

COI ve ITS 1-2 Gen Bölgeleri İle *Prosimulium rachiliense* Djafarov, 1954 (Diptera: Simuliidae) Türü Türkiye Populasyonlarının Genetik Çeşitliliklerinin Araştırılması

Büşra Aslan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2021

Research on Genetic Diversity of *Prosimulium racihiliense* Djafarov, 1954 (Diptera:
Simuliidae) Populations in Turkey with COI and ITS 1-2

Büşra Aslan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

June 2021

COI ve ITS 1-2 Gen Bölgeleri İle *Prosimulium rachiliense* Djafarov, 1954 (Diptera: Simuliidae) Türü Türkiye Populasyonlarının Genetik Çeşitliliklerinin Araştırılması

Büşra Aslan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. D. Ümit Şirin

Bu Tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2019/19A129 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Haziran 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Davut Ümit Şirin danışmanlığında hazırlamış olduğum Türkiye “COI ve ITS 1-2 Gen Bölgeleri İle *Prosimulium rachiliense* Djafarov, 1954 (Diptera: Simuliidae) Türü Türkiye Populasyonlarının Genetik Çeşitliliklerinin Araştırılması” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 15/06/2021

Büşra Aslan

İmza

ÖZET

Bu çalışmada Balkanlar, Anadolu, Kafkaslar ve Kuzey Afrika'da yayılış gösteren *Prosimulium rachiliense* türünün Anadolu populasyonlarının filogenileri ve taksonomik durumları COI, ITS 1 ve 2 gen bölgeleri kullanılarak araştırılmıştır.

2011- 2019 yılları arasında Anadolu'daki 43 farklı lokaliten toplanan bireyler 8 farklı populusyona ayrılarak değerlendirilmiştir. Toplam 125 bireyden total DNA elde edilmiştir. Gen bölgelerinin çoğaltılması ve Sanger sekanslama sonrasında veri setleri oluşturulmuş ve maksimum parsimoni, maksimum olasılık, Bayesian filogeni, Haplotip ağı analizleri, moleküler saat analizi ve genetik çeşitlilik analizleri uygulanmıştır.

Çalışma sonucunda; COI gen bölgesinin populasyonlar arası ilişkiyi ITS1-2 gen bölgesinden daha iyi çözümlendiği görülmüştür. Elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde *P. rachiliense* türü Anadolu populasyonlarının zengin bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir. Yapılan filogenetik analizler ve haplotip ağı analizleri sonucunda türün Anadolu populasyonlarının genetik çeşitlilik merkezinin Batı Akdeniz olduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte türün filocoğrafik yayılış örüntüsünün belirlenebilmesi için diğer ülke populasyonları örnekleri ve daha fazla gen bölgesi ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Prosimulium rachiliense*, COI, ITS 1-2, Filogeni, Simuliidae

SUMMARY

In the study, the Anatolian populations, phylogeny and taxonomic status of *Prosimulium rachiliense* which is prevalent in Anatolia, North Africa, Balkans and Caucasians have been examined by using COI, ITS 1 and 2 gene regions.

From 2011 to 2019, specimens collected from 43 different locations of Anatolia have been evaluated by being divided into 8 distinct populations. Total DNA have been obtained from 125 individuals. Data sets have been formed after replication of gene regions and Sanger sequencing, and Maximum Parsimony, Bayesian Phylogeny, Maximum Likelihood, the analysis of Haplotype Network, Molecular Clock Analysis and genetic diversity have been applied.

As a result of the study, it has been observed that COI gene region has reached a better conclusion for the relationship between populations than ITS1-2 gene region. When all the data have been evaluated, it has been observed that the *P. rachiliense* species has a great genetic diversity in Anatolian populations. As a result of phylogenetic analysis and haplotype analysis, it has been determined that the genetic diversity center of the Anatolian populations of the species is Western-Mediterranean.

In addition, it has been thought that new experiments carried out with the samples of the populations of other countries and more gene regions are needed to be able to determine the phylogeographic prevalence of the species.

Keywords: *Prosimulium rachiliense*, COI, ITS 1-2, Phylogeny, Simuliidae

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEORİK BİLGİ VE LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.2. Total Dna İzolasyonu	24
3.3. . DNA'nın Nanodrop ile Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini	25
3.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	25
3.5. Jel Elektroforez	28
3.6. Dizi Analizleri	29
3.7. Verilerin Analizi	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4. 1. Morfotaksonomik Bulgular	32
4.2. COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Bulguları	35
4.3. COI gen bölgesi için elde edilen genetik çeşitlilik bulguları	51
4.4. ITS1- ITS2 Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Bulguları	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR DİZİNİ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışmada değerlendirilen populasyon dağılımı	16
3.2. COI gen bölgesine ait PZR elde edilen ürünlerin jel elektroforezde örnek görüntüsü. 28	
3.3. ITS 1-2 gen bölgesine ait PZR'den elde edilen ürünlerin jel elektroforezde örnek görüntüsü	29
4.1. <i>Prosimulium rachiliense</i> türünün larva ve pupa görüntüleri A.Solunum flamenti, B.Pupa, C.Larva dorsal, D.Larva lateral, E.Larva kafakapsülü dorsal, F.Larva kafa kapsülü ventral.....	34
4.2. <i>P. rachiliense</i> COI haplotiplerinin 90 haplotip veri seti ile oluşturulan BI filogenetik ağacı (ML ve MP analizideğerleri ve tür sınırları belirleme testleri sonuçları ağaç üzerinde verilmiştir)	39
4.3. Filogenetik analizlerin 4 ana filogrup olarak değerlendirilmesi.....	42
4.4. COI gen bölgesi filogeneti analizleri sonucu elde edilen filogrupların Türkiye haritası üzerinde coğrafik konumlanmaları ve Toros yolu rotası.....	43
4.5. COI Haplotip ağı analizi sonucu (Network programı)	45
4.6. COI Network analizi sonucu haplotiplerin ayrıntılı görüntüleri.....	46
4.7. COI gen bölgesi veri haplotiplerinin BEAST kronogramı ve jeolojik devirler cetveli.....	51
4.8. <i>P. rachiliense</i> ITS 1-2 veri seti ile oluşturulan MO filogenetik ağacı (tür sınırları belirleme testleri sonuçları ağaç üzerinde verilmiştir)	56
4.9. ITS 1-2 veri seti Allel ağı analizi sonucu (Network programı).....	57
4.10. ITS 1-2 veri seti Allel ağı analizi sonucu (SplitsTree programı)	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur).	17
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hazırlanan solüsyonlar ve kullanım miktarları	26
3.3. Çalışılan gen bölgelerinde kullanılan primer dizimleri	26
3.4. COI için PZR reaksiyon basamakları	27
3.5. ITS1-2 için PZR reaksiyon basamakları	27
4.1. Çalışmada uygulanan filogenetik analizler.....	32
4.2. <i>Prosimulium rachiliense</i> türüne ait 90 haplotipin frekansı ve kodları	35
4.3. COI veri seti ile hesaplanan genetik çeşitlilik indeksleri ve nötralite testleri sonuçları (SU=sekans uzunluğu;N=toplam sekans sayısı; HS=Haplotip sayısı;DB=değişken bölge sayısı; π =nükleotid çeşitliliği;HÇ=Haplotip çeşitliliği; Fs= Fu'nunFs'si D=Tajima' Tajima'nın D'si;)	52
4.4. <i>Prosimulium rachiliense</i> türüne ait ITS1-2 gen bölgesi 25 allelin frekansı ve kodları	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

π

%

° C

D

N

Açıklamalar

Pi

Yüzde

Santigrat Derece

Tajima test istatistik değeri

Populasyon sayısı

Kısaltmalar

ABGD

AIC

ATP

Bç

BEAST

BEAUti

BI

BLAST

COI

Cyt

dH₂O

Dk

dNTP

DNA

EtBr

Fst

Açıklama

Automatic Barcode Gap Discovery

Akaike Information Criterion

Adenozin trifosfat

Baz çifti

Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees

Bayesian Evolutionary Analysis Utility

Bayesian Inference

Basic Local Alignment Search Tool

Sitokrom oksidaz alt ünite I

Cytoform

Distile su

Dakika

Deoksiribonükleotit Trifosfat

Deoksiribo Nükleik Asit

Etidyum Bromid

Populasyonlar arası genetik farklılaşma

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

	Global Positioning System Küresel Konumlandırma Sistemi
GPS	Sistemi
GTR	General Time Reversible
ITS	Internal transcribed spacer
Kb	Kilobaz
lnL	Log-likelihood
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
MO	Maksimum Olasılık
MP	Maksimum Parsimoni
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
M	Metre
µl	Mikrolitre
Myö	Milyon yıl önce
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Ng	Nanogram
	National Center for Biotechnology Information veritabanı
NCBI	
PAUP	Pylogenetic Analysis Using Parsimony Program
pH	Power of hydrogen (hidrojenin gücü)
pmol/ul	Picomol per microlitre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
RNase	Ribonükleaz
Sn	Saniye
Sp	Species

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
UV	Ultra Viole



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyolojik çeşitlilik kavramı içerisinde birden fazla tanımı barındırmaktadır. Kısaca tür ve türler arası genetik, ekolojik ve ekosistemler arası çeşitlilikleri ele alan, canlı organizmaların çeşitliliği olarak tanımlanmaktadır (Başbüyük vd., 2013).

Ülkemiz biyoçeşitlilik konusunda oldukça zengin bir ülkedir. Dünya üzerindeki 36 biyoçeşitlilik merkezinden üçünü (Kafkas, İran-Anadolu ve Akdeniz) barındıran Anadolu, kendine özgü eşsiz biyoçeşitliliği ile bir kıta özelliği göstermektedir (Gür, 2017 ve Şekercioğlu vd., 2011). Anadolu coğrafik lokasyonu, heterojen topografyası ve iklimsel koşullarındaki değişikliklere ek olarak karmaşık paleocoğrafik tarihi ile de bu çeşitliliğe katkı sağlamaktadır (Altun vd., 2018). Bununla birlikte biyolojik zenginliklerimizi önemli ölçüde keşfetmemiş olmamız, bu alandaki araştırmaların artması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Biyolojik çeşitliliğin keşfine yönelik olarak yapılan çalışmalarda çoğunlukla morfolojik karakterlere dayalı verilerin kullanıldığı sistematik araştırmalar oldukça önemli bir yere sahiptir (Çıplak, 2004). Ancak morfolojik analizler doğadaki canlı çeşitliliğini belirlemede her zaman yeterli olmayabilir. Fenotipin oluşmasında etkin olan çevresel ve kalıtsal varyasyonlar türler teşhis edilirken zaman zaman hatalı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Son yıllarda moleküler biyoloji ve moleküler genetik alanında oluşan bilgi birikimi taksonomik ve sistematik araştırmaları da olumlu yönde etkilemiş ve DNA temelli filogenetik araştırmaların yapılmasına da öncü olmuştur. Filogenetik araştırmalarda DNA tabanlı analizlerin yapılması popülasyonlar, bireyler ve taksonlar arası bağlantıların kurulmasında ve çeşitliliğin belirlenmesinde fayda sağlamıştır (Cruickshank, 2002).

Biyçeşitliliğin saptanması bu çeşitliliğe neden olan mekanizmaların ve çeşitlenme süreçlerinin açıklanması ile mümkündür. Bir türün ya da soy hattının milyonlarca yıl süren evrimini anlayabilmek ve çıkarsamalar yapabilmek için nesiller boyunca popülasyonların gen havuzlarındaki değişimleri izlemek ve bu değişimin sonuçlarını açıklayabilmek gerekir (Kaya 2015).

Populasyonlar homojen birlikler değildir. Populasyonların genetik yapılanmasında gözlenen farklılaşmalar, yayılış alanındaki tarihsel ve güncel dinamiklerin yanı sıra hem populasyonların evrimsel hikâyesi, hem de alanın jeolojik tarihi ile ilişkilendirilebilir. Populasyonu oluşturan bireyler arasında görülen genetik ve fenotipik varyasyonlar populasyonların evrimsel geçmişini anlamada kullanabileceğimiz araçlardır (Kaya, 2015).

Populasyon genetiği, bireylerin genetik farklılıklarını kullanarak türün gen havuzunun evrimini açıklamaya çalışır. Bunun için genetik verilerin iyi matematiksel modellemelerle analiz edilebilmesi gerekir. Bir başka deyişle populasyon genetiği, populasyonların genetik yapısının zamana ve yere bağlı değişimlerini inceler. Populasyon içi veya arası genetik çeşitliliği ölçmek adına kullanılan matematiksel modellerin uygulanması ve filogenetik analizler günümüzde bilgisayar programları ile yapılabilmektedir. Bu analizlerden alınan veriler ışığında nesiller boyunca oluşan değişimleri ortaya koymak ve açıklayıcı modeller geliştirmek mümkün olabilmektedir. Sonuç olarak populasyonların genetik kompozisyonunun çok yönlü analiz edilebilmesi populasyonun tarihsel değişimi, akrabalık ilişkileri ve yayılış rotaları hakkında bilgiler sağlar (Kaya, 2015).

Filocoğrafya, akrabalık ilişkisi olan türlerin arasındaki veya sadece bir tür içerisindeki soy bağlantılarının coğrafi açıdan genetiksel dağılımlarını incelemektedir (Perktaş, 2017). Filocoğrafya pek çok disiplini ve yöntemi araç olarak kullanır. Moleküler yöntemlerin yanı sıra çoğunlukla istatistiksel yöntemlerle birlikte, paleontoloji, jeoloji, populasyon ekolojisi ve populasyon genetiğine kadar geniş disiplinlerden elde edilen verileri değerlendirir (Knowles, 2009).

Türleşme bir anda oluşan bir durum değildir. Zamanla meydana gelen küçük genetik değişimlerin kademeli birikmesiyle gerçekleşir. Dolayısıyla fenotip çevre ve genlerin etkileşimi sonucunda oluşmaktadır. Bu sürecin detaylı bir şekilde anlaşılması için morfolojik karakterlerin yeterli olmayacağı ve bunlarla birlikte moleküler yöntemlerin kullanılması gereği ortaya çıkmıştır (Howard ve Berlocher, 1998).

Türlere özgü DNA'yı ortaya koyan DNA barkodlama yöntemi, temelde basit bir prensiple çalışmaktadır. Bu prensip, bireylerin DNA dizileri arasındaki farklılıklarının canlıların tür düzeyinde ayrımlarını sağlayacak belirteçler olarak kullanılabilmesini ön görür. DNA barkodlamayı diğer yöntemlerden ayıran ana özellik tek bir gen bölgesi kullanılarak bütün canlıları türlerine yönelik evrensel bir biyolojik tanımlama prensibinin olmasıdır (Keskin ve Atar, 2013).

Canlı taksonları arasındaki biyolojik çeşitlilik ve evrimsel ilişkinin ortaya çıkarılmasında kullanılan araçlar ve uygulamalar biyolojinin iki önemli dalı olan moleküler filogenetik ve popülasyon genetiği disiplinlerince geliştirilmiştir. Moleküler filogenetik canlı grupları arasındaki evrimsel ilişkileri açığa çıkarmayı, popülasyon genetiği ise tek bir türün kendi içindeki ve farklı popülasyonları arasındaki varyasyonları belirlemeyi hedef alır. (Keskin ve Atar, 2013).

DNA barkodlamada en çok kullanılan gen bölgeleri, nükleer DNA olan ITS (internal transcribed spacer) ve mitokondriyal DNA olan COI 'dir (cytochrome c oxidase subunit 1). Ayrıca COI tür tanımlamasında oldukça etkilidir. COI geninin herkes tarafından kabul edilmiş barkod geni olarak seçilmesindeki sebep, türler arasındaki göstermiş olduğu belirgin farkın yanı sıra tür içerisinde ve türler arasındaki uzaklığın çakışmadığı tipik bir varyasyon modeli olmasıdır. (Keskin ve Atar, 2013).

Coğrafik olarak geniş yayılım gösteren farklı türlerin, türler arası ve tür içi genetik varyasyonlarını da içeren birçok çalışma sonucunda elde edilmiş birbirleriyle tutarlı veri setleri, COI geninin barkodlama çalışmasında kullanıldığında saptanmış belirteç kabul görmesinde rol oynamıştır. COI geninin standart belirteç olarak kabul edilmesi sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank ve BOLD (Barcode of Life Data Systems) gibi geniş, herkese açık veri tabanlarına da belirgin bir şekilde yansımıştır (Keskin ve Atar, 2013).

Simuliidae familyası bireyleri, Nematocera (Diptera) alt takımının üyesidir. Dünyada 'Blackflies' olarak bilinen bu hayvanlara Anadolu'da 'Kör sinek, Üvez sinekleri ya da Tatarcık sinekleri'' denilmektedir. (Şirin, 2001).

Simuliidae familyasının 2384 aktüel ve 17 fosil türü bilinmektedir (Adler, 2021). Simuliidae familyası kutuplar dışında bütün Dünya'da büyük yayılışa sahiptir ve larva, pupa evrelerinde akarsularda yaşarlar. Türkiye akarsu havzalarının nerdeyse çoğunda yayılış gösterdiği bilinmektedir (Başören ve Kazancı, 2016).

Alt takımının diğer üyeleri aksine bu familya türleri tıknaz vücutları, vücuda göre geniş kanat yapıları ve güçlü bacakları ile kolaylıkla ayırt edilirler (Adler vd., 2004). Çoğu türün ergin dişileri kan emmek patojenleri taşımaları nedeniyle medikal ve veterinerlik açısından önemli biyolojik vektörlerdir. Sucul evreleri ise akarsu ekosistemlerinin önemli bir bileşenidir. (Crosskey, 1990).

Simuliidae larvası lotik ekosistemde önemli bir görev üstlenmektedir. Akarsu sisteminde asılı kalan tortuları filtre edip parçalar halinde dibe çökmesine engel olarak sistemdeki madde döngüsüne katkı sağlamaktadır. Familya türleri oksijen türlerinin oksijen toleranslarının hasas olması dolayısıyla bu hayvanlarda su kirliliği araştırmalarında yararlanılmaktadır. (Malmqvist vd., 2004).

Kriptik tür ya da gizli tür tanımları, farklı oldukları bilinmesine karşın morfolojik özelliklerine bakılarak ayırt etmenin güç olduğu türler için kullanılır. Bu türlerin yaygın olduğu canlı grupları ile yapılan taksonomik araştırmalarda morfolojik karakterlerin kullanımı yeterli olamayacağı için, sitotaksonomi, DNA barkodlama gibi filogenetik analizler için daha elverişli yöntemlerden yararlanılır (Adler vd., 2004).

Simuliidae, diğer birçok Diptera familyalarına kıyasla, altcins, tür gurubu ve tür düzeyinde taksonların ayrımında problemlere neden olacak kadar morfolojik olarak konservatif bir yapı göstermektedir (Crosskey, 1990). Familya içerisindeki çok sayıdaki ikiz türün ayrımında larva politen kromozomlarının analizi ile tür sınırlarının belirlenmesi bilinen en güvenilir yöntemlerden bir tanesidir. Bu sitotaksonomik yöntemde türlerin sahip olduğu karakteristik inversiyonlar üreme izolasyonunun olup olmadığını test etme imkanı sunar. Bununla birlikte politen kromozomların normalde sadece geç instar larvalarda analiz için uygun yapıda olması diğer yaşam evrelerinin tanımlanmasında sorunlara yol açar. Bu nedenle, DNA barkodlama gibi moleküler yöntemlerin uygulanması Simuliidae taksonomisinde büyük önem taşır. Son yıllarda sayısı giderek artan familya türleri üzerine

DNA barkodlama yöntemi ile yapılan çalışmalarda, DNA barkodlarının tür kompleksleri içerisindeki morfolojik olarak farklı türleri yaklaşık %100' oranında ayırt ettiği gösterilmiştir (Hernandez-Triana vd., 2012).

Prosimulium cinsi tanımlanmış 80 nominal türü ile Simuliidae familyasının ikinci büyük cinsidir. Cinsin “*hirtipes*” tür gurubu Palearktik Bölge’de 30 tür ile temsil edilmektedir (Adler, 2020). Tez çalışmasında hedef organizma olan *Prosimulium rachiliense* Djafarov, 1954 türü bu tür gurubunun üyesidir. Tür gurubunun ülkemizden bilinen 4 türü daha vardır (Adler, 2021). Bu türler içerisinde *P. rachiliense* Anadolu’da en geniş yayılış alanına sahip olan türdür (Başören ve Kazancı, 2016). Bununla birlikte *P. rachiliense* türü ülkemizden kayıtları genellikle larval ve pupal özelliklerine dayalı olarak verilmiş olan *Prosimulium rufipes* (Meigen, 1830) ve *Prosimulium fulvipes* (Edwards, 1921) türleri ile özellikle aquatik evrelerde büyük ölçüde morfolojik benzerlik göstermektedir (Adler ve Şirin, 2014).

Adler ve Şirin (2014), *P. rachiliense*'nin Batı Anadolu populasyonları ile Ermenistan populasyonlarına ait bireylerin politen kromozomlarını karşılaştırmışlardır. Çalışmada Ermenistan populasyonu ile Batı Anadolu populasyonlarının belirgin şekilde sitotaksonomik farklılıklara sahip olduklarını belirlenmiştir. İki ülke populasyonları arasında politen kromozomlarda bariz olarak görülen farklı inversiyonlara dikkat çeken yazarlar, bu populasyonlar arasında üreme izolasyonunun var olup olmadığının test edilmesi gerektiğini önermişler ve türün Ermenistan’da yayılış gösteren populasyonları için "Sitoform A" ve Batı Anadolu populasyonları için ise "Sitoform B" tanımlamalarını yapmışlardır. Fidan ve Şirin (2017) ise bu türün İç-Batı Anadolu, Ege ve Batı Akdeniz populasyonlarına ait az sayıdaki bireyle sadece tek bir gen bölgesi (COI) ile genetik karşılaştırmasını yapmışlardır. Bu çalışmada özellikle İç Batı Anadolu ve Batı Akdeniz populasyonları arasında coğrafi yakınlığa karşın anlamlı sayılabilecek bir genetik çeşitlilik olduğu sonucuna varılmıştır. *Hirtipes* tür gurubu ülkemiz temsilcilerinin taksonomik statüsünü belirlemek için özellikle DNA temelli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada *Prosimulium rachiliense* türünün ülkemizin farklı coğrafik bölgelerindeki populasyonlarından elde edilmiş örneklerden izole edilen iki farklı gen bölgesi (COI ve ITS1-2) çalışılmış olup tezin ana amaçları kısaca şu şekilde belirlenmiştir:

- i Türün Türkiye populasyonlarının genetik çeşitliliğini ortaya koymak
- ii Anadolu'daki filogenetik ve filocoğrafik yapılanmasını belirlemek
- iii Türün olası farklı soyhatlarını ve ayrışma zamanlarını belirlemek
- iv Türkiye ve Palearktik faunası ile ilgili bilgilere katkıda bulunmak
- v Anadolu fauna tarihi bilgilerine katkı sağlamak
- vi Gen Bankalarına ülkemiz Simuliidae türlerine ait veri kazandırmak



2. TEORİK BİLGİ VE LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Arazisi ve iklimsel yapısı bakımından çok kısa mesafelerde oldukça farklı derecelerde değişken ana kara özelliği gösteren, birçok türün anayurdu olan ve özellikle geçmişteki jeolojik ve iklimsel değişikliklerden etkilenen canlılara sığınak olan ülkemiz, dünyadaki herhangi bir kara parçasından daha fazla biyolojik öneme sahiptir (Demirsoy, 1999).

Anadolu aynı zamanda bulunduğu coğrafya ve topoğrafyasıyla pek çok melezleşme durumuyla karşılaşma da gözlenen bir bölgedir. Buzul dönemde sığınak olarak kullanılmış olan bölgelerin olması Anadolu'yu biyocoğrafya açısından daha önemli duruma getirmektedir (Bilgin, 2011).

Günümüzde moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerde kullanılan teknikler canlılarla ilgili tüm araştırmalarda olduğu gibi biyoçeşitlilik çalışmalarında da özellikle çok yönlü kullanılacak verilerin elde edilmesini kolaylaştırmıştır. Geleneksel fauna araştırmalarının ortaya koyduğu ana çıktı olan tür listelerinin kullanılabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle biyolojik çeşitliliğin genetik, türler arası ve evrimsel boyutuyla anlaşılmasında yeterli bilgiyi sunmaz. Oysa DNA temelli bilginin filogenetik yöntemlerle analizi biyoçeşitliliğin çok yönlü tanımını çeşitliliğin kökenini ve nasıl oluştuğunu oluşum süreciyle ilgili olayları ve bugünkü durumunu anlamamızı sağlar. Milyonlarca yıldır süre gelen Dünya üzerindeki jeomorfolojik ve iklimsel değişimler sonucunda farklı yaşam alanları şekillenmiş ve yaşam çeşitliliği ortaya çıkmıştır. Farklı coğrafyalarda yaşayan türlerden elde edilen DNA dizileri arasındaki ilişkilerin coğrafik dağılımları açıklamada kullanılması olarak tanımlanabilecek filocoğrafyanın üretmiş olduğu bilgi biyoçeşitlilik araştırmalarına önemli katkılar sağlar (Avice, 2004; Taylor ve Keller, 2007).

Filocoğrafya, genetik farklılıkların hem tür içerisinde hemde türler arasındaki dağılımını anlamamızı sağlar ve jeolojik olayların çevresel değişkenlerin ve coğrafik faktörlerin bir türün ekolojisi ve doğa tarihiyle etkileşerek türün evrimine nasıl yön verdiğini ortaya çıkarır. Moleküler temelli filogenetik ve filocoğrafik çalışmalar çeşitli genetik belirteçlere dayanarak gerçekleştirilir. Bunlar, filogenetik ve filocoğrafik çalışmalarda hem

populasyon içinde ve populasyonlar arasında, hem de birbiriyle yakından ilişkili türler arasında ya da diğer taksonomik düzeylerde olan genetik varyasyonları karakterize etmek için kullanılır. Çeşitli genetik belirteçler farklı hızlarda biriken genetik değişiklikleri aktarır ve filogenetik-filocoğrafik analize zamansal özellikleriyle katılmış olurlar. Hızlı bir değişimin gerçekleştiği belirteçler, nüfus farklılaşması ve ya güncel gen akışı gibi kısa dönem süreçlerini incelemek için kullanılırken, uzun dönemde işleyen farklılaşma süreçlerini incelemek için, daha yavaş değişim gözlenen belirteçlerden yararlanır (Behura, 2006).

Mitokondriyal DNA, ökaryot organizmalarda genetik çeşitlilik çalışmalarında tercih edilen bir moleküler belirteçtir. Mitokondriyal gen bölgeleri filogenetik ve populasyon genetiği araştırmalarında yakın akraba hayvan türlerinin ve bir hayvan türünün zaman içinde değişimini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu belirteçler, yakın zamanda birbirinden ayrılan türlerin zaman içindeki varyasyonu ve farklılaşmasının genetik temellerinin geçerliliği kanıtı bir şekilde anlaşılmasını sağlar (Behura, 2006).

Filogenetik araştırmalarda, mitokondriyal DNA'nın birkaç farklı gen bölgesinin (16rDNA, 12SrDNA, ND1, COI ve Cytb) daha yaygın kullanıldığı görülmektedir. (Hwang ve Kim, 1999). Özellikle COI gen bölgesinin bir taraftan yüksek oranda korunmuş olması diğer yandan ise değişken bölgeleri içermesi popülasyonlar arası ve popülasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesinde etkin kullanılmasına yol açmıştır (Hebert vd., 2003).

Filogenetik ve filocoğrafik çalışmalarda kullanılan bir diğer moleküler belirteç nüklear ribozomal DNA (rDNA)'dır. Nüklear rDNA'nın farklı bölgeleri arasındaki nükleotid dizileri, oldukça yakın türlerin ya da populasyonların arasında filogenetik farklılık ve benzerlikleri ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Hwang ve Kim, 1999). Nüklear Ribozomal DNA (rDNA) peş peşe dizilen 5000 civarında kopya içermektedir. Ribozomal DNA genleri 28S ve 18S, 5.8S alt birimlerini içermektedir. Bu alt birimler korunmakta olan bölgelerdir. Bununla birlikte ITS1 ve ITS2 (internal transcribed spacer) bölgeleri ise değişkenlikler göstermektedir. Bu durum tekrarlı kopyalar içeren bu bölgelerin türler içerisindeki genetik çeşitliliğin ölçümü için kullanılmasına olanak sağlar (Keller vd., 2009).

Son yıllarda Simuliidae familyası içerisinde bir türün farklı popülasyonlarının sahip olduğu genetik zenginliğin belirlenmesinde DNA barkodlamanın yaygın kullanımı dikkat çekmektedir.

Malezya'da COI ve COII gen bölgeleriyle ile yapılan yükseklik gradient çalışmasında *Simulium tani* türünün kromozomal ve morfolojik varyasyonları göz önüne alarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Popülasyon çeşitliliğini ortaya koymak adına yapılan çok sayıdaki analiz, türün farklı yükseltilerdeki lokal popülasyonlarının yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip olduğu gözlenmiştir (Low vd., 2014).

Kudela vd. (2018), Apeninler ve Sicilya'da yayılış gösteren ve bizim çalışmamızda incelediğimiz *Prosimulium rachiliense* ile aynı tür gurubunda yer alan *Prosimulium italicum* Rivosecchi, 1967 türünün taksonomik statüsünü COI ve COII gen gölgelerini kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. *P. italicum* birkaç morfolojik ayrıntıya dayanarak *Prosimulium hirtipes*'in bir alttürü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra *P. hirtipes* ile aynı tür olarak kabul edilmiştir ve sinonim yapılmıştır. Bu araştırmacılar, politen kromozom bantlama modellerinin ve mitokondriyal DNA dizilerinin (COI ve COII) analizleri ile İtalya'da yayılış gösteren *P. italicum* ile kuzey ve orta Avrupa'daki *P. hirtipes* popülasyonları arasındaki genetik farklılığı ortaya çıkararak, *P. italicum*'un tür statüsünü doğrulamışlardır.

Bir diğer çalışmada Avrupa ve Anadolu arasında bir kavşak görevi gören Balkan Yarımadasında, *Simulium* cinsi *Wilhelmia* altcinsine ait 6 türü arasındaki filocoğrafik ilişkiyi ortaya çıkarmak için COI gen bölgesinin kullanılmış ve altcins içerisindeki bu türlerin yayılış örüntüleri aydınlatılmıştır (Duknic vd., 2019).

Kuzey Tayland'da yapılan bir çalışmada ise birkaç farklı morfotürü olduğu düşünülen *Simulium asakoe* tür kompleksinin, yapılan DNA temelli filocoğrafik analizlerle tek tür olduğu sonucuna varılmıştır (Low vd., 2020).

Simuliidae, Diptera'nın Nematocera alt takımı içinde yer almaktadır. Sıklıkla siyah renkli küçük vücutları, vücuda göre geniş kanat ve güçlü bacak yapılarıyla alttakımın öteki

familyalarından rahatlıkla ayrılırlar. Antarktika kıtası dışında tüm dünyada yayılış göstermektedirler (Crosskey, 1990).

Dişi bireyler yumurtlama sikluslarını tamamlamak için kanla beslenirler. Kanla taşıdıkları hastalıklar ve ısırılmaları sonucunda sebep oldukları komplikasyonlar bu familyayı insan ve hayvan sağlığı açısından sorunlu eklembacaklılar arasında 3. sıraya taşımıştır. Bazı türleri insanlarda 'nehir körlüğü' olarak bilinen Onchocerciasis hastalığının taşıyıcısı, bazı türleri ise kuş ve çiftlik kanatlılarında Leucocytozoonosis olarak bilinen öldürücü hastalığının taşıyıcısıdır. Benzer şekilde binlerce bireyden oluşan sürülerinin çiftlik hayvanlarından kan emmeleri bu hayvanlar üzerinde strese yol açmakta ve süt, yumurta gibi ürün veriminde %30'lara varan kayıplara neden olmaktadır (Adler vd., 2004).

Familya bireyleri larval ve pupal evrelerini akarsu sistemlerinde rheofilik olarak geçirmektedir. Akarsularda yoğun birey sayıları fazlaca baskın bir gruptur ve larvalar genellikle su içindeki asık şekilde olan organik maddeler, diatomlar, bakteriler, detritus, protozoonlar ve alg türleri gibi hayvansal olan organizmaları filtre eder. Besin zincirindeki, beslendikleri organizmalar ve predatörler arasındaki ilişkiyi kurarlar. Bu tip beslenmeleri ile filtre ettikleri askıda kalan organik partikülleri parçalara ayırarak dibe çökmelerine engel olup, madde döngüsüne katılmalarını sağlarlar. Ayrıca çoğu tür oksijen hassasiyetlerinin fazla olması ile su kirliliği çalışmalarında yapılan araştırmalarda biyoidikatör olarak kullanılmaktadır (Adler vd., 2004).

Simuliidae türlerinin bileşimi, tatlı su ekosistemlerinin ekolojik kalitesini ölçmede önemlidir. Özellikle, çözünmüş organik maddeleri kullanan ve nehirlerde bulunan besin döngüsünde belirleyici görevi olan karasineklerin biyolojik sistemde büyük bir rolü vardır (Bernotiene, 2006; Zhang ve diğerleri, 1998).

Simuliidae familyası içerisinde yer alan çok sayıda tür gurubunun varlığı ve morfolojik ayrımlarındaki güçlükler özellikle vektör türlerin zaman zaman hatalı teşhislerine ve mücadele çalışmalarının yanlış yönlendirilmesine de sebep olabilmektedir (Hernandez-Triana vd., 2012).

Simuliidae familyası üzerine ülkemizdeki ilk araştırma 20. Yüzyılın başlarında yapılmıştır. Bu çalışmada Austen (1925) tarafından Çanakkale Biga Yarım Adasından *Simulium pulchripes* türü tanımlanmıştır (Crosskey ve Zwick, 2007). İlk çalışmadan 50 yıl sonrasına kadar ülkemizden bu hayvanlara ait hiçbir veri kaydı yapılmamıştır. Afyon ve Çanakkale illerinden Jedlicka (1975) *Simulium caucasicum* türünü, *Odogmia ornata caucasica* olarak kaydedilmiştir. Heide Zwick tarafından (1978) yılında yayınlanan Limnofauna Europea'da Türkiye'den 3 ayrı simulid türünün kaydı vardır. Ülkemizdeki bu familyaya yönelik ilk kapsamlı çalışma olan Kazancı ve Clergu-Gazeau (1990) araştırmasında ülkenin farklı bölgelerinden 21 tür bildirilmiştir.

Özbek vd. (1995) tarafından, Doğu Anadolu bölgesinden ve özel olarak Erzurum ilinden *Simulium bezzi* türünün salgını olduğunu ve 100 civarlarında küçükbaşın telef olduğu durumunun raporu verilmiştir.

Balık vd. (2002) yılında İzmir Dikili'den bir türü ülkemizden ilk kez kayıt etmişlerdir. Bu hayvanların ülkemizde yaşayan türleri üzerine yapılmış ilk tez çalışmasında (doktora), Şirin (2001) Yukarı Sakarya havzasında yaşayan Simuliidae türlerini belirlemiştir. Çalışmada tespit edilen 23 türden 8 tanesi ilk kayıt niteliğindedir (Şirin ve Şahin, 2005).

Şahin vd. (2004) TÜBİTAK destekli proje çalışmasında Kuzey Marmara bölgesinin faunasını tespit etmeye çalışmışlardır. Kazancı (2006) bazı Simuliidae türleriyle ekolojik parametreleri arasındaki bağları CCA (Canonical Correspondance Analysis) ile analiz etmiştir.

Crosskey ve Zwick (2007) araştırmalarında Anadolu için 9 yeni tür kaydı ve yayılış bilgileriyle birlikte, o zamana kadar yapılan bütün çalışmaları analiz ederek Türkiye için bir kontrol listesi yayınlamıştır. 2006 ile 2007 yıllarında ise Orta Kızılırmak havzasında rastlanan, o çevredeki insan ve hayvan sağlığıyla birlikte ekonomik yönden önemli bir sorun meydana getiren *Simulium lineatum* türünün istilas ve biyolojik mücadele çalışmaları ise Yılmaz vd. (2007) vasıtasıyla rapor edilmiştir.

Türkiye'nin Batı ve Doğu bölgelerinde bazı akarsularda 15 tür tespit edilmiş ve türlerden 5 tanesi yeni kayıt olarak bildirilmiştir (Kazancı ve Ertunç, 2008a). Aynı araştırmacılar 6 adet türü ilk kez rapor ettikleri, 63 türü içeren bir kontrol listesi yayınlanmıştır (Kazancı ve Ertunç, 2008b).

Tuzla (2008) yüksek lisans çalışmasında politen kromozom analizleri ile ülkemizden ilk kez 6 farklı türe ait sitogenetik özellikleri belirtmiştir. Kalafat (2008) yüksek lisans tez çalışmasında Afyon ve çevresinde dağılım gösteren türleri tespit etmiştir. Ertunç (2009) yüksek lisans tezinde Batı Anadolu'daki akarsularda Simuliidae araştırmaları yapmıştır. Çağlar ve İpekdal (2009) kırk beş tane türü içeren çalışmalarıyla, Simuliidae faunasını Türkiye ve yakın ülke faunaları ile mukayese ederek değerlendirmişlerdir.

Kalafat ve Şirin (2011) tarafından ülke faunasına bir yeni tür kaydı verilmiştir. Yeşilöz (2011) yüksek lisans tezinde, Nevşehir Kızılırmak Havzasında sorun oluşturan Simulidlerin, moleküler taksonomisini COI geni ve ITS 2 gen bölgeleriyle çalışmıştır.

Gazyağcı (2011) doktora çalışmasını, Kırıkkale ve Ankara yöresi Kızılırmak Havzasında *Simulium* cinsine ait türlerin belirlenmesi üzerine yapmıştır. Adler vd. (2012) Kızılırmak Havzasında *Wilhelmia* alt cinsi türlerinin kromozomal yapılarını araştırmış ve aynı tür olması ihtimali olan iki ayrı türün *Simulium (Wilhelmia) lineatum* ve *Simulium (Wilhelmia) balcanicum* kromozomal farklılığını tespit etmişlerdir.

Başören vd. (2013) yılında Ankara çayı Simuliidae familyasına ait türleri incelemiş ve 9 tür bildirmiştir. Demircioğlu (2014) Erciyes Dağı akarsularındaki *Simulium* türlerinin moleküler klasifikasyonunu yapmıştır.

Adler ve Şirin (2014) *Prosimulium* cinsi hirtipes tür grubu Batı Asya popülasyonlarını, sitotaksonomik yöntemlerle araştırmışlardır. Çalışmada Batı Anadolu'da tür grubunun 3 türünün varlığını belirlemişler ve bu türlerden bir tanesini yeni tür olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmada *Prosimulium rachiliense* türü Batı Anadolu popülasyonları ile Ermenistan popülasyonları arasında kromozomal inversiyonlarla dikkat çekici farklılıklar bulmuşlar ve Ermenistan popülasyonları için sitoform A, Anadolu popülasyonları içinse sitoform B tanımlaması yapmışlardır.

Şirin vd. (2014), Doğu Marmara Bölgesi'nde yapılan araştırmada 17 tür rapor etmişlerdir. Bir başka araştırmada ise Trakya Bölgesi'nden 18 tür kaydı verilmiştir (Şirin vd. 2015). Bu 18 türden bir tanesi Türkiye için yeni kayıttır.

Adler ve Şirin (2015) ve yine Şirin ve Adler (2015) iki yeni tür tanımlı yapmışlardır. Yapılan iki çalışmada da türlere ait kromozomal ve morfolojik özellikler detaylıca araştırılmıştır.

Küçükyetim (2018) yüksek lisans çalışmasında *Wilhelmia* altcinsi Batı Anadolu popülasyonlarının genetik çeşitliliklerinin COI ve ITS 1-2 gen bölgeleri ile araştırmıştır.

Fidan (2020) Doktora çalışmasında, *Simulium* cinsi *ornatum* tür grubunun Anadolu temsilcilerinin filogenetik ve filocoğrafik analizini üç farklı gen bölgesi kullanarak araştırmıştır. Çalışmada morfotaksonomik olarak *Simulium ornatum* Meigen, 1818 ve *Simulium kiritshenkoi* Rubtsov, 1940 olduğu tespit edilen türlerin genetik açıdan iki farklı tür olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Tür grubunun bir başka türü *Simulium intermedium* Roubaud, 1906 ise Türkiye için ilk kez kaydedilmiştir. Genetik çeşitlilik analizlerine göre tür grubunun Anadolu popülasyonları arasındaki hibitleşme oranının yüksek olduğu görülmüştür.

Son yayınlar incelendiğinde, dünya karasineklerinin (Diptera: Simuliidae) kapsamlı taksonomik ve coğrafik envanter revizyonununa göre *Prosimulium* cinsinin kayıtlara geçen yaşayan tür sayısı 80'dir (Adler, 2021).

Bu türlerden *P. rachiliense* Anadolu'da en geniş dağılımı gösterir. (Başören ve Kazancı, 2016). Buna ek olarak *P. rachiliense* türünün ülkemize ait kayıtlarının çoğunlukla larval ve pupal özelliklerine yönelik verilen *Prosimulium rufipes* (Meigen, 1830) ve *Prosimulium fulvipes* (Edwards, 1921) türleri ile bilhassa aquatik evrelerde önemli derecede morfolojik benzerlik göstermektedir. Görülen benzerlikler araştırmaların moleküler düzeydeki çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği yönünde olmuştur.

Bu alışmada *P. rachiliense* türünün ülkemizin farklı bölgelerindeki populasyonlarının genetik çeşitliliklerinin DNA belirteçleri ile araştırılmasına ve filocoğrafik değerlendirilmesi ile türün yayılış örüntüsünün ortaya konmasına çalışılmıştır.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Materyali

Çalışma materyali *Prosimulium rachiliense* Djafarov, 1954 türüne ait pupa ve larva evrelerindeki bireylerden oluşmaktadır. Örnekler, 2011-2019 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış, Doç. Dr. Ümit ŞİRİN tarafından morfotaksonomik olarak teşhis edilmiş ve içerisinde absölü alkol (%96) bulunan tüplerde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Laboratuvarı'nda, uygun koşullarda muhafaza edilmiş bireylerdir. Örneklerin toplandığı lokalite ve tarih bilgilerine Çizelge 3.1' de yer verilmiştir.

Türün ülkemizdeki yayılışında etkili olabileceği öngörülen coğrafik izolasyon ve havza farklılıklarına dikkat edilerek 8 farklı populasyon oluşturulmuştur. Belirlenen populasyonlar; Trakya, Marmara, Batı Anadolu, Batı Akdeniz, Orta Anadolu, Batı Karadeniz, Orta ve Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu populasyonlarıdır (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur).

Bölgeler	Kodlar	İstasyon No	Şehir	İstasyon Adı	Tarih	Boylam	Enlem	Yükseklik
Trakya Bölgesi	1edibalpr	1	Edirne	Balıklidere	5.04.2018	26°40'3.04"D	41°10'29.84"K	31m
Trakya Bölgesi	2edibalpr	1	Edirne	Balıklidere	5.04.2018	26°40'3.04"D	41°10'29.84"K	31m
Trakya Bölgesi	125edibalpr	1	Edirne	Balıklidere	5.04.2018	26°40'3.04"D	41°10'29.84"K	31m
Trakya Bölgesi	3kiruspr	2	Kırklareli	Üsküp	5.04.2018	27°22'43.30"D	41°43'21.58"K	265m
Trakya Bölgesi	4kiruspr	2	Kırklareli	Üsküp	5.04.2018	27°22'43.30"D	41°43'21.58"K	265m
Trakya Bölgesi	5kiruspr	2	Kırklareli	Üsküp	5.04.2018	27°22'43.30"D	41°43'21.58"K	265m
Trakya Bölgesi	6kiruspr	2	Kırklareli	Üsküp	5.04.2018	27°22'43.30"D	41°43'21.58"K	265m
Trakya Bölgesi	7kiruspr	2	Kırklareli	Üsküp	5.04.2018	27°22'43.30"D	41°43'21.58"K	265m
Trakya Bölgesi	8kirmanpr	3	Kırklareli	Manastır deresi	5.04.2018	27°26'13.38"D	41°40'5.33"K	184m
Trakya Bölgesi	9kirmanpr	3	Kırklareli	Manastır deresi	5.04.2018	27°26'13.38"D	41°40'5.33"K	184m
Trakya Bölgesi	10kirmanpr	3	Kırklareli	Manastır deresi	5.04.2018	27°26'13.38"D	41°40'5.33"K	184m
Marmara Bölgesi	11balcakpr	4	Balıkesir	Çakallar	4.04.2018	27°33'37.20"D	39°42'50.73"K	319m
Marmara Bölgesi	12balcakpr	4	Balıkesir	Çakallar	4.04.2018	27°33'37.20"D	39°42'50.73"K	319m
Marmara Bölgesi	13balcakpr	4	Balıkesir	Çakallar	4.04.2018	27°33'37.20"D	39°42'50.73"K	319m
Marmara Bölgesi	14candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	15candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	16candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	17candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur).

Marmara Bölgesi	18candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	19candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	111candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	112candupr	5	Çanakkale	Duman K.	4.04.2018	26°51'51.83"D	40° 1'0.34"K	140m
Marmara Bölgesi	20balazpr	6	Balıkesir	Azapdere	4.04.2018	27°31'56.93"D	39°45'7.48"K	214m
Marmara Bölgesi	113balazpr	6	Balıkesir	Azapdere	4.04.2018	27°31'56.93"D	39°45'7.48"K	214m
Marmara Bölgesi	92burharpr	35	Bursa	Harmancık	3.05.2011	29° 7'46.35"D	39°41'51.18"K	692m
Marmara Bölgesi	93burharpr	35	Bursa	Harmancık	3.05.2011	29° 7'46.35"D	39°41'51.18"K	692m
Ege Bölgesi	21aydakpr	7	Aydın	Aksu'ya 3 km	26.03.2016	28°19'53.43"D	38° 4'27.40"K	739m
Ege Bölgesi	22aydakpr	7	Aydın	Aksu'ya 3 km	26.03.2016	28°19'53.43"D	38° 4'27.40"K	739m
Ege Bölgesi	23aydakpr	7	Aydın	Aksu'ya 3 km	26.03.2016	28°19'53.43"D	38° 4'27.40"K	739m
Ege Bölgesi	24denyahpr	8	Denizli	Yahşiler	21.04.2013	28°52'24.00"D	37°39'8.00"K	1068m
Ege Bölgesi	25denyahpr	8	Denizli	Yahşiler	21.04.2013	28°52'24.00"D	37°39'8.00"K	1068m
Ege Bölgesi	26denkopr	9	Denizli	Koçar boğazı 2	22.04.2013	28°53'51.00"D	37°23'18.00"K	1178m
Ege Bölgesi	27denkopr	9	Denizli	Koçar boğazı 2	22.04.2013	28°53'51.00"D	37°23'18.00"K	1178m
Ege Bölgesi	28denkopr	9	Denizli	Koçar boğazı 2	22.04.2013	28°53'51.00"D	37°23'18.00"K	1178m
Ege Bölgesi	114denkopr	9	Denizli	Koçar boğazı 2	22.04.2013	28°53'51.00"D	37°23'18.00"K	1178m
Ege Bölgesi	115denkopr	9	Denizli	Koçar boğazı 2	22.04.2013	28°53'51.00"D	37°23'18.00"K	1178m
Ege Bölgesi	29denderpr	10	Denizli	Derbent	21.04.2013	28°49'17.00"D	38° 6'41.00"K	540m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur).

Ege Bölgesi	30denderpr	10	Denizli	Derbent	21.04.2013	28°49'17.00"D	37°23'18.00"K	540m
Ege Bölgesi	116dendepr	10	Denizli	Derbent	21.04.2013	28°49'17.00"D	37°23'18.00"K	540m
Ege Bölgesi	90kutsokpr	34	Kütahya	Sökmen	10.04.2013	30°10'3.87"D	39°30'59.44"K	978m
Ege Bölgesi	91kutsokpr	34	Kütahya	Sökmen	10.04.2013	30°10'3.87"D	39°30'59.44"K	978m
Ege Bölgesi	102kutinpr	40	Kütahya	İncik	27.04.2011	30°15'36.69"D	39°32'40.96"K	1008m
Ege Bölgesi	103kutinpr	40	Kütahya	İncik	27.04.2011	30°15'36.69"D	39°32'40.96"K	1008m
Ege Bölgesi	104kutfinpr	41	Kütahya	Fındık	10.04.2013	30°12'57.75"D	39°33'54.92"K	957m
Ege Bölgesi	105kutfinpr	41	Kütahya	Fındık	10.04.2013	30°12'57.75"D	39°33'54.92"K	957m
Ege Bölgesi	107kutkarpr	42	Kütahya	Kargın	28.03.2014	30°16'47.41"D	39°35'18.67"K	905m
Batı Akdeniz Bölgesi	31ispsipr	11	Isparta	Sipahiler	26.03.2015	30°58'37.95"D	37°39'19.59"K	1207m
Batı Akdeniz Bölgesi	32ispyepr	12	Isparta	Yeşil köy	29.04.2015	30°57'50.03"D	38° 0'43.03"K	945m
Batı Akdeniz Bölgesi	33antalpr	13	Antalya	Altınyayla'ya 15 km	7.05.2016	29°38'13.10"D	36°56'33.73"K	1405m
Batı Akdeniz Bölgesi	34antkoppr	14	Antalya	Köprübaşı mevki Mahmutlar çıkışı	24.04.2015	32° 9'18.09"D	36°30'14.94"K	478m
Batı Akdeniz Bölgesi	36mugsepr	16	Muğla	Seki	1.05.2014	29°39'1.84"D	36°49'7.76"K	1148m
Batı Akdeniz Bölgesi	37mugsepr	16	Muğla	Seki	27.04.2015	29°39'1.84"D	36°49'7.76"K	1148m
Batı Akdeniz Bölgesi	38muginpr	17	Muğla	Kınık, Fethiye-Korkuteli yolu	27.04.2015	29°28'34.06"D	36°46'45.61"K	1180m
Batı Akdeniz Bölgesi	39aksakpr	18	Akşehir	Akseki yolu (engili)	21.05.2015	31°25'22.45"D	38°16'36.80"K	1520m
Batı Akdeniz Bölgesi	40aksakpr	18	Akşehir	Akseki yolu	21.05.2015	31°25'22.45"D	38°16'36.80"K	1520m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur).

İç Anadolu Bölgesi	41kayzapr	19	Kayseri	Zamantı kolu	14.05.2019	35°26'45.22"D	37°48'21.14"K	757m
İç Anadolu Bölgesi	42kaypikpr	20	Kayseri	Piknik alanı	14.05.2019	35°19'45.98"D	37°47'27.22"K	1013m
İç Anadolu Bölgesi	117kaypikpr	20	Kayseri	Piknik alanı	14.05.2019	35°19'45.98"D	37°47'27.22"K	1013m
İç Anadolu Bölgesi	43kaykispr	21	Kayseri	Kıskaçlı köyü	15.05.2019	36°27'35.62"D	38°33'21.68"K	1819m
İç Anadolu Bölgesi	44kaykispr	21	Kayseri	Kıskaçlı köyü	15.05.2019	36°27'35.62"D	38°33'21.68"K	1819m
İç Anadolu Bölgesi	45kaykispr	21	Kayseri	Kıskaçlı köyü	15.05.2019	36°27'35.62"D	38°33'21.68"K	1819m
İç Anadolu Bölgesi	46sivorpr	22	Sivas	Ortaköy	3.05.2018	38°18'41.64"D	39°51'22.34"K	1787m
İç Anadolu Bölgesi	47sivhopr	23	Sivas	Höbek köyü	16.05.2019	37°51'39.60"D	39°18'40.74"K	1756m
İç Anadolu Bölgesi	48sivipr	24	Sivas	Ilıca deresi	17.05.2019	37°34'42.18"D	39°58'50.14"K	1503m
İç Anadolu Bölgesi	49sivipr	24	Sivas	Ilıca deresi	17.05.2019	37°34'42.18"D	39°58'50.14"K	1503m
İç Anadolu Bölgesi	50eskavpr	25	Eskişehir	Avlak kaya	20.04.2018	30°28'59.23"D	39°50'32.29"K	813m
İç Anadolu Bölgesi	51yozeypr	26	Yozgat	Eyri çayı	6.05.2018	34°55'55.47"D	39°51'28.89"K	1195m
İç Anadolu Bölgesi	52yozeypr	26	Yozgat	Eyri çayı	6.05.2018	34°55'55.47"D	39°51'28.89"K	1195m
İç Anadolu Bölgesi	53yozeypr	26	Yozgat	Eyri çayı	6.05.2018	34°55'55.47"D	39°51'28.89"K	1195m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur)

İç Anadolu Bölgesi	54yozeypr	26	Yozgat	Eyri çayı	6.05.2018	34°55'55.47"D	39°51'28.89"K	1195m
İç Anadolu Bölgesi	55yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	56yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	57yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	58yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	59yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	60yozhapr	27	Yozgat	Hacıfakılı	9.04.2019	35°43'31.17"D	39°41'31.35"K	1172m
İç Anadolu Bölgesi	94eskmapr	36	Eskişehir	Mayıslar	16.04.2014	30°39'40.56"D	40° 2'41.47"K	210m
İç Anadolu Bölgesi	95bilyepr	37	Bilecik	Yeni dodurga	28.04.2011	29°56'18.30"D	39°45'52.23"K	1056m
İç Anadolu Bölgesi	96bilyepr	37	Bilecik	Yeni dodurga	28.04.2011	29°56'18.30"D	39°45'52.23"K	1056m
İç Anadolu Bölgesi	97bilyepr	37	Bilecik	Yeni dodurga	28.04.2011	29°56'18.30"D	39°45'52.23"K	1056m
İç Anadolu Bölgesi	100sivorpr	39	Sivas	Ortaköy	3.05.2018	38°18'41.64"D	39°51'22.34"K	1788m
İç Anadolu Bölgesi	101sivorpr	39	Sivas	Ortaköy	3.05.2018	38°18'41.64"D	39°51'22.34"K	1788m
İç Anadolu Bölgesi	109eskbepr	43	Eskişehir	Beşikderesi	20.05.2018	30°25'23.15"D	39°30'46.49"K	1016m
İç Anadolu Bölgesi	110eskbepr	43	Eskişehir	Beşikderesi	20.05.2018	30°25'23.15"D	39°30'46.49"K	1016m
İç Anadolu Bölgesi	118eskbepr	43	Eskişehir	Beşikderesi	20.05.2018	30°25'23.15"D	39°30'46.49"K	1016m
İç Anadolu Bölgesi	119eskbepr	43	Eskişehir	Beşikderesi	20.05.2018	30°25'23.15"D	39°30'46.49"K	1016m
Batı Karadeniz Bölgesi	61kaskizpr	28	Kastamonu	Kızkayası	7.05.2017	33°30'2.76"D	41°43'42.20"K	887m
Batı Karadeniz Bölgesi	62kaskizpr	28	Kastamonu	Kızkayası	7.05.2017	33°30'2.76"D	41°43'42.20"K	887m
Batı Karadeniz Bölgesi	63kaskizpr	28	Kastamonu	Kızkayası	7.05.2017	33°30'2.76"D	41°43'42.20"K	887m
Batı Karadeniz Bölgesi	64kaskizpr	28	Kastamonu	Kızkayası	7.05.2017	33°30'2.76"D	41°43'42.20"K	887m
Batı Karadeniz Bölgesi	65kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m
Batı Karadeniz Bölgesi	66kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m
Batı Karadeniz Bölgesi	67kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur)

Batı Karadeniz Bölgesi	68kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m
Batı Karadeniz Bölgesi	69kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m
Batı Karadeniz Bölgesi	70kascapr	29	Kastamonu	Camili	8.05.2017	33°41'0.56"D	41°44'39.25"K	1126m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	71baysorpr	30	Bayburt	Sorkunlu köyü	2.05.2018	40° 2'51.92"D	40°28'0.94"K	1852m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	72baysorpr	30	Bayburt	Sorkunlu köyü	2.05.2018	40° 2'51.92"D	40°28'0.94"K	1852m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	73baysorpr	30	Bayburt	Sorkunlu köyü	2.05.2018	40° 2'51.92"D	40°28'0.94"K	1852m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	74baysorpr	30	Bayburt	Sorkunlu köyü	2.05.2018	40° 2'51.92"D	40°28'0.94"K	1852m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	75cordagpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	76cordagpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	77cordahpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	78cordagpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	79cordagpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Orta Ve Doğu Karadeniz Bölgesi	80cordagpr	31	Çorum	Dağ kıyısı	18.05.2019	34°15'23.23"D	40°56'10.59"K	1503m
Doğu Anadolu Bölgesi	81erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m
Doğu Anadolu Bölgesi	82erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m
Doğu Anadolu Bölgesi	83erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m
Doğu Anadolu Bölgesi	84erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m
Doğu Anadolu Bölgesi	85erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m
Doğu Anadolu Bölgesi	86erzkapr	32	Erzincan	Kasaplar	3.05.2018	38°25'8.55"D	39°52'31.94"K	2008m

Çizelge 1. (devam) Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı lokalite bilgileri ve Analiz kodları (Kodlar: sıra numarası bulunduğu şehrin ilk hecesi ve bulunduğu istasyonun ilk hecesi olarak oluşturulmuştur)

Doğu Anadolu Bölgesi	87karsapr	33	Kars	Sarıkamış'a 15 km	29.06.2018	42°38'51.99"D	40°15'28.19"K	1992m
Doğu Anadolu Bölgesi	88karsapr	33	Kars	Sarıkamış'a 15 km	29.06.2018	42°38'51.99"D	40°15'28.19"K	1992m
Doğu Anadolu Bölgesi	89karsapr	33	Kars	Sarıkamış'a 15 km	29.06.2018	42°38'51.99"D	40°15'28.19"K	1992m

3.2. Total DNA İzolasyonu

DNA eldesi için seçilen pupaların kokon ve solunum filamentleri dışında kalan tüm vücut kısmı, larvaların ise kafa kapsülü çıkarılarak vücudun tamamı kullanıldı.

DNA izolasyonu;

1. Elde etmek istediğimiz dokunun belirlenmesi
2. DNA'nın eldesi için hücreleri ezerek DNA'ya zarar vermeden parçalanması,
3. DNA'dan hücre materyalinin uzaklaştırılması,
4. Hücre içeriğinden arınan DNA'yı çöktürerek total DNA eldesi olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirildi.

Çalışmada ZYMO Research DNA Pürifikasyon kiti kullanıldı. Uygulanan kit protokol basamakları;

1. Seçilen örnek larva ise kafa kapsülü, pupa ise filament ve kokonu vücuttan ayrılarak farklı bir eppendorf tüpüne alındı. Ayrılan kısımlar teşhis tekrarı veya kontrol için saklandı.
2. Total DNA eldesi etmek istediğimiz vücut bölümü üzerinde etiket kodu ile 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne konuldu. DNA'ya zarar vermeyecek şekilde eppendorf içerisinde kürdan büyüklüğündeki bir aparatla ufak darbelerle vücut bütünü bozularak ezme işlemi yapıldı.
3. Hücre zarının parçalanmasıyla DNA'nın açığa çıkması ve homojen bir karışım elde etmek adına tüplerin içerisine 95µl moleküler su ve 95µl Solid TissueBuffer(Blue), konuldu. Karışım içerisindeki proteinlerin çöktürülmesi ve temiz bir total DNA eldesi için 10µl Proteinaz K konuldu.
4. Solüsyonu homojenize etmek için eppendorf tüplerine 10-15 saniye vortek işlemi yapıldı ve sonrasında 55 °C' de 3 saat su banyosunda inkübe edildi.
5. Su banyosundan alınan tüplere DNA eldesi için gerekli olan pH ortamını yaratmak adına GenomicBindingBuffer solüsyonundan 400µl eklendi ve 10-15 saniye vorteks işlemi yapıldı.

6. Karışım, DNA'yı filtre etmek için Zymo–Spin kolonuna aktarıldı. 12.000 xg'de 1 dakika santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpleri atılıp yeni koleksiyon tüpleri kolonlara takıldı.
7. Kolonların içerisine DNA 'yı ilk solüsyonundan temizlemek için 400µl DNA Pre-Wash Buffer eklendi. Sonrasında 12.000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüp boşaltılıp tekrar takıldı.
8. Kolona 700µl g-DNA Wash Buffer eklenerek DNA saflaştırma ve son kolon yıkama işlemi yapıldı. 12.000xg'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü boşaltılıp tekrar takıldı.
9. Aynı işlem tekrarlanıp 200µl g-DNA Wash Buffer eklendi ve 12.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında koleksiyon tüpü içindeki sıvı ile atıldı.
10. Önceden hazırladığımız temiz ve üzerinde bireye verdiğimiz kodların yazılı olduğu eppendorf tüplerine kolonlar yerleştirildi. İçerisine 50µl - 100µl arasında DNA Elution konuldu. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Maksimum hızda 1 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
11. Santrifüj işlemi sonrası kolonlar atılıp Eppendorfta biriken total DNA -20°C'ye kaldırıldı.

3.3. . DNA'nın Nanodrop ile Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini

Çalışmamızda elde edilen total DNA konsantrasyonu ölçümü Thermo Fisher Nanodrop 2000 cihazıyla yapıldı. DNA'nın içinde çözdürülen Elüsyon tamponu öncesinde cihaza kör olarak tanıtıldı. 50 ng/µl düşük değere sahip bireylerin total DNA'ları yetersiz kabul edilip, Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirilmedi.

3.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

DNA izolasyonu sonrası seçilen bireylerin mitokondriyal DNA ve nükleer DNA genomunda bulunan iki farklı bölge (COI ve ITS1-2) PZR ile çoğaltıldı. PZR çalışmasında Bio-Rad T-100 marka Thermal Cycler PZR cihazı kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli olan primerleri öncesinde yapılmış olan çalışmaları örnek alarak belirlendi (Simon vd., 1994; Boore, 1999; Spanos vd., 2000). COI gen bölgesi mitokondriyal gen bölgesi olup en çok mutasyon ve değişimlere karşı korunan gen bölgesidir ve 1200 baz çifti

uzunluğundadır. Bu yüzden bu gen bölgesiyle çalışmalar yapıldı. ITS1-2 gen bölgesi filogenetik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen kromozomal gen bölgesi olup çekirdekte meydana gelen değişimlerin izlenmesi ve korunmuş bir gen bölgesi olması açısından tercih edildi. Bu bölge 970 – 1020 baz çifti uzunluğundadır.

Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan solüsyonlar ve kullanım miktarları

Materyal	Hacim (µl)
dH ₂ O	36,35
Buffer 10X	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP (10 mM)	1
F Primer (100 pmol/ul)	0,2
R Primer (100 pmol/ul)	0,2
Taq	0,25
Total DNA	3
Toplam	50

Çizelge 3.3. Çalışılan gen bölgelerinde kullanılan primer dizilimi

Gen Bölgesi	Primer Bağlanma Yönü	Primer Dizilimi
COI	F	1490:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 25 mer
	R	3014: 5'- TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' 25 mer
ITS1-2	F	ITS5:5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 22mer
	R	ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 20mer

Çizelge 3.4. COI için PZR reaksiyon basamakları

Reaksiyon	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	4 dk	1X
Denatürasyon	95	1 dk	30X
Annealing	52.2	1 dk	
Elongation	72	2.30 dk	
Final Extension	72	7dk	1X

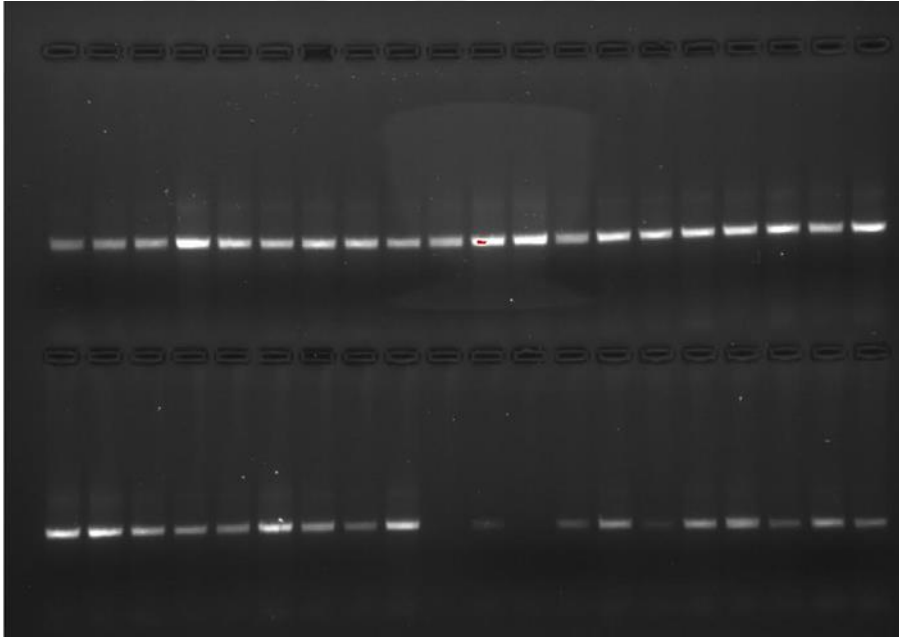
Çizelge 3.5. ITS1-2 için PZR reaksiyon basamakları

Reaksiyon	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	4 dk	1X
Denatürasyon	95	1 dk	30X
Annealing	55.8	1 dk	
Elongation	72	0.50 dk	
Final Extension	72	7dk	1X

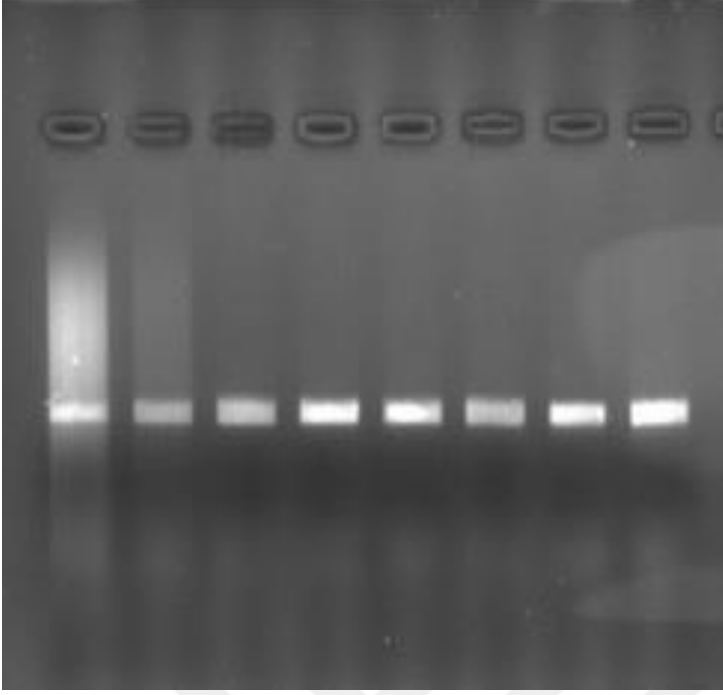
3.5. Jel Elektroforez

Yapılan PZR reaksiyonundan sonra elde ettiğimiz ürünlerin kalitesini ölçmek, istenilen saflık ve yeterli uzunluğa sahip olup olmadığını belirlemek için % 1'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

Jel, 1 gr agaroz toz ve 100ml 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) ile hazırlandı. Mikrodalga fırında şeffaf ve pürüzsüz bir hal alana kadar arada çalkalayarak hazırlanan karışım el yakmacak dereceye gelene kadar soğutup sonrasında 1 µl Etidyum Bromür eklendi ve karıştırılarak homojenizasyonu sağlandı. Elektroforez kalıbına dökülen karışımın bir süre polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jel içerisinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına konuldu. Yükleme kuyucuklarına baz uzunluğu belirli primer ile PZR sonucunda elde edilen ürünler yüklendi. Yürütülen ürünler 90 volt'da 45 dk işlem sonucunda UV ışını ile görüntülenip, fotoğraflanarak kayıt altına alındı (Şekil 3.2 ve 3.3). Bu işlemler Bio-Rad marka jel dökümantasyon ve görüntüleme cihazında yapıldı.



Şekil 3.2. COI gen bölgesine ait PZR elde edilen ürünlerin jel elektroforezde örnek görüntüsü



Şekil 3.3. ITS 1-2 gen bölgesine ait PZR'den elde edilen ürünlerin jel elektroforezde örnek görüntüsü

3.6. Dizi Analizleri

Çalışmada toplam 125 bireyden elde edilen DNA saflaştırıldıktan sonra hedef gen bölgelerinin dizilenmesi için Macrogen firmasına gönderildi. Bireylerin gen bölgelerinin dizi analizi çift taraflı okunarak ab1. dosyası formatında alındı. COI ve ITS 1-2 bölgelerinin hizalanması SEQUENCHER v.4.1 programı kullanılarak gerçekleştirildi. İkili hizalamalar sırasında bozuk, temiz olmayan diziler veri matrisine dahil edilmedi. 125 bireye ait dizilerden COI gen bölgesi için 19 birey, ITS1-2 için ise 29 bireyin dizileri analizler için kullanılmadı. İkili hizalamaları yapılan diziler daha sonra SEQUENCHER v.4.1 ve MEGA v.7 (Tamuravd 2007) programı kullanılarak her bir gene ait dizilerin çoklu hizalaması gerçekleştirildi ve veri matrisleri elde edildi. Çoklu hizalama ile kontrol edilen dizilerin her birinin istenilen gen bölgesine ait olup olmadığı ise nükleotid BLAST yapılarak kontrol edildi.

3.7. Verilerin Analizi

Filogenetik analizler gerçekleştirilmeden önce veri setlerinin haplotip analizi DnaSP v5.0 (Librado ve Rozas 2009) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu haplotip dosyası filogenetik analiz programlarına uygun formatlara (Nexus, Phylip ve Fasta) yine DnaSP v5.0, Mesquite ve DAMBE programları ile dönüştürüldü.

Populasyon genetiği analizi için DnaSP v5.0 programıyla populasyonların haplotip ve nükleotid çeşitliliği analiz edildi. Nükleotid çeşitliliğinin nötralite ilişkisinin belirlemek üzere nötral teori baz alınıp Tajima'nın D (1989) ve Fu'nun F_s değerlerinin (1997) analizi yapıldı. JModelTest 2.1.6 (Posada, 2008) programında bulunan AIC (Akaike Information Criterion) ve BIC (Bayesian Information Criterion) göre, uygulanacak filogenetik analiz için en uygun evrimsel model belirlendi. Ağaç yapımı için kullanılacak parametre tahminleri gerçekleştirildi.

Haplotiplerin arası filogenetik ilişkiyi belirlemek için PAUP v.4.0b10 (Swofford 2002) programı kullanıldı ve Maksimum Olasılık (MO) analizi, Maksimum Parsimoni (MP) analizi gerçekleştirildi. Bayesian filogenetik analizi (BI) MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist ve Huelsenbeck 2003) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Haplotiplerin arası oluşan ilişkiyi median-joining ve MJ şebeke yaklaşımı Network 4.5.1.6 (Anonim, 2021) programıyla gerçekleştirirken, haplotipler arasındaki mutasyonel uzaklıklar ise SplitsTree v.4.11.3 (Huson ve Bryant, 2006) programı kullanılarak analiz edildi.

Oluşturulan veri setlerine 3 ayrı tür sınırları belirleme testi uygulandı. Birincisi ABGD tür sınırları belirleme testidir. (Puillandre vd., 2011). Bu Analiz, dizileri barkod boşluğuna göre hipotetik türlere ayırır. Haplotiplerde boşluk ve limit tespiti yaparak gruplama gerçekleştirir. Dar bir gruplama yapmak için veri setine tekrar tekrar uygulanıp kesin sonucu belirtir.

İkinci tür sınırları belirleme testi TCS 1.21 programıyla gerçekleştirilmiştir. Bu program istatistiksel Parsimoni kullanılarak filogenetik ağ tahmini analizi yapmaktadır. (Clement vd., 2000). TCS, retikülasyon veya çoklu dallanma dâhil edilip soy tahmininde bulunan Java temelli programdır. DNA sekans verilerinden ve Restriksiyonendonükleaz haritalamasından çıkan haplotiplerle fenotipik ilişkilerinin kladistik analizidir. Analizde, haplotipler arasında yakınlık limiti % 90 ve % 95 olarak 2 alt analizle gerçekleştirildi.

Üçüncü tür sınırları belirleme testi SpeciesIdentifier (SpeID) 1.7.8, türler arası ve tür içi uzaklıkları hesaplamak, DNA dizileri ile tür tanımlamanın farklı yollarını keşfetmek ve dizileri ikili mesafelere dayalı olarak kümeler halinde gruplandırmak için kullanılmaktadır (Meier vd. 2006).

Türe ait haplotiplerin ve populasyonların ayrılma zamanları Bayesian metoduyla, MarkovChain Monte Carlo (MCMC) simülasyonlarıyla çalışan BEAST v. 1.7.4 ve BEAUti (Drummond ve Rambaut, 2007) programları vasıtasıyla hesaplandı. MODELTEST analizinin önermiş olduğu nükleotid değişim modelleriyle birlikte “uncorrelatedlognormalrelaxedclock” saat modeli ve gen bölgeleri için Papadopoulou vd. (2010) tarafından verilmiş baz/milyon yıl oranları girilerek gerçekleştirildi. Veri setleri, “Yuleprocess” ağaç tarama seçeneğiyle ve her 1000’inci simülasyonda örnekleme alınacak biçimde, 80 milyon jenerasyonlu analiz edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Entomoloji Envanteri 'ne kayıtlı olan *Prosimulium rachiliense* örnekleri ile Çizelge 4.1' de sıralanan filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Örnekler Fırat ve Dicle Havzalarının güney kısmı hariç tüm Anadolu'yu kapsayan 42 farklı akarsudan alınmıştır. İstasyonlar Anadolu'nun coğrafik bariyerleri göz önünde bulundurularak 8 farklı populasyon halinde gruplanmış ve filogenetik analizler için toplamda 125 *P. rachiliense* bireyi seçilmiştir (Bkz. Çizelge 3.1).

Çizelge 4.1. Çalışmada uygulanan filogenetik analizler

Çalışılan Gen Bölgesi	Model	Çalışılan Sekans Sayıları	Haplotip Sayıları	Baz Çifti Sayısı	Uygulanan Analizler
COI	GTR+I+G	105	90	1171	BI, MO, MP, ABGD, NetWork, TCS (%90/95), SpeID, BEAST
ITS I-II	GTR+I+G	99	25	884	ML, Network, SplitsTree. ABGD, TCS (90/95), SpeID

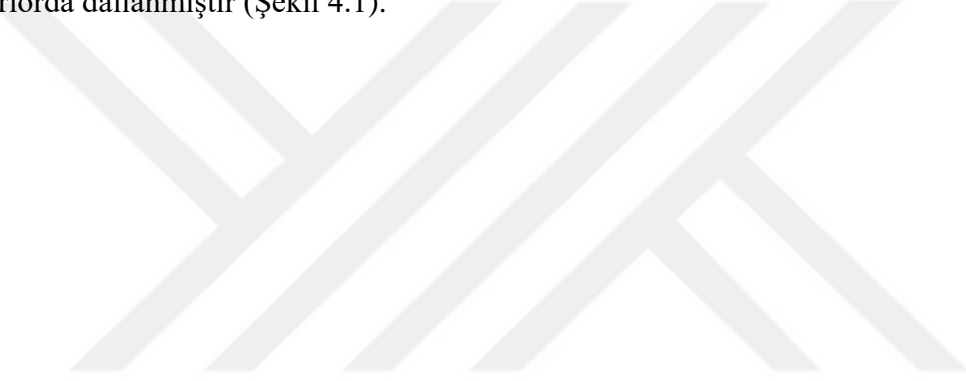
4. 1. Morfotaksonomik Bulgular

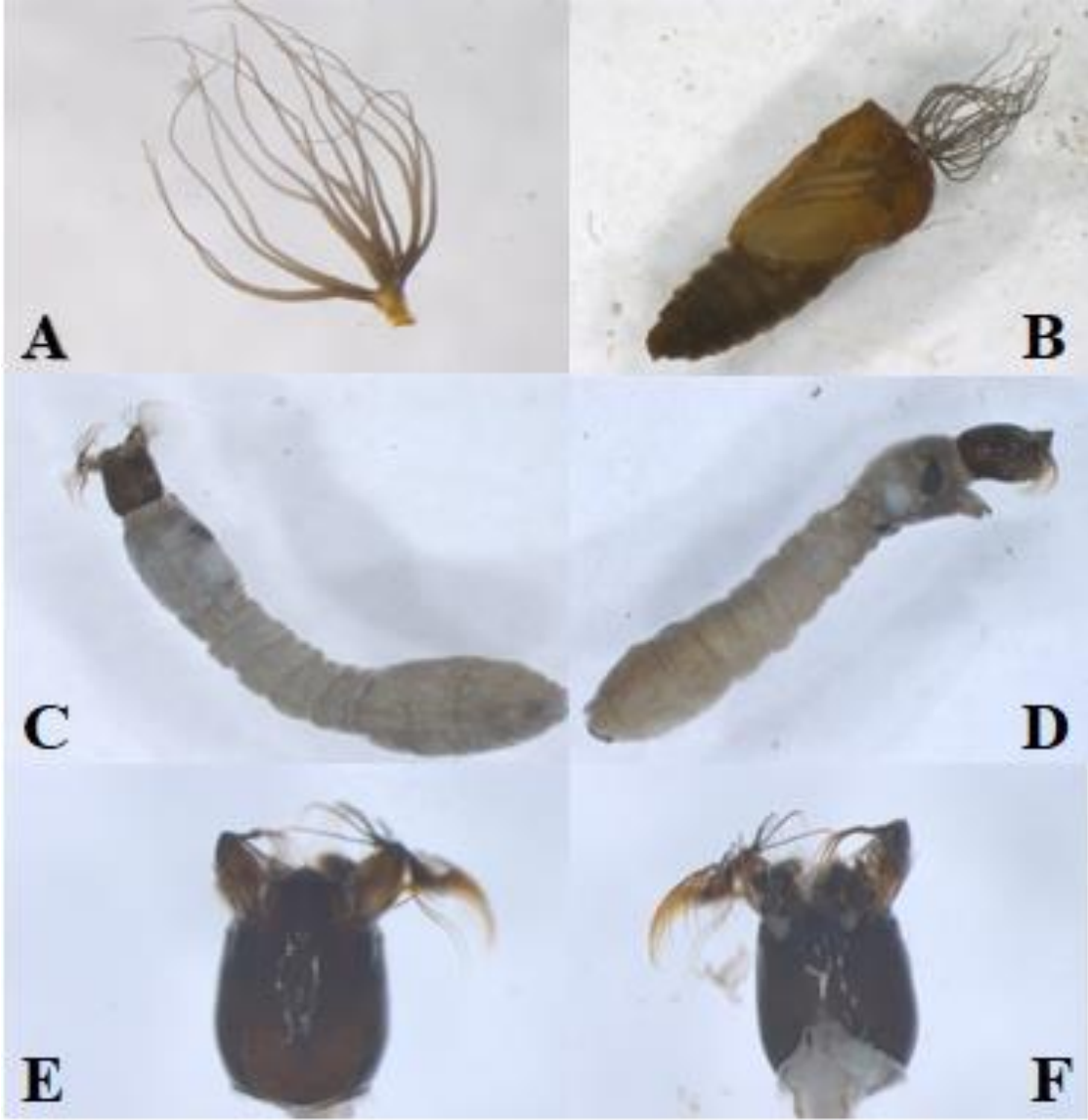
Çalışmada kullanılan larva ve pupaların temel taksonomik karakterleri Rubtsov (1956) ve Terteryan (1968)'da verilen *Prosimulium pronevitschae* Rubtsov, 1955 türüne ait deskripsiyonla uyumludur. Bu tür *P. rachiliense*'nin sinonimidir (Adler, 2021). İncelenen materyalde morfolojik karakterler bakımından anlamlı bir varyasyon gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte larva ve pupaya ait taksonomik karakterler aşağıda verilmiştir.

Pupa: Vücut boyu 4.0-4.2 mm. dir. Kokon gevşek ve düzensiz örlü olup, çoğunlukla vücudu büyük oranda (thoraks dahil) örter. Solunum filamentleri 16 tanedir. Ancak dallanmalarında (2+3) + (2+2+3) + (2+1+1) ya da (3+2+3) + (2+2) + (2+1+1) gibi varyasyonlar görülebilir.

Filamentlerin uzunluğu vücut uzunluğunun yarsını geçmez. Buna karşın filament ortak sapları belirgin şekilde uzundur. Pupa baş bölgesinde temporalde 2 adet, frontalde ise bir çift yüz kıllı taşır. Abdomen sonunda cinsin karakteristiği olan bir çift dikenin inceliği dikkat çeker (Şekil 4.1).

Larva: Vücut boyu 7.0-8.0 mm'dir. Genel vücut rengi koyu gri veya kahverengimsidir. Baş kapsülü koyu renklidir. Apotom benekleri belirgin değildir. Anten 4 segmentlidir. Hypofarinksin papillaları dikkat çekici şekilde küçüktür. Mandibulun 2. ve 3. subapikal dişleri belirgindir. Hypostomiumun median diği güçlü yapıda ve diğerlerinden belirgin şekilde uzundur. Kafa kapsülü ventral yarığı belirgin şekilde derin değildir Ventral papillalar anteriorda dallanmıştır (Şekil 4.1).





Şekil 4.1. *Prosimulium rachiliense* türünün larva ve pupa görüntüleri A.Solenum flamenti, B.Pupa, C.Larva dorsal, D.Larva lateral, E.Larva kafakapsülü dorsal, F.Larva kafa kapsülü ventral

4.2. COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Bulguları

PZR işlemleri ve dizi analizi sonrasında Sequencer v4.1.4 programı ile.ab1 uzantılı dosyaların hizalanmaları gerçekleştirilmiştir. Hizalanma sonrasında nükleotid BLAST programı ile dosyaların doğru gen bölgesi olup olmadığı kontrol edilmiştir. Diziler Mega programında düzenlenip veri bloğu oluşturulmuştur. 125 bireyin sekansları ile oluşturulan veri bloğunda kısa kalan ve bütünlüğü bozan sekanslar çıkarılmıştır. COI gen bölgesi sekansları Mega programı ile hizalandıktan sonra 105 dizi ve 1171 baz çifti uzunluğunda bir set oluşturulmuştur. Bu veri seti ile ikisi dış grup olmak üzere toplam 90 haplotip elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Nükleotidlerin 817/1171'si konservatif, 354/1171'si varyasyonel, 260/1171'i ise parsimonik bilgi vericidir. Oluşturulan dosya, DnaSP, Mega, DAMBE ve Mesquite programları yardımıyla filogenetik analizlerde kullanmak için farklı formatlara dönüştürülüp kaydedilmiştir.

Analizler için seçilen dış grup, familyaya ait 2 farklı cinsten 2 farklı tür seçilmiştir. Seçilen türler, *Metacnephiasubalpina* (Rubtsov, 1956) ve *Simulium (Wilhelmia) sp.* dir. Dış grupların COI gen bölgesi laboratuvarımızda çoğaltılıp analize eklenmiştir.

Çizelge 4.2. *Prosimulium rachiliense* türüne ait 90 haplotipin frekansı ve kodları

Haplotip Numarası	Haplotip Frekansı	Haplotipi Oluşturan Bireyler
Hap_1	1	[119_coi]
Hap_2	1	[118_coi]
Hap_3	1	[116_coi]
Hap_4	2	[115_coi 25Cdenyahpr]
Hap_5	1	[113_coi]
Hap_6	1	[110Ceskbepr]
Hap_7	1	[109Ceskbepr]
Hap_8	1	[107Ckutkarpr]
Hap_9	1	[106Ckutkarpr]
Hap_10	1	[105Ckutfinpr]
Hap_11	1	[104Ckutfinpr]
Hap_12	1	[103Ckutinpr]

Hap_13	1	[102Ckutinpr]
Hap_14	1	[101Csivorpr]
Hap_15	1	[100Csivorpr]
Hap_16	1	[96Cbilyepr]
Hap_17	1	[95Cbilyepr]
Hap_18	1	[93Cburharpr]
Hap_19	1	[92Cburharpr]
Hap_20	1	[91Ckutsokpr]
Hap_21	1	[90Ckutsokpr]
Hap_22	1	[89Ckarsapr]
Hap_23	1	[88Ckarsapr]
Hap_24	1	[87Ckarsapr]
Hap_25	1	[86Cerzkapr]
Hap_26	1	[85Cerzkapr]
Hap_27	1	[84Cerzkapr]
Hap_28	1	[82Cerzkapr]
Hap_29	1	[80Ccordagpr]
Hap_30	1	[79Ccordagpr]
Hap_31	1	[78Ccordagpr]
Hap_32	1	[77Ccordahpr]
Hap_33	10	[76Ccordagpr 70Ckascapr 67Ckascapr 66Ckascapr 65Ckascapr 64Ckaskizpr 60Cyozhapr 59Cyozhapr 58Cyozhapr 57Cyozhapr]
Hap_34	1	[75Ccordagpr]
Hap_35	1	[74Cbaysorpr]
Hap_36:	2	[73Cbaysorpr 71Cbaysorpr]
Hap_37	1	[72Cbaysorpr]
Hap_38	1	[69Ckascapr]
Hap_39	1	[68Ckascapr]
Hap_40	1	[M.subalpina-2]
Hap_41	1	[63Ckaskizpr]
Hap_42	2	[62Ckaskizpr 61Ckaskizpr]

Hap_43	1	[56Cyozhapr]
Hap_44	1	[55Cyozhapr]
Hap_45	1	[54Cyozeypr]
Hap_46	1	[53Cyozeypr]
Hap_47	2	[52Cyozeypr 51Cyozeypr]
Hap_48	1	[50Ceskavpr]
Hap_49	1	[49Csivipr]
Hap_50	1	[48Csivipr]
Hap_51	1	[47Csivhopr]
Hap_52	1	[46Csivorpr]
Hap_53	1	[45Ckaykispr]
Hap_54	1	[44Ckaykispr]
Hap_55	1	[43Ckaykispr]
Hap_56	1	[42Ckaypikpr]
Hap_57	1	[41Ckayzapr]
Hap_58	1	[40Caksakpr]
Hap_59	1	[39Caksakpr]
Hap_60	1	[38Cmugkinpr]
Hap_61	1	[37Cmugsepr]
Hap_62	1	[36Cmugsepr]
Hap_63	1	[34Cantkoppr]
Hap_64	1	[33Cantalpr]
Hap_65	1	[32Cispyepr]
Hap_66	1	[31Cispsipr]
Hap_67	1	[30Cdenderpr]
Hap_68	1	[29Cdenderpr]
Hap_69	1	[28Cdenkoppr]
Hap_70	1	[27Cdenkoppr]
Hap_71	1	[26Cdenkoppr]
Hap_72	1	[24Cdenyahpr]
Hap_73	1	[23Caydakpr]
Hap_74	1	[22Caydakpr]
Hap_75	1	[21Caydakpr]
Hap_76	2	[20Cbalazpr 19Ccandupr]
Hap_77	1	[18Ccandupr]
Hap_78	1	[17Ccandupr]

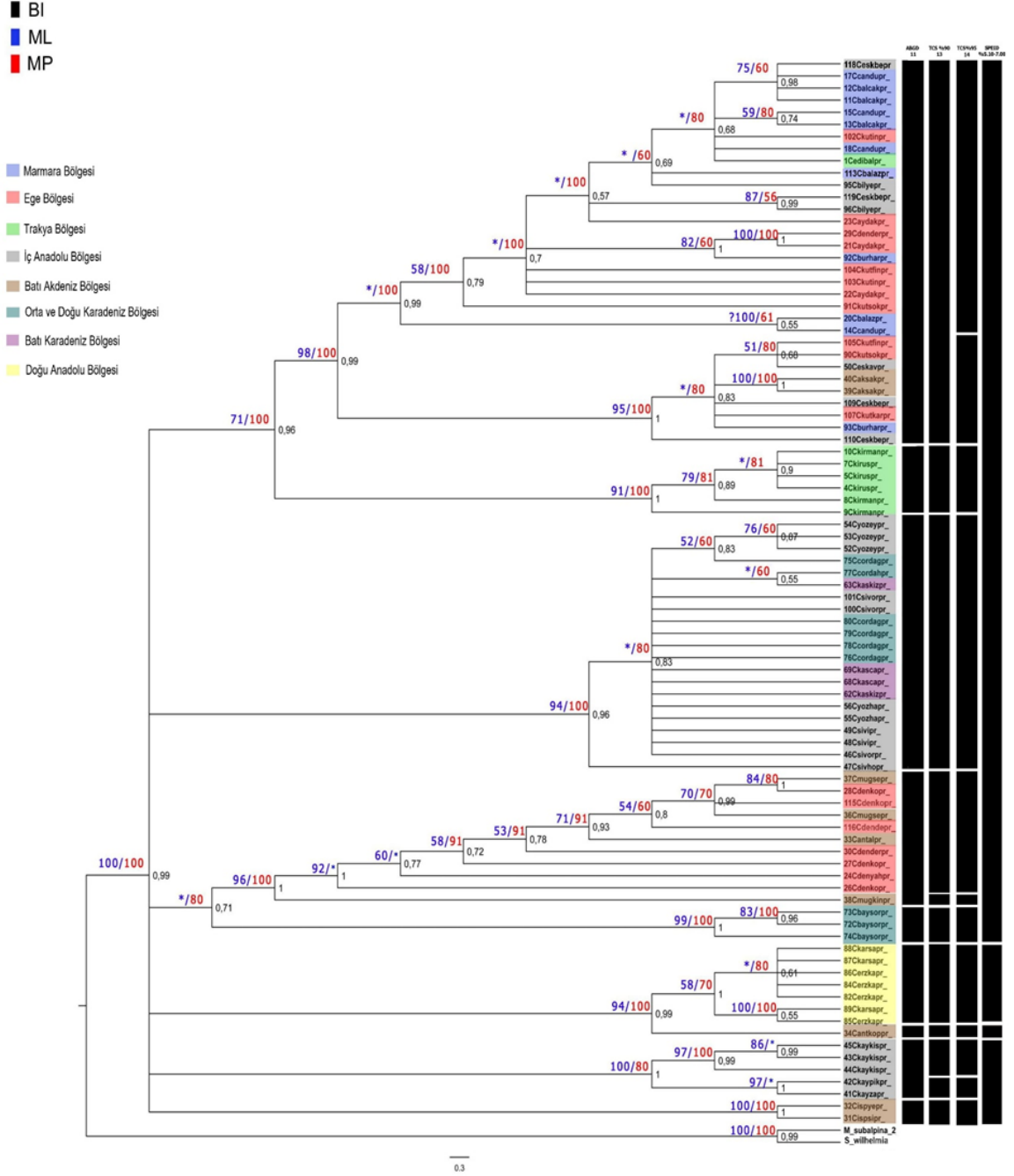
Hap_79	1	[15Ccandupr]
Hap_80	1	[14Ccandupr]
Hap_81	1	[13Cbalcakpr]
Hap_82	1	[12Cbalcakpr]
Hap_83	1	[11Cbalcakpr]
Hap_84	1	[10Ckirmanpr]
Hap_85	1	[9Ckirmanpr]
Hap_86	2	[8Ckirmanpr 6Ckiruspr]
Hap_87	1	[7Ckiruspr]
Hap_88	1	[5Ckiruspr]
Hap_89	1	[4Ckiruspr]
Hap_90	1	[1Cedibalpr]

Elimizdeki veri setine Maksimum Olasılık, Bayesian, Maksimum Parsimoni ve Haplotip Ağı analizleri ile birlikte tür sınırları belirleme testleri ve moleküler saat analizi uygulanmıştır.

BI, MP ve MO analizleri öncesinde dizilere uygun olan baz değişim modeli Jmodeltest programını kullanarak belirlenmiştir. Akaike Information Criterion (AIC)'ye göre uygunluğu en çok olan model GTR+I+G (-lnL=6447.5109) olarak bulunmuştur. Baz frekansları; $\text{freqA} = 0.3257$, $\text{freqC} = 0.1862$, $\text{freqG} = 0.1278$, $\text{freqT} = 0.3602$ olarak saptanmıştır. Substitüsyon modelinin önerdiği baz değişim oranları, R(a) [AC] =1.6159, R(b) [AG] =29,4276, R(c) [AT] =2.2679, R(d) [CG] =0.0000, R(e) [CT] =17.0984, R(f) [GT] = 1.0000 olarak hesaplanmıştır. Değişken bölgelerin oranı (G)= 0.7100, değişmeyen bölgelerin oranı ise (I)= 0.5840 olarak hesaplanmıştır. Önerilen parametreler ve model doğrultusunda analizler gerçekleştirilmiştir.

COI için MP analizi 67133 eş derecede parsimonik ağaç ile sonuçlanmıştır. Veri setine uygulanan, 100 tekrarlı MP analizinde dalların çoğunluğunun yüksek dal destek değeri aldığı görülmektedir. Benzer şekilde MO analizi sonucunda da populasyonlar arası ilişkinin yüksek dal destek değerleriyle iyi şekilde çözümlendiği görülmektedir. Veri seti için aynı model ve parametre ile uygulanan Bayesian analizi ağacı (%50 çoğunluk uyum

ağacı) yüksek dal destek değerleriyle diğer analizlere benzer sonuç vermiştir. COI veri setine uygulanan tüm filogenetik analiz sonuçları BI ağacı üzerinde Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.2. *P. rachiliense* COI haplotiplerinin 90 haplotip veri seti ile oluşturulan BI filogenetik ağacı (ML ve MP analizideğerleri ve tür sınırları belirleme testleri sonuçları ağaç üzerinde verilmiştir)

Analiz sonuçlarının gösterildiği filogenetik ağaç incelendiğinde 4 ana filogrup göze çarpmaktadır (Şekil 4.2.)

1. filogrubun haplotipleri coğrafik olarak Batı Anadolu ve Marmara Bölgesini kapsamaktadır.

Bu filogrup içerisinde Trakya Bölgesi'nden elde edilen Kırklareli haplotiplerinin oluşturduğu haplogrup yüksek dal destek değeriyle (ML:91, MP:100, BI:1) diğer haplotiplerden farklı bir dallanma göstermektedir. Trakya bölgesinin, bol yağış ve yüksek sıcaklık değerleriyle bilinen Akdeniz-Karadeniz iklimi çakışması, İstanbul'un Avrupa yakası ve Kırklareli illerinde görülmekte ve bu bölgede farklı bir coğrafik yapı ve iklim oluşturmaktadır. Kırklareli haplogrubunun farklı bir populasyon şeklinde gruplanması populasyonun bulunduğu bölgenin farklı iklimsel ve coğrafik özellikleri ile ilgili bir sonuç olabileceği değerlendirilmiştir.

Yine bir diğer ilgi çekici sonuç Aksaray ilinden alınan bireylerin oluşturduğu haplotiplerin bu filogrup içerisinde dallanmasıdır. Toros Dağlarının üst kısmından elde edilen bu bireyler İç Anadolu ya da Akdeniz haplotipleriyle değil Batı Anadolu filogrubu içinde dallanmıştır.

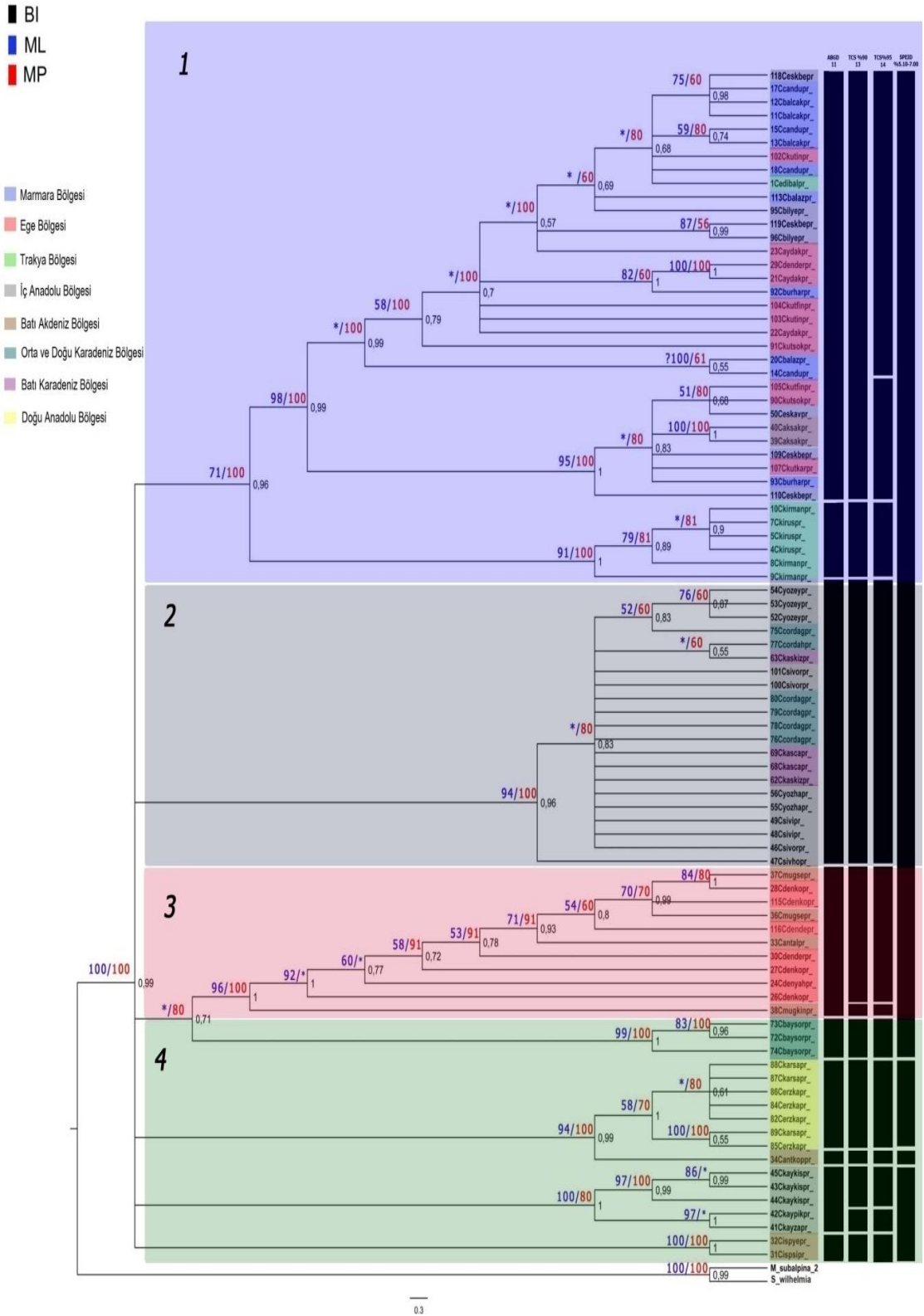
Bu filogrup içerisindeki yüksek dal destek değerleri alan diğer haplogrupların dallanma yapısına bakıldığında farklı populasyonların iç içe gruplandığı ve bütünsel coğrafik bir örüntü verdiği görülmektedir. Bu nedenle Batı Anadolu ve Marmarahaplotiplerinin tek bir filogrup olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

2. filogrup İç Anadolu Bölgesi'nin kuzeyi ve Karadeniz Bölgesi haplotiplerini kapsamaktadır. Her üç filogenetik analizden de yüksek dal destek değeri olmasına karşın (ML:94, MP:100, BI:0,96) haplotiplerin dallanma yapısı politomiktir. Analizlere başlanılmadan önce haplotiplerin coğrafik konumları dikkate alınmış ve 3 farklı populasyon olarak verilmiştir. Oysaki analiz sonuçları bu 3 populasyonun (İç Anadolu- Orta ve Batı Karadeniz) tek bir populasyon gibi şekillendiğini göstermektedir.

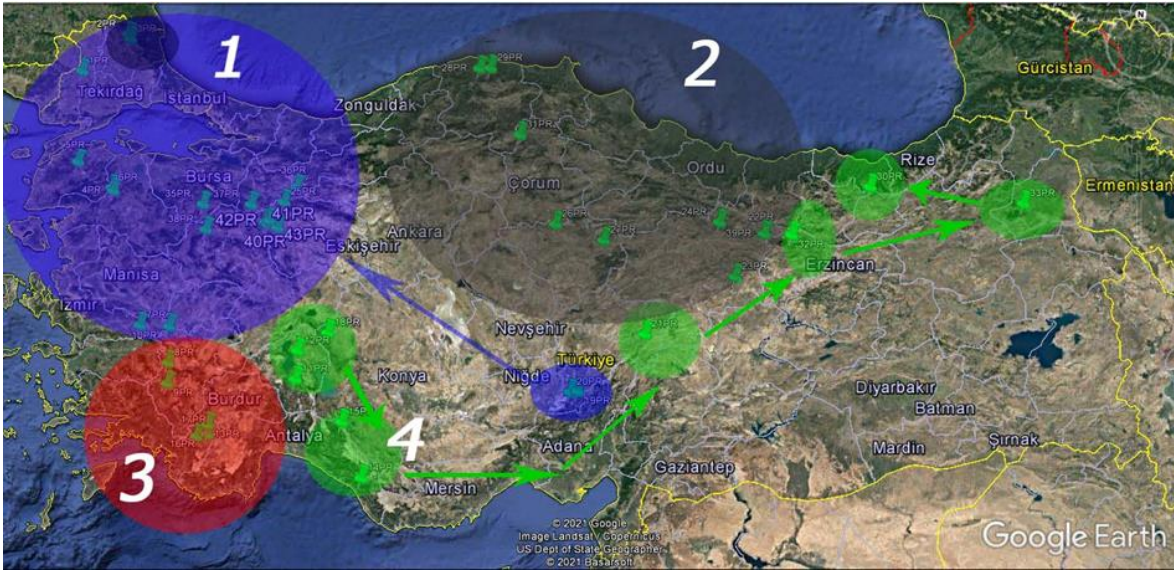
3. filogrup haplotiplerin coğrafik dağılışı Teke Yarımadasının batısı ve kuzeyini kapsamaktadır. Filogenetik analiz sonuçları bu grubun, Batı Anadolu'nun güneyinde kalmış periferik bir populasyon yapısı gösterdiğine işaret etmektedir.

4. filogrup 4 farklı haplogrubun birleşiminden oluşmaktadır. Bunlar; Isparta-Antalya haplotipleri, Kayseri haplotipleri, Erzincan-Kars haplotipleri ve Bayburt haplotipleridir. Bu haplogrupların bir arada değerlendirilmesinin sebebi haplotiplerin coğrafik konumlarının Güney Batı Anadolu'dan başlayıp Doğu Anadolu'da sonlanan, Anadolu'nun iki büyük genetik çeşitlilik bariyeri olan Toroslar ve Anadolu diyagonalini takip etmesidir. Bu dispersal dağılış rotası Çıplak (2008) tarafından "Toros Yolu" olarak isimlendirilmiştir.

Batı Akdeniz populasyonundan elde edilen haplotiplerfilogenetik ağaçta farklı populasyonların içerisine dağılmış ve yüksek dal destek değerleri almıştır. Bu veri ile *P. rachiliense* türünün Anadolu populasyonlarının genetik çeşitlilik merkezinin Batı Akdeniz olduğu ve bu haplotiplerinatasalhaplotipler olduğu yorumu yapılabilir. Şekil 4.3'de gösterildiği gibi 4. filogrubun coğrafik dağılışı "Toros Yolu" rotası ile yorumlandığında anlam kazanmaktadır. Bu nedenle filogenetik ağaç üzerinde her üç filogenetik analizden de oldukça yüksek dal destek değeri alan bu küçük haplogruplar birlikte değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Filogenetik analizlerin 4 ana filogrup olarak değerlendirilmesi



Şekil 4.4. COI gen bölgesi filogeneti analizleri sonucu elde edilen filogrupların Türkiye haritası üzerinde coğrafik konumlanmaları ve Toros yolu rotası

Populasyonlar arasındaki olası farklılaşmanın belirlenmesi için 3 farklı tür sınırları belirleme testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). ABGD ve TCS (%90-95) testleri hemen hemen benzer sonuçlar verirken SpeID testi populasyonları farklı gruplandırmıştır.

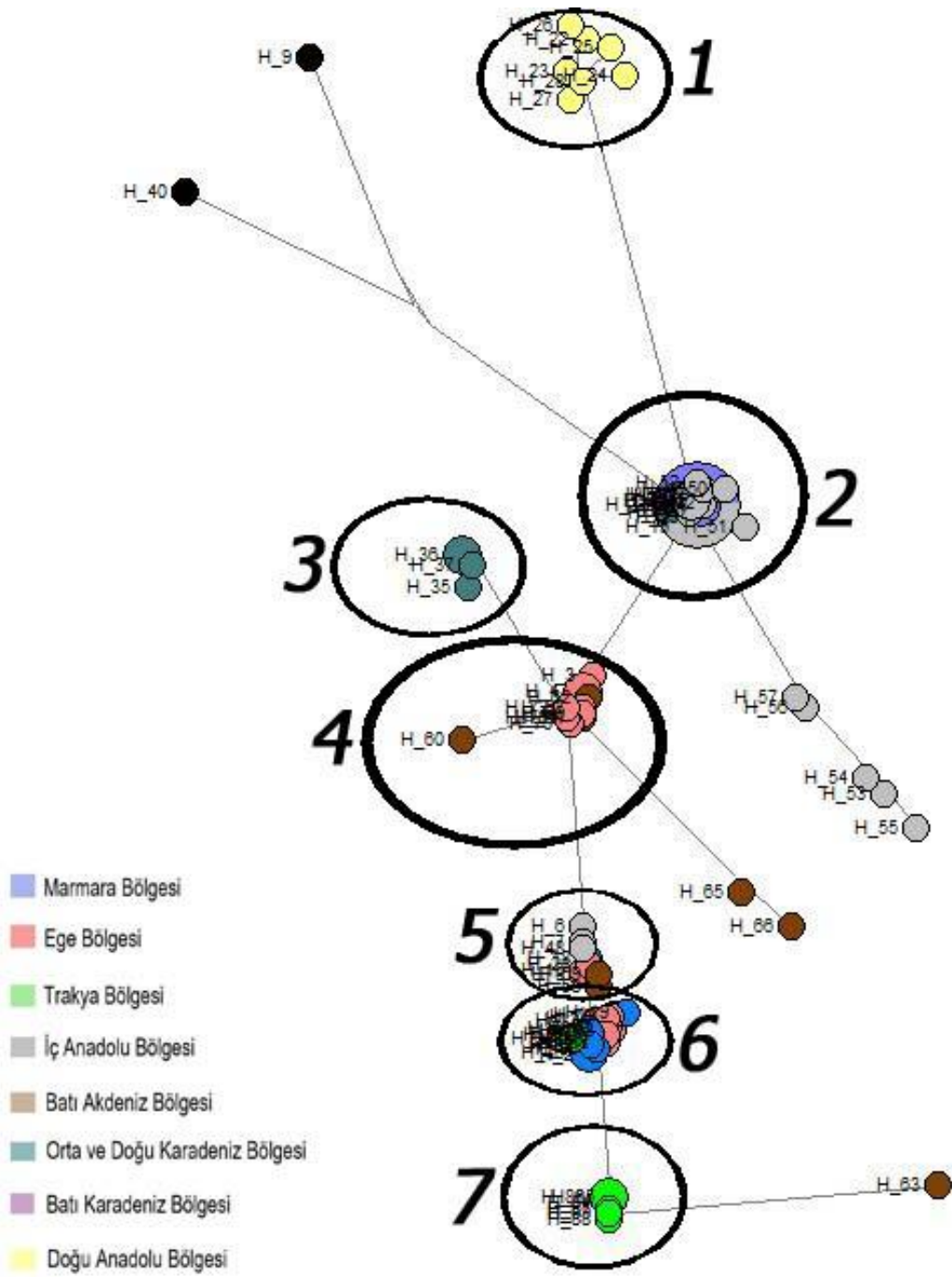
ABGD testi, veri setinde 9 farklı tür önermektedir. Bu sonuçlar filogenetik analizlerle (BI, MO, MP) örtüşmektedir. 1, 2 ve 3. filogruplar ayrı türler olarak önerilirken Toros rotası üzerinde toplu olarak değerlendirilen 4. filogrubun her bir haplogubunu da ayrı bir tür olarak önermiştir. Filogenetik analizlerde de yüksek dal destek değerleri ile ayrılan bu haplogruplar coğrafik olarak önemli bir bariyer üzerinde farklılaşmakta olan populasyonlar olarak değerlendirilebilir.

TCS %90 ve %95 değerli testlerinde de genel haplotip gruplanma yapısı itibariyle ABGD testine benzer sonuçlar vermiştir. TCS (%90) testi ABGD den farklı olarak "38mugkinpr" haplotipi ve "41kayzapr-42kaypikpr" haplotiplerini de farklı türler olarak değerlendirmiş ve toplamda 11 tür önermiştir. TCS (%95) testinde ise aynı 11 tür önerisine ek olarak Batı Anadolu içinde Bursa-Eskişehir-Aksaray haplogrubu 12. tür olarak görülmektedir.

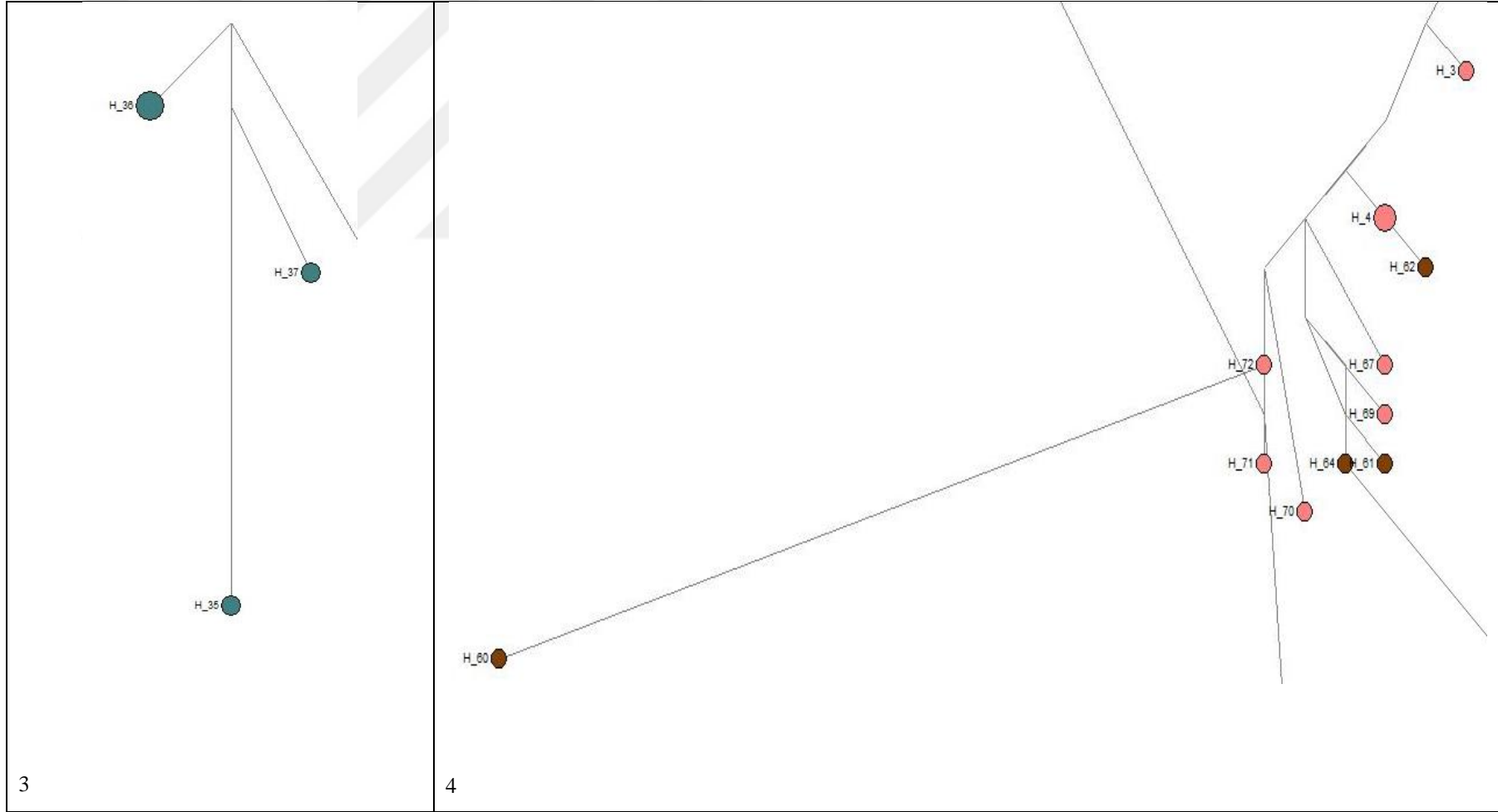
SpeID testinde ise farklı bir örüntü görülmektedir. Bu test sonucuna göre veri seti bize 4 tür önermektedir. Tüm Orta ve Batı Anadolu'yu ilk tür olarak, "Kayseri-Isparta" haplotiplerini 2. tür olarak önermektedir. SpeID testinin 3. ve 4. tür haplotipleri tüm analizler tarafından ortak sonuç olarak önerilmiştir. Bunlar; "Erzincan-Kars"haplotipleri ve "34antkoppr" haplotipidir.

"34antkoppr" haplotipinin tüm analizler tarafından ayrı bir tür olarak önerilmesi ve filogenetik ağaç içerisinde Batı Akdeniz haplotiplerinin dağınık şekilde dallanması genetik çeşitlilik merkezinin bu bölge olduğu çıkarsamamızı güçlendirmektedir.

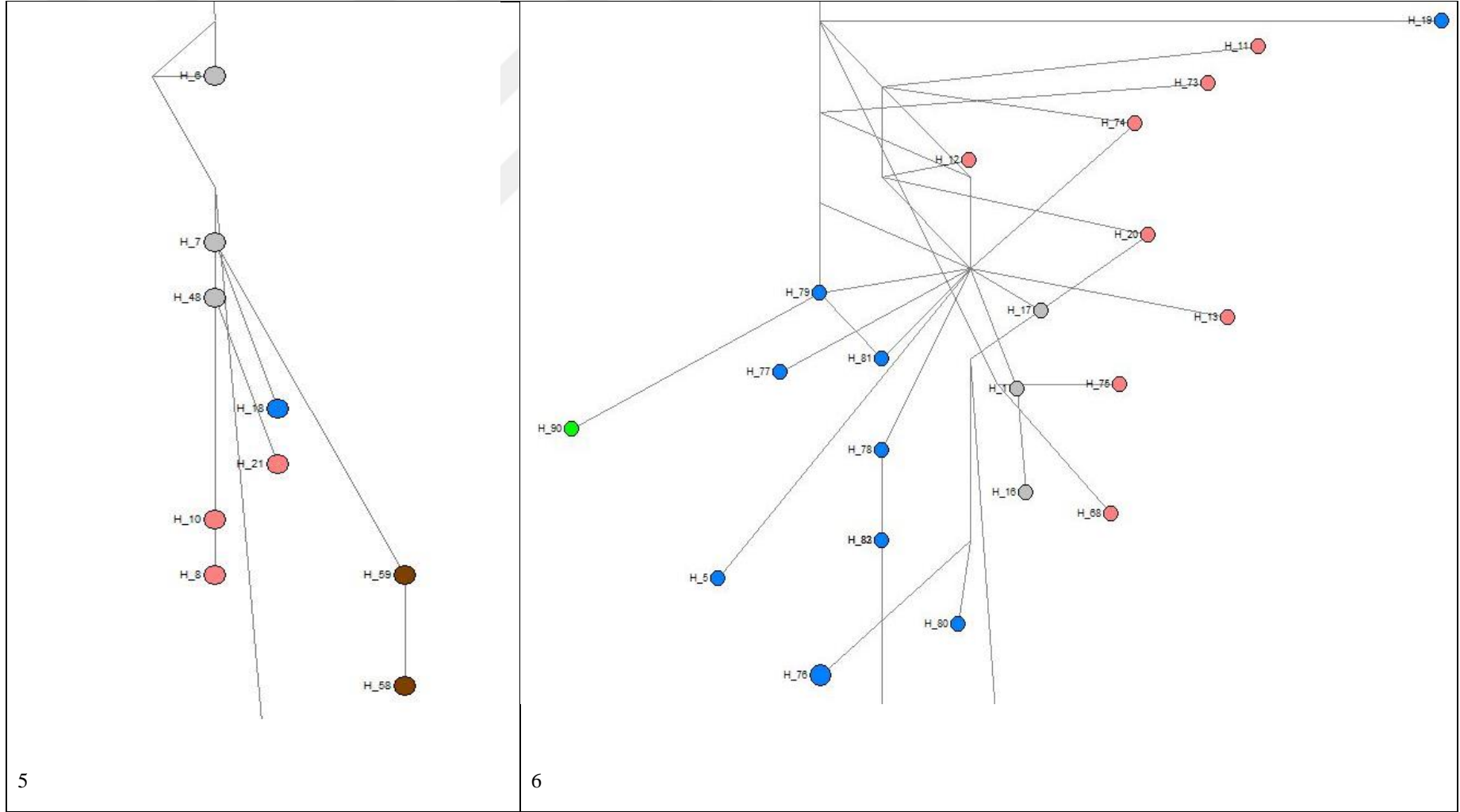
P. rachiliense COI veri setine uygulanan haplotip ağı analizi sonuçları filogenetik analiz sonuçlarıyla örtüşmüştür. Analiz şekli incelendiğinde kahverengi ile belirlenmiş olan Batı Akdeniz haplotiplerinin tüm ağ içerisinde dağılmış halde olduğu ve farklı popülasyonlara ait haplotiplerle birlikte gruplandığı net bir biçimde görülmektedir. Yine filogenetik analizlerle benzer şekilde Doğu Anadolu popülasyonu, Trakya popülasyonu, Batı Anadolu-Marmara popülasyonu gibi temel popülasyonların ağ içerisinde belirgin ayrımlar gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.5; Şekil 4.6).



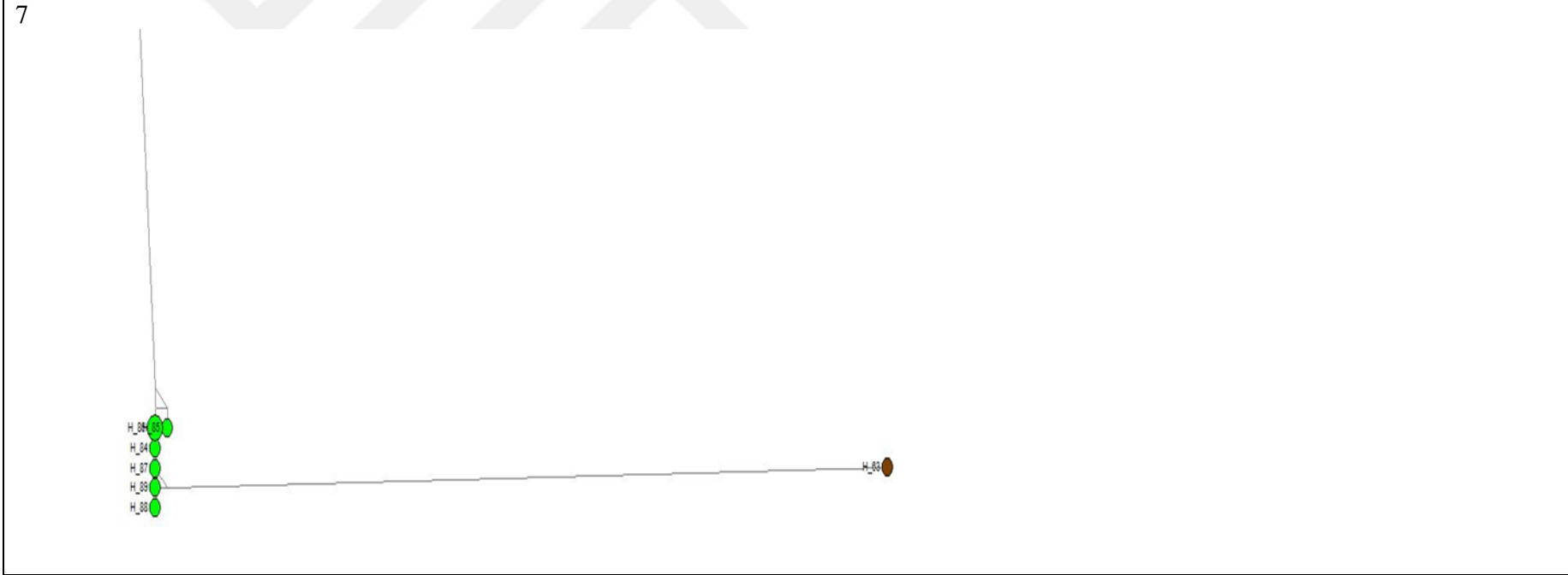
Şekil 4.5. COI Haplotip ağı analizi sonucu (Network programı)



Şekil 4.6. (devam) COI Network analizi sonucu haplotiplerin ayrıntılı görüntüleri (3-4)



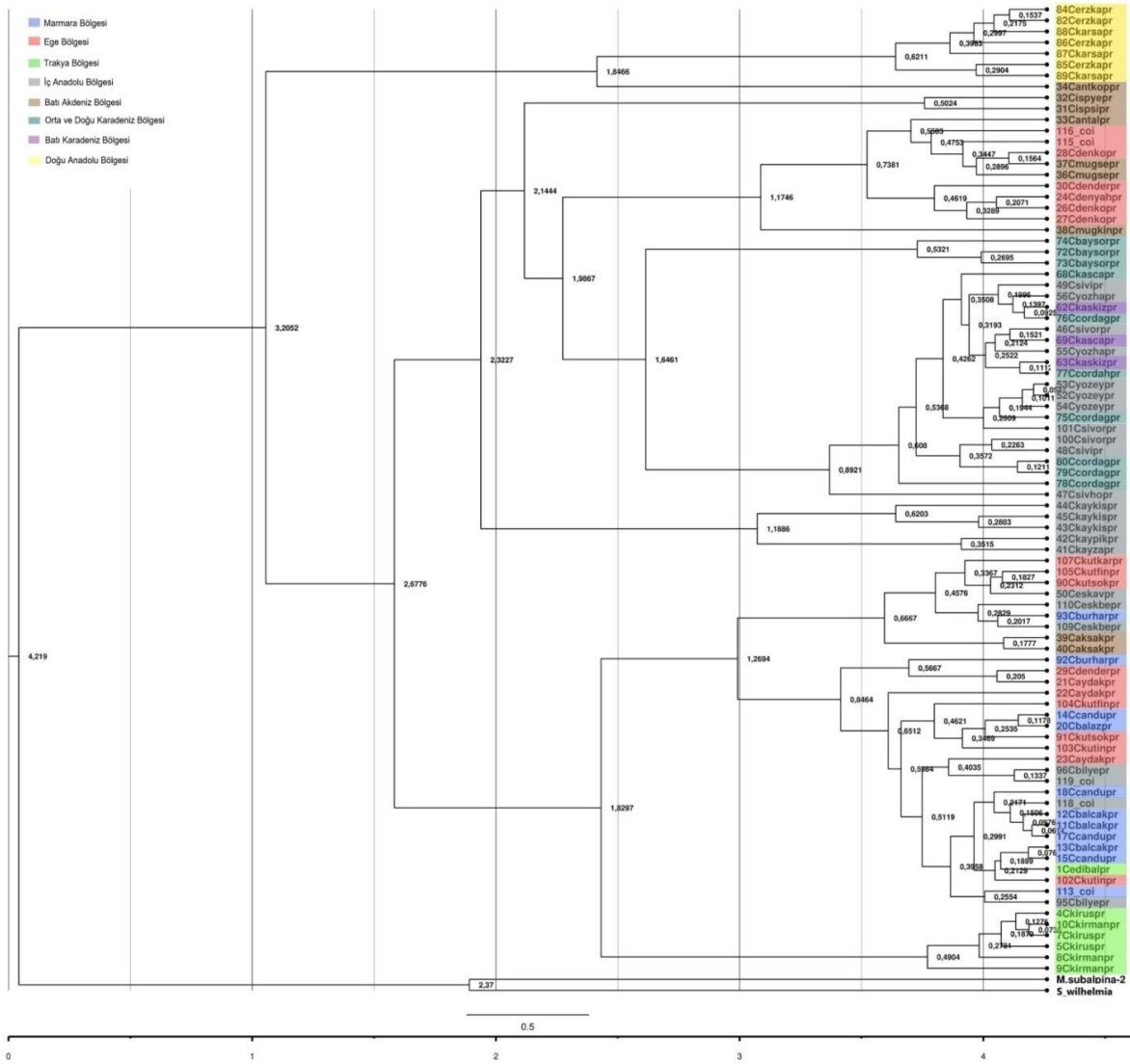
Şekil 4.6. (devam) COI Network analizi sonucu haplotiplerin ayrıntılı görüntüleri. (5--6)



Şekil 4.6. (devam) COI Network analizi sonucu haplotiplerin ayrıntılı görüntüleri. (7)

Moleküler saat analizi sonucu da filogenetik analizlerle paralel sonuçlar vermiştir (Şekil 4.7); analize göre iç grupta 1. filogrup olarak değerlendirdiğimiz Batı Anadolu-Marmara ve Trakya populasyonları 1,82 myö ortak ataya sahiptir. 1. filogrup ile 2. ve 3. filogrup haplotiplerinin 2,67 myö ortak ataya sahip olduğu görülmektedir. En uzak moleküler saat aralığı veren sonuç ise; Doğu Anadolu ve 34antkoppr haplotiplerinin oluşturduğu populasyondur. Bu populasyon ile diğer populasyonların 3,20 myö ortak ataya sahip oldukları tespit edilmiştir. Analiz incelendiğinde genel anlamda *P. rachiliense* türünün Anadolu popülasyonlarının haplotip yoğunluğu ile değerlendirildiğinde 2,67 myö (Pliyosen-Pleyistosen geçişi) çeşitlenmeye başladığı yorumu yapılabilir.





Şekil 4.7 COI gen bölgesi veri haplotiplerinin BEAST kronogramı ve jeolojik devirler cetveli

4.3. COI gen bölgesi için elde edilen genetik çeşitlilik bulguları

P. rachiliense'nin Anadolu lokaliteleri coğrafik bariyerler göz önüne alınarak 8 popülasyon şeklinde gruplandırılmıştır. Bu popülasyonların genetik çeşitliliğini saptayabilmek amacıyla her bir popülasyonun veri seti için ayrı ayrı; Haplotip çeşitliliği (hç),

Haplotip sayısı (hs), değişken bölge sayısı (db), nükleotid çeşitliliği (π) hesaplanmıştır. Her popülasyonda Tajima'nın D ve Fu'nun Fs değerleri, nükleotid dizileri arasında nötral süreç uzaklaşması olup olmadığını saptamak amacıyla hesaplanmıştır. Tüm hesaplamalar DnaSP5 Programı ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3.).

Genetik çeşitlilik testi sonuçlarına göre COI veri setindeki en yüksek haplotip çeşitliliği değerleri sırasıyla Batı Akdeniz (1,0000) ve Doğu Anadolu (1,0000) popülasyonlarında görülürken en düşük haplotip çeşitliliği Batı Karadeniz (0,7556) popülasyonunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. COI veri seti ile hesaplanan genetik çeşitlilik indeksleri ve nötralite testleri sonuçları (SU=sekans uzunluğu, N=toplam sekans sayısı, HS=Haplotip sayısı, DB=değişken bölge sayısı, π =nükleotid çeşitliliği, HÇ=Haplotip çeşitliliği, Fs= Fu'nun Fs'si, D= Tajima' Tajima'nın D'si)

POPULASYONLAR	N	SU	DB	HS	HÇ	π	D	Fs
Tüm Popülasyonlar	105	1171	354	90	0,9907	12,51078	-0,21509	-33,3
Trakya Popülasyonu	8	1171	55	7	0,9643	12,39722	-1,40587	-0,699
Marmara popülasyonu	12	1171	53	11	0,9848	12,35060	-1,28915	-3,335
Batı Akdeniz popülasyonu	9	1171	190	9	1,0000	12,35200	-0,06747	0,429
Batı Karadeniz popülasyonu	10	1171	7	5	0,7556	12,52678	-1,16172	-2,371
Orta ve Doğu Karadeniz popülasyonu	10	1171	69	9	0,9778	12,47784	0,97197	-0,686
Doğu Anadolu popülasyonu	7	1171	30	7	1,0000	12,02047	-0,93505	-1,519
İç Anadolu popülasyonu	28	1171	134	24	0,9815	12,35373	0,93216	-5,351
Ege Popülasyonu	19	1171	118	18	0,9942	12,88560	0,8645	-3,228

Tajimanın D si açısından sonuçlar incelendiğinde pozitif değer veren popülasyonların; Orta ve Doğu Karadeniz popülasyonu, İç Anadolu popülasyonu ve Ege popülasyonu olduğu en düşük negatif değere sahip popülasyonun ise (-1,40587) değeri ile Trakya popülasyonu olduğu görülmektedir.

Filogenetik ve haplotip ağı analizlerinde işaret ettiği şekilde Trakya popülasyonunun Marmara popülasyonu içerisinde bir darboğaz etkisi ile farklılaşmakta olduğu yorumu yapılabilir. Fs değeri açısından anlamlı bir sonuç vermemiştir.

4.4. ITS1- ITS2 Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Bulguları

COI gen bölgesi ile aynı şekilde; PZR işlemleri ve dizi analizi sonrasında Sequencer v4.1.4 programı ile. ab1 uzantılı dosyaların hizalanmaları gerçekleştirilmiştir. Hizalanma sonrasında nükleotid BLAST programı ile dosyaların doğru gen bölgesi olup olmadığı kontrol edilmiştir. Diziler Mega programında düzenlenip veri bloğu oluşturulmuştur. 125 bireyin sekansları ile oluşturulan veri bloğunda kısa kalan ve bütünlüğü bozan sekanslar çıkarılmıştır. ITS1-2 gen bölgesi sekansları Mega programı ile hizalandıktan sonra 99 dizi ve 884 baz çifti uzunluğunda bir set oluşturulmuştur. Bu veri seti ile biri dış grup olmak üzere toplam 25 allel elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Nükleotidlerin 678/884'si konservatif, 196/884'si varyasyonel, 41/884'i parsimonik bilgi vericidir. Oluşturulan dosyada, DnaSP, Mega, DAMBE ve Mesquite programlarının yardımıyla filogenetik analizlerde kullanmak için farklı formatlara dönüştürülüp kaydedilmiştir.

Çizelge 4.4. *Prosimulium rachiliense* türüne ait ITS1-2 gen bölgesi 25 allelin frekansı ve kodları

Haplotip numarası	Haplotip frekansı	Haplotipi oluşturan bireyler
Hap_1	1	[FJ538878.S.aureohirt] dış grup
Hap_2	7	[100Isivorpr 46Isivorpr 47Isivhopr 48Isivipr 49Isivipr-2 50Ieskavpr-2 77Icordahpr]
Hap_3	62	[101Isivorpr 102Ikutinpr 107Ikutkarpr 10Ikirmanpr 113Ibalazpr 114Idenkopr 115Idenkopr 116Idendepr 118Ieskbpr 11Ibalkapr 12Ibalkapr 13Ibalkapr 18Icandupr 21Iaydakpr 22Iaydakpr 23Iaydakpr 24Idenyahpr 31Iispsipr 33Iantalpr 33Iantalpr-2 36Imugsepr 37Imugsepr 38Imugkinpr 39Iaksakpr 40Iaksakpr 49Isivipr-1 4Ikiruspr 50Ieskavpr-1 51Iyozeypr 52Iyozeypr 53Iyozeypr 54Iyozeypr 55Iyozhapr 5Ikiruspr 61Ikaskizpr 62Ikaskizpr 63Ikaskizpr 64Ikaskizpr 65Ikascapr 66Ikascapr 67Ikascapr 68Ikascapr 69Ikascapr 70Ikascapr 75Icordagpr 78Icordagpr 7Ikiruspr 80Icordagpr 84Ierzkapr 85Ierzkapr]

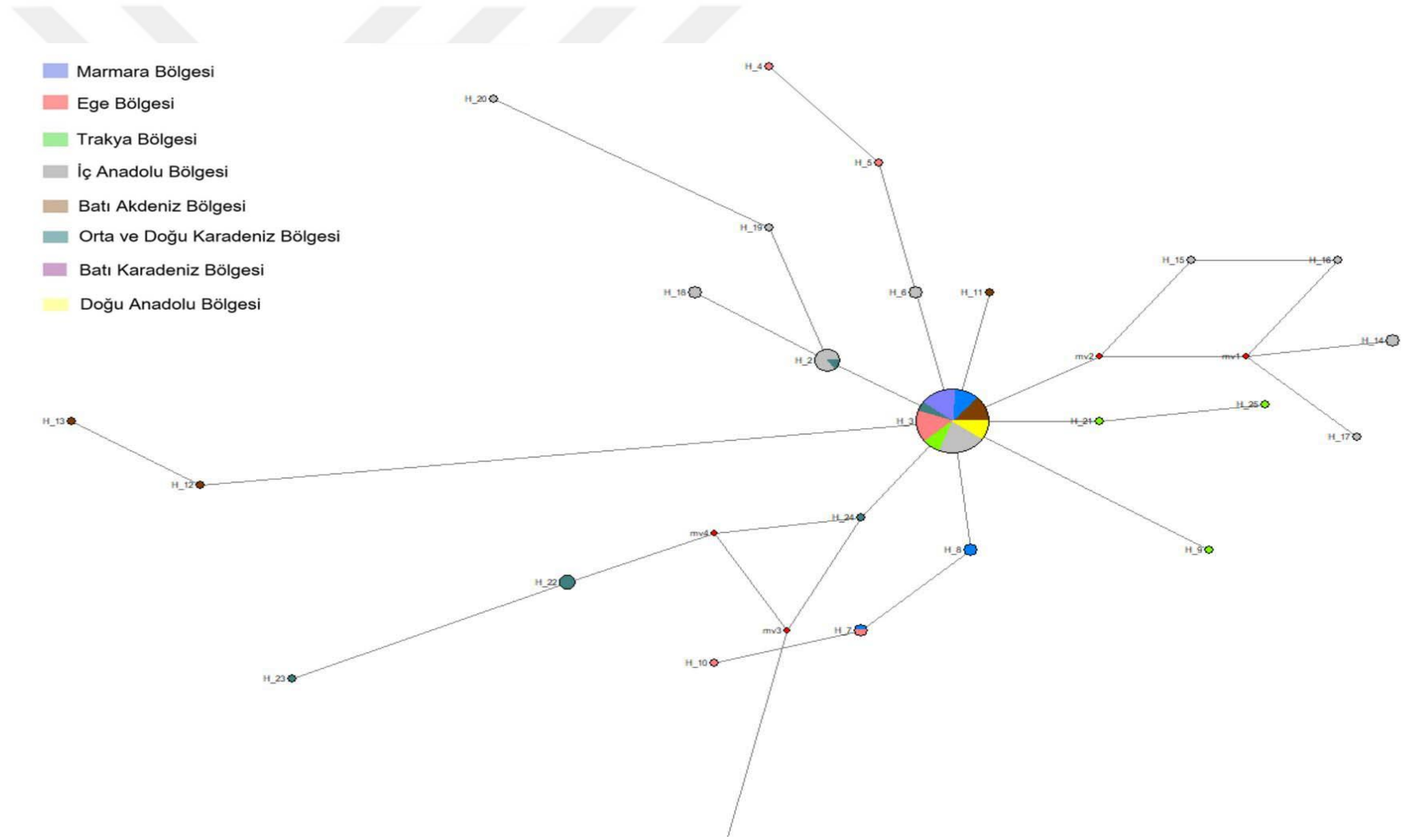
		86Ierzkapr 87Ikarsapr 88Ikarsapr 89Ikarsapr 91Ikutsokpr 92Iburharpr 93Iburharpr 94Ieskmapr 95Ibilyepr 96Ibilyepr 97Ibilyepr 9Ikirmanpr]
Hap_4	1	[103Ikutinpr]
Hap_5	1	[104Ikutfinpr]
Hap_6	2	[109Ieskbep 110Ieskbep]
Hap_7	2	[14Icandupr 25Idenyahpr]
Hap_8	2	[15Icandupr-1 15Icandupr-2]
Hap_9	1	[1Iedibalpr]
Hap_10	1	[28Idenkopr]
Hap_11	1	[32Iispyepr]
Hap_12	1	[34Iantkoppr-1]
Hap_13	1	[34Iantkoppr-2]
Hap_14	2	[41Ikayzapr 43Ikaykispr]
Hap_15	1	[44Ikaykispr-1]
Hap_16	1	[44Ikaykispr-2]
Hap_17	1	[45Ikaykispr]
Hap_18	2	[56Iyozhapr 58Iyozhapr]
Hap_19	1	[57Iyozhapr]
Hap_20	1	[59Iyozhapr]
Hap_21	1	[6Ikiruspr]
Hap_22	3	[71Ibaysorpr 72Ibaysorpr 74Ibaysorpr]
Hap_23	1	[73Ibaysorpr]
Hap_24	1	[79Icordagpr]
Hap_25	1	[8Ikirmanpr]

MO analizini yapmadan öncesinde dizilere uygun olan baz değişim modeli Jmodeltest programını kullanarak bulunmuştur. Akaike Information Criterion (AIC)'ye göre uygun olan model GTR+I+G (-lnL=3474.2065) olarak bulunmuştur. Baz frekansları; freqA =0.3522, freqC =0.1453, freqG =0.1687, freqT = 0,3338 olarak bulunmuştur. Substitüsyon modelinin önerdiği baz değişim oranları R(a) [AC] =1.0000, R(b) [AG] =1.5797, R(c) [AT] =0.9363, R(d) [CG] =0.9363, R(e) [CT] =1.5797, R(f) [GT] = 1.0000 olarak hesaplanmıştır. Değişken bölgelerin oranı (G)=1.3960, değişmeyen bölgelerin oranı ise (I)= 0.8200 değerinde hesaplanmıştır. Önerilen model ve parametreler doğrultusunda analiz gerçekleştirilmiştir. Veri seti ile gerçekleştirilen Maksimum Olasılık analizisonucunda

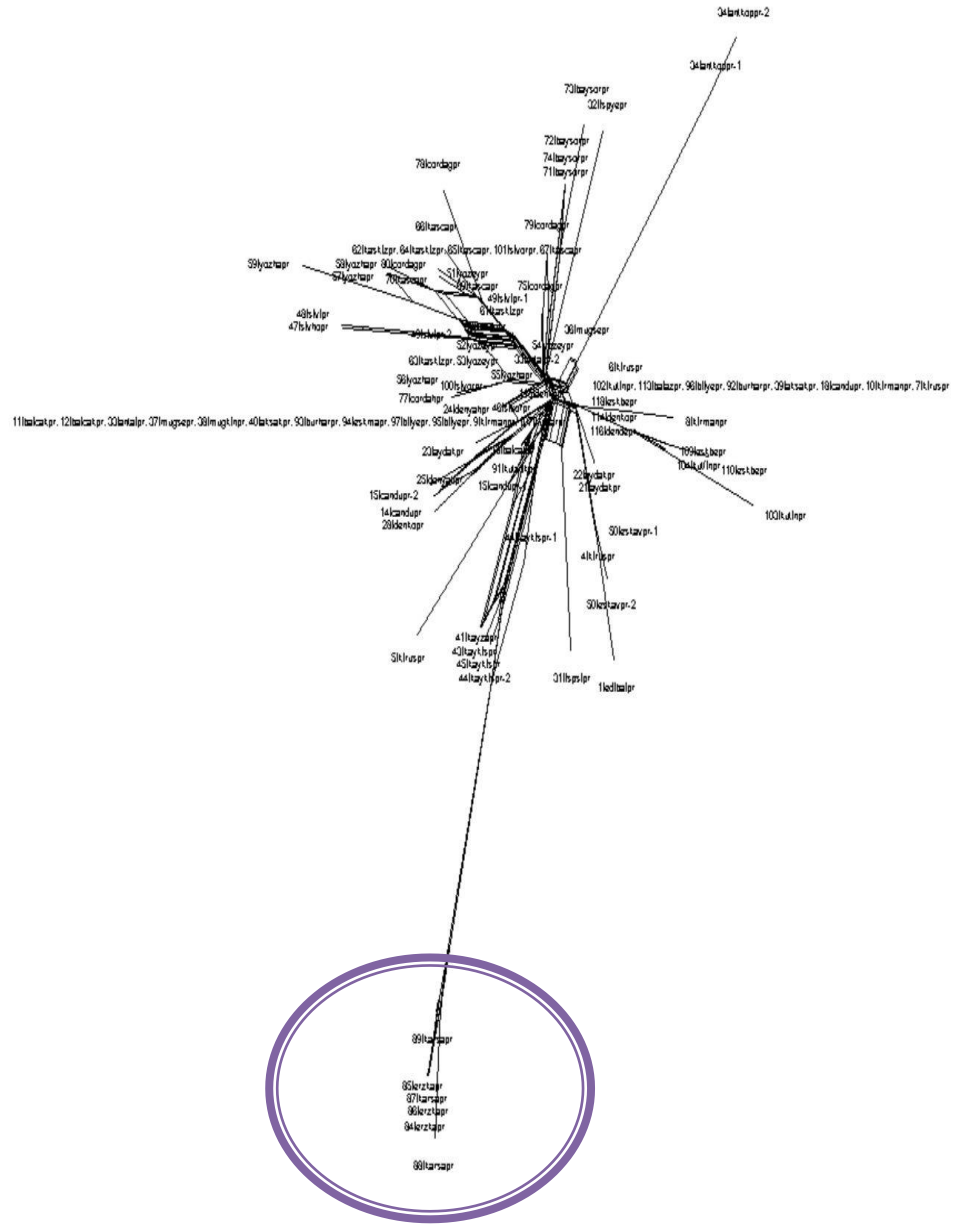
populasyonlar arası ilişkinin iyi şekilde çözümlenmediği görülmektedir. Analizde haplotipler düşük dal destek değeriyle politomik dallanmışlardır. Doğu Anadolu populasyonu haricinde herhangi bir populasyon örüntüsü tespit edilememiştir.

Tür sınırları belirleme testlerinin hepsi aynı sonucu vermiştir. Testlere göre *P. rachiliense*'nin Anadolu populasyonları ITS 1-2 gen bölgesi ile değerlendirildiğinde tek tür olarak önerilmektedir (Şekil 4.8).





Şekil 4.9. ITS 1-2 veri seti Allel ağı analizi sonucu (Network programı)



Şekil 4.10. ITS 1-2 veri seti Allel ağı analizi sonucu (SplitsTree programı)

Allel listesinde de görüldüğü üzere türler arasında allel paylaşımının çok olması nedeniyle, haplotipler arasındaki evrimsel ilişki, SplitsTree ve Network v.5.0.0.3 programlarıyla analizleri yapılmıştır.

P. rachiliense ITS 1-2 veri setine uygulanan allel ağı analizi sonuçları filogenetik analiz sonuçlarıyla örtüşmüştür. Network analizinde haplotiplerin örüntüsüz şekilde bir ağ oluşturduğu görülürken (Şekil 4.9) bir diğer allel ağı analizi olan SplitsTree analizinde Doğu Anadolu popülasyonuna ait haplotiplerinin ana haplotip yumağından ayrıldığı

gözlemlenmektedir (Şekil 4.10). Maksimum olasılık analizi sonucunda oluşturulan filogenetik ağaçta Doğu Anadolu popülasyonuna ait haplotiplerinin ana politomik dallanmadan ayrı bir haplogrup oluşturduğu görülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anadolu eşsiz bir biyolojik çeşitliliğe sahiptir. Coğrafik ve iklimsel koşulların farklı vejetasyon tiplerini meydana getirmesi ve bunların tüm Anadolu'da doğal geçiş kuşakları oluşturması neticesinde ülkemiz faunal açıdan oldukça yüksek tür sayısına sahiptir.

Anadolu'da mevcut biyolojik çeşitliliğin bir diğer nedeni de oldukça kuvvetli karasal (Anadolu diyagonali, Toroslar vb.) ve sucul bariyerlerin (Fırat, Kızılırmak nehir havzaları) popülasyonların izole kalmasına neden olabilmesidir. Aynı şekilde geniş bir coğrafyada yayılış gösteren türlerin tanımlanmasında bazen zorluklar yaşanmaktadır. Bir türün farklı bölgelerdeki popülasyonlarına ait bireyler arasında görülebilen morfolojik karakterlerdeki ufak bir varyasyon ya da buna zıt şekilde çevresel koşulların etkisiyle farklı türlerin bireylerinde görülen morfolojik benzerlik taksonomistlere problem oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, Palearktik Bölge'de Kafkaslar, Balkanlar ve Kuzey Afrika'da görülen ve Anadolu'da geniş yayılışa sahip *P. rachiliense* türü popülasyonlarının genetik çeşitliliği 2 gen bölgesi ile araştırılmıştır. Çalışma türün Anadolu'nun farklı bölgelerindeki popülasyonlarını temsil edecek çok sayıda lokaliteden örneklenmiş 125 birey ile gerçekleştirilmiştir. Bu bireyler üzerine 2 genetik belirteç (COI ve ITS1-2) kullanılarak aralarındaki filogenetik ilişkiyi ve genetik çeşitliliği ortaya çıkaracak toplam 9 farklı analiz yapılmıştır. Çalışma sonucunda oldukça ilginç ve önemli sonuçlar elde edilmiştir.

COI ile yapılan filogenetik analizlerde 105 dizi ile oluşturulan veri setinde 90 haplotip önerilmiştir. Elde edilen veri setine Haplotip ağı analizleri, Maksimum Parsimoni, Maksimum Olasılık ve Bayesian, moleküler saat analizi ve tür sınırları testleri uygulanmıştır.

Her 3 filogenetik analizde de (BI, MO, MP) benzer sonuçlar alınmıştır. Elde edilen veriler tek filogenetik ağaç üzerinde değerlendirilmiş ve 4 ana filogrup üzerinden yorumlanmıştır. Buna göre;

Batı Anadolu ve Marmara Bölgesini kapsayan 1. Filogrubun haplotipleri içerisinde Kırklareli haplotiplerinin farklı bir dallanma gösterdiği görülmüştür. Bu sonuç Kırklareli haplogrubunun elde edildiği lokalitenin farklı iklimsel ve coğrafik özellikleri ile

ilişkilendirilmiştir. Aksaray ilinden alınan bireylerin oluşturduğu haplotipler de ilginç şekilde bu filogrup içerisinde dallanmıştır. Bu sonuç Torosların kuzeyinde yaşayan populasyonlar ile Batı Anadolu populasyonları arasında süregelen bir bağlantı olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

İç Anadolu Bölgesi'nin kuzeyi ve Karadeniz Bölgesi haplotipleri 2. Filogrup olarak görülmektedir. Yüksek dal destek değerine karşın (ML:94, MP:100, BI:0,96) haplotiplerpolitomik dallanma göstermiştir. Buradan hareketle türün İç Anadolu ile Orta ve Batı Karadeniz populasyonlarıarasında gen akışının diğer populasyonlara oranla belirgin şekilde daha yüksek olduğu düşünülmüştür.

3. filogrup haplotiplerin coğrafik dağılışıları Teke yarım adasının batısı ve kuzeyini kapsamaktadır. Filogenetik analiz sonuçları bu grubun, Batı Anadolu'nun güneyinde kalmış periferik bir populasyon yapısı gösterdiğine işaret etmektedir.

4. filogrup; Çıplak (2008)'ın "Toros Yolu" olarak isimlendirdiği rotada yerleşmiş 4 farklı haplogrubun birleşiminden oluşmaktadır. Bunlar; Isparta-Antalya haplotipleri, Kayseri haplotipleri, Erzincan-Kars haplotipleri ve Bayburt haplotipleridir. Güney Batı Anadolu'dan başlayıp Doğu Anadolu'da sonlanan, Anadolu'nun iki büyük genetik çeşitlilik bariyeri olan Toroslar ve Anadolu diyagonalini takip eden bu 4 haplogrup coğrafik bariyerlerin dağılım rotasını nasıl etkilediğini ortaya koyan güzel bir örnek teşkil etmektedir. Çıplak (2008)'in karasal bir böcek gurubu olan çekirge populasyonları ile gerçekleştirdiği çalışmadan elde edilen biyocoğrafik sonuçlar ile bizim çalışmamızda gözlemlenen yayılış örüntüsünün paralellik göstermesi Anadolu fauna tarihinin açıklanması açısından önemlidir.

Türün Batı Akdeniz populasyonundan elde edilen COI haplotiplerininfilogenetik ağaçta farklı populasyonların içerisine dağılması ve yüksek dal destek değerleri almasıedeniyle *P. rachiliense* Anadolu populasyonlarının genetik çeşitlilik merkezinin Batı Akdeniz olduğu ve bu haplotiplerinin atasal haplotipler olduğu sonucuna varılabilir.

COI veri seti ile gerçekleştirilen tür sınırları belirleme testleri farklı sayıda tür önerisi ile sonuçlanmıştır. Fakat türler filogenetik ağaç ve haplogrupların coğrafik dağılışı göz önüne alınarak yorumlandığında önerilen grupların "tür" olarak değil

“farklılaşma/ayrışmakta olan populasyonlar” şeklinde yorumlanması daha doğru olacaktır. Tez çalışmasına dâhil edilen bireylerin morfolojik incelenmesinde populasyonlar arasında belirgin taksonomik karakter farklılıklarının gözlemlenmemesi ve COI veri seti ile gerçekleştirilen haplotip ağı analizinde şekillenen haplogrupların populasyon örüntüsünü desteklemesi de bu yorumu güçlendirmektedir.

COI veri seti ile yapılan moleküler saat analizi sonuçlarında bu türün Anadolu lokal populasyonları arasındaki genetik çeşitlenmesinin Pliyosen-Pleyistosen geçişinde olduğu görülmektedir (3,2-2,6 myö). Bahsi geçen dönemde iklim şartları oldukça kurak ve soğuktur. Pleyistosende buzul dönemleri süresince oluşan ve kaybolan kara ve su bariyerleri, türün populasyonları arasındaki farklılaşmanın başlamasına neden olan faktörlerden birisi olabilir. Bu çalışmamız ile çalışmada türün lokal populasyonlarının "Toros Yolu" üzerindeki hat boyunca parçalı bir yayılım gösterdiği şeklindeki diğer çalışmamız örtüşmektedir.

ITS1-2 veri seti sonuçları incelendiğinde haplotip paylaşımının yoğun olduğu görülmektedir. Gerçekleştirilen Network analizi sonucunda COI gen bölgesinden farklı bir sonuç ortaya çıkmıştır. Tüm veri seti tek tür örüntüsü göstermiştir. Bunun yanı sıra SplitsTree haplotip ağı analizinde; Doğu Anadolu populasyonu ana ağdan ayrılmaktadır.

ITS1-2 veri seti ile yapılan Maksimum olasılık analizi sonuçları incelendiğinde, SplitsTree analizinde de olduğu gibi, Doğu Anadolu populasyonu haricinde düşük dal destek değerli politomik bir dallanma yapısı görülmüştür. Diğer yandan bu veriler ile yapılan tür sınırları belirleme testlerinin tümü, türün Anadolu populasyonlarını tek tür olarak önermiştir.

2014 yılında Adler ve Şirin tarafından gerçekleştirilen çalışmada türün Batı Anadolu ve Ermenistan populasyonları sitotaksonomik metotlarla analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda her iki populasyon farklı birer sitoform (Ermenistan populasyonu için sitoform a ve Türkiye populasyonu için sitoform b) olarak önerilmiştir. Bizim çalışmamızda çekirdek belirteci olan ITS1-2 gen bölgesi ile yapılan tür sınırları belirleme testleri sonuçları genel olarak Anadolu populasyonlarının tek bir türe ait olduğunu göstermiştir. Ancak MO analizi ve SplitsTree analizlerinin belirgin şekilde Doğu Anadolu populasyonunun diğerlerinden ayrıldığını işaret etmesi ile Adler ve Şirin'in (2014) önermesinin örtüşmesi, irdelenmesi gereken ilginç bir sonuçtur.

Çalışmada elde edilen tüm genetik veri Gen bankasına girildiğinde, bu türe ait ülkemizden kaydedilmiş en geniş veri seti olacaktır.

Sonuç olarak elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde *P. rachiliense* türü Anadolu popülasyonlarının zengin bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte türün filocoğrafik yayılış örüntüsünün belirlenebilmesi için diğer ülke popülasyonları örnekleri ve daha fazla gen bölgesi ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünölmektedir.

Diğer yandan türün “*hirtipes*” tür gurubu içerisindeki taksonomik statüsünün belirlenmesi için gurubun diğer üyelerini de kapsayacak filogenetik ve filocoğrafik araştırmaların yapılması gerekir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004, The black flies (*Simuliidae*) of North America, Ithaca, NY: Cornell University Press, p.941.
- Adler, P.H., 2021, World blackflies (*Diptera: Simuliidae*): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory, South Carolina: USA.
- Adler, P.H., Şirin, Ü.D., 2014, Cytotaxonomy of the *Prosimulium* (Diptera: Simuliidae) of western Asia, Zoological Journal of the Linnean Society, 171, p. 753-768.
- Adler, P. H., Inci, A., Yıldırım, A., Seitz, G., & Duzlu, O. (2012, September). Chromosomal insights into the pest status of the subgenus *Wilhelmia* in Turkey. In 5th International Simuliidae Symposium.
- Adler, P.H., Şirin, Ü.D., 2015, A New Species of Black Fly in the *Prosimulium hirtipes* (Fries) Group (*Diptera: Simuliidae*) from Western Turkey. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 117(2):85-94.
- Anonim, 2021, <https://www.fluxus-engineering.com>, Erişim tarihi: 13.06.2021.
- Austen, E. E., 1925, A contribution to the knowledge of the bloodsucking Diptera of the Dardanelles, Bulletin of Entomological Research, 16,1: 1-13.
- Avise, J.C., 2004, Molecular markers, natural history, and evolution. Maryland, Sinauer-Sunderland. Springer. 398 pp.
- Balık, S., Ustaoglu, M. R., Özbek, M., Taşdemir, A., Topkara, E. T. (2002). Yelköprü Mağarası (Dikili, İzmir) ve Yakın Çevresinin Sucul Faunası Hakkında Bir Ön Araştırma. Su Ürünleri Dergisi, 19(1).
- Başbüyük, H. H., Yılmaz, A. Kılınç, S. 2013, Biyoçeşitlilik, biyolojik devinimler ve koruma. Palme Yayınevi-Akademik kitaplar. Ankara. 259 s.
- Başören, Ö., Kazancı, N., Girgin, S., 2013, The distribution of *Simuliidae* (*Insecta, Diptera*) species in Ankara stream (Turkey), Review of Hidrobiology, 6(2), p.157-167.
- Başören, Ö., Kazancı, N., 2016, A checklist of Simuliidae (*Insecta, Diptera*) species of Turkey. Review of Hydrobiology, 9,2: 153-164.
- Behura, S.K., 2006, Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology, 15 (11), 3087-3113.
- Bernotiene, R., 2006. On the distribution of black fly larvae in small lowland rivers in Lithuania. Acta entomologica Serbica 11: 115–125.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bilgin, R., 2011, Back to the suture: the distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4080- 4103.
- Boore, J. L., 1999, Animal mitochondrial genomes, *Nucleic Acids Research*, 27,8, p.1767–1780.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A., 2000, TCS: a computer program to estimate gene genealogies, *Molecular Ecology*, 9 (10): 1657-1660.
- Cruickshank, R.H., 2002, Molecular markırs fort he phylogenetics of mites an ticks. *Systematic and Applied Acarology*, 7: 3-14.
- Crosskey R.W., 1990, *The Natural History of Blackflies*. John Wiley & Sons, Chichester U.K., p.711
- Crosskey, R.W., Zwick, H., 2007, New faunal records, with taxonomic annotations, for the blackflies of Turkey (*Diptera, Simuliidae*), *Aquatic Insects*, 29, p.21-48.
- Çağlar, S.S., İpekdağ, K., 2009, A biogeographical evaluation of the Turkish *Simuliidae* fauna. *Acta Zoologica Lituanica*, 19:148-151.
- Çıplak, B., 2004, Systematics, phylogeny and biogeography of *Anterastes* (*Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae*): evolution within a refugium, *Zoologica Scripta*, 33, p.19–44.
- Çıplak, B., 2008, The analogy between interglacial and global warming for the glacial relicts in a refugium, Ed. Fattorini S., *Insect Ecology and Conservation*, Research Signpost, p.135–163.
- Demircioğlu, A., 2014, Erciyes dağı akarsularında simulium türlerinin araştırılması ve moleküler klasifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, , 82 s.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007, Beast: bayesian evolutionary analyses by sampling trees, *Bmc Evolutionary Biology*, 7, p.214-221.
- Đuknić, J., Jovanović, V. M., Popović, N., Živić, I., Raković, M., vd., 2019, Phylogeography of *Simulium* Subgenus *Wilhelmia* (*Diptera: Simuliidae*)—Insights From Balkan Populations. *Journal of Medical Entomology*. 56(4), 967-978.
- Ertunç, Ö., 2009, Türkiye'nin Batısındaki Bazı Akarsuların *Simuliidae* (*Insecta, Diptera*) Faunası Üzerine Bir Araştırma. Hacettepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fidan, E. C., 2020, Türkiye *Simulium ornatum* tür grubunun (*Simuliidae: Diptera*), filogenisi, filocoğrafyası ve taksonomisi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Fidan, E.C., Şirin, Ü., 2017, Ülkemiz Siyah Sivrisinek (*Diptera: Simuliidae*) Faunası İle İlgili
- Güncel Bilgiler Ve Son 10 Yılda Meydana Gelen Salgınlar Üzerine Değerlendirmeler. 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 355-356.
- Fu, Y. X., 1997, Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147, 915-925.
- Gazyağcı, A., 2011, Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde *Simulium* Türlerinin Yayılışı. Kırıkkale Üniversitesi. Sağlık Bilimleri. Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Gür, H., 2017, Anadolu diyagonalı: bir biyocoğrafi sınırın anatomisi, *Kebikec: İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmalı Dergisi*, 43,177-188.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., and De Waard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 596-599.
- Hernandez-Triana, L.M., Crainey, J.L., Hall, A., Fatih, F., Mackenzie-Dodds, J., vd., (2012) DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (*Diptera: Simuliidae: Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa* 3514:43-69. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3514.1.3>
- Huson, D., Bryant, D., 2006, Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23(2),254-321.
- Howard D. J., Berlocher S. H. 1998, *Endless Forms: Species and Speciation*, Oxford University press, New York.
- Hwang, U. W., Kim, W., 1999, General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4), 215.
- Jedlicka, L., 1975, *Odagmia ornata caucasica* Rubtsov, 1940 (*Diptera, Simuliidae*) in Turkey. *Acta Rerum Naturalium Musei Nationalis Slovaciae*, Bratislava, 21:255 □ 258.
- Kalafat, A., 2008, Afyon ve Çevresi *Simuliidae* (*Diptera*) Faunası Üzerine Çalışmalar. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaya, S., 2015, Anadolu yükselti zincirlerinin soğuk seven formların yayılış ve türleşmesindeki rolü: *Psorodonotus* Brunner Von Wattenwyl 1861 cinsinin türleşme ve filocoğrafyası, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi.
- Kazancı, N., Clergue-Gazeau, M., 1990, Simuliidae de Turquie. I. premie' res donne'esfaunistiques et bioge'ographiques (*Diptera, Simuliidae*), Annales de Limnologie, 26, p.45–50.
- Kalafat, A., ve Şirin, U., 2011, A New Record for Turkish blackfly fauna: *Simulium* (*Eusimulium*) *petricolum* (Rivosecchi, 1963) (*Diptera, Simuliidae*). Journal of Entomology Research Society, 13(1): 49-52.
- Kazancı, N., 2006, Ordination of *Simuliidae* and Climate Change Impact. Acta Entomologica Serbica, Supplement, 69-76.
- Kazancı, N., Clergue-Gazeau, M., 1990, Simuliidae de Turquie. I. premie' res donne'esfaunistiques et bioge'ographiques (*Diptera, Simuliidae*), Annales de Limnologie, 26, p.45–50.
- Kazancı, N., Ertunç, Ö., 2008a, Bazı *Simuliidae* (*Insecta, Diptera*) Türlerinin Habitat Özellikleri. Su Ürünleri Dergisi, 25(4), 319-323.
- Kazancı, N., Ertunç, Ö., 2008b, Checklist of the Simuliidae (*Insecta, Diptera*) of Turkey, Review of Hydrobiology, 1,2: 129-144.
- Keller, A., Schleicher, T., Schultz, J., Muller, T., Dandekar, T., vd., 2009, 5.8S-28S rDNA interaction and HMM-based ITS2 annotation, Gene, 430, 50-57.
- Keskin, E., Atar, H. H., 2013, DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. Molecular Ecology Resources, 13(5), 788-797.
- Kúdela, M., Adler, P. H., Kudelova, T., 2018, Taxonomic status of the black fly *Prosimulium italicum Rivoshwanecchi* (*Diptera: Simuliidae*) based on genetic evidence. Zootaxa, 4377(2), 280-290.
- Küçükyetim, M., 2018, Batı Anadolu bölgesi *Wilhelmia* (*Simuliidae: Diptera*) altcinsi türlerinin populasyon genetikleri üzerine araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü..103 s.
- Knowles, L. L., 2009, Statistical phylogeography. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 40:593-612.
- Librado, P., Rozas J., 2009, Dna SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, Bioinformatics, 25,11, p.1451-1452.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Low, V.L., Adler, P.H., Takaoka, H., Ya'cob, Z., Lim, P.E., vd., 2014, Mitochondrial DNA Markers Reveal High Genetic Diversity but Low Genetic Differentiation in the Black Fly *Simulium tani* Takaoka & Davies along an Elevational Gradient in Malaysia.
- Low, V. L., Srisuka, W., Saeung, A., Tan, T. K., Ya'cob, Z., vd., 2020, DNA Barcoding of *Simulium asakoae* (Diptera: Simuliidae) From Northern Thailand. *Journal of Medical Entomology*, 57(5), 1675-1678.
- Malmqvist, B., Adler, P.H., Kuusela, K., Merritt, R.W., Wotton, R.S., 2004, Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: a review, *Écoscience*, 11, p.187-200.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Ng, P. K. L., 2006, DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55(5), 715–728. doi:10.1080/10635150600969864
- Ozbek, H., Hayat, R., & Aslan, I., 1995, Erzurum'un bazı ilçelerinde *simuliid* (Diptera, Simuliidae) salgını.[An outbreak of black fly (Diptera, Simuliidae) in some towns of Erzurum]. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 19, 37-42.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Vogler, A. P., 2010, Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-aegean trench calibration, *Molecular Biology Evolution*, 27(7): 1659–1672. Doi:10.1093/molbev/msq051.
- Perktaş, U., 2017, Filocoğrafya: Coğrafi Varyasyon Örüntüleriyle Geçmişe Bakmak. *Kebikec: İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmalı Dergisi*, (43).
- Posada, D., 2008, jmodeltest: phylogenetic model averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25, p.1253-1256.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2012, ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Rubtsov, I.A., 1956, Blackflies (fam. Simuliidae) [Moshki (sem. Simuliidae)], Fauna of the USSR, New Series No. 64, insects, Diptera [Fauna SSSR Novaya seriya No. 64, Nasekomye dvukrylye] 6 (6), Moscow & Leningrad. Akademii Nauk SSSR.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19 (12): 1572–1574. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., vd., 1994, Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Entomological Society of America*, 87,6, p.651-701.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spanos, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M., Louis, C., 2000, The mitochondrial genome of the Mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*, *Insect Molecular Biology*, 9,2, p.139–144.
- Swofford, D.L., 2002, PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) 4.0 beta. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Şahin, Y., Şirin, Ü., Çalışkan, H., 2004. "Kuzey Marmara Bölgesi *Simuliidae* ve *Asilidae* Faunasının Tespiti", TÜBİTAK, Proje No: TBAG-2050.
- Şekercioğlu, H. Ç., Anderrson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö. E., vd., 2011, Turkey's globally important biodiversity in crisis, *Biological Conservation*, 12, p.2752-2769.
- Şirin, Ü., 2001, Yukarı Sakarya Nehir Sistemi Simulidae (Diptera) Faunasının Tespiti, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. s.136.
- Şirin, Ü. and Adler, P. 2015, Chromosomal and morphological taxonomy of a new species of Black fly in the genus *Metacnephia* (Diptera: *Simuliidae*) from Western Anatolia, Turkey. *Zootaxa*. 4048(2):269-280.
- Şirin, Ü., Çalışkan, H., Şahin, Y., 2015, Black flies (Diptera: Simuliidae) of Turkish Thrace, with a new record for Turkey. *Biodiversity Data Journal* 3: e4834. doi: 10.3897/BDJ.3.e4834
- Şirin, Ü., Fidan, E.C., Çalışkan, H., Şahin, Y., 2014, Blackflies (*Diptera:Simuliidae*) records from east Marmara region. *Munis Entomology and Zoology*, 9 (2):882- 831.
- Şirin, Ü., Şahin, Y., 2005, New records of black flies (*Diptera, Simuliidae*) for the Turkish fauna. *Zoology in the Middle East*, 36:87-98.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., vd., 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731–2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Tajima, F., 1989, Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism, *Genetics*, 123, 585-595.
- Taylor, D. R., Keller, S. R., 2007, Historical range expansion determines the phylogenetic diversity introduced during contemporary species invasion. *Evolution*, 61(2), 334–345.
- Temel, Altun, B., Korkmaz, E., Başbüyük, H. H., 2018, Anadolu *bombus lapidarius l. (apidae: hymenoptera)* populasyonlarının genetik yapılanması. *Anadolu üniversitesi bilim ve teknoloji dergisi: c-yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 7(2), 180-195.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Terteryan, A.E., 1968, Black flies (*Simuliidae*) fauna of the Armenian SSR, Diptera [Moshki (*Simuliidae*) fauna Armyanskoi SSR, Nasekomye dvukrylye]. Yerevan, Izdatel'stvo Akademii Nauk Armyanskoi SSR, p.272.
- Tuzla, A., 2008, Bazı *Simuliidae* (*Diptera*) Türlerinin Sitotaksonomik Özelliklerinin İncelenmesi. ESOGÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Yeşilöz, H., 2011, Orta Kızılırmak havzasının Nevşehir bölümünde sorun oluşturan karasinek (*Diptera: Simuliidae*) türlerinin moleküler klasifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi.
- Yılmaz, A., İnci, A., Şirin, Ü., Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (*Diptera: Simuliidae*) İstilas, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 18-23 Kasım 2007, Kayseri ve Ürgüp, Türkiye.
- Zhang, Y., Malmqvist, B., & Englund, G. (1998). Ecological processes affecting community structure of blackfly larvae in regulated and unregulated rivers: a regional study. *Journal of Applied Ecology*, 35(5), 673-686.
- Zwick, H., 1978, *Simuliidae*. In *Limnofauna Europaea*. Eine Zusammenstellung aller die europäischen Binnengewässer bewohnenden mehrzelligen Tierarten mit Angaben über ihre Verbreitung und Ökologie. Zweite, überarbeitete und ergänzte Auflage. (pp. 396-403). Gustav Fischer Verlag; Swets & Zeitlinger BV.