cinsi diğer Helopini aşiretinin karakteristik klipeus özelliği (Şekil 1.1c) taşımakla birlikte, farklı olarak bu cinsin bireylerinde ön femurlarda keskin bir diş bulunur (Şekil 1.1a). Vücudu kısa, geniş ve kubbelidir. Elitranın epipleurası çok geniş (Şekil 1.1b) ancak elitranın sonuna kadar aynı genişlikte uzanmaz ve erkeklerde mentum (Şekil 1.1d) çok küçük bir kıl yumağına sahiptir (Reitter, 1922a).



Şekil 1.1*Accanthopus velikensis* (Piller and Mitterpacher, 1783) türünde morfolojik yapılar a) Dorsal görünüm (Gabris, 2011'den)b) epipleura c) klipeus d) mentum (Orijinal).

Accanthopus velikensis(Piller and Mitterpacher, 1783) türünün Türkiye'den ilk kaydını Canpolat ve arkadaşları vermiştir (Canpolat ve ark., 2007). Her iki tür Yunanistan, Arnavutluk ve Makedonya'da simpatrik dağılım gösterirken, *Accanthopus reitteri* türü için Palearktik bölgede başka kayıt verilmemiştir (Löbl and Smetana,2008). Türlerin yayılış alanları Şekil 1.2 de gösterilmektedir.



Şekil 1.2*Accanthopus* cinsi üyelerinin yayılış alanı
Accanthopus velikensis (Piller and Mitter, 1783) ♦
Accanthopus reitteri (Brenske, 1884) ▲

Bu çalışmada, zaman içerisinde taksonomik durumu tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olan *Accanthopus* cinsini, Tenebrionidae ailesi ve Helopini aşireti içindeki durumu, moleküler bir belirteç olan mitokondriyal *cox1* geninden faydalanılarak filogenetik analizlerle test edilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyalin Elde Edilmesi

Çalışmanın materyali 2009-2014 yılları arasında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yapılan arazi çalışmaları ve NCBI/GenBank verileri ile oluşturulmuştur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Moleküler analizlerde kullanılan materyal örneklem alanları

Tür	Sayı	Yöre	İl/Ülke
Accanthopus velikensis	12 birey	Yıldız Dağları	Kırklareli /Türkiye
Catomus sp.	2 birey	Buğlan Geçidi	Muş/ Türkiye
Cylindronotus sp.	3 birey	Palandöken	Erzurum/ Türkiye
Helops cyanipes	2 birey	Toros	Mersin/ Türkiye
Nalassus sp.	3 birey	Yıldız Dağları	Kırklareli/ Türkiye
Odocnemis nasreddini	1 birey	Dedegöl	Isparta/ Türkiye
Odocnemis sp.	1 birey	Akşehir	Konya/ Türkiye
Odocnemis squalidus	2 birey	Sertavul	Mersin/ Türkiye
Pimelia subglobosa	1 birey	FN391500 (NCBI)	İzmir/ Türkiye
Pimelia subglobosa	1 birey	FN391496 (NCBI)	Andros Adası/ Yunanistan
Probaticus sp.	2 birey	Çobanlar	Aydın/ Türkiye
Raiboscelis sp.	2 birey	Bolkar Dağları	Niğde/ Türkiye
Raiboscelis sp.	1 birey	FN544724 (NCBI)	İzmir/ Türkiye
Raiboscelis sp.	1 birey	FN544721 (NCBI)	Sifnos Adası/ Yunanistan
Taurohelops incultus	2 birey	Sertavul	Mersin/Türkiye
Xanthomus sp.	2 birey	Çeşme	İzmir/ Türkiye
Zophohelops sp.	2 birey	Berçelan Yaylası	Hakkari/ Türkiye

Örnekler taş altı/üstü veya ağaçların üzerinden el ya da pens yardımıyla toplanmıştır. Laboratuvar çalışması için kullanılacak örnekler, etiket bilgileri kaydedilerek %96'lık etil alkol içerisine alınıp, -20 ºC'de muhafaza edilmiştir. Müze materyali olarak saklanacak örnekler ise etil asetat damlatılmış talaşlı kavanozlara alındıktan sonra, etiket bilgisi ve demirbaş numarası verilerek iğnelenip, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Müzesi koleksiyonuna kaldırılmıştır.

2.2 Moleküler Analizler

2.2.1 Total Genomik DNA İzolasyonu

Örnekler steril pensler yardımıyla mesotoraks ve metatoraks arasındaki bir bölgedenkırılarak baş ve pronotumla beraber olan kısmı izolasyon kuyucuklarının içine alınmıştır. Abdomen kısmı ise aynı numaraların verildiği ependorf tüplerine alınarak muhafaza edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu "genomic DNA purificiation system" (Wizard) kit ile beraberinde verilen prosedür doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunun ardından bu örnekler de koleksiyon materyali haline getirilmiştir.

2.2.2 *cox1* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

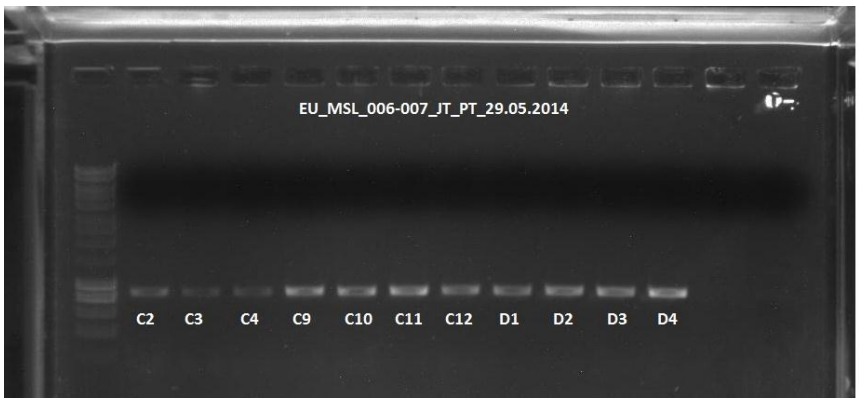
Total genomik DNA'dan mitokondriyal *cox1* gen bölgesini amplifiye edebilmek için Jerry-Ten (5'CAACACTTATTYTGATTYTTTGG-3') ve Pat-Ten (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATAWTA-3') (Papadopoulou et. al., 2009) seçici primerleri kullanılarak PCR uygulaması yapılmıştır. PCR karışımı 25µl'lik son reaksiyon hacminin içeriğine; ddH_2O, 12 µl Trehalose, 2.5 µl 10X reaksiyon tamponu (NH_4 tampon), 1.25 µl (1.5 mM/µl) $MgCl_2$, primerlerin her birinden 10pmol, 0.5 µl (0.2 mM) dNTPs,5 U *Taq* DNA polimeraz ve 3 µl(50 ng/µl)kalıp DNA eklenerek optimize edilmiştir.

PCR reaksiyonları "Applied Biosystem" marka"GeneAmp PCR system 9700" model termal cycler cihazında aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç denatürasyonu	: 94 ºC, 2 dakika	
Denatürasyon	: 94 ºC, 30 saniye	35 döngü
Primer bağlanma (Annealing)	: 56 ºC, 1 dakika	
Uzama- Sentez (Extension)	: 70 ºC, 2.15 dakika	
Son Uzama (Final Extension)	: 70 ºC, 10 dakika	

PCR işleminden sonra %1 lik Agoroz jel hazırlanarak elektroforez işlemi yapılmış ve "SmartView Pro 1100 image system" marka görüntüleme cihazında

fotoğrafları çekilmiştir. Örneklerin bir kısmına ait jel görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir.



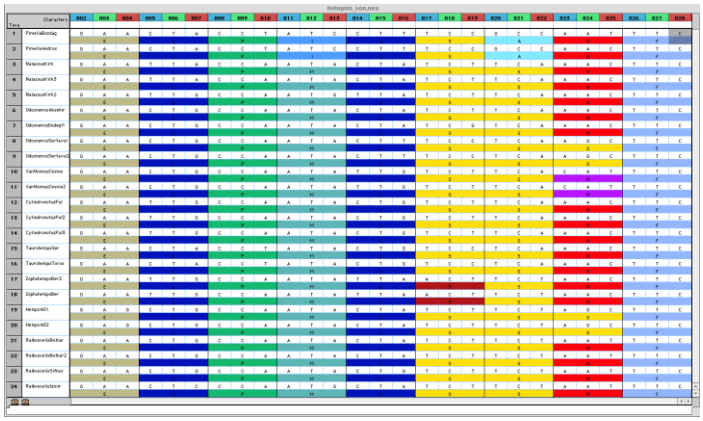
Şekil 2.1 Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü (Orijinal)

2.2.3 Gen Fragmanlarının Dizilenmesi ve Hizalanması

PCR işlemleri sonrasında örneklerin saflaştırılması ve dizilenmesi işlemleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yaptırılmıştır. Dizileme işlemleri PCR işlemindeki primerler ile çift yönlü gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrası elde edilen *.abi* uzantılı dosyalar Sequencher 4.8 (Gene Codes, 2007) programında ileri ve geri yönlü diziler karşılıklı hale getirilerek kontrol edilmiştir. Contig dosyaları oluşturulduktan sonra hatalı pikler düzeltilmiştir. (Şekil 2.2)

Şekil 2.2 Dizilerin Sequencher 4.8programındaki kromatogram görünümü.

FASTA formatındaki DNA dizileri Clustal X/W (Larkin et. al., 2007) programında hizalanmıştır. McClade 4.08 (Maddison and Maddison, 2011) programında oluşturulan aminoasit ifadeleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 McClade programında amino asit ifadelerinin gösterilmesi

2.2.4 Veri Analizi

*Accanthopus*Dejean, 1821 cinsinin filogenetik analizleri farklı algoritmalar bir arada kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin analizi DNA uzaklık, maksimum olasılık (ML), maksimum parsimoni (MP) ve Bayesiyan çıkarsamalı (BI) yaklaşımlar kullanılarak yapılmıştır. Analizler öncesinde *cox1* gen bölgesi için uygun mutasyon modeli JModeltest (Posada, 2008) programında belirlenmiştir. Mega6(Tamura et. al., 2013) ve R paket programında, iki mutasyon modeli ile genetik uzaklık matrisi oluşturulmuştur (EK 1). mtDNA *cox1* gen bölgesi için haplotip çeşitliliği ise DnaSP (Rozas et al., 2010) programıyla belirlenip, haplotipler arası ilişkiler (ağlar) SplitsTree v4.13.11 (Daniel and Braynt, 2006) programında elde edilmiştir.

Tüm analizler sonucunda elde edilen gen ağaçları FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2009) programı kullanılarak çizilmiştir.

2.2.4.1 Uzaklık analizleri

Minumum evrim prensibi kullanımına dayalı komşu-bağlama (NJ) yönteminde evrimsel uzaklık testi, doğada transisyonel nükleotid değişimlerinin transversiyonel değişimlerden daha yüksek olması özelliğinden yola çıkarak çoklu yer değişimleri test eden Kimura 2-Parametre (K2-P) modeli (Kimura, 1980) kullanılarak yapılmıştır. Nükleotid değişimlerine transisyon ve transverisyonların tümü dahil edilmiştir ve nükleotid pozisyonları arasındaki varyasyon için gamma dağılımı seçilerek “nst=6” değeri girilmiştir.

Aynı veri seti ile R paket programında K80 (default) model ayarları kullanılarak genetik uzaklık veri matrisi oluşturulmuştur (EK 2).

2.2.4.2 Maksimum Olasılık Analizi

Maksimum olasılık analizleri Felsenstein (1973) ve Farris (1973) tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yönteme göre evrimsel değişmeler basit bir olasılık modeli altında açığa çıkar. Yani bir karakterin bir durumdan diğer bir duruma değişmesinin ya da yeni bir karakterin açığa çıkmasının belli bir olasılığı vardır.

Bu yaklaşıma dayandırılarak geliştirilen maksimum olasılık analizi MacOSX v10.9.5 işletim sistemine sahip bilgisayarda,PAUP 4.06.10 (Swofford 2002) programında yapılmıştır.

2.2.4.3 Maksimum Parsimoni Analizi

Maksimum parsimoni analizi, evrimin en kısa yolu izlediğini, tutucu ve ekonomik olduğunu kabul eden bir yaklaşımla hareket eder. Filogeniyi en iyi tahmin edecek ağacın minumum seviyede karakter değişmesi gösteren ağaç olduğu prensibiyle çalışır. Moleküler ve morfolojik veriler için kullanışlıdır. Veri seti için parismoni analizleri MacOSX v10.9.5işletim sistemine sahip bilgisayarda PAUP 4.06.10 (Swofford 2002) programında, ilk basamakta adım-adım ekleme algoritması, ikinci basamakta dal değiş tokuşu evresine dayalı TBR algoritması seçilerek gerçekleştirilmiştir.Ayrıca, tutarlılığı ölçmek için tutarlılık indeksi (Consistency Index), homoplasileri ölçmek için homoplasi indeksi (Homoplasy Index), sinapomorfilerin ağacı ne kadar iyi açıkladığını ölçen birikim indeksi (Retention Index) ve yeniden ölçeklendirilmiş birikim indeksi (Rescaled Retention Index) oluşturulan ağaçlar için hesaplanmıştır.

2.2.4.4 Bayesiyan Çıkarsamalı Analizler

Bayesiyan çıkarsamalı ve Markov Chain Monte Carlo (MCMC) temelli filogenetik analizler Mr.Bayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bayesiyan yaklaşım ardıl ya da posterior [Pr(|D)] olarak bilinen parametre değerini baz alarak çalışır. Posterior değeri MCMC örnekleme kullanarak tahmin edilir. Analiz yapılırken nükleotid değişim yapısını veren “nst” değeri için GTR algoritmasına önerilen “nst=6” değeri seçilmiştir. Analiz sırasında 5.000.000 jenerasyonda her 1000 ağaçta bir örneklem yapılmıştır.

Durağan dağılım üzerine konvergens, ayrılma frekanslarının ortalama standart sapması iki yürütme arasında 0.05 değerinin altında olup olmadığı kontrol edilerek doğrulanmıştır. Elde edilen 5000 ağaç üzerinden %50 Majority-Rule konsensüs ağaç oluşturularak tahmin edilmiştir.

2.2.4.5 Haplotipler arası ilişkilerin analizi

Haplotip çeşitliliğini belirlemek amacıyla DNAsp 5.10 (Rozas et al., 2010) programında fasta formatındaki veri seti haplotiplere paylaştırılmıştır. Veri setinden dış grup da dahil 23 haplotip elde edilmiştir. SplitsTree v4.13.11 programında haplotipler arası paylaşılan mutasyon büyüklüğüne göre ağaç inşa edilmiştir.

2.2.4.6 Farklılaşma Zamanlarının Tahmin Edilmesi

Accanthopus cinsinin genetik çeşitlenmesi ve farklılaşma zamanını tahmin etmek, tarihsel süreçlerle ilişkilendirmek amacıyla Bayesian çıkarsamalı ve MCMC yaklaşımlı bir filogenetik analiz BEAST version 1.6.1 (Drımmond and Rambaut, 2007) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mitokondri belirteci kladların ayrılma zamanlarını analiz etmek açışından oldukça güvenilirdir. Analiz aşamasında GTR + G + I mutasyon modeli altında strict clock parametresi kullanılmıştır. Veri seti, sekans çiftleri arasında milyon yılda %3.54 farklılaşma hızı ile kalibre edilmiştir. Bu mutasyon oranı Ege Adaları Tenebrionidae türlerinde mitokondriyal genom için belirlenen nesil başına mutasyon oranına göre seçilmiştir (Papadopoulau et. al., 2010). Analizler iki farklı yürütme ile gerçekleştirilmiştir. Birincisinde dış grup için yaş bilgisi girilmeden, ikincisinde ise *Pimelia* cinsinin bilinen yaş aralığı (17.26-22.49 milyon yıl) (Papadopoulou et. al., 2010) dahil edilerek yapılmıştır. Yürütmeler 50 milyon jenerasyon üzerinden gerçekleştirilmiş ve her 5.000 zincirde bir örneklem yapılarak toplamda 10.000 ağaç elde edilmiştir.Örneklenen ağaçların olasılık değerlerinin (likelihood) değerlerinin sabitlenip sabitlenmediği ve uygun posterior olasılık dağılımının oluşup oluşmadığı, Efektif Örneklem Büyüklüğü (ESS),Tracer v1.5 (Rambout and Drummond, 2009) programı yardımıyla kontrol edilerek belirlenmiştir. Örneklenen 10.000 ağaçtan %20'si ön deneme (burn-in) olarak yakılmıştır. Kalan 8.000 ağaç üzerinde maksimum klad - güvenirlilik ağacı (maximum clade - credibility tree) yine aynı program içerisinde olan TreeAnnotator programıyla elde edilmiştir.

3. BULGULAR

DNA izolasyonu, amplifikasyon, dizileme ve hizalama uygulamaları sonucu 40 bireyde mitokondriyal *cox1* gen bölgesinin konsensüs dizisi elde edilmiştir ve analizler bu diziler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sekansların tekli piklere sahip oldukları, insersiyon-delesyon bölgesi içermedikleri gözlenmiştir. 829 baz çifti uzunluğundaki dizi, amino asit ifadesine çevrildiğinde rastgele stop kodonları oluştuğu gözlenmiş, bunun için dizinin ilk sırası silinmiştir. Analizlerde 828 baz çiftlik dizi kullanılmıştır.

Mesquite v2.75 (Maddison and Madison, 2011) programında nexus formatına çevrilen 40 dizi ile DnaSP v5.10 (Rozas et. al., 2010) programında haplotip analizi yapılmıştır.23 haplotipe ayrıldıkları ve haplotip çeşitliliğinin yüksek olduğu Hd=0.919 Hd varyans=0.0012 olarak gözlenmiştir. Bireylerin hangi haplotipleri paylaştıkları EK 1'de verilmiştir. Sonuçlara göre 828 baz çifti uzunluğundaki dizilerin, 338 segregasyon bölgesi içerdiği, total mutasyon sayısının Eta=542 olduğu görülmüştür. Nükleotid farklılıklarının ortalama sayısı, k= 129.77308, nükleotid çeşitliliği, Pi= 0.15673, Theta (sekans başına) =127.42318, Theta (baz başına) = 0.15389 değerleri bulunmuştur. Sinonim ve sinonim olmayan sübstitüsyonların oranı Çizelge 3.1'de verilmiştir. 828 kodlama yapan bölgeden total kompleks nükleotid sayısı 651, analiz edilmeyen 177 bölge, kodlama yapmayan bölge sayısı 0 bulunmuştur.

Çizelge 3.1 Sinonim ve sinonim olmayan mutasyonların oranı

	Tajima's D	Not Sign. P	Total Polimorfik Bölge	Değşimler	
Kodlama Bölgeleri	0.13763	P > 0.10	206	328	
Sinonim Bölgeler	0.24909	P > 0.10	197	319	sinonim değişimler 314
Sinonim Olmayan Bölgeler	0.00827	P > 0.10	14	119	sinonim olmayan değişimler 14
Sessiz Bölgeler	0.24909	P > 0.10	197	319	sessiz değişimler 314

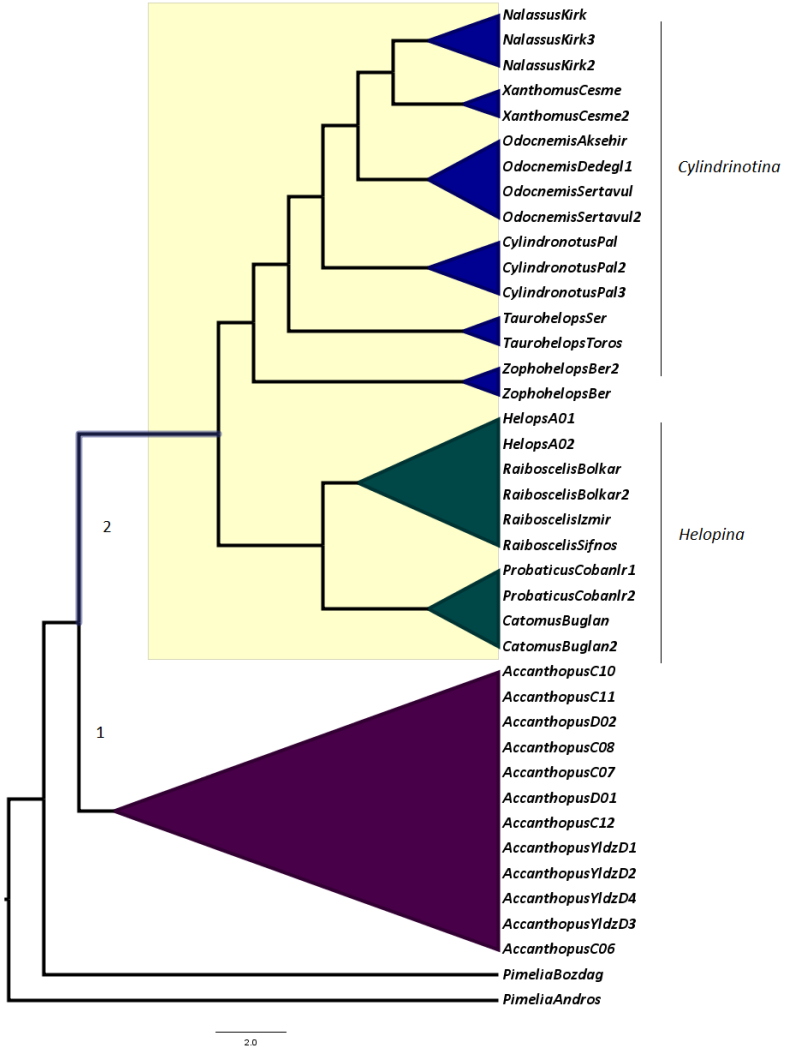
Mitokondriyal *cox1* gen bölgesi için belirlenen AIC ve BIC parametrelerinin sunduğu nst=6 parametreli GTR + G + I modeline göre transisyon/ transversiyon oranları [R(AC=6.0136), (AG=31.9315), (AT=11.4042), (CG=5.6968), (CT=121.7405), (GT=1.0000)]; denge baz frekansları A=0.3434, G=0.1130,

C=0.2401, T=0.3035; gamma şekil parametresi α= 0.8640 ve invariant şekil parametresi= 0.5300 olarak saptanmıştır.

3.1 Filogenetik analizler

MEGA6 ve R programında elde edilen genetik uzaklık tablosuna bakıldığında *Accanthopus* cinsinin diğer cinslerden % 12- 25 arasında gibi yüksek bir oranla farklılaştığı görülmektedir (EK 2).

Minumum evrim prensibiyle hareket eden komşu- bağlama (NJ) analizi ile ortaya çıkan ağaç topolojisine bakıldığında, ağacın iki ana klada ayrıldığı görülmektedir. 1 numaralı soy hattında *Accanthopus* cinsi en bazalda çıkmıştır. 2 numaralı soy hattı ise iki dala ayrılmış ve *Helops,Raiboscelis. Catomus* ve *Probaticus* cinsleri bir kladda; *Zophohelops, Taurohelops, Cylindronotus, Odocnemis, Xanthomus* ve*Nalassus* cinsleri de diğer kladda gruplanmıştır.



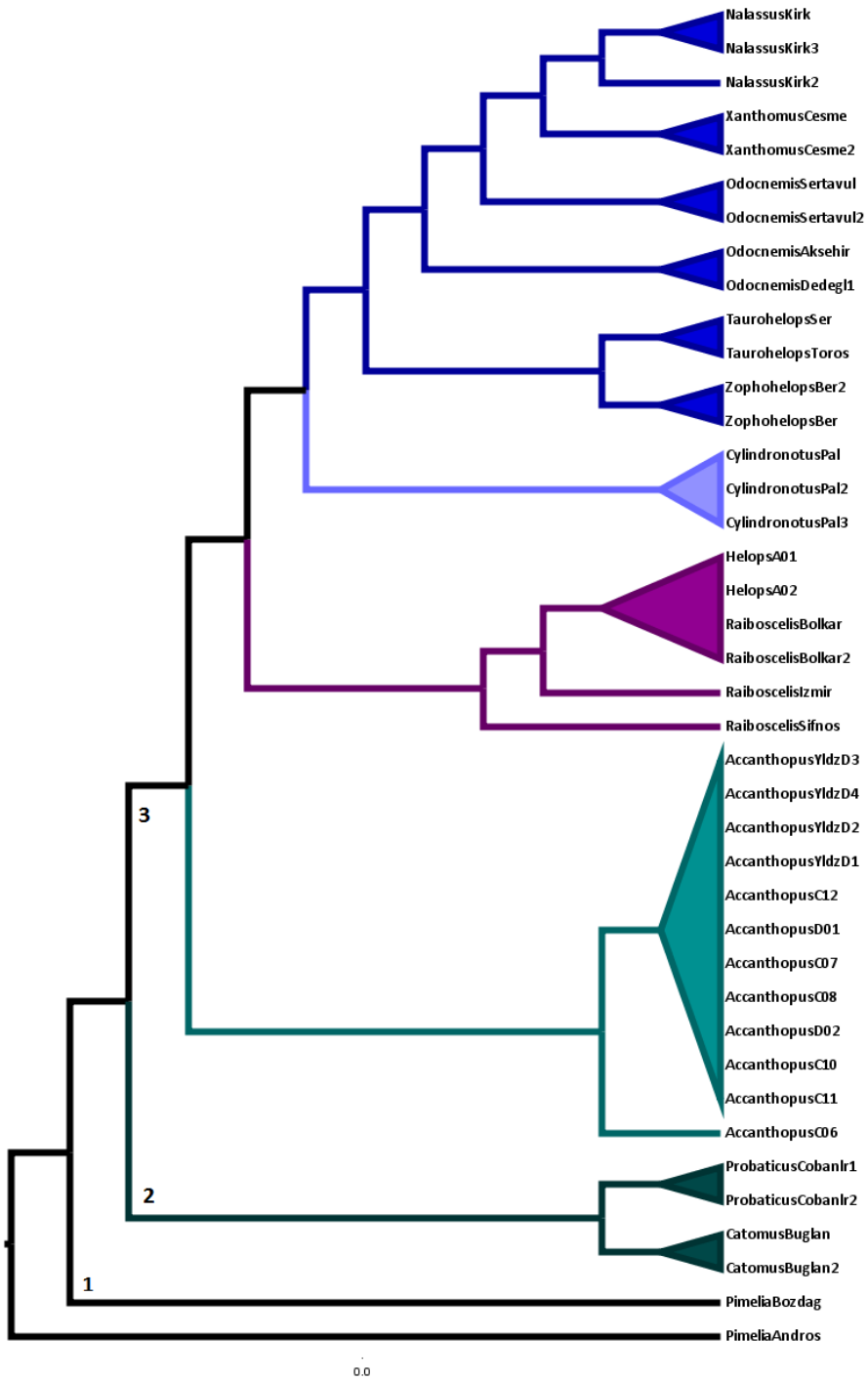
Şekil 3.1 K-2P parametresi ile PAUP programında oluşturulan komşu-bağlama (NJ) ağacı.

Maksimum parsimoni algoritması kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda 828 total karakter eşit olarak ağırlıklandırılmış ve 490 sabit karakter, 331 parsimonik bilgi verici karakter ve 7 değişken bilgi verici olmayan karakter bulunmuştur. Ağaç uzunluğu 1333 adım olarak belirlenmiş ve karakterlerin performanslarını ölçen; tutarlılık indeksi CI= 0.4066, homoplasi indeksi HI= 0.5934, sinapomorfilerin ağacı ne kadar iyi açıkladığını ölçen birikim indeksi RI= 0.7523, yeniden ölçeklendirilmiş birikim indeksi ise RC=0.3059 olarak bulunmuştur. Bu veriler ile elde edilen maksimum parsimoni (MP) ağacında 1 numaralı soy hattı dış grubu temsil etmektedir (Pimelia cinsi- Bozdağ/İzmir ve Andros Adası/Yunanistan örnekleri). Topolojiye bakıldığında iki ana klad (2 ve 3 numara) ve 3. kladın ise kendi içinde 4 soy hattına ayrıldığı görülmektedir (Şekil 3.2).

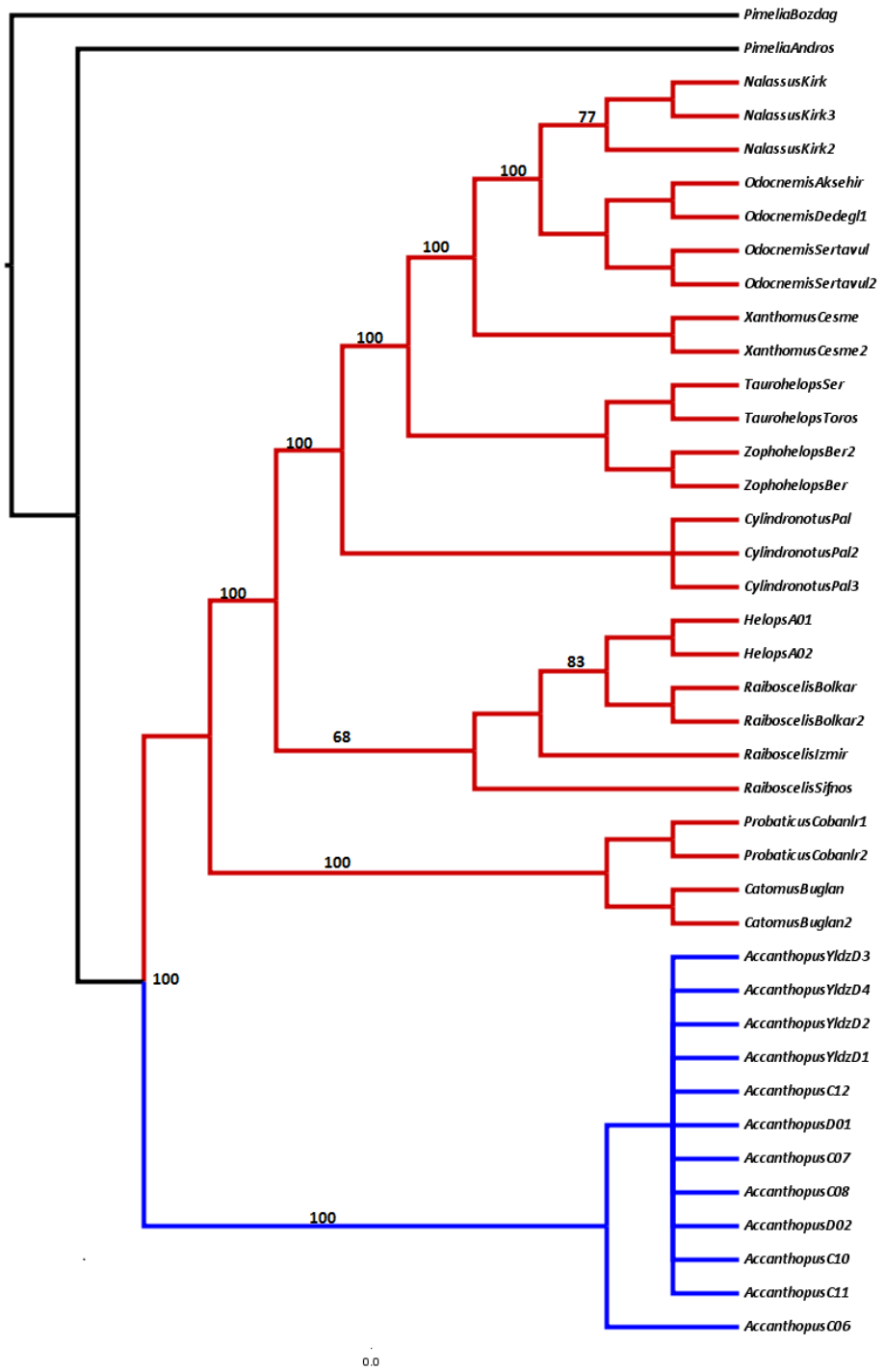
2 numaralı soy hattında *Probaticus* ve *Catomus* cinsleri Helopina alt aşiretinin diğer üyeleri olan *Helops* ve *Raiboscelis* cinslerinden oldukça uzakta olup ağacın en atasal dalı olarak ayrılmıştır. *Raiboscelis* cinsinin Sifnos Adası örneği ve İzmir ve Bolkar örneklerinden daha önce ayrılmış görülmektedir.

Maksimum olasılık analizi (Şekil 3.3) iki soy hattını 100 dal desteği ile ayırmış *Accanthopus* cinsi NJ ağacında olduğu gibi bazalda yer almıştır. Yine *Accanthopus* C06 bireyi diğer bireylerden ayrılmıştır. 2. soy hattında *Probaticus* ve *Catomus* cinsleri birlikte kladın atasal dalı olarak ayrılmıştır. *Nalassus* cinsi diğer analizlerde *Xanthomus* cinsi ile aynı dalda yer alırken ML ağacında *Odocnemis* cinsiyle birlikte yer almıştır ve dal destek değeri 100'dür.

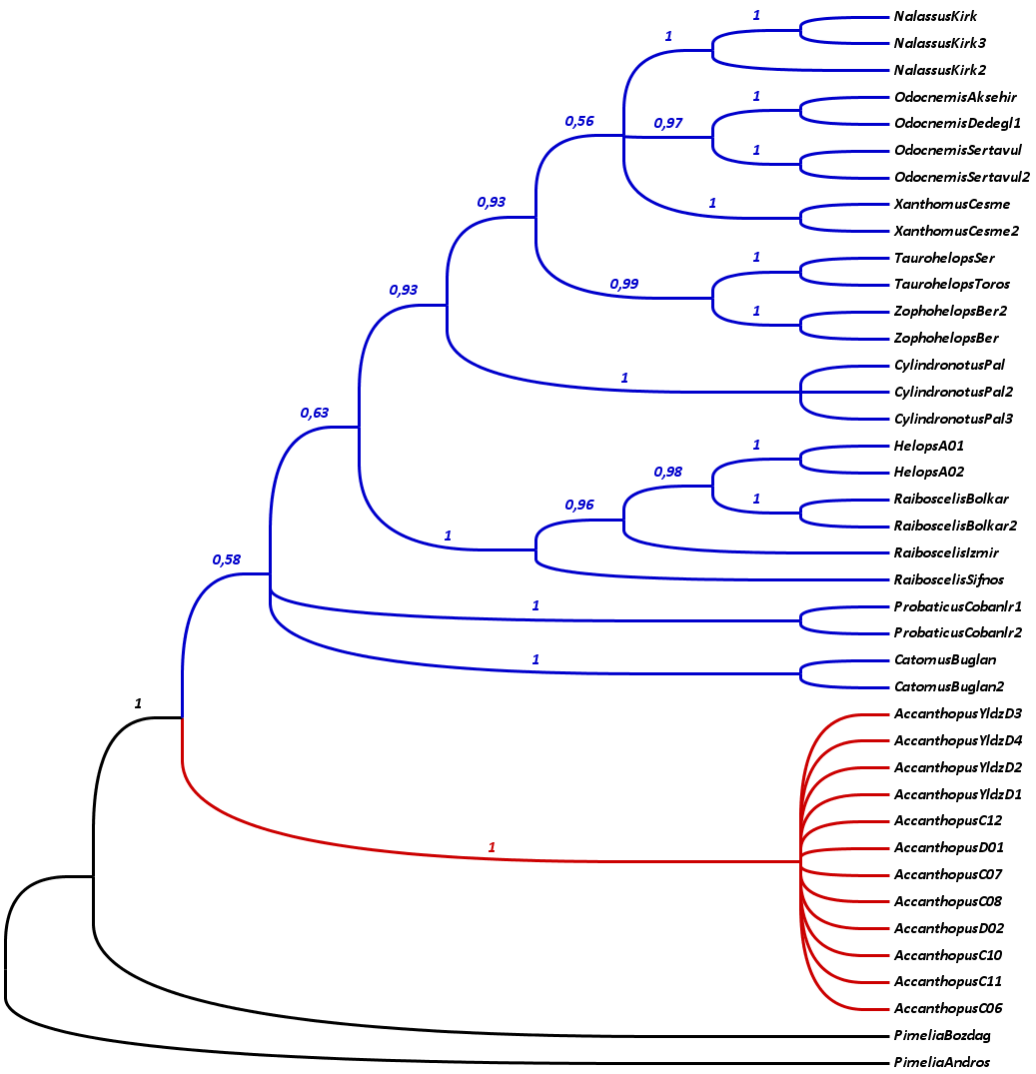
Bayesiyan yaklaşımı posterior olasılıkları test eder, elde edilen ağacın posterior olasılıkları dallar üzerinde gösterilmiştir. Bu yaklaşım diğer analizlerde olduğu gibi aşiretini iki ana soy hattına ayırmıştır. Ayrım noktalarının posterior olasılık değerleri güven aralığı içerisinde iken, 2. kladın içinde yer alan *Probaticus* cinsinin ayrım noktası ise çözümsüz kalmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.2 Maksimum parsimoni (MP) analizi ile PAUP programında elde edilen filogenetik ağaç.



Şekil 3.3 Maksimum olasılık (ML) prensibi ile PAUP programında elde edilen filogenetik ağaç.



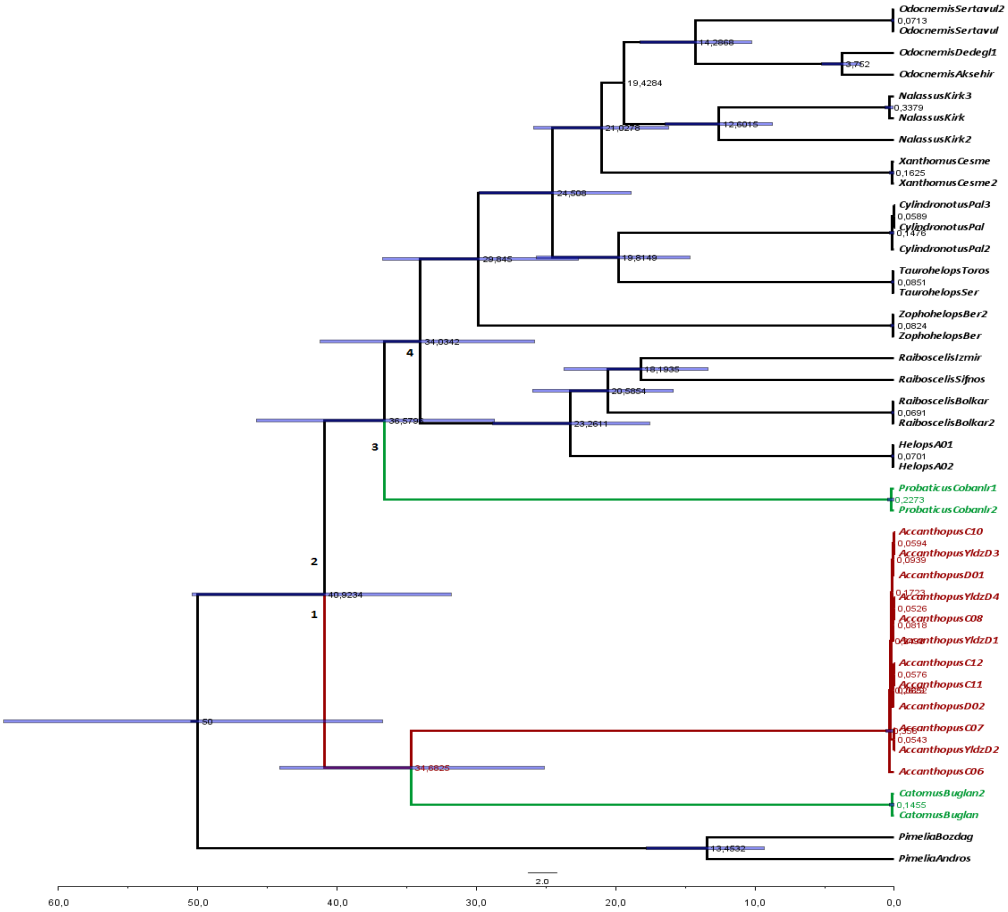
Şekil 3.4 Bayesiyan yaklaşımı ile Mr.Bayes programında elde edilen filogenetik ağaç

Farklılaşma zamanlarının tahmin edilmesi için Bayesian yaklaşımıyla yapılan analizlerde dış grup (*Pimelia*cinsinin bireyleri) için yaş bilgisi girilmeden elde edilen ağaçta; kök 50 milyon yıl öncesine dayanırken, 1 ve 2 numaralı kladın ayrımı 40 milyon yıl, *Accanthopus* ve *Catomus* cinslerinin ayrımı ise 34 milyon yıl kadar öncedir. 2 numaralı soy hattında diğer Helopini cinsleri bir arada yer almış ve 3 numara ile bu soyhattının en bazalında *Probaticus* cinsi 36 milyon yıl önce ayrılmıştır.4 numaralı soy hattında ise diğer cinslerin Helopina ve Cylindronotina alt aşiretiü ayrımı 34 milyon yıl önce gerçekleşmiştir.

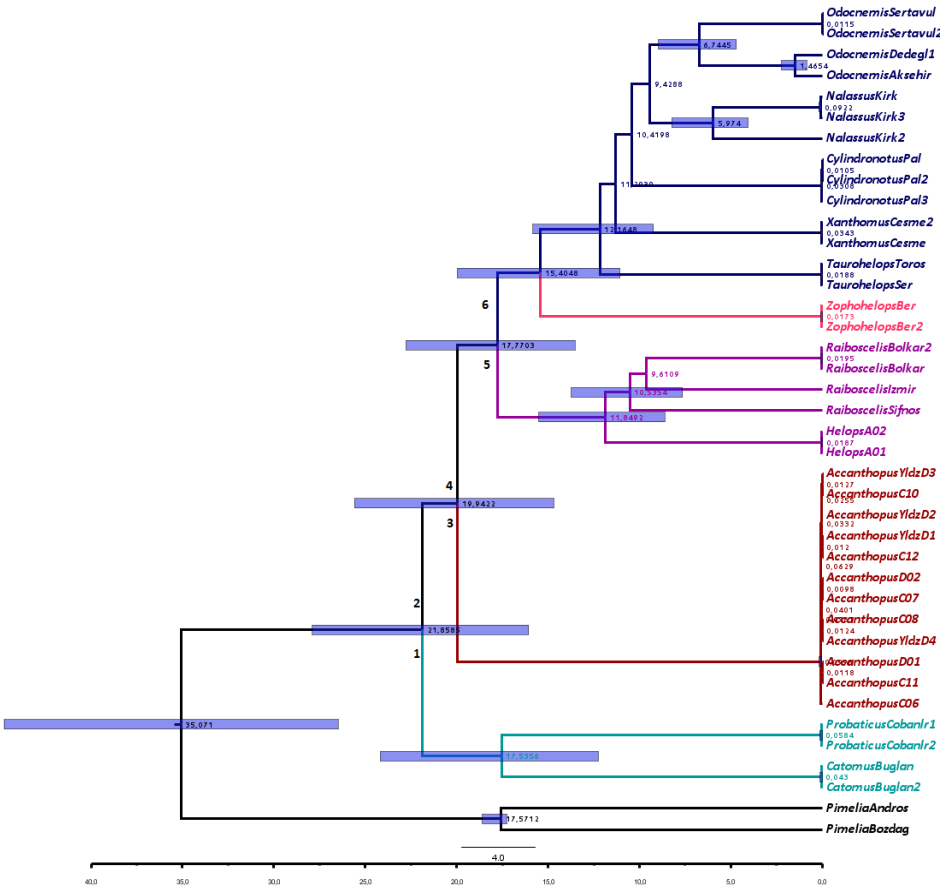
Analizin ikinci yürütmesinde dış grup olan Pimelia için Papadopoulou et. al. (2010)'a göre yaş aralığı değerlendirmeye alınmıştır ve bu testte ağacın kök yaşı 35 milyon bulunmuştur. Ağaç iki ana soy hattına ayrılmıştır ve 1. soy hattı olan *Catomus* ve *Probaticus* cinsleri yaklaşık 22 milyon yıl önce diğer cinslerden

ayrılmıştır. Diğer ana soy hattında ise en bazalda *Accanthopus* cinsi yaklaşık 20 milyon yıl önce kladın atasal cinsi olarak ayrılmıştır. 5 ve 6 numaralı soy hatlarının ayrımı ise 18 milyon yıl olarak tespit edilmiştir.

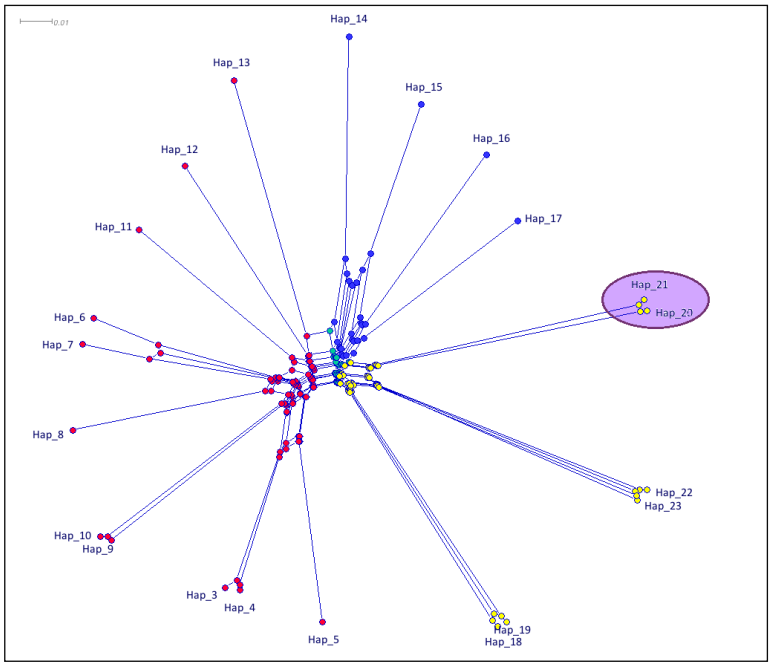
Haplotiplerin paylaştıkları mutasyonları belirlemek için SplitsTree programında elde edilen ağ, önceki analizlerde ağaçların verdiği topolojiyi destekler niteliktedir. 3 koldan oluşan haplotip ağında Hap_1 ve Hap_2 numaralı haplotipler sırasıyla *Pimelia* Bozdağ ve *Pimelia*Andros Adası örnekleri, dış grup olup analize dahil edilmemiştir. *Accanthopus* cinsinin 11 bireyi Hap_20 içerisinde iken, C06 numaralı bireyi 21. haplotipte yer almıştır. Hap_22 ve 23 *Catomus* cinsi ile Hap_18 ve 19 *Probaticus* cinsi; *Accanthopus*cinsiile beraber bir kola ayrılmıştır. Ancak bu üç haplotip ikilisi, mavi kolda yer alan Helopina üyeleri ya da pembe kolda yer alan Cylindrinotina üyeleri kadar yakın değildir.



Şekil 3.5 Yaş bilgisi girilmeden farklılaşma zamanlarını gösteren filogenetik ağaç



Şekil 3. 6 Dış grup için yaş bilgisi girilerek elde edilen filogenetik zaman ağacı



Şekil3.7 SplitsTree programında elde edilen haplotip ağı

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Helopini aşireti geniş habitat tercihleri olan taksonları içine alan bir gruptur. Aşiretin üyelerine tayga ve tundra dışında, neredeyse her türlü yer şekli ve yüksek rakımlı zonlarda rastlanır. *Odocnemis* ve *Accanthopus* cinsleri tipik ağaç formu iken, *Nalassus*ve *Probaticus* taksonları geçiş formu, *Catomus* ve *Xanthomus* cinslerine bağlı türler ise tipik yer formudur (Nabozhenko, 2007b).Çoğunluğu geceleri aktif olan bu aşiret üyelerinden *Raiboscelis* cinsi gündüz formu olmasıyla ayrılır. *Nalassus* cinsine dahil türlerin bazıları kayaların üzerinde liken ile beslenirken, bazı üyeler ağaçları yaşam alanı olarak tercih etmiştir. *Accanthopus* cinsi ise hem morfolojik farklılıkları ile hem de yaşam alanı olarak kayın ormanlarını tercih etmesi ile diğer Helopini üyelerinden ayrılır.

Bu kadar çeşitlilik sergileyen Helopini aşireti için morfolojik veriler ile yapılan sınıflandırmalar yeterli gelmemiş, farklı zamanlarda otörler tarafından alt aşiret ve cinsler farklı kategorilerle sınıflandırılmıştır (Reitter, 1922a; Nabozhenko, 2001; 2008). Son yıllarda aşiretine dahil olan*Zophohelops* Reitter, 1902, *Microdocnemis* Nabozhenko and Keskin, 2010 ve*Idahelops* Keskin and Nabozhenko, 2012 cinsleri de bu grubunun revizyonun yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Morfolojik karakterlerin, mitokondriyal *cox1* belirteci ile birlikte değerlendirilerek yapıldığı çalışmalar (Rees et. al., 2001) yol gösterici olmuştur. Moleküler filogeniyle desteklenen bir sınıflandırma sisteminin daha yararlı olacağı düşüncesinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada mitokondriyal belirteçlerden olan *cox1* geni üzerinden *Accanthopus* cinsinin yakın akrabalarıyla evrimsel ilişkileri araştırılmıştır.

Toplamda 12 cins altında 14 tür üzerinden elde edilen haplotiplerin çeşitliliğinin fazla olması, segregasyon bölgelerinin sayısının ve nükleotid çeşitliliğin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Mitokondriyal *cox1* geni tür seviyesinde çalışmalar için oldukça yeterli olsa da yüksek mutasyon hızına sahip olduğu için cins düzeyinde haplotipleri daha iyi ayırabilmek için en az bir çekirdek DNA gen bölgesi ile de (28S rRNA geni) haplotip analizleri yapılmalıdır.

Komşu- bağlama (NJ) analizi ile elde edilen ağaçta (Şekil 3.1) Cylindronatina ve Helopina alt aşiretlerine dahil olan cinsler bilinen taksonomik

sınıflandırmayı (Nabozhenko and Löbl, 2008) destekleyecek şekilde ayrılmışlardır. Burada *Accanthopus* cinsi en atasal grup olarak ayrı bir soy hattında yer almıştır.

Maksimum parsimoni analizi sonucunda 828 nükleotidin içinden 490'ı sabit karakter ve 331 tanesi de parsimonik olarak bilgi verici karakter olarak saptanmıştır. Bu bağlamda elde edilen ağaçta (Şekil 3.2) *Probaticus* ve *Catomus* cinslerinin grubun en atasal formları olarak ayrıldığını ve *Accanthopus* cinsinin de yine ayrı bir soy hattında Cylindronotina ve Helopina alt aşiretlerinden daha eski bir zamanda ayrıldığı görülmüştür. Ancak aynı analiz eşliğinde karakterlein homoplasi indeksinin, tutarlılık indeksinden yüksek çıkmış olması, parsimoni analizinin yeterliliğini tartışılır kılmıştır. İyi bir parsimonik ayrım için homoplasilerden olabildiğince uzak verilerle çalışmak gereklidir.

Maksimum olasılık analizleri sonucunda elde edilen ağaç topolojisi (Şekil 3.3) NJ analizinden elde edilen ağaç ile daha benzer topolojiye sahipken, parsimoni ağacından farklı yapılanma göstermiştir. Helopina içerisindeki *Raiboscelis* ve *Helops* cinslerinin Cylindronotina'dan % 68 seç-bağla (bootstrap) desteği ile ayrılması kladların güven aralığı içinde ayrıldığını göstermektedir. Ancak *Probaticus* ve *Catomus* cinsleri yüzde yüz destekle ayrılmış görünseler de diğer analizlerde farklı dallarda yer almaları maksimum olasılık analizinin tek başına yeterli olmadığını göstermiştir.

Bayesiyan yaklaşımı ile posterior olasılıkların test edildiği analiz sonucunda (Şekil 3.4),aşiret diğer analizlerde olduğu gibi iki ana klada ayrılmıştır. Komşu-bağlama (NJ) (Şekil 3.1), maksimum olasılık (ML) (Şekil 3.3) ve bu analizde elde edilen ağaçlar benzer topolojiyi desteklemiştir. *Accanthopus* cinsi bu ağaçta da en atasal takson olarak ayrılmıştır. Ayrım noktalarının posterior olasılıkları 0.5-1 güven aralığı içerisinde iken *Probaticus* cinsi için ayrım noktası tam belirlenememiştir.

Bir taksonun filogenisi zamansal olarak, yakın akrabaları ile ortak ata temelindeki durumunun ortaya çıkarılması demektir. Taksonların birbirinden farklılaşma zamanlarını değerlendirmek için yapılan ikili analizlerde, girilen prior değerlerine göre iki farklı zaman ağacı elde edilmiştir. Öncelikle taksonlar için her hangi bir ayırıcı bilgi girilmeden yapılan analizde ağacın kökü 50 milyon yıl öncesine dayanırken, iki ana kladın ayrımı yaklaşık 40 milyon yıl olarak elde

edilmiştir. *Accanthopus* ve *Catomus* cinsleri 34 milyon yıl öncesinde farklılaşmış görünmektedir (Şekil 3.5).

Ancak ikinci aşamada dış grup olan *Pimelia* cinsine dahil iki türün ayrılma yaşı olarak önerilmiş olan 17- 24 My (Papadopoulou et. al., 2010)kalibrasyon noktası olarak kullanıldığında, analizlerde farklı bir ağaç topolojisi ortaya çıkmıştır. Ağacın kökü 35 milyon yıl öncesini gösterirken,en atasal grup olarak *Probaticus* ve *Catomus* cinsleri ayrılmış ve *Accanthopus* cinsinin ayrım noktası 20 milyon yıl olarak bulunmuştur. *Raiboscelis* ve *Helops* cinslerinin olduğu soy hattı 17 miyon yıl öncesinde Cylindronotina olarak bilinen gruptan ayrılmıştır.Cylindronotina içindeki ayrımların daha yakın dönemler olması genç bir grup olduğunu göstermektedir.

Genel olarak analizlerin sonuçlarına bakıldığında tartışılması gereken durumları şöyle sıralanabilir;

1- *Accanthopus* cinsi tek başına ayrı bir soy hattı olarak NJ, ML ve Bayes analizlerinde en atasal takson olarak ayrılmıştır.

2-Dış grup için yaş belirtilmeden yapılan analizde *Accanthopus*cinsi, *Catomus* cinsi ile birlikte en atasal klad olarak yaklaşık 35 milyon yıl önce ayrılmıştır.

3- Dış grup olan *Pimelia* için yaş parametresi girilerek yapılan zamansal farklılaşma analizi,*Probaticus* ve *Catomus* cinslerini atasal klad olarak ayırmış ve*Accanthopus* cinsini Helopini içerisinde ancak daha yaşlı bir takson olarak vermiştir.

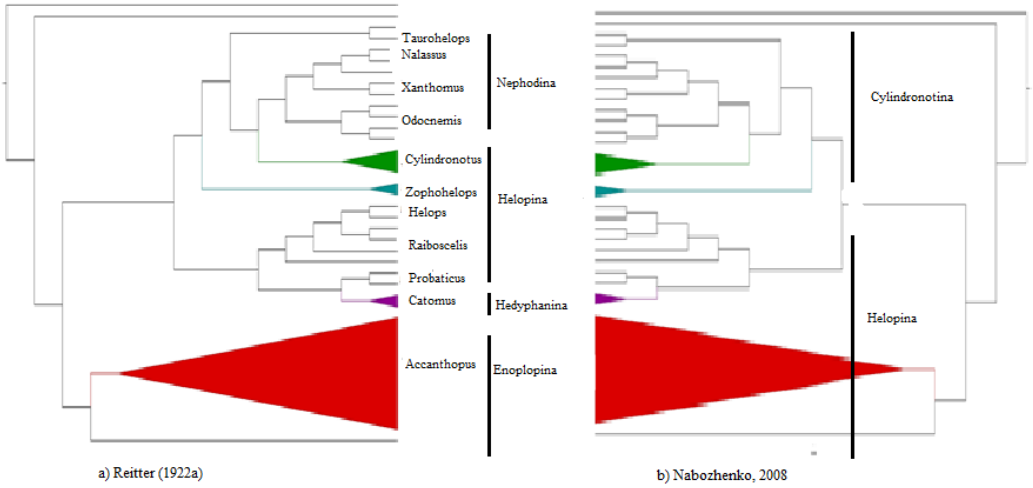
4- Moleküler veriler ve bu zamana kadar morfolojik veriler ile yapılan sınıflandırılmalar bir araya geldiğinde;

Allard (1876)'ın Helopini aşiretini iki ana divisio şeklinde ayırması elimizde olan moleküler verilerle kısmen desteklenmektedir. Ağaçlar Helopini aşiretinde iki temel gruba işaret etmektedir.

Reitter (1922a)'in bu iki divisioyu dört alt aşiret olarak ayırıp, Enoplopina alt aşireti içinde sadece *Accanthopus*(*sinonim Enoplopus*) cinsini alması ve

ayırması, cinsin tüm analizlerde atasal bir soy hattı olarak ayrılmasıyla desteklenmektedir Şekil 4.1)

Reitter (1922a)'in Helopina alt aşireti içerisine dahil ettiği, ancak son çalışmalarıyla Nabozhenko' nun (2008) Cylindronotina alt aşireti içine aldığı *Zophohelops* cinsi, elde edilen tüm filogenetik ağaçlarda Cylindronotina üyeleriyle bir arada aynı soy hattı içerisinde yer almaktadır. Bu altaşiret içinde tüm analizlerde, dalların neredeyse bütünüyle aynı şekilde korunmuş olması daha genç bir grup olmasıyla bağdaştırılabilir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Morfolojik verilere göre yapılmış sınıflandırmaların ağaç üzerinde karşılaştırılması
a) Reitter (1922a)'ya göre Helopini aşiretinin sınıflandırılması
b) Nabozhenko, 2008'e göre Helopini aşiretinin sınıflandırılması

İki zamansal farklılaşma analizinde *Accanthopus* cinsi için ayrılma zamanı yaklaşık olarak 20 - 30 milyon yıl öncesini göstermektedir. Üst Oligosen - Alt Miyosen arası döneme denk gelen bu ayrılma, cinsin türlerinin Güney Avrupa'da yayılış gösterdiği göz önünde bulundurulursa, bu dönemlerdeki iklimsel değişimler ve Alplerin yükselişi ile açıklanabilir.

Tüm bu analizler Helopini aşiretinin klasik sınıflandırılmasını büyük ölçüde desteklemektedir. Daha çok verinin kullanılacağı ayrıntılı araştırmalarda mitokondriyal DNA belirteciyle birlikte çekirdek DNA gen bölgesi ile kombine çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Allard, E.,1876, Revison des Helopides vrais de Lacordaire, L'Abeille, 14: 1-80pp.

Avise, J.C., 1994, Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York. 511p.

Bouchard,P.,Lawrence, J.F.,Davies,A.E.andNewton,A.F.,2005,Syntopic classificationoftheworlTenebrionidae (Insecta:Coleoptera)withareview of family-groupnames,AnnalesZoologici,55 (4):499 – 530pp.

Brenske E. and Reitter E. 1884, Neuer Beitrag zur Kaferfauna Griechenlands. Deutsche Entomologische Zeitschrift 28:17- 100pp.

Canpolat, D., Lillig, M. and Hasbenli, A., 2007, "Accanthopus velikensis (Piller and Mitterpacher, 1783)- new to the Turkish fauna (Coleoptera: Tenebrionidae)",Zoology in the Middle East, 42: 104-105pp.

Daniel H. Huson, 1998 , SplitsTree : Analyzing and Visualizing Evolutionary Data, Bioinformatics Applications Note, 25 : 1451–1452pp.

Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007, BEAST : Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology, 7: 214p.

Felsenstein, J., 1973, Maximum likelihood and minimum- steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. Systematic Zoology, 22: 240- 249pp.

Farris, J.S., 1973, A probability model for inferring evolutionary trees. Systematic Zoology, 22: 250- 256pp.

Grimaldi, D. and Engel, M.S.,2005, Evolution of the insects. Cambridge University Press,pp 755p.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001, Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17 :754-755pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kimura, M., 1980, A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, Journal of Molecular Evolution, 16: 111–200pp.

Larkin,M. A., Blackshields, G., Brown, N. P.,Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H.and Higgins, D. G., 2007, Clustal W and Clustal Xversion 2.0, Bioinformatics, 23: 21:2947-2948pp.

Lodos, N.,1991, Türkiye Entomolojisi 1, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova- İzmir, 130-142s.

Löbl,I.andSmetana,A.,2008,CatalogueofPalaearctic Coleoptera Volume5, ApolloBooks Stenstrup-Denmark,670 p.

Maddison, W. P. And Maddison, D. R., 2011, Mesquite : a modular system for evolutionary analysis, version 3.01, http://mesquiteproject.org

Minelli, A., and Contrafatto G., 2009,Biological Science Fundamentals and Systematics, EOLSS Publishers Co Ltd, 472p.

Nabozhenko, M. V.,2001,Taxonomic notes on the genus*Zophohelops*Reitter, 1901 with description of new species from Tadzhikistan and new genus*Pseudoprobaticus*gen. n. (Coleoptera, Tenebrionidae).*Annales Zoologici*, 51(4):113–117pp.

Nabozhenko, M.V., 2005, Interstructural correlations in evolution of darkling beetles of the tribe Helopini (Coleoptera : Tenebrionidae), *Caucasian Entomological Bulletin*, 1:37- 48pp.

Nabozhenko,M.V.,2006a, ANewspeciesoftheGenus*Odocnemis*Allard,1876 (Coleoptera,Tenebrionidae)fromTurkey,*CaucasianEntomologicalBull.*2(2): 183–185pp.

Nabozhenko,M.V.,2006b,ARevision oftheGenus*Catomus*Allard,1876and theAlliedGenera(Coleoptera,Tenebrionidae) fromtheCaucasus,Middle Asia, andChina.*EntomologicalReview*,Vol. 86, No. 9:1024–1072pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

NabozhenkoM.V.,2007a, Reviewofthesubgenus*Helopondrus*Reitter,1922of thegenus*Nalassus*Mulsant,1854(Coleoptera:Tenebrionidae)ofTurkey, *RussianEntomol*.J. 16(4):453–456pp.

NabozhenkoM.V.,2007b,Landscape-BiotopicDistributionandTrophicLinks ofTenebrionidBeetlesoftheTribeHelopini(Coleoptera,Tenebrionidae)in theCaucasus andPre-Caucasus//Studies oftheSouthern ScientificCentre oftheRussianAcademyofSciences/Editor-in-chief AcademicianofRAS G.G.Matishov.Issue3:BiodiversityandTransformation ofMountain EcosystemsofCaucasus/Scientificeditor N.V.Lebedeva.Rostov-on-Don: *SSC RAS Publishing*,242–252pp.

NabozhenkoM.V.,2008,Reviewofthe genus*Pseudoprobaticus*Nabozhenko,2001 (Coleoptera:Tenebrionidae),*AnnalesZoologici*,58(4):721-724pp.

Nabozhenko,M.V.,Bouchard,P.,Löbl,I.,2008,*Helops*Fabricius, 1775 (Insecta,Coleoptera,Tenebrionidae):ProposedConservation ofUsageby Designation of*Tenbriocaeruleus*Linnaeus,1758ontheTypeSpecies, *Bulletinof ZoologicalNomenclature*,65(1):27–30pp.

Nabozhenko, M. V. And Löbl, I., 2008, Tribe Helopini in Catologue of Palaearctic Coleoptera, Vol 5, Apollo Books Stenstrup-Denmark, 241-256pp.

Nabozhenko, M. V. and Keskin, B., 2014, New data about “nalassoid” genera from esatern Anatolia with description of new species of Zophohelops (Coleoptera : Tenebrionidae), *Acta Entomologica Musei Nationals Pragae*, 54(1): 243-249pp.

Nass, M.M., and Nass, S., 1963 İntramitochondrial Fibers with DNA characteristics. *The Journal of Cell Biology*19:593-629pp.

Papadopoulou A., Anastasiou,I., Keskin, B., Vogler, A.P., 2009, Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. Molecular Ecology, 18 :2503-2517pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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

Piller M. and Mitterpacher L. 1783 : Iterper Poseganam Slavoniae provincian mensibus Junio, et Julio MDCCLXXXII suspectum. Budae: Regiae Universitatis, 147p.

Posada, D.,Krandal K.A., 1998, Modeltest: testing the model of DNA substitution, Bioinformatics 14, 817-81pp.

Rambaut A., 2009, FigTree v1.2. Available from: http://tree.bio.ed.ac.uk/ software/ FigTree/.

Reitter,E.,1922a,BestimmungstabellederHelopinae1Wien,Ent. Zeitung39, BandHeft1-4 :1-44pp.

Rozas J., and Librado, J., 2010, DnaSP v5 a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics Applications* Note Vol. 25:1451–1452pp.

Swofford,D.L.,2002, PAUP*, PhylogeneticAnalysisUsingParsimony(andOther Methods) Version 4. SinauerAssociates,Sunderland,Massachusetts.

Trautwein MD, et al., 2012, Advances in insect phylogeny at the dawn ofthe postgenomic era. *Annu Rev Entomol*. 57:449–468pp.

Watson J.D. and Crick F.H.C., 1953, A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171: 737-738pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgier

Soyadı, adı : PEKTAŞ, Ayşe Nur

Doğum tarihi ve yeri : 30.04.1990 /ANKARA

Telefon : 0 (554) 514 42 43

e-mail : aysenur.pektas@gmail.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**
Lisans	Ege Üniversitesi/Biyoloji Bölümü
Lise	Keçiören Lisesi/ Ankara

Staj

Yıl	**Yer**
06-08/2011	Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı/ Biyoloji İhtisas Dairesi

Yabancı Dil

İngilizce

İlgi Alanları

Harmonika ve doğa yürüyüşü

EKLER

EK 1 DnaSP Programında Oluşturulan Haplotiplerin Listesi

EK 2 R Programında K80 Parametresi İle Oluşturulan Genetik Uzaklık Tablosu ve MEGA Programında Cinslerin Genetik UzaklıkTablosu

EK 1 DnaSP Programında Oluşturulan Haplotiplerin Listesi

Haplotipler	Örnekler	Yer
Haplotip 1	*Pimelia sp.*	Bozdağ
Haplotip 2	*Pimelia sp.*	Andros Adası
Haplotip 3	*Nalassus sp*	Yıldız Dağları
Haplotip 4	*Nalasuus sp.*	Yıldız Dağları
Haplotip 5	*Nalassus sp.*	Yıldız Dağları
Haplotip 6	*Odocnemis sp.*	Akşehir
Haploitp 7	*Odocnemis sp.*	Dedegöl
Haplotip 8	*Odocnemis sp*	Sertavul
Haplotip 9	*Xanthomus sp.*	Çeşme
Haplotip 10	*Xanthomus sp.*	Çeşme
Haplotip 11	*Cylindronotus sp.*	Palandöken
Haplotip 12	*Taurohelops sp.*	Sertavul, Toros
Haplotip 13	*Zophohelops sp.*	Berçelan
Haplotip 14	*Helops sp.*	Toros
Halotip 15	*Raiboscelis sp.*	Bolkar Dağları
Haplotip 16	*Raiboscelis sp.*	Sifnos Adası
Haplotip 17	*Raiboscelis sp.*	Bozdağ
Haplotip 18	*Probaticus sp.*	Çobanlar Yaylası
Haplotip 19	*Probaticus sp.*	Çobanlar Yaylası
Haplotip 20	*Accanthopus sp.*	Yıldız Dağları
Haplotip 21	*Accanthopus sp.*	Yıldız Dağları
Haplotip 22	*Catomus sp.*	Buğlan Geçidi
Haplotip 23	*Catomus sp.*	Buğlan Geçidi

EK 2R Programında K80 Parametresi İle Oluşturulan Genetik Uzaklık Tablosu ve MEGA Programında Cinslerin Genetik UzaklıkTablosu

	Pim	Pim	Nals	Nals	Nal	Odoc	Odoc	Odoc	Odoc	Xanth	Xanth	Cyin	Cylin	Cylin	Taur	Taur	Zoph	Zoph	Helo	Helo	Raibo	Raibo	Raibo	Raibo	Prob	Pptob	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Acca	Cato	Cato
Pim	0	0.120	0.234	0.229	0.228	0.210	0.209	0.219	0.219	0.228	0.230	0.209	0.209	0.209	0.207	0.207	0.227	0.227	0.243	0.243	0.220	0.220	0.220	0.205	0.231	0.231	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.233	0.235
Pim	0.120	0	0.236	0.231	0.241	0.233	0.230	0.220	0.220	0.233	0.235	0.244	0.244	0.244	0.226	0.226	0.262	0.262	0.260	0.260	0.240	0.240	0.228	0.235	0.229	0.229	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.219	0.219
Nals	0.234	0.236	0	0.004	0.120	0.151	0.155	0.141	0.141	0.142	0.144	0.152	0.152	0.152	0.165	0.165	0.179	0.179	0.207	0.207	0.197	0.197	0.194	0.160	0.189	0.189	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.222	0.221	0.207	0.205
Nals	0.229	0.231	0.004	0	0.115	0.150	0.152	0.138	0.138	0.138	0.139	0.156	0.156	0.156	0.160	0.160	0.175	0.175	0.205	0.205	0.192	0.192	0.194	0.155	0.187	0.187	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.216	0.208	0.207
Nals	0.228	0.241	0.120	0.115	0	0.170	0.167	0.163	0.163	0.168	0.170	0.171	0.171	0.171	0.174	0.174	0.184	0.184	0.213	0.213	0.201	0.201	0.196	0.165	0.195	0.195	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.218	0.217	0.214	0.212
Odoc	0.210	0.233	0.151	0.150	0.170	0	0.046	0.140	0.140	0.153	0.155	0.149	0.149	0.149	0.169	0.169	0.183	0.183	0.205	0.205	0.187	0.187	0.181	0.180	0.187	0.187	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.207	0.207
Odoc	0.209	0.230	0.155	0.152	0.167	0.046	0	0.138	0.138	0.158	0.159	0.155	0.155	0.155	0.170	0.170	0.180	0.180	0.215	0.215	0.189	0.189	0.184	0.183	0.191	0.191	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.197	0.197
Odoc	0.219	0.220	0.141	0.138	0.163	0.140	0.138	0	0	0.161	0.159	0.147	0.147	0.147	0.179	0.179	0.218	0.218	0.223	0.223	0.211	0.211	0.185	0.189	0.210	0.210	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.196	0.209	0.209
Odoc	0.219	0.220	0.141	0.138	0.163	0.140	0.138	0	0	0.161	0.159	0.147	0.147	0.147	0.179	0.179	0.218	0.218	0.223	0.223	0.211	0.211	0.185	0.189	0.210	0.210	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.196	0.209	0.209
Xanth	0.228	0.233	0.142	0.138	0.168	0.153	0.158	0.161	0.161	0	0.001	0.178	0.178	0.178	0.169	0.169	0.204	0.204	0.250	0.250	0.193	0.193	0.175	0.161	0.217	0.217	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.206	0.221	0.221
Xanth	0.230	0.235	0.144	0.139	0.170	0.155	0.159	0.159	0.159	0.001	0	0.179	0.179	0.179	0.171	0.171	0.205	0.205	0.251	0.251	0.194	0.194	0.177	0.162	0.219	0.219	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.208	0.221	0.221
Cylin	0.209	0.244	0.152	0.156	0.171	0.149	0.155	0.147	0.147	0.178	0.179	0	0	0	0.155	0.155	0.183	0.183	0.192	0.192	0.187	0.187	0.179	0.181	0.189	0.191	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.192	0.215	0.215
Cylin	0.209	0.244	0.152	0.156	0.171	0.149	0.155	0.147	0.147	0.178	0.179	0	0	0	0.155	0.155	0.183	0.183	0.192	0.192	0.187	0.187	0.179	0.181	0.189	0.191	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.192	0.215	0.215
Cylin	0.209	0.244	0.152	0.156	0.171	0.149	0.155	0.147	0.147	0.178	0.179	0	0	0	0.155	0.155	0.183	0.183	0.192	0.192	0.187	0.187	0.179	0.181	0.189	0.191	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.193	0.192	0.215	0.215
Taur	0.207	0.226	0.165	0.160	0.174	0.169	0.170	0.179	0.179	0.169	0.171	0.155	0.155	0.155	0	0	0.187	0.187	0.197	0.197	0.177	0.177	0.190	0.183	0.207	0.207	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.193	0.214	0.214
Taur	0.207	0.226	0.165	0.160	0.174	0.169	0.170	0.179	0.179	0.169	0.171	0.155	0.155	0.155	0	0	0.187	0.187	0.197	0.197	0.177	0.177	0.190	0.183	0.207	0.207	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.193	0.214	0.214
Zoph	0.227	0.262	0.179	0.175	0.184	0.183	0.180	0.218	0.218	0.204	0.205	0.183	0.183	0.183	0.187	0.187	0	0	0.210	0.210	0.209	0.209	0.214	0.213	0.231	0.231	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.214	0.242	0.243
Zoph	0.227	0.262	0.179	0.175	0.184	0.183	0.180	0.218	0.218	0.204	0.205	0.183	0.183	0.183	0.187	0.187	0	0	0.210	0.210	0.209	0.209	0.214	0.213	0.231	0.231	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.214	0.242	0.243
Helo	0.243	0.260	0.207	0.205	0.213	0.205	0.215	0.223	0.223	0.250	0.251	0.192	0.192	0.192	0.197	0.197	0.210	0.210	0	0	0.154	0.154	0.224	0.181	0.219	0.218	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.236	0.262	0.261
Helo	0.243	0.260	0.207	0.205	0.213	0.205	0.215	0.223	0.223	0.250	0.251	0.192	0.192	0.192	0.197	0.197	0.210	0.210	0	0	0.154	0.154	0.224	0.181	0.219	0.218	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.234	0.236	0.262	0.261
Raibo	0.220	0.240	0.197	0.192	0.201	0.187	0.189	0.211	0.211	0.193	0.194	0.187	0.187	0.187	0.177	0.177	0.209	0.209	0.154	0.154	0	0	0.153	0.153	0.200	0.198	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.211	0.220	0.220
Raibo	0.220	0.240	0.197	0.192	0.201	0.187	0.189	0.211	0.211	0.193	0.194	0.187	0.187	0.187	0.177	0.177	0.209	0.209	0.154	0.154	0	0	0.153	0.153	0.200	0.198	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.211	0.220	0.220
Raibo	0.220	0.228	0.194	0.194	0.196	0.181	0.184	0.185	0.185	0.175	0.177	0.179	0.179	0.179	0.190	0.190	0.214	0.214	0.224	0.224	0.153	0.153	0	0.149	0.206	0.208	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.197	0.190	0.190
Raibo	0.205	0.235	0.160	0.155	0.165	0.180	0.183	0.189	0.189	0.161	0.162	0.181	0.181	0.181	0.183	0.183	0.213	0.213	0.181	0.181	0.153	0.153	0.149	0	0.185	0.187	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.181	0.182	0.217	0.218
Prob	0.231	0.229	0.189	0.187	0.195	0.187	0.191	0.210	0.210	0.217	0.219	0.189	0.189	0.189	0.207	0.207	0.231	0.231	0.219	0.219	0.200	0.200	0.206	0.185	0	0.002	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.212	0.210
Prob	0.231	0.229	0.189	0.187	0.195	0.187	0.191	0.210	0.210	0.217	0.219	0.191	0.191	0.191	0.207	0.207	0.231	0.231	0.218	0.218	0.198	0.198	0.208	0.187	0.002	0	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220	0.212	0.210
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.222	0.217	0.218	0.214	0.214	0.198	0.198	0.208	0.209	0.193	0.193	0.193	0.194	0.194	0.213	0.213	0.234	0.234	0.213	0.213	0.198	0.181	0.220	0.220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.208	0.208
Acca	0.207	0.218	0.221	0.216	0.217	0.214	0.214	0.196	0.196	0.206	0.208	0.192	0.192	0.192	0.193	0.193	0.214	0.214	0.236	0.236	0.211	0.211	0.197	0.182	0.220	0.220	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0	0.208	0.208
Cato	0.233	0.219	0.207	0.208	0.214	0.207	0.197	0.209	0.209	0.221	0.221	0.215	0.215	0.215	0.214	0.214	0.242	0.242	0.262	0.262	0.220	0.220	0.190	0.217	0.212	0.212	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0	0.001	
Cato	0.235	0.219	0.205	0.207	0.212	0.207	0.197	0.209	0.209	0.221	0.221	0.215	0.215	0.215	0.214	0.214	0.243	0.243	0.261	0.261	0.220	0.220	0.190	0.218	0.210	0.210	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.208	0.001	0

MEGA 6 distance		
Cato	Acca	0.179
Zoph	Acca	0.184
Xanth	Acca	0.180
Taur	Acca	0.169
Raibo	Acca	0.118
Prob	Acca	0.187
Pim	Acca	0.129
Odoc	Acca	0.132
Nals	Acca	0.151
Helo	Acca	0.199
Cylin	Acca	0.168