

**BAZI TABANIDAE (Diptera:Tabanidae)
TÜRLERİNİN COI GEN BÖLGESİ İLE
FİLOGENETİK AKRABALIKLARININ
ANALİZİ**

Şükran YALÇIN
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Mayıs-2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1109F152**



JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Şükran YALÇIN'ın ‘ ‘ Bazı Tabanidae (Diptera:Tabanidae) Türlerinin COI Gen Bölgesi İle Filogenetik Akrabalıklarının Analizi ‘ ‘ başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 16. 01. 2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Filiz SUSUZ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Ümit ŞİRİN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI TABANIDAE (Diptera:Tabanidae) TÜRLERİNİN COI GEN BÖLGESİ İLE FİLOGENETİK AKRABALIKLARININ ANALİZİ

Şükran YALÇIN

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ

2012, 85 sayfa

Bu tezde Türkiye'nin Eskişehir (Merkez), Eskişehir (Yarımca), Artvin (Merkez), Artvin (Yusufeli), Rize (Ayder), Rize (Merkez), Amasya (Merkez), Balıkesir (Dursunbey), Adapazarı (Kocaali), İçel (Namrun), Kastamonu (Tosya), Kastamonu (Azdavay), Karabük (Ovacık), Bolu (Abant) ve Edirne (Lalapaşa) bölgelerinden toplanan Diptera:Tabanidae türlerinin sitokrom oksidaz 1 gen bölgesi, evrensel primerlerden COI kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen diziler Kimura 2 parametresi ve General Time Reversible Gamma distribution modeli ile analiz edilmiş, Neighbor joining ve Maximum likelihood istatistiksel yöntemleri kullanılarak filogenetik ağaçları elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik ağaçlardan çıkan sonuca göre grup üyeleri 7-8 gruba ayrılarak tür içindeki coğrafik popülasyon farklılıklarını kanıtlamışlardır. Analiz sonuçlarına göre morfolojik olarak da birbirinden ayırt edilmesi zor olan *T. maculicornis*, *T. miki* ve *T. armeniacus* %90 bootstrap değeriyle aynı dalda bulunmuşlardır.

Anahtar Kelimeler: Diptera, Tabanidae, Moleküler Filogeni, COI

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF THE PHYLOGENY OF SOME TABANIDAE (DIPTERA: TABANIDAE) SPECIES USING COI GENE AREA

Şükran YALÇIN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ

2012, 85 pages

In this thesis, Diptera: Tabanidae members specimens were collected from Eskişehir (Central), Eskişehir (Yarımca), Artvin (Central), Artvin (Yusufeli), Rize (Ayder), Rize (Central), Amasya (Central), Balıkesir (Dursunbey), Adapazarı (Kocaali), İçel (Namrun), Kastamonu (Tosya), Kastamonu (Azdavay), Karabük (Ovacık), Bolu (Abant) ve Edirne (Lalapaşa) areas and their cytochrome oxidase one gene area were amplified with one of the universal primer COI with polymerase chain reaction and had done sequencing. Achieved sequences analysed with Kimura 2 parameter and General Time Reversible Gamma distribution model, than had got phylogenetic trees using Neighbor joining and Maximum Likelihood statistical methods. Based on the results obtained from phylogenetic trees of the group members are geographically divided into 7-8 groups in their species group which proved that the different populations. According to analysis results that are difficult to distinguish morphologically from each other, *T. maculicornis*, *T. miki* and *T. armeniacus* bootstrap value of 90% shared same klad.

Keywords: Diptera, Tabanidae, Molecular phylogeny, COI

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince akademik bilgisini ve kişisel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ'a,

İspanya'da Erasmus öğrenimim esnasında filogenetik konusunda çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Miquel ARNEDO'ya ve laboratuvar disiplini edinmemeye yardımcı olan Raquel ALVAREZ ile Vera OPATOVA'ya,

Üniversitenin ilk yıllarından bu yana çalışmalarımnda her zaman danıştığım ve yardımını aldığıım Hocam Uzm. Dr. Ferhat ALTUNSOY'a ve Yard. Doç. Dr. Sulhi ÖZKÜTÜK'e,

Moleküler konudaki tecrübelerinden faydalandığım Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na ve pratik bilgisinden yararlandığım Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR'a,

Beni akademik çalışmalarım içinde bulunmam konusunda her daim destekleyen kardeşlerim Büşra ve Fatih YALÇIN'a ve herkesten önemlisi anneciğim ve babacığıma,

Maddi manevi desteğini her an hissettiğim sevgili Neslihan KAVAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	iii
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	İx
1. GİRİŞ	1
1.1. Sınıflandırmanın Önemi ve Sistematikte Kullanılan Yaklaşımlar	1
1.2. Filogenetik Sistematik.....	4
1.3. Filogenetik Sınıflandırmada COI Gen Bölgesi	7
1.4. Tabanidae Sistematığı ve <i>bromius</i> Grubun Temel Özellikleri.....	8
1.5. Daha Önce Yapılmış Çalışmalar	14
1.6. Çalışmanın Amacı	15
2. MATERYAL ve YÖNTEM	17
2.1. Materyaller	17
2.2. DNA Ekstraksiyonu ve PCR Reaksiyonu.....	19
2.2.1. Stok Solüsyonlarının Hazırlanması:	19
2.2.2. DNA Ekstraksiyonu.....	20
2.2.3. PCR Reaksiyonu.....	21
2.2.3.1. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Evrensel Olarak Spesifik primerler ve Dizileri.....	22
2.2.3.2. PCR Thermal Programları.....	22
2.2.3.3. Agaroz Jel hazırlığı ve UV Transimülatörde Görüntüleme.....	23
2.3. Cleaning Reaction (Temizleme Reaksiyonu).....	24
2.4. Dizi Analizi Reaksiyonu ve Programı.....	25

3. BULGULAR	26
3.1. PCR Reaksiyonu.....	26
3.2.Dizi Analizi	29
3.3.Filogenetik Analiz	37
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
5. KAYNAKLAR	46
Ek-1 Dizi analizi pik grafikleri.....	52
Ek-2 BOLD systems v 2.5 Veri tabanındaki 100 Tabanidae örneği ile Bromius grup üyelerinin COI gen bölgesinin 3 kodon pozisyonun Kimura2 parametresi kullanılarak karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar ...	72
Ek-3 Protein Hizalaması Sonucu.....	82
Ek-4 Kimura-2 parametresiyle oluşan NJ ağacı.....	81
Ek-4 devam Kimura-2 parametresiyle oluşan ML ağacı.....	84
Ek-5 GTR ve Gamma distribution kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Tabanus briani</i> Lecl. Taksonomik karakterleri.....	9
Şekil 1.2. <i>Tabanus armeniacus</i> Kröb. taksonomik karakterleri.....	10
Şekil 1.3. <i>Tabanus indrae</i> Hauser taksonomik karakterleri.....	10
Şekil 1.4. <i>Tabanus bromius</i> L. Taksonomi karakterleri.....	11
Şekil 1.5. <i>Tabanus miki</i> Brau. Taksonomik karakterleri.....	11
Şekil 1.6. <i>Tabanus regularis</i> Jaen. Taksonomik karakterleri.....	12
Şekil 1.7. <i>Tabanus tergestinus</i> Egg. taksonomik karakterleri.....	12
Şekil 1.8. <i>Tabanus maculicornis</i> Zett. taksonomik karakterleri.....	13
Şekil 1.9. <i>Tabanus cuculus</i> Szil. taksonomik karakterleri.....	13
Şekil 2.1. ExoSAP-IT™ 'nin çalışma mekanizması	24
Şekil 3. 1. 1. PCR 1-Blanco, TT1, TT2, TT3, TT4 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	26
Şekil 3. 1. 2. PCR 2- Blanco, TT5, TT6, TT7, TT8, TT9, TT10 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	26
Şekil 3. 1. 3. PCR 3- Blanco, TT17, TT18, TT19, TT20, TT21, TT22 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	26
Şekil 3. 1. 4 PCR 5- TT11, TT12, TT13, TT14, TT15, TT16, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	27
Şekil 3. 1. 5. PCR 38- TT23, TT24, TT25, Blanco, Blanco(tekrar) örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	27
Şekil 3. 1. 6. PCR 48- TT24, TT28, TT29, TT30, TT31, TT32, Boş kuyu, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	27
Şekil 3. 1. 7. PCR 49- TT24, TT28, TT29, TT30, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.1. TT3- <i>T. armeniacus</i>	72
Şekil 4.2. TT5- <i>T. armeniacus</i>	73
Şekil 4.3. TT7- <i>T. bromius</i>	74

Şekil 4.4. TT8- <i>T. bromius</i>	75
Şekil 4.5. TT13- <i>T. karaosus</i>	76
Şekil 4.6. TT14- <i>T. karaosus</i>	77
Şekil 4.7. TT15- <i>T. tergestinus</i>	78
Şekil 4.8. TT16- <i>T. tergestinus</i>	79
Şekil 4.9. TT29- <i>T. tergestinus</i>	80
Şekil 4.10. TT30- <i>T. maculicornis</i>	81
Şekil 4. 11. Gen bankasından 4 Tabanidae örneği ile birlikte protein hizalaması sonucu 1000 bootstrap ardından oluşan NJ filogenetik ağacı.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Toplanan Tabanus türlerinin toplanma tarihleri ve lokasyonları.....	18
Çizelge 2. 2. Kit içeriği.....	19
Çizelge 2. 3. PCR reaktifleri ve miktarları.....	21
Çizelge 2. 4. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Evrensel Olarak Spesifik Primerler ve Dizileri	22
Çizelge 2. 5. Agaroz jel için kullanılan reaktifler ve miktarları.....	23
Çizelge 2. 6. Dizi Analizi Reaksiyonunda kullanılan reaktifler ve miktarları.....	25
Çizelge 3. 2. 1. Dizi analizi tüplerinin erişim kodları.....	29
Çizelge 3. 2. 2. LCOI-HCOI çakıştırılmış, primerleri traşlanmış dizi analizi sonuçları.....	30

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA : Reoksirübonükleik asit
ML: Maksimum likelihood
NJ: Neighbor joining
Wg: Kanat gelişim geni
Hox: Temel gelişim geni
Cox1: Sitokrom oksidaz 1- isoenzim
Cox2: Sitokrom oksidaz -isoenzim
CytB: Sitokrom B -isoenzim
16s: Ribozom alt ünitesi
12s: Ribozom alt ünitesi
rRNA: Ribozomal Ribonükleik asit
tRNA: Taşıyıcı Ribonükleik asit
mt: Mitokondriyal
COI: Sitokrom oksidaz I
GENEIOUS: Filogenetik tabanlı bilgisayar programı
ClustalW2: Hizalama veritabanı
NCBI: National Center for Biotechnology Information
BOLD: Barcoding of Life Data
MEGA5: Filogenetik ağaç yapımı programı
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BB1-BB2-BB3-BB5: Buffer
x g: Satntifüj birimi
bp: Baz çifti
LCOI: İleri primer
HCOI: Geri primer
UV: Ultra viyole
dNTP: Di Nükleotid tri fosfat
ExoSAP-IT: DNA solüsyonu temizleme enzimi
SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase
ABI PRISM Big Dye: Dizi analizi kiti



1. GİRİŞ

1.1. Sınıflandırmanın Önemi ve Sistematikte Kullanılan Yaklaşımlar

Dünya üzerinde ne kadar türün varolduğu, bilimin ve insanlığın yüzyıllardır merak ettiği bir sorudur. Günümüzde ökaryotik canlı çeşitliliği yaklaşık 8.7 milyon \pm 1.3 milyon olarak bildirilmektedir [1].

Biyolojide sınıflandırma, var olan çeşitliliğin farkında olmaya ve yaşamın kökeninin dayandığı noktayı keşfetmeye ışık tutan bir bilim dalıdır. Biyolojinin diğer alt bilim dallarında yapılan araştırmaların değer kazanması, açıklayıcı temellere dayanması ve bilimin birbirinden beslenen araştırmalarının artması için sınıflandırma bilimi gereklidir. Evrimsel açıdan bakıldığında yapılan her araştırma öncelikle taksonomiye ihtiyaç duyar.

Sınıflandırmanın öncüsü Linneus'dan (1707-1778) bu yana tür kavramının sınıflandırmanın ilk adımı olduğu bilinmektedir. Tür kavramı ilk olarak 1686 'da John Ray (Historia Plantarum) tarafından ortaya atılmıştır. Aristo ve Eflatun'un ardından sınıflandırmada 'Tipolojik tür' kavramı öne çıkmıştır. Tipolojik tür kavramında türün değişmez tipler sergilediği ve bu tipe bağlı olmayanların varyete olduğu söylenir [2]. Aynı ekosistemi paylaşan bireylerin hangi tür olduklarını ve bir türün varyete formlarını tanımlayabilmek için sistematik yaklaşımlar ortaya konmuştur. Sistematik için tür kavramı kullanılmaya başlandığından bu yana 4 farklı sistematik yaklaşımı araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür [3] :

1) Klasik evrimsel taksonomi: Bu yaklaşımı kullanmak için morfoloji, anatomi, histoloji ve kromozom farklılıkları gibi karakterler baz alınır. Karakterlerin canlı gruplarında karşılaştırılması ile gruplar arasındaki ilişkinin tahmini için çalışılır. Diğer yaklaşımlara göre daha fazla tecrübeye ve kişisel yargıya dayanan temelleri vardır.

Klasik yaklaşımda bir dizi karakterin benzerliklerinin değerlendirilmesi yapılır. Ancak bir karakter özelliği, aynı kökenden gelmese de aynı ortamda yaşayan farklı canlı grupları tarafından paylaşılabilir. Bu durumda farklı kökenlerden gelen organizmalar aynı kökendenmiş gibi görülebilir (convergent-daralan evrim). Bu nedenle klasik evrimsel taksonominin bazı

dezavantajları vardır. Klasik taksonomi hangi karakterlerin homolog ya da analog olduğunu ayırt etmede zorlanır.

2) Fenetik yaklaşım: Bu yaklaşım, homoloji-analoji farklılıklarını göz ardı ederek tüm karakterlere aynı değerin biçildiği bir hesaplama yapar. Bu durumda klasik yaklaşımda olduğu gibi karakterin özelliği konusunda kişisel bir yargıya gerek kalmadan objektif davranılır. Fenetikte türün her bir karakteri bir değere sahiptir ve tüm farklılıklar bir değer ifade eder. Hesaplanan farklılık değerlerine göre türlerin birbirine olan uzaklıklarını-yakınlıklarını gösteren bir diyagram elde edilir. Ancak bu şekilde oluşturulan diyagramların iki sorunu vardır. Birincisi, diyagramların kökensiz oluşu, ikincisi, belirsizlikler, hatalar ve şans faktörlerinin hesaplama karışması nedeniyle çatallardaki dalların uzunluklarının hiçbir zaman uyumlu olmamasıdır.

3) Kladistik: Kladistik yaklaşımını kullanan araştırmacılar ortak türemiş karakterleri yani sinapomorfileri kullanırlar. Atadan sonra oluşan özelliklere odaklanarak homoloji ve analogiyi göz ardı ederler. Fenetikte ölçülebilir olan tüm karakterler hesaplama tabi tutulurken kladistikte örneğin iki fare türü karşılaştırıldığında genel olarak memelilerin paylaştığı karakterler göz ardı edilecektir.

Kladistikte hangi karakterlerin ortak türemiş karakterler olduğuna karar vermek kişisel bir yargı gerektirdiğinden eleştiriye açık bir yaklaşımdır.

4) Moleküler taksonomi: Bu yaklaşım homoloji, analogi tartışmasından uzak durarak DNA-RNA-Protein temelli araştırmaları kapsar. Taksonomik karakterler olarak nükleik asitler ve proteinler kullanılır. Nükleik asit dizilerindeki değişimler bilgisayar programlarında anlamlı istatistiksel veriler haline gelirler ve bu veriler türlerin akrabalıklarını belirlemek için yorumlanır. Organizmanın sahip olduğu gen dizisinin tek bir bazındaki mutasyon protein translasyonunu çeşitli derecelerde etkileyebilir. Üçüncü kodonda gerçekleşen mutasyonlar nötr ya da işlevsel olabilir. Nötr mutasyonlar protein translasyonundan bir değişime sebep olmadıklarından evrimsel anlam taşımazlar ancak bazda meydana gelen değişim kimi zaman öyle farklı sonuçlara yol açar ki bu durum organizmanın evrimsel kaderini değiştirebilir.

Sınıflandırmada kullanılan bu yaklaşımların yanında çok uzun yıllardan bu yana kullanılan sınıflandırma teorileri de mevcuttur. Sınıflandırmanın tarihsel gelişimine bakıldığında sınıflandırma sürecini Darwin'den önce ve Darwin'den sonra olarak ikiye ayırmak mümkündür. Günümüze dek beş sınıflandırma teorisi savunulmuştur.

- 1) Esasçılık: Aristo mantığına dayanan ve Linnaeus'un da kabul ettiği bu teori 1960'lı yıllara kadar bir çok araştırmacının savunduğu bir teori olmuştur. Teori, bir taksonun sahip olduğu tüm bireylerin aynı tipi yansıttığını savunduğu için tipe bağlı bir teori olduğu söylenebilir. Türlerin değişmezliğine ve taksonların sabitliğine inanır. Bu teoriye göre taksonomistin görevi taksonları belirlemektir.
- 2) İsimcilik: Teoride sadece bireylerin varlığı kabul edilir. Diğer tüm sistematik kategorilerin insanların akli tarafından oluşturulduğuna inanan bir görüştür. Akrabalık kavramını dikkate almadan sadece benzerlikten yola çıkarak taksonları oluştururlar.
- 3) Amprikçilik: Taksonomistin meydana getireceği ayrıca bir sınıflandırma teorisine gerek olmadığına, yeterli miktarda karakterlerin mantıklı bir şekilde değerlendirildiğinde sistematığın zaten kendiliğinden ortaya çıkacağına inanan araştırmacıların savunduğu bir teoridir.
- 4) Kladistik: Akrabalık ilişkilerini baz alan ağaçlar oluşturmayı ve sınıflandırmayı bu ağaçlara dayandırmayı hedefler. Oluşturulan filogenetik ağaçlardaki dallardan her biri farklı taksonomik kategorileri temsil ederler.
- 5) Evrimsel sınıflandırma teorisi: Bu teoride taksonomistler doğada evrimsel bir süreçten geçerek oluşan grupların birbiriyle olan ilişkisini evrimsel açıdan bakarak ortaya koyan kişilerdir. Teoride amaç karakterleri değil, organizmaları sınıflandırmaktır. Günümüzde en çok kabul edilen teoridir [4].

1.2. Filogenetik Sistematik

1700'lü yıllardan bu yana uygulanan klasik taksonominin ve tipolojik sınıflandırmanın yetersizliği nedeniyle son yıllarda evrimsel araştırmaların da artmasıyla tipe bağlı ya da morfolojiye bağlı tür kavramlarının kullanım alanları kısıtlanmıştır. Filogenetik sistematik, kapsadığı uygulamalı yöntemlerle sistematiğe yeni bir bakış açısı sunmuştur. Günümüzde biyologlar biyokimyasal ve immünolojik yöntemleri veya gen dizi analizi yöntemlerini kullanarak populasyonlar ve bireyler arası filogenetik yakınlığı ya da uzaklığı gösterebilmektedirler. Filogenetik sistematikte taksonları birbirinden ayırt etmek için yalnızca taksonların gen dizilerindeki değişimin verilerinin grafiğe dönüştüğü filogenetik ağaçlar kullanılır. Gen dizileri, taksonların morfolojik, biyokimyasal, histolojik, anatomik, fizyolojik ve sitolojik tüm özelliklerinin üçlü baz kombinasyonları şeklinde çekirdek DNA'sında ve organellerinde saklı tutan yaşamsal şifrelerdir. Taksonları evrimsel olarak karşılaştırabilmek için işlevsel olarak kullanılabilir gen bölgeleri hücre dışı ortamda Polimeraz Zincir Reaksiyonları ile çoğaltılır, ardından bu gen bölgeleri dizi analizi reaksiyonuna tabi tutulur. Sonuçlar veri halinde bilgisayar ekranına yansıtılır ve farklı filogenetik yaklaşımlarla ağaçlar elde edilir.

Doğanın şu anda sahip olduğu canlı çeşitliliği, soy hatlarının artması ve zaman içerisinde dallanması demek olan kladogenezin bir sonucudur. Kladogenez takiben tür içi evrim olan anagenez mekanizması çalışır [5]. Canlı çeşitliliğine evrim açısından bakarak filogenetik akrabalığı ortaya koymak bu alandaki çalışmalara hiyerarşik bir düzen ve akılcı çözümler getirecektir. Filogenetik akrabalık belirlemek için filogenetik tür kavramının bilinmesi gereklidir. Filogenetik tür kavramı için şu tanımlamalar yapılmıştır [5]:

1. Cracraft 1989'a göre bir filogenetik tür, canlıların oluşturduğu temel nitelikteki kümedir ve benzeri kümelerden farklıdır. Her tür içinde bir ata ve ondan türeyenlerin örüntüsü gözlenir.
2. Queiroz ve Donoghue 1990'a göre bir tür ortak ataya sahip olan en küçük tek kökenli gruptur.

Bu tanımlar doğrultusunda sistematikçiler filogenetik ilişkiler arasında kullanılan tüm uygulamaları Alman entomolog Willi Hennig'e

dayandırır. Hennig, taksonların karakterlerinin türemiş, atasal ve homoplasi durumlarını paylaştıklarını ve bu paylaşımın filogenetik ağacı oluşturan monofiletik grupların bir kanıtı olduğunu söyler [5].

- Türemiş karakter (plesiyomorfik) : Soy boyunca yeni bir dala sebep olacak şekilde evrilmiş ve o dalın üyelerini diğer dallardan ayrı kılan bir karakter anlamına gelir.
- Atasal karakter (apomorfik): Bir soy dizisi boyunca ortak görülen karakterlere atasal karakterler denir. Örneğin memelilerin dört üyeye sahip olması atasal bir özellik durumudur. Günümüzde yaşayan yılanların dört üyeye sahip olmasalar bile bir zamanlar sahip olduklarına dair izler taşımaları atasal karaktere bir örnektir.
- Homoplasi: Farklı taksonlarda farklı yollarla evrimleşen ancak bazen aynı amaca hizmet edebilen özelliklerdir. Hem benzeştirici evrimi hem de geri dönüşel evrimi kapsadığı için filogeniyi yanıltma riski taşır.

Hennig'in ilkesinin, karakterlerden hangisinin atasal, hangisinin türemiş olduğunu tahmin etmek ve özelliğin türemiş özellik ya da homoplasi olduğunu saptamak gibi bazı problemleri vardır. Bu problemlerin çözümü için ise en iyi filogenetik ilişkinin en az derecede homoplasi barındırması gerektiğini söyleyen Parsimoni ilkesi kullanılır.

Homoplasi filogeni oluşturulurken kullanılan verilerin bir kaos içine sürüklenmesine neden olur. Türlerin akrabalık ilişkilerini belirlemede kullanılan karakterler birbiriyle çatışacak sonuçlar verdiğinde homoplasi ortaya çıkar. Bu sebeple filogenetik sistematikçiler evrimin her zaman ileriye dönük değil, bazen de geriye dönük olabileceğini savunarak homoplasinin meydana getirdiği düğümün boyutunu azaltmaya çalışırlar [6].

Filogenetik sistematikte kullanılan yaklaşımları açıklamak ve algılamak olabildiğince zordur. Kullanılan yaklaşımların gereklerinden biri yoğun istatistiksel bilgi gerektiren biyoinformatik bilgisayar programlarına hakim olmaktır. Günümüzde Parsimoni, Komşu kalıtlama, Maksimum olasılık, Minimum evrim ve Bayes yaklaşımları tür içi ve türler arası filogenetik yakınlığı saptamada kullanılmaktadır.

Parsimoni, olası birçok evrimsel dallanmanın arasından doğruya en yakın dallanma modelini seçmeye yardım eder. Uzaklık matriksini baz alan metodların aksine parsimoni ve maksimum olasılık tahmini metodları, bir gen dizisinin tarihsel gelişiminin haritasını ağaç üzerinde ortaya çıkartır. Parsimonide iki karakter dizisi arasındaki farklılık en azsa bu iki karakter dizisi birbirine en çok benzeyen dizilerdir. Bu şekilde karakter dizileri arasındaki farklılık ve benzerliği defalarca test ederek analiz yapılır [7]. Ancak Felsenstein, J. 1981'e göre parsimonide araştırmacıların bilgisayara girdikleri dizi ve karakterlerden hepsi kullanışlı olmadığından istatistiksel anlamda daha güçlü bir yaklaşım olan maksimum olasılık tahmini kullanılır [6].

Maksimum olasılık tahmini (ML); dizi üzerindeki değişimin hızlı olduğunda ya da çok uzun zaman önce değişmiş bir dizinin diğerlerinden ayrılışı göstermek istendiğinde çoklu mutasyonları gösterebilecek bir yaklaşımdır. Maksimum olasılık yöntemi verileri gözleme olasılığını hesaplar. Filogeninin en iyi tahmini ise bu olasılığı en yüksek olan ağaçtır.

Komşu kalıtlama (NJ); oldukça hızlı ve diğer tüm metodlar gibi diziler arasındaki dallanmaların seviyesi düşük olduğunda en iyi sonucu verir. Minimum evrim kriterleri üzerine temel almıştır. Analizin ilk aşamasında DNA ya da protein dizileri bir uzaklık matriksine çevrilir ve bu matriks iki dizi arasındaki evrimsel uzaklığı temsil eder. Diğer uzaklık tahmini metodlarında olduğu gibi NJ'nin de en zayıf noktası, diziler arasında görülen farklılığın evrimsel uzaklığa tam anlamıyla yansımamasıdır. Bu yöntemde bir dizi bölgesinin yeri birçok kez değiştirilerek diğer dizilerin de yeriyle eşleşmeye çalışılır. Ancak aynı bölgedeki çoklu yerine koymalar gerçek uzaklığı tanımlamada belirsizdir ve dizileri yapay olarak birbirine yakın göstertir. Eğer bütün evrimsel ağaçtaki değişim sabitse çoklu yerine koymanın düzeltilerek ağaçtaki tahminin yapılması önemsiz olabilir. Kısaca NJ, kullanılan veriler homoplasiye dirençli olduğunda filogenetik ağaç oluşturmak için hızlı ve sık kullanılan bir yöntemdir.

Son zamanlarda geliştirilen Bayesian yöntemi ML'ye çok benzer bir yöntem olmasına rağmen olası bir ağacın olasılığını en yükseğe çıkartmayı hedefler yani öncül olasılık oluşturmaya çalışır. Bayesian yönteminde bir grup ağacın olasılığı sağlanır ve hesaplanır. Bayesian yaklaşımında sonuç spesifik bir değere dayanmaz, fakat olası tüm parametrelere sahiptir [8].

Özet olarak bir filogenetik çalışma için öncelikle filogenetik bilgiyi edineceğimiz karakterlerin birbirinden bağımsız ve homoplasiye dirençli olması gerekir. Daha sonra yapılacak analiz için parsimoni, maksimum olasılık tahmini, minimum evrim, komşu kalıtlama ya da Bayesian metodlarından hangisinin kullanılacağına karar verilmesi ve algoritmaların en iyi ağacı oluşturacak biçimde seçilmesi gerekir.

1.3. Filogenetik Sınıflandırmada COI Gen Bölgesi

Sistemik entomolojide en eski ve önemli sorunlardan biri ordolar arasındaki yakınlıkları ve onların kökenlerini saptamaktır. Homolojik yapıların karşılaştırılmasındaki güçlükler, morfolojik yapıların ayırt edilmesinde karşılaşılan zorluklar, genital organ yapılarının küçük ve diseksiyona dayanıksız olması ve tür içi varyasyonlar sistemik entomologları moleküler biyolojinin daha gelişmiş çözümler sunan yaklaşımlarını uygulamaya yöneltmiştir. Küçük karşılaştırmalı nükleer gen bölgeleri olan 18S ve 28S, bazı histon alt üniteleri, mitokondriyal genlerin bazı parçaları (cox1, cox2, cytB, 16S ve 12S) ve bazı gelişim genleri (Wg-Kanat, Hox) arthropodları karşılaştırmalı olarak analiz etmeye yarayan işlevsel gen bölgeleridir [9]. Filogenetik yakınlığı belirlemek için evrimsel olarak korunmuş bölgelerin çoğaltılması ve çeşitli bilgisayar programlarıyla bu bölgelerin dizilerinin karşılaştırılması günümüz moleküler biyoloji ve filogenetik çalışmalarında esas alınmıştır. Geçtiğimiz 30 yıldan bu yana popülasyonlar ve türlerin evrimsel ilişkilerini ortaya koymak için mitokondriyal gen bölgeleri kullanımı yaygınlaşmıştır [10]. Hayvanlarda mitokondriyal gen bölgeleri arasında evrimsel olarak iyi korunmuş bölgelerden biri de sitokrom oksidazdır [11]. Mitokondriyal genom üzerindeki 37 gen bölgesinden 13 tanesi protein kodlayan, 2 tanesi rRNA ve 22 tanesi de tRNA gen bölgesidir. Genellikle 14000-17000 baz çifti uzunluğunda olan mitokondriyal genom metazoa için en korunmuş bölgedir. Bu büyüklük bütün olarak analiz etmekte zorluklar oluştursa da böcek filogenetiğini ortaya koymak için tek tek gen bölgelerinin analizi mümkündür [12]. Mitokondrinin en önemli bileşenlerinden sitokrom c oksidaz enziminin amino asit dizisi de günümüzde bir çok organizma için çalışılmıştır. Çarpıcı şekilde sitokromların 70'ten 80'inci pozisyona kadar

aynı amino asitlere sahip olduğu görülmüştür. Sitokrom c evrimsel olarak hemoglobin, fibrinin gibi diğer proteinlerden daha konservatiftir. Sitokrom c'nin amino asit translasyonunu gerçekleştiren nükleotid zinciri boyunca meydana gelen değişikliklerin yerini de işlevsel olarak benzer amino asitler tamamlamıştır. Değişikliklerin çoğu nötral mutasyonlardan oluşmuştur.

Cywinska ve arkadaşları [13] standart sitokrom c oksidaz subunit I'in Kanada kökenli Tabanidlerin identifikasyonunda çok iyi çalıştığını göstermişlerdir.

Yaşamın barkodlanması (The Barcoding of Life) projesinin önde gelen çalışanlarından Hebert ve arkadaşları hayvan türlerinin sınıflandırılmasında sitokrom oksidaz alt ünite I (cox1) dizilerinin cluster ile hizalandıktan sonra neighbor joining (NJ) yöntemiyle analiz edilmesinin etkili ve uygun bir yol olduğunu ortaya koymuşlardır [13]. NJ, dizilerin dallanması çok düşük olduğunda tür seviyesindeki filogeniyi düzenleyebilmek için uygundur [12].

Tür seviyesinde dallanmalar çok düşük değerlerde olduğunda homoplasiyi azaltmayı amaçlayan en iyi metrik yöntem olan Kimura 2 parametresinin NJ analizinde kullanılması uygundur [12].

1.4. Tabanidae Sistematığı ve *bromius* Grubun Temel Özellikleri

Tabanidae üyelerinin biyolojisi, Türkiye faunasındaki yeri, fauna kayıtlarına yeni eklemeler, populasyonlarının mevsimsel aktiviteleri ve dinamikleri ile morfolojik olarak sınıflandırılması adına bir çok makale yayımlanmıştır [16-30, 32, 34, 36, 38, 39]. Moleküler anlamda sınıflandırma için ise sınırlı sayıda çalışma vardır [12, 14, 41, 43, 44, 45, 56]. Tabanidae familyası ve ordo içindeki diğer familyaların ilişkisini ortaya koymak için birbirine çok yakın morfolojik özelliklere sahip türlerde sistematığı kolaylaştıracak bir yöntem olan sistematik dışı gruplar oluşturulması uygun görülmüştür. Bromius grup, bovinus grup, glaucopis grup ve cordiger grup şeklinde bir çok tür üstü kategoriler araştırmacılar tarafından oluşturulmuştur. Tabanidae familyasının da içinde bulunduğu Tabanomorpha altordosu, birbirine çok yakında bulunan Pelecorhynchidae, Athericidae, Rhagionidae, Vermileonidae ve Tabanidae olmak üzere beş familyaya ayrılır. Ancak bu beş familyanın da filogenetik ilişkileri

problemlidir. Araştırmacılar Tabanomorphanın monofilisini birkaç sinapomorfiye dayandırır [15].

- Larval anten üzerindeki fırça şeklinde kıllar ve ergin alınının dışbükey ve yuvarlak olması [65-67]
- Vermileonidae familyasının Tabanomorpha içinde tutulmasının sebebi, Rhagionidae ve Pelecorhynchidae familyaları dışı üyelerinde olduğu gibi Vermileonidler'in dişilerinin de cercus taşınması [67]

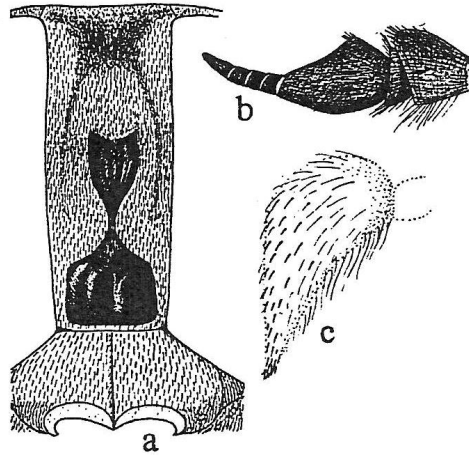
Sinapomorfilere (atasal paylaşılmış türemiş karakterler) sahip *Tabanus bromius* grup üyelerinin de morfolojik olarak ortak birçok özelliği vardır. Yakın familyalardaki ve familya içindeki sinapomorfiler sistematik kategorilerin tartışmalı olmasına neden olurlar.

Bromius grupta yer alan türler genellikle orta boyda, gözleri bantlı ya da bantsızdır. Başları biraz dardır, çizgisel callus az ya da çok basal callusla birleşmiştir. Genellikle sadece subcallustan ve gözlerin kenarlarından küreselden dikdörtgene doğru daralma görülür daha sonra genişler.

Bu çalışma kapsamında *bromius* grupta yer alan ve aşağıda tipolojik tür ayırt etmede kullanılan karakterleri verilen 10 türün dişileri kullanılmıştır [16].

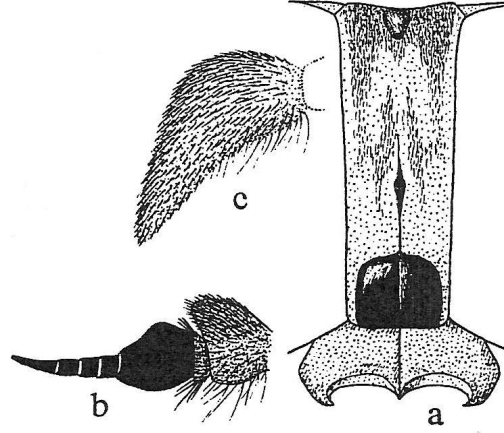
1. *Tabanus briani* Leclercq, 1962: Orta ve büyük boyda, gözler bantsız, alın geniş, üçüncü anten segmenti kahverengi, palpler kuvvetli ve beyazımsı sarı, median callus uzun, dar ve basal callusla daralarak birleşir. Abdomen grimsi siyah ve soluk desenli.

Şekil 1.1. *Tabanus briani* Lecl., dişi, a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



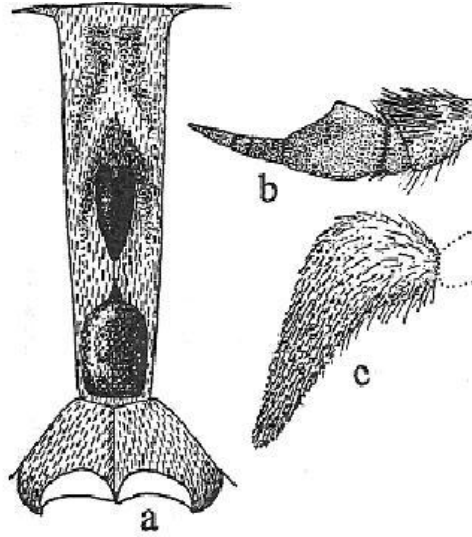
2. *T.armeniacus* Kröber, 1928: Orta boyda siyahımsı gri renkli, gözler çıplak ve bantsız, antenler siyah, palpler soluk renkli ve kalın, basal callus geniş, karemsi ve siyah, çizgisel callusla birleşir.

Şekil 1.2. *Tabanus armeniacus* Kröb., dişi, a. Alın b. Anten c. Palp [15]



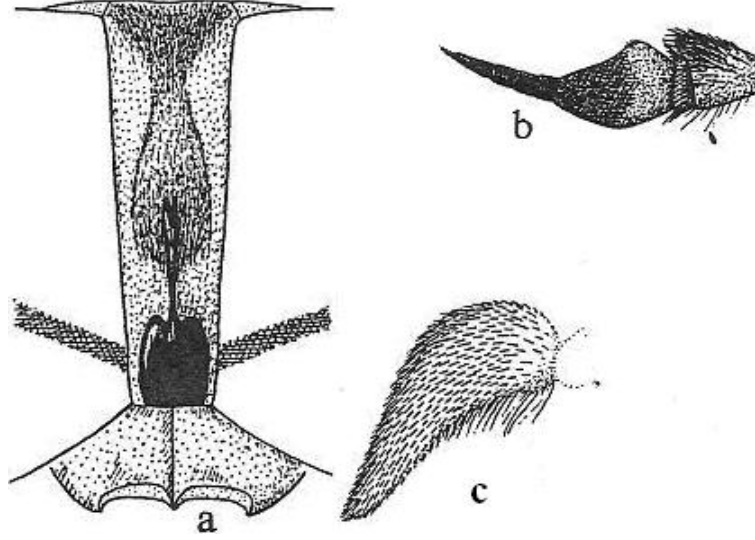
3. *T. indrae* Hauser, 1939: Orta boyda, gözler kılsız , bantsız ve *T. miki*'ye çok benzeyen ancak postocular margin kısa ve yoğun kıllı, abdomenin dorsalinde gümüşümsü griden gümüşümsü kahverengiye kıllarla desenli.

Şekil 1.3. *Tabanus indrae* Hauser, dişi, a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



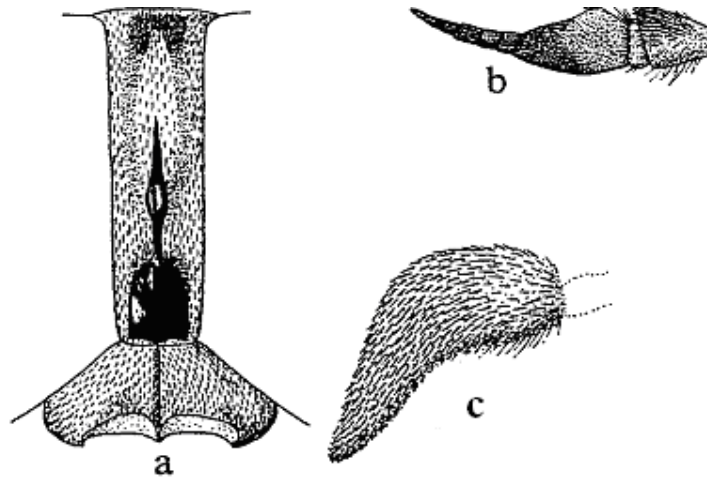
4. *T. bromius* Linne, 1758: Orta boyda grimsi bireyler gözleri bir bantlı ve çıplak, basal callus median callus ile birleşik, antenler siyahımsı kahverengi, abdomen dorsale doğru 3 sıra halinde solgun.

Şekil 1.4. *Tabanus bromius* L., a. Dişi alın, b. Dişi anten, c. Dişi palp [15]



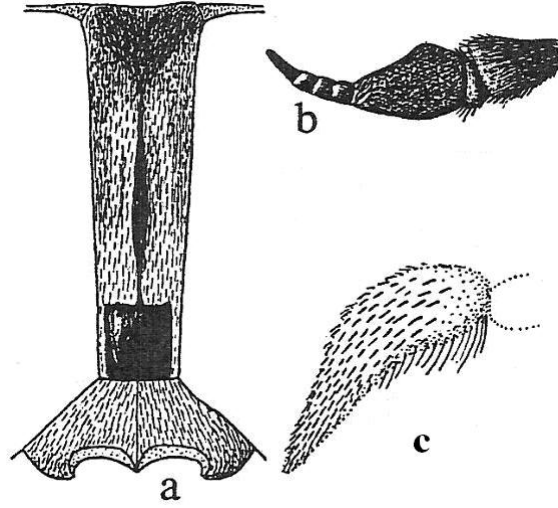
5. *T. miki* Brauer, 1880: Orta boyda bireyler, abdomen desenleri *T. bromius*'a benzer, öndeki 4 tergit az ya da çok kırmızımsı kahverengi ya da karnı kapsayacak şekilde abdomen bütünüyle koyu gri, dişilerde gözler çıplak ve çizgisiz, alın oldukça dar.

Şekil 1.5. *Tabanus miki* Brau., a. Dişi alın, b. Erkek anten, c. Dişi palp [15]



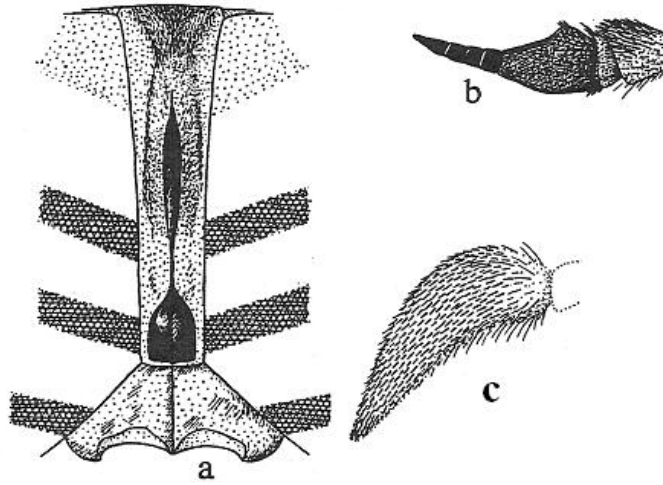
6. *T. regularis* Jaennicke, 1866: Küçük ya da orta boyda bireyler, *T. bromius*'a benzetilir ancak dişilerin alınları çok dar, basal callus uzun ve gözler bantsız, antenler siyah, ya üçüncü segmenti kahverengi ya da bütünüyle hepsi kahverengimsi.

Şekil 1.6. *Tabanus regularis* Jaen., dişi a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



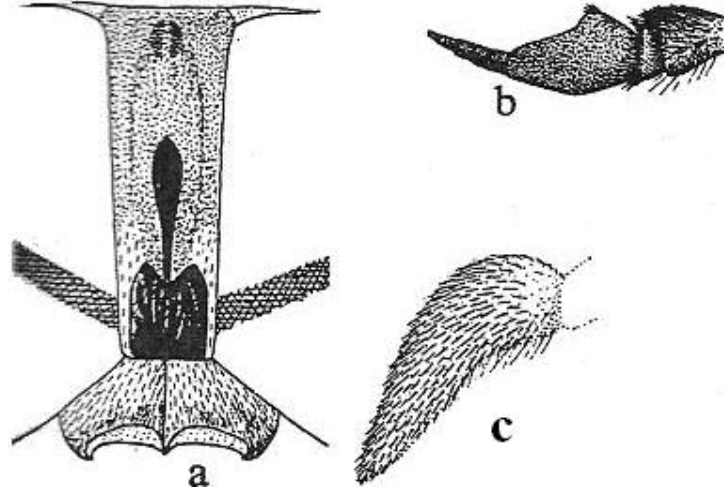
7. *T. tergestinus* Egger, 1859: Orta boydan büyüğe kadar değişken boyda, gözler kılsız, çıplak ve 3 bantlı, median callus düz ve basal callusla birleşik, abdomen kenarlarda kırmızımsı kahverengi.

Şekil 1.7. *Tabanus tergestinus* Egg., dişi a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



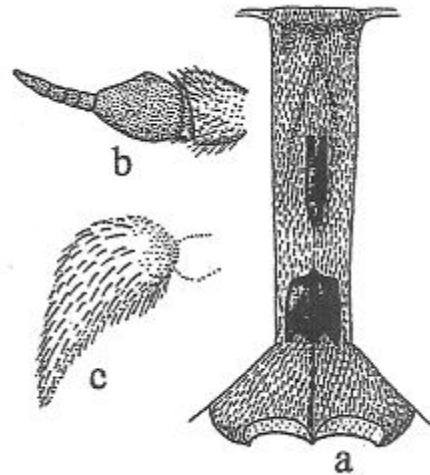
8. *T. maculicornis* Zetterstedt, 1842: Küçükten ortaya kadar değişken boyda, grimsi siyah türler *T.bromius*'a benzetilir ancak antenlerinin 3. segmenti daha geniş ve tekdüze kahverengidir. Gözbantları daha derin ve daha koyu renkli, postocular magrin daha geniş, abdomenin dorsal kısmı geniş ve çok fark edilmeyen üç sıra desenli.

Şekil 1.8. *Tabanus maculicornis* Zett., dişi, a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



9. *T. cuculus* Szilady, 1923 {Cordiger grup}: Küçük, siyahımsı gri bireyler bromiustaki gibi abdomenlerinde kahverengi çizgili, gözler çıplak ya da bantsız, baş dar, frontal calli parçalı, antenler kırmızımsı sarı, bacaklar tarsi dışında sarımsı kahverengi.

Şekil 1.9. *Tabanus cuculus* Szil., dişi a. Alın, b. Anten, c. Palp [15]



10. *T. karaosus* Timmer, 1984: Orta boyda bireyler, alın genellikle grimsi ya da siyahımsı, basal callus dikdörtgenden yuvarlağa doğru şekillenebilir, antenlerin ilk iki segmenti renklenme ve tüylenmede çok büyük değişkenlik gösterir, ya tamamen siyah ya da grimsi tozlu ve siyah tüylü, abdomenin dorsali ya da bir kısmı siyah renkli [17].

1. 5. Daha Önce Yapılmış Çalışmalar

Tabanidae faunası üzerine yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları; Yücel [17], Kılıç [18-24], Yağcı [25, 26], Hayat [27], Gören [28], Büber [29], Yaman [30]. Tabanidae üyelerinin biyolojisini konu alan bir çok çalışma yapılmıştır, bunlardan bazıları; [15], Tetik [31], Altunsoy [32], Squitier [38].

Ülkemiz dışındaki farklı coğrafyalarda da birçok araştırmacı tarafından Tabanidae türlerinin yayılışları, ekolojik tercihleri, mevsimlik-günlük aktiviteleri ve popülasyon dinamikleriyle ilişkili çalışmalar yapılmıştır [33–40].

Türkiye Tabanidae familyasından şimdiye dek Tabanidae familyasının 3 alt familyası, 9 cinse ait 167 türü ve 14 alttürü bildirilmiştir [20]. Çalışmaların tamamına yakınında da kullanılan yöntemler, klasik taksonomik yöntemlerden morfolojik ve tipolojik tür tayinine dayanan yöntemlerdir. Günümüzde moleküler biyolojinin gelişmiş hızlı, tutarlı ve duyarlı yöntemlerini kullanarak sistematik zoolojiye yeni veriler sunmak için Tabanidlerin filogenetik yakınlıklarını belirleyen çalışmalara da ihtiyaç vardır. Altunsoy [43], Boyes [44] ve Ivanischuk [45] ve de son olarak Cywinska ve ark.'nın [12] Kanada Tabanidlerinin DNA barkodlama sistemi ile identifikasyonunu konu alan çalışma bu konuda yapılmış en son çalışmadır.

Literatürde at sineklerinin filogenisiyle ilişkili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tabanidler için standardize bir DNA barkodlama sistemi yoktur. Son yıllardaki sınırlı sayıda çalışmalardan bazıları Yeates & Wiegmann [14] Tabanomorpha'nın 28S ribozomal gen dizilimine göre monofilisinin ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi belirlemeye yönelik, Wiegmann ve ark. [40] Diptera gruplarının filogenisi, Wiegmann ve ark. [41] Brachycera grubunun moleküler saati, Winterton ve ark. [42] bir başka Diptera grubu olan

Acroceridae'nin multiple moleküler markerlar kullanarak Bayesian metodu esas alınarak filogenisinin belirlenmesi çalışmalarıdır.

1. 6. Çalışmanın Amacı

Faunaları oluşturan canlılar topluluğu içinde hemen hemen dünyanın her bölgesinde yayılış gösteren ve 32 takım içinde yaklaşık olarak 1.200.000 türe sahip olan Insecta sınıfı en geniş canlı gurubunu oluşturmaktadır. Diptera ise bu sınıfın içinde çok sayıda türe sahip taksonlardan biridir.

Türkiye'deki çeşitliliğin belirlenmesi adına geleneksel şekilde sistematigi konu alan birçok çalışma yapılmış ancak Tabanidae faunasının filogenetik akrabalıklarının belirlenmesi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır [29, 30, 21-24, 47]. Geleneksel sistematik kurallarında kullanılan morfolojik karakterlerden olan genital organ yapıları, göz ve abdomendeki desenlenmeler ve baştaki kütikular yapılar çevresel faktörlerin değişmesiyle varyasyonlar gösterebilmekte, o nedenle akrabalık ilişkilerini tespit etmede yetersiz ya da yanıltıcı olabilmektedir. Buna karşılık gen analizleri, yüzyıllardan bu yana canlının atasından miras kalan evrimsel değişimlerin gözlenmesine yardımcı olabilmektedir. Bu açıdan morfolojik sınıflandırmanın gen dizilimi belirleme çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir [48-51].

Tabanidae familyasının farklı isimlendirilmiş üyelerinde görülen morfolojik farklılıkların tür farklılığından mı yoksa aynı türlerin morfolojik varyasyonlar taşımalarından mı kaynaklandığı sorusuna bir açıklık getirebilmek için gen dizisi analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmanın birincil amacı Tabaninae alt familyası, Tabanini tribusundan Tabanus cinsi içinde yer alan *bromius* gruptaki (*Tabanus briani*, *T. armeniacus*, *T. bromius*, *T. miki*, *T. regularis*, *T. tergestinus*, *T. maculicornis*, *T. karaosus*, *T. indrae*) ve karşılaştırma yapmak üzere *cordiger* grupta yer alan *T. cuculus*'un morfolojik farklılıklarının farklı türe işaret edip etmediğini saptamak, ikinci amacı ise ayrı tür iseler aralarındaki filogenetik akrabalık konusunda bilgi sağlamaktır. Çalışmanın diğer bir amacı ise Türkiye genelinde Tabanidae faunasına ilişkin bilgilerin genişletilmesi ve gen dizisi veri tabanlarına Türkiye Tabanidae familyasından verilerin kazandırılmasıdır.

Hayvan türlerinde %95 oranında filogenetik çözüm getiren 658 bazlık evrensel mitokondriyal (mt) gen bölgesinin cytochrome oxidase I (COI)'in kolaylıkla amplifiye etmeye uygun olduğu bildirilmiştir [14, 52-62]. Bu sebeple çalışmada %100'e yakın bir oranda filogenetik sonuç verme eğilimi yüksek olduğu bildirilen COI gen bölgesi kullanılarak, çoğaltılmış ve dizi analizi reaksiyonuna tabi tutulduktan sonra GENEIOUS 5.5 dizi analizi sonuçlarını hizalama ve karşılaştırma programı, ClustalW2 hizalama, NCBI ve BOLD siteleri ve MEGA5 biyoinformatik programlarıyla çeşitli filogenetik ağaçların oluşturulması gerçekleştirilmiştir.

1. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyaller

Çalışmada Türkiye'nin çeşitli merkezlerinden toplanan *Tabanus bromius* L. grup üyelerinin listesi Tablo 1'de verilmiştir. Eskişehir (Merkez), Eskişehir (Yarımca), Artvin (Merkez), Artvin (Yusufeli), Rize (Ayder), Rize (Merkez), Amasya (Merkez), Balıkesir (Dursunbey), Adapazarı (Kocaali), İçel (Namrun), Kastamonu (Tosya), Kastamonu (Azdavay), Karabük (Ovacık), Bolu (Abant) ve Edirne (Lalapaşa)'dan *Tabanus* örnekleri ışık tuzakları, Malezya tuzağı ya da elle toplanmış ve toplanan örnekler klasik Bayesian metod ile morfolojik karakterler kullanılarak tayin anahtarı yardımıyla [15] Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesinden Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ ve Uzm. Dr. Ferhat ALTUNSOY tarafından teşhis edilmiştir. Geçmiş yıllardaki arazi çalışmaları sırasında toplanan örnekler ilk etapta öldürme şişelerinde öldürülmüş ve laboratuvara taşınmıştır. Analiz edilecek örneklerden bazıları alkol şişelerinde bazıları ise kuru müze örneği olarak saklanmıştır.

Çizelge 2. 1. *Tabanus* türlerinin toplanma tarihleri ve lokasyonları

Lokalite	Populasyon adı	Tarih	Tür ismi	Deney kodu
Eskişehir(Merkez)	EsMer	07/08.2007	<i>T. briani</i>	TT1
Balıkesir(Dursunbey)	BaDur	25.07.1997	<i>T. briani</i>	TT2
Kastamonu (Azdavay)	KaAz	08.08.2000	<i>T. briani</i>	TT21 TT22 TT23 TT31

Artvin(Merkez)	ArtMer	22.08.2010	<i>T.armeniacus</i>	TT3
Adapazarı(Kocaali)	AdaKo	17.07.2000	<i>T.armeniacus</i>	TT5 TT24
Artvin(Yusufeli)	ArtYus	16.07.2010	<i>T. cuculus</i>	TT4
Edirne(Lalapaşa)	EdirLa	12.08.1995	<i>T. cuculus</i>	TT6 TT25
Rize(Ayder), Artvin(Merkez)	RiAy,ArtMer	20.08.2010, 22.08. 2010	<i>T. bromius</i>	TT7 TT8
İçel(Namrun)	İçNa	07.07.1990	<i>T. bromius</i>	TT26
Rize(Ayder), Artvin(Merkez)	RiAy, ArtMer	20.08.2010, 22.08. 2010	<i>T. miki</i>	TT9 TT10
Eskişehir (Yarımca)	EsYa	08.07. 2005	<i>T. miki</i>	TT27
Bolu(Abant)	BoAb	21.07. 1999	<i>T. miki</i>	TT32
Rize(Ayder)	RiAy	20.08.2010	<i>T. regularis</i>	TT11
Kastamonu(Tosya)	KaTos	26.07.1999	<i>T. regularis</i>	TT12 TT28
Artvin(Merkez)	ArtMer	22.08.2010	<i>T. karaosus</i>	TT13 TT14
Amasya(Merkez)	AmMer	22.08.2010	<i>T. tergestinus</i>	TT15
Karabük(Ovacık)	KaOv	22.09.2000	<i>T. tergestinus</i>	TT16 TT29
Artvin(Merkez)	ArtMer	22.08.2010	<i>T.maculicornis</i>	TT17
Bolu(Abant)	BoAb	21.07.1999	<i>T.maculicornis</i>	TT18 TT30
Artvin(Yusufeli)	ArtYus	16.07.2010	<i>T. indrae</i>	TT19 TT20

2.2. DNA Ekstraksiyonu ve PCR Reaksiyonu

Total genomik DNA'nın izolasyonu içeriği tablo 2'de belirtilen Speedtools Tissue DNA extraction kit (Instructions for Use - Cat. No. 21.136/7) uygulanarak yapılmıştır.

Çizelge 2. 2. Kit içeriği

Reaktif	50 kullanımlık Katalog No	250 Kullanımlık Katalog No
	21.136	No21.137
Buffer BT1	20 ml	5 x 20 ml
Buffer BB1	10 ml	5 x 10 ml
Reagent BB2	2.5 ml	5 x 2.5 ml
Buffer BB5 (konsantre)	7 ml	5 x 7 ml
Buffer BBW	30 ml	5 x 30 ml
Buffer BBE	13 ml	5 x 13 ml
Proteinaz K(liyofilize)	30 mg	5 x 30 mg
Proteinaz Buffer	1.8 ml	5 x 1.8 ml
Speedtools Tissue Tüpleri	50	5 x 50
2 ml Collecting tüpleri	100	5 x 100
BB3 için Label	1	5 x 1

2.2.1. Stok Solüsyonlarının Hazırlanması:

- Proteinaz K: 1.35 ml proteinaz buffer liyofilize haldeki proteinaz K içinde çözülmüştür. 6 aya kadar +4°C'de saklanabilir.
- BB3 Buffer: BB1 Ve BB2 tamamen birbirine karıştırılarak ve BB3 elde edilmiştir. Bu solüsyon 20-25°C'de 1 yıla kadar saklanabilir.
- %96'lık ethanolden 28 ml konsantre haldeki BB5'e eklenmiştir. Bu solüsyon da 20-25°C'de 1 yıla kadar saklanabilir.

2.2.2. DNA Ekstraksiyonu

1. Örneklerin Hazırlanması: çalışmaya başlamadan önce eppendorf ısıtıcı 56°C'ye ayarlanmıştır. Tabanus örnekleri ayrı petri kutularına alınmış ve örneklerin başları, abdomenleri, kanatları ve bacakları steril pens yardımı

ile ayrılarak daha önceden isimlendirilmiş etanol dolu saklama tüplerine bırakılmıştır. Saklama tüpleri dizi analizi sonrasında karşılaşılabilecek bir problem riskini önlemek için -20°C 'de saklanmıştır. Örneklerin torax kısımları yine daha önce isimlendirilmiş olan büyük eppendorf tüplerine ayrılmıştır.

2. Ön lizis aşaması: 180 μl BT1 ve 25 μl proteinaz K örneklerin üzerine bırakılarak önceden ısıtılmış 56°C 'lik eppendorf ısıtıcıda vortex konumunda 3 saat ile 1 gece aralığında bekletilmiştir.
3. Lizis aşaması: Bekletilen örneklere vortex+spin yapılmıştır. Üzerlerine 200 μl BB3 eklenerek tekrar vortexlenmiştir. 10 dk boyunca 70°C 'de bekletilmiştir. Ayrıca Elution buffer da bu esnada 70°C 'de beklemeye alınmıştır.
4. DNA bağlanması koşullarının ayarlanması: 70°C 'den alınan tüplere spin yapılmıştır ve 210 μl soğuk etanol eklenmiştir, ardından vortex ve spin uygulanmıştır.
5. DNA bağlanması aşaması: örneklerin hepsi 2 ml'lik column tüplerine alınmıştır ve $11,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Silika membranların yıkanması aşaması 1: Santrifüjlenen sıvı kısım atılırken filtre membranı bir başka 2 ml'lik koleksiyon tüpüne alınmış ve üzerine 500 μl BBW eklenmiştir. $11,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
7. Filtreler yeni 2 ml'lik koleksiyon tüplerine alınmış ve sıvı kısım atılmıştır.
8. Silika membranın yıkanması aşaması 2: filtrelerin üzerine 600 μl BB5 eklenerek $11,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Filtreler bu kez kapaklı eppendorf tüplerine alınmış, sıvı kısım tekrar atılmıştır.
9. Silika membranın kurutulması: Kapaklı eppendorfların kapakları açık şekildeyken içlerindeki filtreli koleksiyon tüpleriyle birlikte santrifüjde birer aralıkla $11,000 \times g$ 'de 1 dakika daha santrifüjlenmiş ve mebrandaki etanolün kurutulması hedeflenmiştir. Filtreler yeniden yeni kapaklı eppendorflara alınmıştır.
10. Elution aşaması ve saf DNA eldesi: Filtrelerin üzerine 70°C 'lik Elution bufferdan 100 μl eklenmiştir. 5-10 dakika oda sıcaklığında beklenmiş, $11,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu kez filtreler atılarak,

ependorf tüpleri isimlendirilmiş ve saf haldeki DNA eldesi yakın zamanda kullanılacaksa +4°C’de, değilse -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. PCR Reaksiyonu

Çizelge 2. 3. PCR reaktifleri ve miktarları

Reaktif	Miktar
5x My Taq Red Reaction Buffer	5 µl
Primer F (10 mM)	0,5 µl
Primer R (10 mM)	0,5 µl
Taq polymerase(My taq red; Biotools)	0,15 µl
dH ₂ O	17,85 µl
Templete DNA	1 µl
Toplam	25 µl

2.2.3.1. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Evrensel Olarak Spesifik Primerler ve Dizileri

Çizelge 2. 4. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Evrensel Olarak Spesifik Primerler ve Dizileri [63].

GB*	Yön	P.İ*	Primer	~B.S. *	Bp*	Rf. *
COI	İleri	LCOI	5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	50°C	658	Folmer ve ark., 1994
COI	Geri	HCOI	5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'	50°C	658	Folmer ve ark., 1994

*G.B.: Gen bölgesi, P. İ.:Primer ismi, B.S.: Bağlanma sıcaklığı, Bp: Base pair, Rf.:Referans

2.2.3.2. PCR Thermal Programları

- ❖ 94°C- 5'
 - ❖ 94°C- 30''
 - ❖ 42°C-45''
 - ❖ 72°C-1'
- } x 35 döngü
- ❖ 72°C-7'

PCR reaksiyonları toplamda 25 µl hacimde *MyGenie*TM 96/384 ve GeneAmp® PCR System 9700 makinalarında gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonları deneme aşamasında bazı türler 42-45°C arasında COI gen bölgesi için bariz görünen tek bir banda sahip olurken bazı türler düşük sıcaklıklarda birden fazla hatta 2'den fazla spesifik olmayan gen bölgelerine sahip oldukları için modifiye PCR teknikleri uygulanmıştır. Bazı türler için ise 40°C-52°C aralığında bir çok kez PCR denemesi yapılarak ürün elde edilmeye çalışılmış ve başarılı olunmuştur.

Touchdown PCR:

- ❖ 94°C- 5'
 - ❖ 94°C- 40''
 - ❖ 51°C- 30 ''
 - ❖ -0,2°C
 - ❖ 72°C-1'
- } x 14 döngü
- ❖ 94°C- 40''
 - ❖ 45°C - 30 ''
 - ❖ 72°C-60''
- } x 16 döngü

❖ 72°C-8'

51°C-45°C=6°C 6°C/30=0,2°C Her döngüde azalacak olan sıcaklık miktarı.

2.2.3.3. Agaroz jel hazırlığı ve UV transimülatörde görüntüleme

PCR ürünlerinin varlığını tespit etmek için agaroz jel hazırlanmış ve donduktan sonra örnekler havuzlara yüklenmiştir. %1,5'luk agaroz jel DNA'yı gözlemlemek için uygundur ve aşağıdaki oranlar kullanılarak hazırlanmıştır. DNA'nın görünür hale gelmesi için etidium bromürden daha güvenli, duyarlı, mikrodalgalara dayanıklı, daha uzun süre oda sıcaklığında kimyasal özelliğini yitirmeyen ve de UV transimülatörde daha iyi görüntü oluşturan GelRed™ kullanılmıştır.

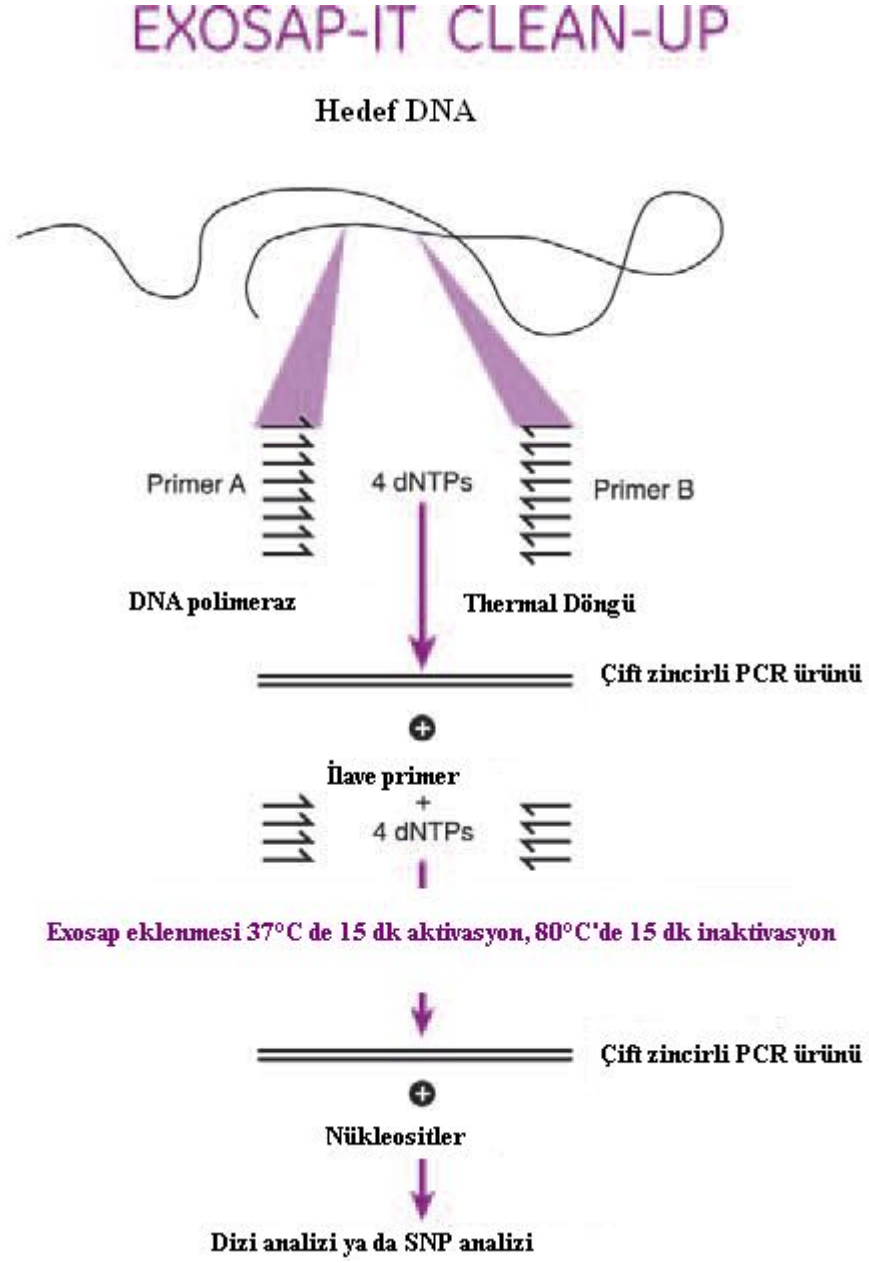
Çizelge 2. 5. Agaroz jel için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
1x TBE	100 ml
Agaroz	1,5 gr
GelRed™	0,4 µl

2.3. Cleaning Reaction (Temizleme Reaksiyonu)

Dizi analizi sonucunu elde etmek amacıyla PCR reaksiyonuna tabi tutulan DNA solüsyonunda istenmeyen dNTP'leri uzaklaştırmak için ExoSAP-IT™ enziminin kullanıldığı cleaning reaksiyonu yapılmıştır. ExoSAP-IT™'nin içerdiği iki hidrolitik enzim Exonuclease I ve Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ile istenmeyen molekülleri DNA'dan arındırılmıştır.

Şekil 2.1. ExoSAP-IT™ 'nin çalışma mekanizması [64]



Cleaning reaksiyonunun programı:

- ❖ 37°C-30'
- ❖ 80°C-15'
- ❖ 4°C-∞

2.4. Dizi Analizi Reaksiyonu ve Programı

Cleaning reaksiyonundan sonra DNA solüsyonu dizi analizine hazırlanarak dizi analizi için ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılmıştır. Reaksiyon toplamda 20 µl hacimde yapılmıştır.

Çizelge 2. 6. Dizi Analizi Reaksiyonunda kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
Terminator Ready Rection mix (buffer)	1, 5 µl
Primerler (3,2mM)	1 µl
BigDye™	1 µl
Templete DNA	1 µl
H ₂ O	15, 5 µl
Toplam	20 µl

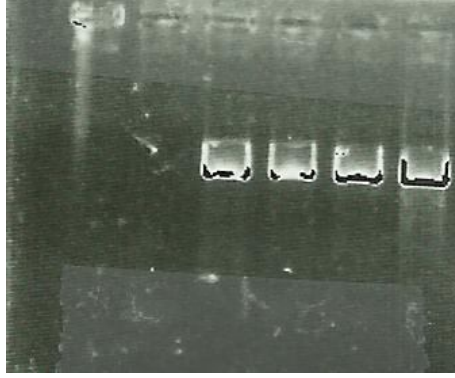
Dizi analizi programı:

- ❖ 96°C-1'
 - ❖ 96°C- 10''
 - ❖ 50°C-5''
 - ❖ 60°C-4'
- } x 35 döngü
- ❖ 4°C-∞

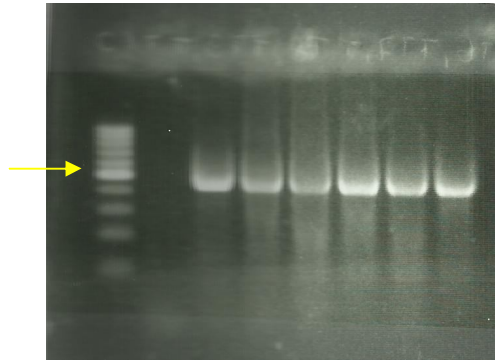
3. BULGULAR

3.1. PCR Reaksiyonu

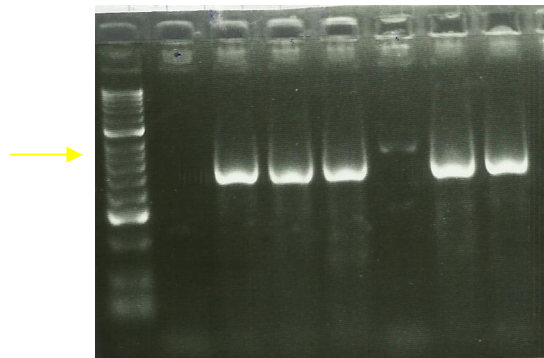
Şekil 3. 1. 1. PCR 1-Blanco, TT1, TT2, TT3, TT4 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü



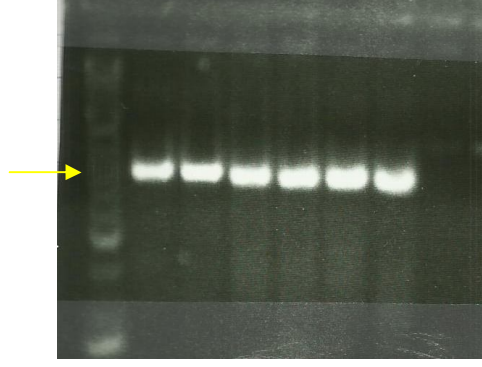
Şekil 3. 1. 2. PCR 2- Blanco, TT5, TT6, TT7, TT8, TT9, TT10 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 600 bp



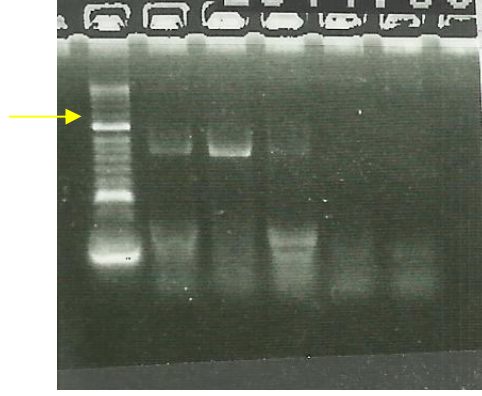
Şekil 3. 1. 3. PCR 3- Blanco, TT17, TT18, TT19, TT20, TT21, TT22 örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 700 bp



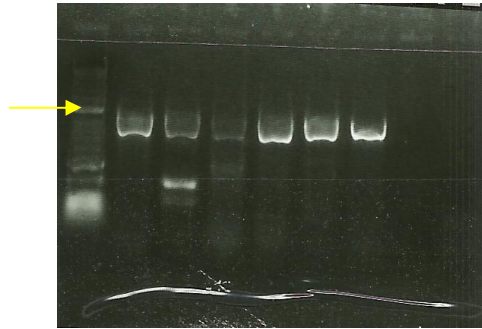
Şekil 3. 1. 4 PCR 5- TT11, TT12, TT13, TT14, TT15, TT16, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 600 bp



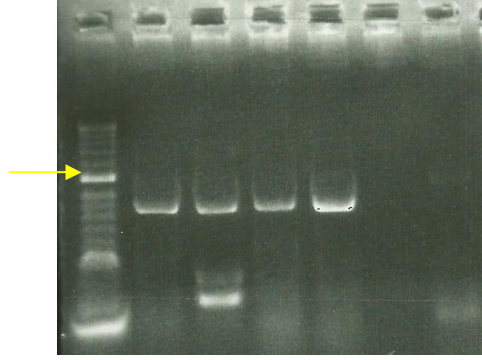
Şekil 3. 1. 5. PCR 38- TT23, TT24, TT25, Blanco, Blanco(tekrar) örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 1000 bp



Şekil 3. 1. 6. PCR 48- TT24, TT28, TT29, TT30, TT31, TT32, Boş kuyu, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 1000 bp



Şekil 3. 1. 7. PCR 49- TT24, TT28, TT29, TT30, Blanco örneklerinin L-COI ve H-COI gen bölgesi PCR sonucu jel görüntüsü → 1000 bp



3.2. Dizi Analizi

Çizelge 3. 2. 1. Dizi analizi tüplerinin erişim kodları

Sequence Code	DNA code	Primer	Run SCT	Sequence Code	DNA code	Primer	Run SCT
SY1	TT1	L-COI	100819800	SY23	TT13	L-COI	100842790
SY2	TT2	L-COI	100819800	SY24	TT14	L-COI	100842790
SY3	TT3	L-COI	100819800	SY25	TT15	L-COI	100842790
SY4	TT4	L-COI	100819800	SY26	TT16	L-COI	100842790
SY5	TT1	H-COI	100819800	SY27	TT17	L-COI	100842790
SY6	TT2	H-COI	100819800	SY28	TT18	L-COI	100842790
SY7	TT3	H-COI	100819800	SY29	TT19	L-COI	100842790
SY8	TT4	H-COI	100819800	SY30	TT21	L-COI	100842790
SY9	TT5	L-COI	100823875	SY31	TT22	L-COI	100842790
SY10	TT6	L-COI	100823875	SY32	TT11	H-COI	100842790
SY11	TT7	L-COI	100823875	SY33	TT12	H-COI	100842790
SY12	TT8	L-COI	100823875	SY34	TT13	H-COI	100842790
SY13	TT9	L-COI	100823875	SY35	TT14	H-COI	100842790
SY14	TT10	L-COI	100823875	SY36	TT15	H-COI	100842790
SY15	TT5	H-COI	100823875	SY37	TT16	H-COI	100842790
SY16	TT6	H-COI	100823875	SY38	TT17	H-COI	100842790
SY17	TT7	H-COI	100823875	SY39	TT18	H-COI	100842790
SY18	TT8	H-COI	100823875	SY40	TT19	H-COI	100842790
SY19	TT9	H-COI	100823875	SY41	TT21	H-COI	100842790
SY20	TT10	H-COI	100823875	SY42	TT22	H-COI	100842790
SY21	TT11	L-COI	100842790	SY48	TT23	L-COI	100894244
SY22	TT12	L-COI	100842790	SY49	TT24	L-COI	100894244
SY50	TT25	L-COI	100894244	SY58	TT26	H-COI	100894244
SY51	TT26	L-COI	100894244	SY59	TT27	H-COI	100894244
SY52	TT27	L-COI	100894244	SY60	TT30	H-COI	100894244
SY53	TT30	L-COI	100894244	SY61	TT31	H-COI	100894244
SY54	TT31	L-COI	100894244	SY62	TT29	L-COI	100894242
SY55	TT23	H-COI	100894244	SY63	TT29	H-COI	100894242
SY56	TT24	H-COI	100894244	SY64	TT28	L-COI	100894544
SY57	TT25	H-COI	100894244	SY65	TT28	H-COI	100894544

Yukarıda numaralandırılmış ve kodlandırılmış olan dizi analizi sonuçları grafik halinde Ek-1 de gösterilmiştir. Analiz için kullanılabilir oranda sağlıklı olan piklerdeki düzeltmeler ve primer traşlanması GENIOUS programında yapılmıştır. L-COI ve H-COI dizileri eşleştirilerek amplifiye edilen diziler fasta formatında elde edilmiş, çizelge 3.2.2. de nükleotid dizileri belirtilmiştir.

Çizelge 3. 2. 2. LCOI-HCOI çakıştırılmış, primerleri traşlanmış dizi analizi sonuçları

TT1	AACACTATACTTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAAATTCGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTCAATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTCGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGGTCAGTTGATTAGCAATTTTTTCT TTACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTCATCAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTGACCGAATACCAT TATTTGTAGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTAC CTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAAT ACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAACA CTTATTC
TT2	AACACTATACTTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAAATTCGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTCAATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTCGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGGTCAGTTGATTAGCAATTTTTTCT TTACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTCATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTGACCGAATACCAT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAAC ACTTATTC
TT3	AACATTATATTTTATTTTGGAGCGTGGGCTGGAATAATTGGTACATCAT TAAGTATTTTAAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAAATTGGA GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTTATAAT TTTCTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCACGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTGGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTAGCCATTTTTTCT CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCAATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC AACAGTAATTAATATACGTTCTACAGGAATTACATTTGACCGAATACCCT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACCGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT



TT4	AACATTATATTTTTATTTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATTGGTACTTCAC TAAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGTCATCCAGGATCATTAATTGGA GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTTGTTATAAT TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCTCCCGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGACTATTACCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGGACTGGTTGAACTGTTTACCCACCTCTAT CTGCTGCAATTGCTCATGGAGGAGGTTGAGTTGACTTAGCTATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCCACAGGAATTACATTTGATCGAATACCTT TATTTGTATGGGCTGTAGTAATTACAGCTATTCTTTTACTATTATCTTTA CCTGTATTAGCAGGGGCAATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGACCCCGCAGGAGGAGACCTATTCTATACCAAC ATTTATTT
TT5	AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCGTGGGCTGGAATAATTGGTACATCAT TAAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAATTGGA GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTTGTTATAAT TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCACGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTGGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCT CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCAATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC AACAGTAATTAATATACGTTCTACAGGAATTACATTTGACCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACCGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGATCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT
TT6	AACACTATATTTTTATTTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTTAATTCGAGCCGAATTAGGTCATCCTGGATCATTAATTGGA GATGACCAAATTTATAACGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTTGTTATAAT TTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TCCCTTTAATATTGGGGGCTCCTGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGACTATTACCCCATCTTTAACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CAGCCGCAATTGCTCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCA CTACACTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTTGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCGGTATTAGCGGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATTTAAA TACATCCTTTTTTGACCCTGCGGGAGGGGAGACCCAATCTTATACCAAC ATTTATTC
TT7	AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGTCATCCAGGATCATTAATTGGT GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCACGCTTTTTGTCATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCTCCTGATATAGCATTCCCCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGACTACTACCTCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTTGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATCCTTCTATTATTATCTTTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGGGAGATCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT



TT8	AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAATTGGA GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCACGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCCCGGATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGAAGTGGTTGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCTCATGGAGGAGGGTCAGTTGACTTAGCTATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTTGACCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCTTTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGGAATTTAAA TACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGATCCAATTTTATACCAAC ATTTATTT
TT9	AACATTATATTTTTATTTTTGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTTAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTGTGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTCGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT
TT10	AACATTATATTTTTATTTTTGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTTAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTGTGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTCGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT
TT11	AACATTATATTTTTATTTTTGGGACATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTTAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTGTGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTCGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT

TT12	AACATTATATTTTTATTTTTGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTAAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGATCCAGCAGGAGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT
TT13	AACATTATATTTTTATTTTTGGGGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTAAATTCGAGCTGAATTAGGTCATCCAGGATCATTAATTGGT GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCNCCTGATATAGCATTTCCTCCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGTACTGGATGAACAGTTTATCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCACATGGAGGGGGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGATTACATTTGACCGAATACCTT TATTTGTATGGGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCCGTATTAGCAGGAGCCATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACTTCATTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAAC ACTTATTC
TT14	AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTAAATTCGAGCTGAATTAGGTCATCCAGGATCATTAATTGGT GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCTCCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGTACTGGATGAACAGTTTATCCACCACTAT CTGCTGCAATTGCACATGGAGGGGGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGATTACATTTGACCGAATACCTT TATTTGTATGGGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCCGTATTAGCAGGAGCCATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACTTCATTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAAC ACTTATTC
TT15	AAATAAATGAAAGTATAAAATTGGGTCACCTCCTCCTGCTGGATCAAAAA ATGAAGTATTTAAATTTGATCAGTTAAAAGTATAGTAATAGCTCCTGCT AATACAGGTAAGGATAATAATAAAAAGAATCGCTGTAATTACTACAGCTCA TACAAATAAAGGTATTCGATCAAATGTAATTCCTATAGATCGTATATTAA TTACAGTAGTAATAAAATTAACAGCTCCTAAAATAGAAGAAATACCTGCT AAATGAAGTGAAAAAATTGCTAAATCAACTGATCCTCCTCCATGAGCAAT TGCAGCAGATAGGGGAGGATAAACTGTTTCATCCAGTTCCAGCTCCATTTT CTACTATACTACTAGCCAATAGAAGAGTCAATGATGGAGGTAATAATCAA AACTTATATTATTTATTCGAGGAAATGCTATATCAGGAGCTCCTAATAT TAAAGGAACATAATCAATTTCCAAACCCTCCAATTATAATAGGTATTACTA TAAAGAAAATTATTACAAAAGCATGTGCTGTTACAATTACATTATAAATT TGGTCATACCAATTAATGATCCTGGATGTCCTAATTCAGCTCGAATTAA AATACTTAATGAGGTACCAATTATTCCAGCTCATGCTCCAAAGATAAAAT ATAATGTT

TT16	AACATTATATTTTTATCTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACCTCAT TAAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAATTGGT GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACATGCTTTTGTAAATAAT TTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGGTTTGGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCATCATTGACTCTTCTATTGGCTAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTATCCCTCCCCTAT CTGCTGCAATTGCTCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTTATTAC TACTGTAATTAATATACGATCTATAGGAATTACATTTGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACAGCGATTCTTTTATTATTATCCTTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACTTCATTTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGTGACCCAATTTTTATACCAAC ATTTATTT
TT17	AACATTATATTTTTATTTTTGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTTAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCCTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTTATATCAAC ATTTATTT
TT18	AACATTATATTTTTATTTTTCGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTTAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCCTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTGTGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATCTTCGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTTATATCAAC ATTTATTT
TT19	AACCTTATATTTTTATTTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACTTCAT TGAGTATTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCCGGGTCATTAATTGGG GATGACCAAATTTATAACGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTATAAT TTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCACCGCTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCT CTCCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTTGATCGAATACCTC TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCTCTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACATCATCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCTATTTTTATATCATC ATTTATTC

TT21	AACACTATACTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAATTCGGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTTCATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTCGGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGGGGTTCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT TTACACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTCATTAC TACAGTGATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTTCGACCGAATACCAT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGAGACCCAATTTTATACCAAC ACTTATTC
TT22	AACACTATACTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAATTCGGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTTCATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTCGGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGGGGTTCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT TTACACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTCATTAC TACAGTGATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTTCGACCGAATACCAT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGAGACCCAATTTTATACCAAC ACTTATTC
TT23	AACACTATACTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAATTCGGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTTCATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTCGGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGGGGTTCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT TTACACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTCATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTTCGACCGAATACCAT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGGAGACCCAATTTTATACCAAC ACTTATTC
TT24	AACATTATATTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACTTCCC TAAGTATTTTAATTCGGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAAATTGGG GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTCATAAT TTTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGACTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCACCCTAT CTGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTCGATCGAATACCTT TATTTGTGTGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTCGATCCAGCAGGAGGGAGACCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT

TT25	<p>TGGGGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCACGCTTTTGTTA TAATTTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAACTGA TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAA TAATATAAGTTTTTGTACTTCCCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCA GTAGTATAGTAGAAAACGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTCTACCCACCA CTATCAGCCGCAATTGCTCATGGAGGGGTTTCAGTTGATTTAGCTATTTT TTCACCTCATTTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGGGCCGTTAATTTTA TTACTACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACCTTTGACCGAATA CCTTTATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTTTATTACTATC TTTACCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATT TAAATACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATAC CAACATTTATTT</p>
TT27	<p>AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCNTGAGCTGGAATAATTGGTACTTCCC TAAGTATTTTAAATTCGGGCTGAATTAGGGCATCCAGGATCATTAAATTGGA GATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTGATAAT TTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGAATTTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCTCCTGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGTATTATTACCTCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTACCCACCCTAT CTGCTGCAATTGCACATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTCTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTACATTTGACCGAATACCTT TATTCGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTCTATTATTATCATT CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTCGACCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTTTATACCAAC ATTTATTT</p>
TT29	<p>AACATTATATTTTTATCTTTGGAGCATGAGCTGGAATAATTGGTACTTCAT TAAGTATTTTAAATTCGGGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAAATTGGT GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACATGCTTTTGTAAATAAT TTTCTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGTATTATTACCTCCATCATTGACTCTTCTATTGGCTAGTAG TATAGTAGAAAATGGAGCTGGAACGGATGAACAGTTTATCCTCCCCTAT CTGCTGCAATTGCTCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCA CTTCATTTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTAC TACTGTAATTAATATACGATCTATAGGAATTACATTTGATCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACAGCAATTCCTTTTATTATTATCCTTA CCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACTTCATTTTTTGTATCCAGCAGGAGGAGGTGATCCAATTTTATACCAAC ATTTATTT</p>
TT30	<p>AACATTATATTTTTATTTTTGGAGCGTGGGCTGGAATAATTGGTACATCAT TAAGTATTTTAAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCAGGATCATTAAATTGGA GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTGTGATAAT TTTCTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTTCACGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGTATTATTACCCCGTCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG TATAGTGGAAAATGGAGCTGGAACGGATGAACAGTTTACCCACCCTAT CTGCTGCAATTGCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCT CTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTAC AACAGTAATTAATATACGTTCTACAGGAATTACATTTGACCGAATACCTT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACTGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCAGTATTAGCGGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTAAA TACATCATTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAAC ATTTATTT</p>

TT31	AACNCTATACTTTATTTTCGGGGCATGAGCTGGAATAATCGGTACCTCGT TAAGTATTTTAATTCGGGGCTGAATTAGGGCACCCAGGTTTATTAATTGGG GATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTTGTATAAT TTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTCGGAAATTGATTAG TTCCTTTAATATTAGGGGCCCCAGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAAT ATAAGTTTTTGATTATTACCCCATCATTGACTCTTTTATTAGCCAGTAG CATAGTCGAAAATGGAGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTAT CAGCTGCAATTGCCCATGGAGGAGGATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCT TTACACTTAGCCGGGATTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTAC TACAGTAATTAATATACGATCTACAGGTATCACTTTTCGACCGAATACCAT TATTTGTATGAGCTGTAGTAATTACGGCTATTCTTTTATTATTATCTTTA CCTGTACTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATCTAAA TACTTCATTCTTTGACCCTGCAGGAGGGGGAGACCCAATTTTATACCAAC ACTTATTC
-------------	--

3.3. Filogenetik Analiz

Elde edilen dizi analizi sonuçları Barcoding Of Life Data System v 2.5 (BOLD-Yaşamın barkodlanması) veri tabanından yararlanarak analiz edilmiştir [13]. BOLD, Kanada merkezli bir milyondan fazla ve diğer bölgelerle birlikte yaklaşık 1, 5 milyon örneğin barkod verilerine sahiptir. Kimura 2 parametresi baz alınarak ve 3 kodon pozisyonunu da kullanarak BOLD veri tabanından 100 adet dizi arasında karşılaştırılma yapıldığında bu çalışmada kullanılan izolatların unknown specimen adı altında Tabanidae üyesi oldukları görülmektedir [Ek 2].

Çalışmada elde edilen yaklaşık 658 baz çifti uzunluğundaki gen bölgelerinin nükleotid dizileri, NCBI-blastx veri tabanı kullanılarak kodladıkları 6 açık okuma çerçevesinden gapsiz çerçeveler edinilmiştir. Gen bankasından 4 Tabanidae üyesi de analize eklenmiştir. Gapsiz çerçeveler ClustalW2 veri tabanında hizalanmış ve Jalview’de görüntülenmiştir. 1000 bootstraplı NJ ağacı elde edilmiştir [Ek 3].

Farklı parametreler kullanarak daha detaylı sonuç elde etmek için izolatların nükleotid dizileri ile birlikte NCBI’den 21’i Tabanidae familyasından ve dış grup olarak seçilen 2’si Pelechorhynchidae familyasından toplam 23 izolatın birbirine homolog olan nükleotid dizileri ClustalW2’de hizalanmış ve tüm gaplar, hizalama kalitesi düşük olan bloklar ve tüm izolatlarda korunmuş olan bloklar Jalview yardımıyla silinmiştir. Temizlenen diziler tekrar ClustalW2’de hizalanmış ve ardından FASTA formatına alınmıştır. Hizalamalar MEGA5’te görüntülenmiş, 1., 2. ve 3. kodon pozisyonları için Kimura 2 parametre modeli

baz alınarak Neighbor joining ve Nearest-Neighbor-Interchange metodunun kullanıldığı maximum likelihood ağacı oluşturulmuştur [Ek 4].

Gen dizisini oluşturan 3 kodon pozisyonuna da aynı istatistiksel metotla yaklaşmak filogenetik analize fenetik bir mantık katar. Fenetik yaklaşımda organizmanın her karakterine aynı değer biçilir ancak kodonların her birine aynı değer biçilmesi evrimsel süreçteki değişikliğin göz ardı edilmesine yol açar. Evrimsel süreçte 3 kodonun mutasyon geçirme olasılığı eşit değildir. Filogenetik analizde, 2. kodondan daha hızlı farklılaşma riski olan 1. ve 3. kodon pozisyonları için daha hızlı değişim hızını öngören, 2. kodon için evrimsel değişim riskinin daha az olduğunu öngören bir modelin kullanılması sonucun anlamlandırılmasında yardımcı olacaktır. General Time Reversible (GTR) Gamma distribution modeli, evrimsel süreçte 2. kodonun 1. ve 3. kodondan daha korunmuş olduğunu öngörerek analiz yapan istatistiksel bir yöntemdir. Bu nedenle çalışmada elde edilen diziler ClustalW2’de hizalanmış ve tüm gaplar, hizalama kalitesi düşük olan bloklar ve tüm izolatlarda korunmuş olan bloklar Jalview yardımıyla silindikten sonra temizlenen diziler tekrar ClustalW2’de hizalanmış ve ardından FASTA formatına alınarak GENEIOUS bilgisayar programında General Time Reversible (GTR) Gamma distribution modeli yönteminin uygulanması uygun görülmüştür [Ek 5]. Bu yöntem için maximum likelihood’un daha hızlı bir uygulaması olan RAxML uygulanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Başka hiçbir bilim dalında, alanların alt bölümleri arasında biyoloji alanındaki kadar güçlü bir tezat ve uğraş görülmemektedir. Problemler çok çeşitli olduğundan, biyoloji alanında uygulanan metodlar, başka bir bilim dalına kıyasla daha çeşitlidir. Bu çeşitlilik nedeniyle karşılaşılan çok sayıda problemden herhangi birinin çözülebilmesi, yoğun konsantrasyon, zaman ve alanında uzmanlık gerektirmektedir.

Biyoloji alanındaki tüm çalışmaların temelini taksonomi oluşturur. Yaşayan doğal objeler arasındaki tüm bağlantının araştırılması ve korunması sistematığın görevlerindedir. Sistematik temelini de canlılar arasındaki ilişkilerin ve doğal süreçte geçirdikleri değişimlerin araştırılması oluşturur.

Son yıllara kadar sınıflandırma alanında büyük ölçüde morfoloik özellikleri karşılaştırmaya dayalı yöntemler kullanılmıştır. Her ne kadar bu karşılaştırmalarda homoloji esas alınsa da karakter varyasyonlarının fazla olması tanımlamaları zorlaştırmakta ya da yetersiz bırakmaktadır. Teknolojik gelişmeye de bağlı olarak biyoloji alanındaki tanımlamalarda ve akrabalık ilişkilerinin araştırılmasında moleküler seviyede kısa zamanda değerli sonuçların elde edildiği çalışmalar yapılmaktadır. Bu alanlardan birisi de filogenetik sistematiktir.

Filogenetik sistematikte ilişkiler soy ağacını yani taksonları oluşturmada tek atadan gelme ölçüsünün kullanılması esasına dayanır. Filogenide milyonlarca nesil dikkate alındığında mutasyonlar, seleksiyonlar ve yeni birleşmeler nedeniyle sayısız gende değişimler meydana gelir ve sonuçta yakın akrabalar arasında çok belirgin farklar oluşur. Bu durumun aksine uzun yıllar boyunca genotipinde herhangi bir değişiklik meydana gelmeyen ya da gelse bile fenotipinde bir değişiklik göstermeyen canlı gruplarının varlığından da söz edilebilir [68].

Belirli genler ve bazı proteinler evrimsel kronometreler olup, evrimsel değişimi ölçerler. Diğer bir değişle işlevsel olarak benzer (homolog) makro moleküllerin nükleotid ve aminoasit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıkların sonucudur. Moleküler dizileme ve evrimsel uzaklıkların ölçülmesi amacıyla yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküllerin seçilmesi şarttır. Kusursuz bir moleküler kronometreyi tanımlayan bazı kriterler vardır. Bunlardan ilki, moleküler kronometre, çalışmak için seçilen grup içerisinde evrensel olarak

yaygın olmalıdır. Bu tüm organizmaların karşılaştırılmasına yardım eder. İkinci olarak, molekül her organizma için işlevsel olarak homolog olmalıdır aksi halde işlevselliği farklı olan moleküllerin dizi benzerliği göstermesi beklenmez. Üçüncü olarak, analizler için dizileri sıralamak amacıyla molekülün korunmuş ve deneysel olarak tekrar edilebilir dizi bölgeleri içermesi çok önemlidir. Son olarak seçilen molekül dizisinin organizmadaki evrimsel değişimi bir bütün olarak yansıtması gerekir. Aslında ölçülecek filogenetik uzaklık artıkça, dizilerdeki değişim oranının yavaşlaması gerekir ki bu sayede çok uzun bir zaman sürecinde meydana gelen değişimler bize evrimsel sinyalleri işaret eder. Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmekte ve bunu destekleyen şekilde bir çok moleküler temelli çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Küçük karşılaştırmalı nükleer gen bölgeleri olan 18S ve 28S, bazı histon alt üniteleri, mitokondriyal genlerin bazı parçaları (cox1, cox2, cytB, 16S ve 12S) ve bazı gelişim genleri (Wg-Kanat, Hox) Arthropodları karşılaştırmalı olarak analiz etmeye yarayan işlevsel gen bölgeleridir [8].

Toda ve Murai (2007) tarafından yapılan çalışmada 118 Thripidae örneğinin COI gen bölgesi çoğaltılmış ve analizler sonucunda 17 farklı haplotipe ayrıldıkları bildirilmiştir. Bazı haplotiplerdeki yüksek homolojilerin varlığı tespit edilmiştir. Toda ve Murai analizlerinde NJ metodunu, parsimoni ve maximum likelihood istatistiksel yöntemlerini kullanmışlardır [63].

Hebert ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada Artropoda, Mollusca, Chordata, Echinodermata, Annelida, Nematoda Ve Platelminthes olmak üzere 100 farklı türün COI profilleriyle filogenetik analizler uygulanmıştır. Çalışmada filum ve ordo seviyesindeki homoplasi etkilerini azaltmak için Poisson corrected-p uzaklık amino asit dallanması metodu kullanılırken, tür içindeki homoplasiyi azaltmak için bireyler arasındaki evrimsel uzaklık az olduğunda kullanılan en iyi metrik yöntem olan Kimura 2 parametresini kullanmışlardır. COI tabanlı identifikasyonun hayvanlar için genel anlamda iyi çalıştığını göstermişlerdir [13].

Cywinska ve ark. (2010) tarafından Kanada at sinekleri ve geyik sinekleri (Tabanidae) için DNA barkodlanması ve identifikasyonları için yapılan çalışmada 42 türden 332 Kanada tabanid üyesi COI gen bölgesi üzerinde filogenetik analizler yapılmıştır. Analizlerde Kimura 2 parametresi, NJ ve Bayesian metodları kullanılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada da kullanılan primerle aynı diziye sahip

COI primerinin Kanada kökenli tabanidlerde çok iyi çalıştığını ve filogenetik yakınlık belirlemede kullanılabileceğini göstermişlerdir [12].

Tabanidae türlerinin sınıflandırılmasında uzun yıllardır morfolojik karakterler baz alınmıştır. Bir çok araştırmacı bu morfolojik karakterler üzerinden oluşturulmuş tayin anahtarları yayınlamışlardır [15, 69]. Diğer taraftan morfolojik karakterlerin sınıflandırmada yetersiz kaldığını rapor eden bazı araştırmacılar sitogenetik çalışmalar yapmışlardır [18, 45]. Fakat bu türlerin sitogenetik özelliklerinde de ayırım yapılması zordur [18]. Bu çalışmanın konusunu oluşturan *bromius* türleri birbirlerinden çok küçük morfolojik farklılıklar gösterirler ki bu farklılıkların varyasyon olabileceği hipotezini düşündürürler. Morfolojiye dayalı teşhislerde zorluklar ya da hatalar olabildiği için moleküler temelli sınıflandırılma ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Çalışmada dizi analizi yapılan her izolatin BOLD veri tabanında eşleşmesinin bulunmadığı ancak, Ek-2’de unknown specimen adı altında dizileri eşleştirilen TT3-TT5-*T. armeniacus*, TT7-TT8-*T. bromius*, TT13-TT14-*T. karaosus*, TT15-TT16-TT29-*T. tergestinus* ve TT30-*T. maculicornis* izolatlarımız için sonuç verdiği görülmüştür. Bazı ağaçlarda ismi mavi renkle gösterilen tür- *T. rufokrater* W. gen bankasındaki izolattır [64].

Moleküler hizalama temelli çalışmalarda araştırmacılar nükleotid dizileri hizalama sonuçlarından daha fazla protein hizalaması sonuçlarına güvenirler. Bu sebeple protein dizisi üzerinden çalışıldığında elde edilen ağaç Ek-3, Şekil 4. 11’de sunulmuştur. Ancak oluşan protein ağacında *Atherix sp.* (GB) dış grup olarak kalırken, dış gruptan *Chrysops sp.* (GB) ile 64 bootstrap değeriyle ayrılan tüm örnekler için protein temelli bir farklılaşma gözlenmemiştir. Yalnızca *T. tergestinus* türlerinin diğer tüm örneklerden az ya da çok protein temelli ayrıldığı görülmektedir. Yine de *bromius* grup için filogenetik yakınlık söz konusu olduğunda COI gen bölgesinin protein temelli karşılaştırmada yeterli olmayacağı anlaşılmaktadır.

Bu nedenle *bromius* grubu COI gen bölgesi filogenetik karşılaştırılması için nükleotid dizisi temel alınmasının daha uygun olacağı görülmektedir. Kimura 2 parametre modeli baz alınarak Neighbor joining ve Nearest-Neighbor-Interchange metodunun kullanıldığı analizde hem NJ hem ML yöntemleriyle ağaçlar oluşturulmuştur. Nearest-Neighbor-Interchange metodunda yerel dal değiş

tokuşu yapılır. Ağaçtaki her bir yerel dal 4 yerel alt ağacı bağlayan dalı belirler. Bu ağaçlardan her birinin diğer taraftaki biri ile yer değiştirmesinin ardından optimal ağaç bulunur. Bu şekilde elde edilen optimal ağaçlar Ek-4'te sunulmuştur. Ek-4'teki NJ ve ML ağaçlarının temelde 2 dala ayrıldıkları ve çalışma kapsamındaki izolatların ağaçtaki konumlarının arasına hiçbir gen bankası örneğinin yerleşmediği görülmüştür. Bu durum henüz gen bankasında ya da çeşitli gen dizisi veritabanlarında Türkiye'den *bromius* üyelerine ait yayınlanmış bir verinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Türkiye izolatlarının NJ ağacında 7 gruba, ML ağacında ise 8 gruba ayrıldıkları görülmektedir.

İzolatlardan TT1-TT2-TT21-TT22-TT23-TT31-*T. briani* Ek 4 NJ ağacında 97, ML ağacında 98 bootstrap değeriyle aynı kökten ayrıldıkları, ancak klad içinde farklı populasyonlardan olduklarını kanıtlayacak şekilde dallandıkları görülmüştür. Yine her iki ağaçta da 99 bootstrap değeriyle birbirinden ayrılmayan *T. karaosus*, *T. briani*'ye en yakın türler olmuşlardır. *T. karaosus*'un, TT1-TT2-TT21-TT22-TT23-TT31-*T. briani* izolatları gibi coğrafik farklılığı belirten şekilde dallanmalarının sebebi Doğu Karadeniz bölgesi için endemik olması olabilir [16]. Dolayısıyla TT13 ve TT14'ün 99 bootstrap değeriyle desteklenerek aynı kladda bulunmaları sınırlı bölgede yayılım göstermeleri nedeniyle beklenen bir sonuçtur. TT1-TT2-TT21-TT22-TT23-TT31-*T. briani* izolatları Eskişehir (Merkez), Balıkesir (Dursunbey) ve Kastamonu (Azdavay) olmak üzere 3 farklı lokaliteden toplanmış ve bunu NJ ve ML ağaçlarındaki *T. briani* örneklerinden oluşan grup içinde farklı dallarda konumlanarak kanıtlamışlardır. TT4-TT6-TT25-*T. cuculus* izolatlarının NJ ağacındaki durumu 70 bootstrap değerinin altında desteklendiği bir grup oluştururken, ML ağacında konumlanamayan TT25 diğer *T. cuculus*'lardan ayrılarak problem oluşturmuştur. Ancak morfolojik sınıflandırmada araştırmacılara çalışmalarda kolaylık sağlayan sistematik dışı kategorilerden olan 'grup'ların oluşturulmasında daha titiz davranılması gerektiği düşünülmektedir. Çünkü morfolojik sınıflandırma uygulamalarında *cordiger* grupta yer alan *T. cuculus*'un *bromius* grup üyelerine *bromius* grup içinde gösterilen *T. tergestinus*'tan daha yakın olduğu Ek 4'teki NJ ve ML ağaçlarında görülmektedir. Bu nedenle *bromius* grup içinde gösterilen *T. tergestinus*'un gruptaki konumu hakkında problem olduğu gibi *cordiger* grupta yer alan *T.*

cuculus'un *cordiger* gruptaki konumu hakkında da problemlerin varlığı düşünülmektedir.

Çalışmadaki izolatlar arasında TT15-TT16-TT29-*T. tergestinus*'un MEGA5'te oluşturulan bir çok ağaçta her zaman diğer izolatlardan ayrılarak en dışta kaldığı görülmektedir. *T. tergestinus* izolatlarının Ek-3'teki protein ağacında da diğer izolatlardan farklı bir konumda bulunduğu gözlenmiştir. Bu nedenle *T. tergestinus*'un *bromius* grup içinde değerlendirilmesinin doğruluğu tartışmalıdır.

Morfolojik tanı yanımlarını gösteren türlerden olabileceği düşünülen türler, *T. armeniacus*, *T. maculicornis* ve *T. miki*'dir. TT3 ve TT5-*T. armeniacus*'un BOLD veri tabanındaki analiz sonuçlarında ve de Ek-5'te sunulan filogenetik ağaç sonucunda TT17-TT18-TT30-*T. maculicornis* ile aynı dalda bulunduğu görülmüştür. Her iki analizde de aynı dalda bulunan *T. armeniacus* ve *T. maculicornis*'in literatürdeki sistematiğe yakın olmadıkları, morfolojik olarak farklı oldukları, ancak teşhis, etiketleme ya da deney sırasındaki isimlendirmede hata olabileceği düşünülmüştür. Yine TT24-*T. armeniacus*'un Ek 4'teki her iki ağaçta da TT18-*T. maculicornis*, TT11-*T. regularis* ve TT9-TT10-*T. miki*'den oluşan grup içinde konumlandığı görülmektedir. Bu bireyin de morfolojik tanısının yanlış yapıldığı veya etiketleme ya da isimlendirmede hatalı olabileceği düşünülmektedir. TT30-*T. maculicornis* izolatının yanlış teşhis edilmiş olabileceği ve bir *T. armeniacus* olabileceği NJ ve ML ağaçlarındaki sonuçlardan görülmektedir. TT17-TT18-*T. maculicornis* arasında kalan T27-*T. miki* örneği için de durum aynıdır. TT15-TT16-TT29-*T. tergestinus* Ek 4'teki NJ, ML ağaçları ve Ek 5'teki ağaçta *bromius* grup örneklerinden dışta konumlandıkları gibi morfolojik olarak da diğer *bromius* grup üyelerinden büyük farklılık göstermeleri nedeniyle teşhisleri konusunda bir hatanın olmadığı düşünülmektedir.

Ek-4'teki NJ ağacında 81 bootstrap değeriyle desteklenerek aynı klada düşen TT11-TT12-*T. regularis*, TT17-TT18- *T. maculicornis*, TT9-TT10-TT27-*T. miki* ve TT24-*T. armeniacus* 'un göz ve palp yapılarının morfolojik olarak birbirine çok benzer oldukları bilinmektedir. Bu klad üzerindeki yüksek bootstrap değeri yüksek sinapomorfilerin varlığını düşündürmektedir.

Ek-4'te sunulan NJ ve ML ağaçlarında temelde iki problem görülmektedir. Birincisi, dış grup olarak seçilen 2 örnek Pelecorhynchidae familyasından *Glutops rossi* ve *Pseudoerinna jonesi*'nin ağaçlardaki konumundan sonra Tabanidae üyesi olan ve NCBI'dan alınan 7 izolat konumlanmaktadır. Bu durumun ağaçlardaki izolatların birbirine yakınlığını olumsuz yönde etkilediği ve dış grupların izolatlar üzerinde oluşturacağı baskıyı azalttığı düşünülmektedir. Bu sebeple gen bankasındaki *Dasyrhamphis anthracinus*, *Dasyrhamphis ater*, *Philipomyia aprica*, *Philipomyia graeca*, *Chrysops viduatus*, *Tabanus bromius*, *Tabanus maculicornis* nükleotid dizilerinin analize eklenmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır. İkincisi ise nükleotid dizilerindeki 3 kodon pozisyonunun herhangi bir mutasyona uğrama olasılığının eşit olmamasından kaynaklanır. MEGA5 ile yapılan analizlerde her 3 kodon pozisyonunun konumuna da aynı istatistiksel metodla yaklaşılır, bu yaklaşım kodonların evrimsel süreçte farklı olan değişim hızının ve riskinin göz ardı edildiği bir sonuç elde edilmesini sağlar. Bu çalışmada kullanılan Kimura 2 parametresi dizideki transisyonların (pürinin pürine dönüşmesi) transversiyonlardan (pürinin pirimidine ya da pirimidinin pürine dönüşmesi) daha fazla olduğunu varsayan bir istatistiksel methodur. Kimura 2 tür seviyesinde homoplasiyi azaltmak için kullanılan en iyi metrik yöntemdir [13]. Ancak Ek-4te görüldüğü üzere Kimura 2, dizilerdeki benzerlikleri göstermek için yeterli olmamıştır. Bu sebeple evrimsel süreçte 2. kodondan daha hızlı farklılaşma riskine sahip olan 1. ve 3. kodon pozisyonları için daha yavaş değişim hızını öngören, 2. kodon için evrimsel değişim riskinin daha az olduğunu öngören bir model olan General Time Reversible (GTR) modeli Gamma distribution uygulanması uygun görülmüştür. Her iki problemin de meydana getirdiği olumsuz etkiden kurtulmak için son analizde dış grubun da dışında kalan 7 Tabanidae izolatı analize eklenmemiş ve Kimura 2 parametresi yerine GTR Gamma distribution modeli uygulanmıştır. GTR modeli maximum likelihoodun hızlı bir uygulaması olan RAxML ile 16 gen bankası örneğine ve 28 Türkiye *bromius* grup üyesine uygulanmış ve oluşan filogenetik ağaç Ek-5'te sunulmuştur. Oluşan ağaçta Türkiye izolatları 7 gruba ayrılmıştır. TT15-TT16-TT29-*T. tergestinus* Ek 3'te sunulan protein dizisi kullanılarak oluşturulan ve Ek-4'te sunulan Kimura 2 parametresi ve kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlardaki gibi yine diğer Türkiye izolatlarından ayrılarak dış gruba yaklaşık konumlanan örnekler

olmuşlardır. Ek-5'teki ağaçta TT15-TT16-TT29-*T. tergestinus* 100 bootstrap ile aynı grupta, TT13-TT14-*T. karaosus* 100 bootstrap ile aynı grupta, TT3-TT5-*T. armeniacus* ve TT30-*T. maculicornis* 100 bootstrap ile aynı grupta oldukları yüksek desteklenen izolatlardır. TT1-TT2-TT21-TT22-TT23-TT31-*T. briani* Ek-4'te sunulan Kimura 2 parametresi ve kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlardaki gibi yine bir arada konularak 98 bootstrap değeriyle desteklenmiştir. Ek 4'te sunulan ML ağacında konumu belirlenemeyen ve problem oluşturan TT25 izolatu Ek 5'te sunulan ağaçta TT4-TT6-TT25-*T. cuculus* grubuna girmiş ancak 70 bootstrap değerinin altında desteklenmiştir. TT9-TT10-TT27-*T. miki*, TT11-TT12-*T. regularis* , TT17-TT18-*T. maculicornis* ve TT24-*T. armeniacus* Ek 4'te sunulan NJ ağacına paralel şekilde bir arada konularak 84 bootstrap değeriyle desteklenmiştir.

İncelenen örneklerden *T. miki*, *T. armeniacus* ve *T. maculicornis* için morfolojiye dayalı teşhiste sorun yaşandığı bilinmektedir. *T. miki* ve *T. armeniacus* birbirlerine morfolojik olarak çok benzerler ve sınıflandırılmaları için bir iki karakter kullanılır. Dolayısıyla bu iki türün özellikle siyah renkli örneklerinin ayırımında sıklıkla sorun yaşanmaktadır. Ek 5'teki filogenetik ağaçta *T. miki* ve *T. armeniacus*'un birbirine yakın türler oldukları yüksek %70'in üzerinde bootstrap değeriyle desteklenmiştir. Dolayısıyla 16S, 28S ve ITS gen bölgelerinde de benzer analizlerin yapılması bu iki türün, varyasyon taşıyan aynı türler olduklarına işaret edebilir.

Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar birbirini destekler niteliktedir. Türkiye *bromius* grup izolatları genellikle 7-8 gruba ayrılarak çeşitli bootstrap değerleriyle bir arada bulunmuşlardır. Ancak bootstrap değerleri ne kadar yüksek olursa olsun *bromius* gruba ait türlerin filogenisindeki hikayeyi okumak için yalnızca COI gen bölgesinin yeterli olmadığı da görülmüştür. Takip eden çalışmaların Türkiye'deki Tabanidae türlerinin birbirine yakınlığı-uzaklığı ve klasik morfolojik sistematikteki problemlerine ışık tutabilmeleri için 16S, 28S, ITS gen bölgeleri, protein alt üniteleri ve metrik morfolojik karakterlerle desteklenmesi yararlı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A. G. B., Worm, B, (2011) "How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?" PLoS Biol 9(8): e1001127.
- [2] Hayvan Sistematiği, Prof. Dr. Yalçın ŞAHİN, Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 2000.
- [3] Genel Biyoloji, Keeton/Gould, Çeviri editörleri Prof. Dr. Ali DEMİRİSOY, Prof. Dr. İsmail TÜRKAN, Palme Yayıncılık, 1999
- [4] Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Prof. Dr. Özcan Seçmen, Prof. Dr. Yusuf Gemici, Doç. Dr. Güven Görk, Yrd. Doç. Dr. Lütfi Bekat, Uzman Erkuter Leblebici, Ege Üniversitesi Basımevi 2004.
- [5] Futuyma, D. J. , Bölüm 2, Bölüm 15, "Evrimsel" (Ed: Kence A., Bozcuk A. N.), Palme Yayıncılık, Ankara, 17-42, 353-378, 2008
- [6] Freeman, S., Herron, J. C., Evrimsel Analiz, Çeviri editörleri: Çıplak, B., Başıbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ., Palme Yayıncılık, 2nd Edition
- [7] Holder M. and Lewis P. O., Phylogeny Estimation: Traditional and Bayesian Approaches, © 2003 Nature Publishing Group, VOLUME 4 | APRIL 2003 Reviews
- [8] Cameron, S. L., Beckenbach, A. T., Dowton, M., Whiting M. F., Evidence from Mitochondrial Genomics on Interordinal relationships in Insects, Arthropod systematics and Phylogeny 64(1) 27-34
- [9] Ballard, J. W. O., Whitlock, M. C. The incomplete natural history of mitochondria, Molecular Ecology (2004) 13, 729–744
- [10] Brown, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: *Molecular Evolutionary Genetics*, R.J. MacIntyre (ed.). New York: Plenum Press, pp. 95-130.
- [11] Cameron, S. L., Lambkin, C. L., Barker, S. C. ve Whiting, M. F., A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision, Systematic Entomology (2007), 32, 40–59
- [12] Cywinska, A., Hannan, M. A., Kevan P. G., Rouhley, R. E., Iranpour, M., ve Hunter, F. F., Evaluation of DNA barcoding and identification

of new haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies, *Medical and Veterinary Entomology* (2010) **24**, 382–410.

- [13] Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **270**, 313–321.
- [14] Wiegmann, B.M., Tsaur, S.C., Webb, D.W., Yeates, D.K. & Cassel, B.K. (2000) Monophyly and relationships of the Tabanomorpha (Diptera: Brachycera) based on 28S ribosomal gene sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, **93**, 1031–1038.
- [15] Chvala M., Lyneborg, L. & Moucha J. *The horseflies of Europe (Diptera: Tabanidae)*, Ent. Soc. Copenhagen, E. W. Classey Ltd. Hampton, (1972).
- [16] Altunsoy ve Kılıç, 2011. New Data About *Tabanus karaosus* Timmer 1984 (Diptera: Tabanidae) from Turkey. *J. Entomol. Res. Soc.*, 13(1):77-82.
- [17] Yücel, Ş., *İç Anadolu bölgesinde bulunan Tabanidae (Diptera) türleri üzerinde araştırmalar*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (1987).
- [18] Kılıç, A.Y, Gören, T., Altunsoy, F., Düzce ili Tabanidae (Insecta:Diptera) Faunası, SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi, 14. Cilt, 1. Sayı,s. 29-32, 2010
- [19] Kılıç A.Y. *New addition and errata for Checklist of Tabanidae (Diptera) From Turkey* Tr. J. Of Zoology (36) 67-89 (2006).
- [20] Altunsoy F, Kılıç AY, 2010 A New Record for Turkish Tabanidae (Insecta: Diptera) Fauna.J. Ent. Res. Soc. 12(2) 109-111
- [21] Kılıç, A.Y. , Checklist of Tabanidae (Diptera) From Turkey Tr. J. Of Zoology (23) 123–132 (1999b).
- [22] Kılıç, A.Y., Eskişehir ve Çevresi *Tabanus bromius* L., *T. exlusus* Pand., *T. glaucopsis* Meig., *T. spodopterus ponticus* Ols., ve *Philipomyia aprica* (Meig.) (Diptera: Tabanidae) Türlerinin mevsimsel Aktiviteleri Üzerine Bir Çalışma Tr. J. Of Zoology (17) 303-310 (1993).

- [23] Kılıç, A.Y., *Eskişehir ve Çevresi Tabanidae (Diptera) Faunası* Türk. Entomol. Derg. 16(3) 169-180 (1992)
- [24] Kılıç, A. Y., Trakya Bölgesi Tabanidae (Diptera) Faunası, 1996, Tr. J. of Zoology 23 (1999) Ek Sayı 1, 67–89 TÜBİTAK
- [25] Yağcı, Ş. ve Dinçer, Ş. 1996. Türkiye Tabanidae (Diptera) Faunası için Yeni Bir Tür *Tabanus caucasius* Kröber 1925. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg. 43: 357-359.
- [26] Yağcı, Ş. 1997, Edremit (Balıkesir) Yöresi Tabanidae (Diptera) Türleri, Türkiye Parazitoloji Derg. 21: 405-408.
- [27] Hayat, R. ve Schacht, W. 2000, Distributional data of Horse-flies from Turkey with new records (Diptera, Tabanidae). Entomofauna, 21: 265-284.
- [28] Gören, T., *Düzce ili Tabanidae (Diptera) faunası üzerinde çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2003).
- [29] Büber, H., *Afyon ili Tabanidae (Diptera) faunası üzerinde çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2004).
- [30] Yaman, M., Yağcı Ş., Hatay yöresindeki Tabanidae (Diptera) Türleri Üzerine Araştırmalar
- [31] Tetik, Z., Tabanidae (Insecta: Diptera) Türlerinin Sindirim Sistemlerinden Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Haziran 2007
- [32] Altunsoy, F., Eskişehir Çevresi Tabanidae (Insecta: Diptera) Türlerinin Populasyon Dinamiğinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Mayıs 2009
- [33] Leclercq, M., Tabanidae (Diptera) de Turquie III, Bull. Rech. Agron. Gembloux, 2(4): 707-710, 1967.
- [34] Chvala, M., L. Lyneborg & J. Moucha, 1972. The Horse Flies of Europe (Diptera: Tabanidae), Entomological Society of Copenhagen, E. W. Classey Ltd. Hampton, pp. 1-502.
- [35] Jezek, J., Key to the last instar larvae and pupae of some European Tabanidae (Diptera), Acta ent. Bohemoslov, 74, 339-344 (1977a).



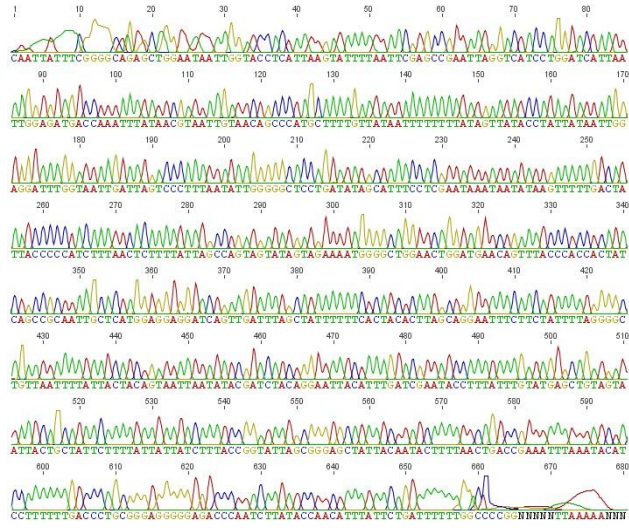
- [36] Jezek, J., Larvae and pupae of three European Tabanus species (Diptera: Tabanidae), *Acta ent. Bohemoslov*, **39**, 290-307 (1977b)
- [37] Chavala, M., Catalogue of Palaearctic Diptera, Family Tabanidae, Ed. Soss, A. And Papp, L., (1988).
- [38] Squitier, J. M. Deer flies, yellow flies and horse flies, *Chrysops*, *Diachlorus*, and *Tabanus spp.*, Featured Creatures from the Entomology and Nematology Department, University of Florida. **EENY-028**,(1998).
- [39] Andreeva, R., Altunsoy, F. ve Kılıç A. Y., New Contribution to Information about Tabanidae (Diptera) Adult and Larvae from West Anatolia. *J. Ent. Res. Soc.*, 11(3): 19-30, 2009.
- [40] Yeates, D.K. & Wiegmann, B.M. (1999) Congruence and controversy: toward a higher level phylogeny of Diptera. *Annual Review of Entomology*, **44**, 397–428.
- [41] Wiegmann, B.M., Yeates, D.K., Thorne, J.L. & Kishino, H. (2003) Time flies, a new molecular time-scale for Brachyceran fly Evolution without a clock. *Systematic Biology*, **52**, 745–756.
- [42] Winterton, S.L., Wiegmann, B.M. & Schlinger, E.I. (2007) Phylogeny and Bayesian divergence time estimations of small-headed flies (Diptera: Acroceridae) using multiple molecular markers. *Journal of Molecular and Phylogenetic Evolution*, **43**, 808–832.
- [43] Altunsoy, F. , Bazı Tabanidae (İnsecta: Diptera) Türlerinin Karyotip Analizi, Yüksek Lisans Tezi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Ağustos – 2005
- [44] Boyes, J. W. & Wilkes A., 1972. Chromosomes of Tabanidae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14 (1): 95–104.
- [45] Ivanischuk, P. P., 1983. Karyotypical Differences of Some Horse-flies Subspecies (Tabanidae, Diptera) (in Russian), MSc Thesis, Ivanovo State Medical Academy Moscow, 85 pp.
- [46] Spakulova, M., Kralova, I., Dudinak, V. ve Reddy, P.V., Karyotype of *Acanthocephalus lucii*: The first record of supernumerary chromosomes in thorny-headed worms, *Parasitol Res*, **88**, 778-780 (2002)

- [47] Spakulova M., Casanova J.C., Laplana Guillen N. ve Kralova L., *A karyological study of the spirurid nematode Mastophorus muris (Nematoda: Spirocercidae)*, Parasite, **7**, 173-177 (2000).
- [48] Türkoğlu, S. ve Koca, S., *Karyotype , C- and G- band patterns and DNA content of Callimenes (Bradyporus) macrogaster macrogaster*, Journal of Insect Science, **2(24)**, 1-4 (2002)
- [49] De Prins, J., De Prins, W. ve Dall’Asta, U. *The resent spreading of Cameraria ohridella (Lepidoptera: Gracillariidae) in Belgium* Bultein DeL’Institut Royal Des Sciences Naturelles De Belgique, **72**, 165-170 (2002).
- [50] Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, **101**, 14812–14817.
- [51] Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology*, **2**, 1657–1663.
- [52] Ball, S.L., Hebert, P.D.N., Burian, S.K. & Webb, J.M. (2005) Biological identification of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 508–524.
- [53] Barret, R.D.H. & Hebert, P.D.N. (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 481–491.
- [54] Smith, M.A., Woodley, N.E., Jazen, D.H., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, **103**, 3657–3662.
- [55] Smith, M.A., Fisher, B.L. & Hebert, P.D.N. (2005) DNA barcoding for effective diversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, **360**, 1825–1834.

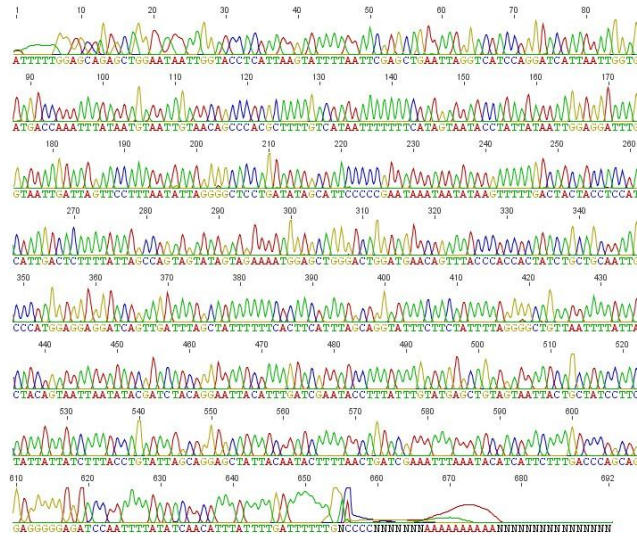
- [56] Cywinska A ., Hunter F. F., Hebert P. D . N ., Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes, *Medical and Veterinary Entomology* (2006) **20**, 413–424.
- [57] Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, **103**, 968–971.
- [58] Seifert, K.A., Samson, K.A., de Waard, J.R. *et al.* (2007) Prospects for fungus identification using COI DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of National Academy of Sciences, United States of America*, **104**, 3001–3006.
- [59] Borisenko, A.V., Lim, B.K., Ivanova, N.V., Hanner, R.H. & Hebert, P.D.N. (2008) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Notes*, **8**, 471–479.
- [60] Kress, W.J. & Erickson, D.L. (2008) DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, **105**, 2761–2762.
- [61] Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., ve Vrijenhoek, R., DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology* (1994) 3(5), 294-29.
- [62] GE Healthcare Data File 18-1150-14 AB.
- [63] Toda S., and Murai T., Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution, *Appl. Entomol. Zool.* 42 (2): 309–316 (2007)
- [64] <http://eol.org/pages/738342/entries/36635307/overview>
- [65] Woodley, N. E. 1989. Phylogeny and classification of the “orthorrhaphous” Brachycera, pp. 1371–1395. In J. F. McAlpine [ed.], *Manual of Nearctic Diptera*. Monograph 32, vol. 3. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa.

- [66] Sinclair, B. J. 1992. A phylogenetic interpretation of the Brachycera (Diptera) based on the larval mandible and associated mouthpart structures. *Syst. Entomol* 17: 233Ð 252.
- [67] Sinclair, B. J., J. M. Cumming, and D. M. Wood. 1994. Homology and phylogenetic implications of male genitalia in Diptera flower Brachycera. *Entomol. Scand.* 24: 407Ð 432.
- [68] Hennig W., *Phylogenetic Sysyematics*, Translated by Dwight D. ve Zangerl R.
- [69] Olsufjev, N., 1977, Tabanidae. In: *Fauna of the USSR*, 7 (2), 1-434 Nauka Publishing house, Leningrad. (Ru).

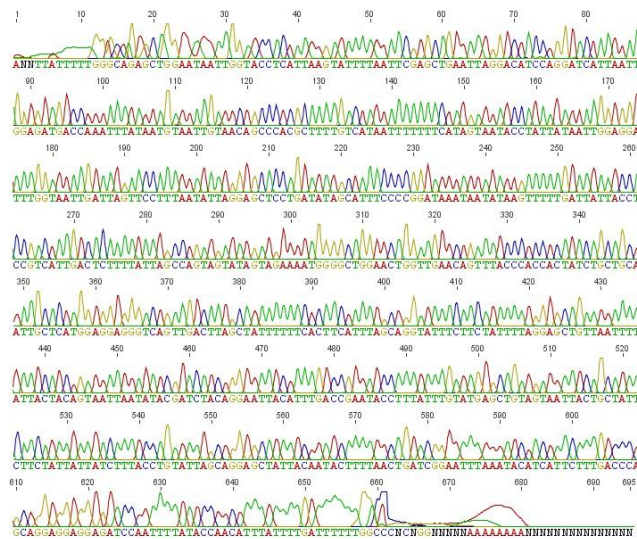
SY10



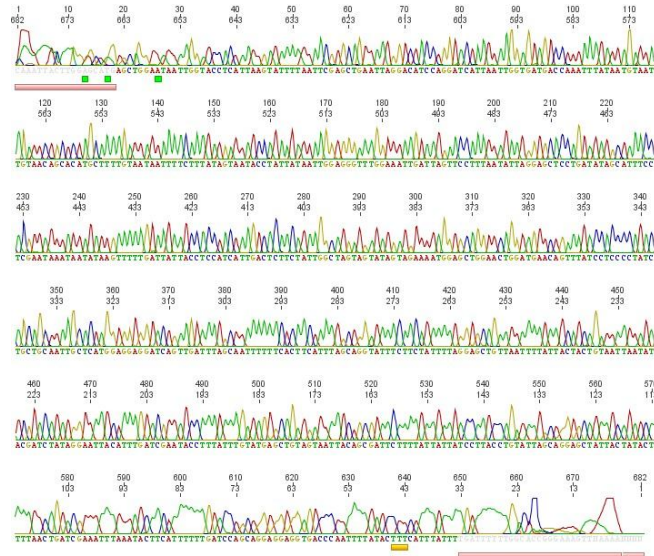
SY11



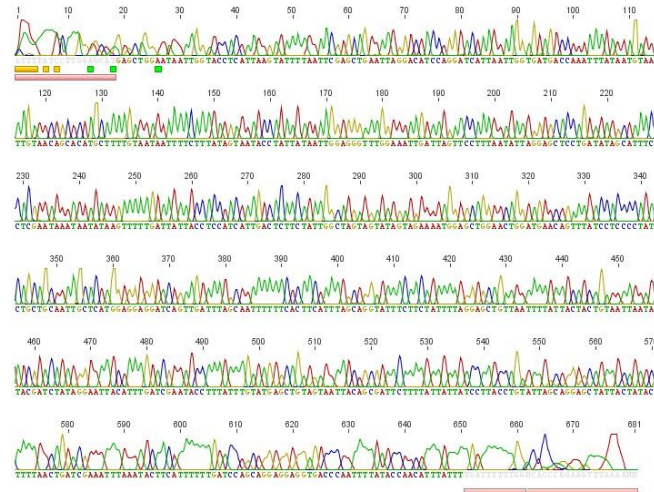
SY12



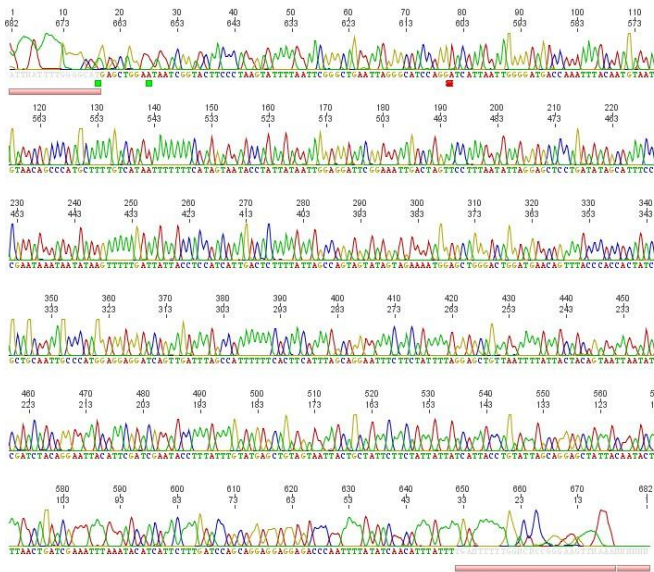
SY25



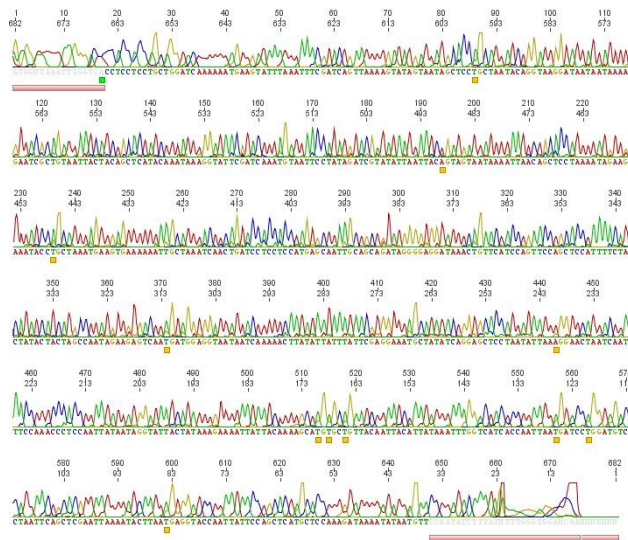
SY26



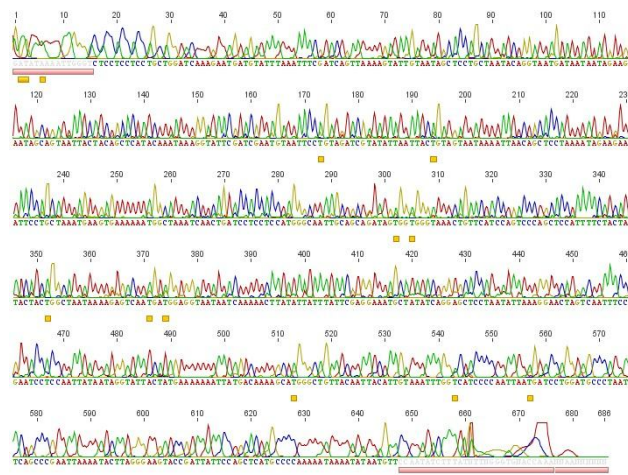
SY27



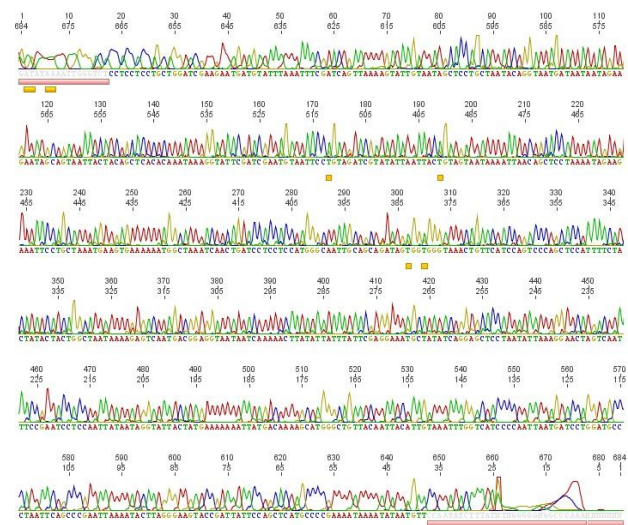
SY37



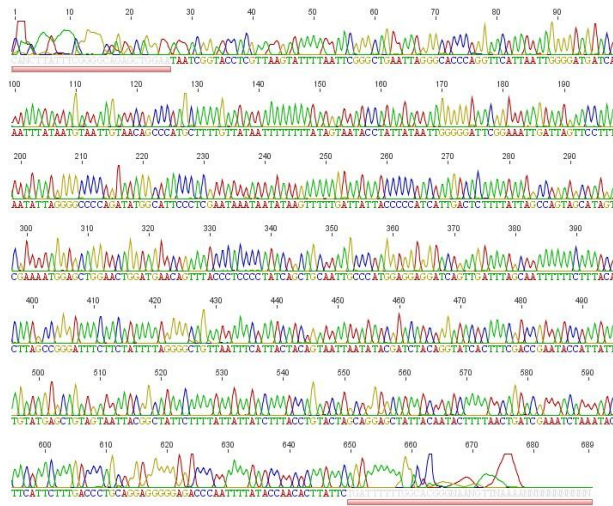
SY38



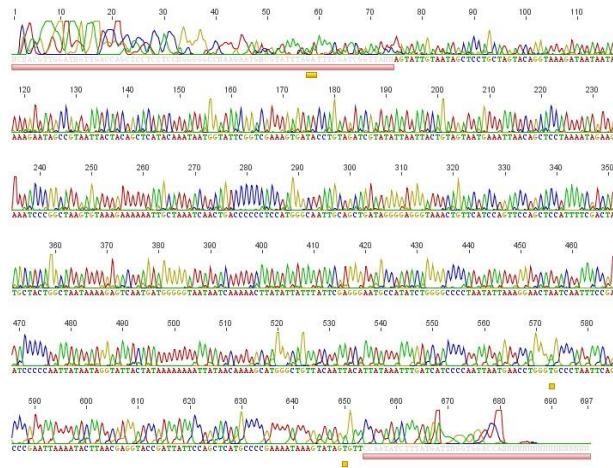
SY39



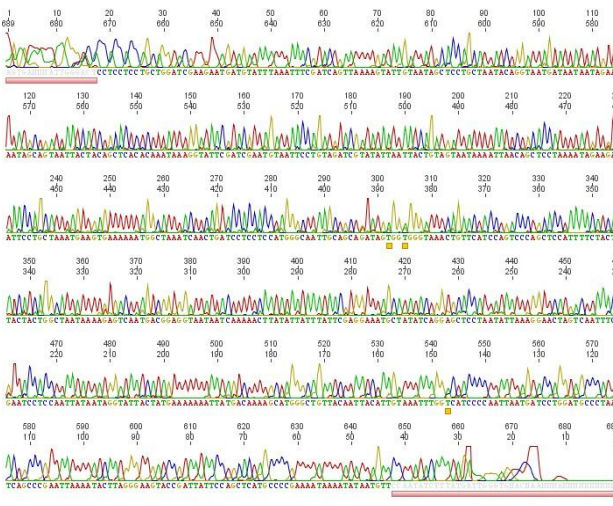
SY54



SY55



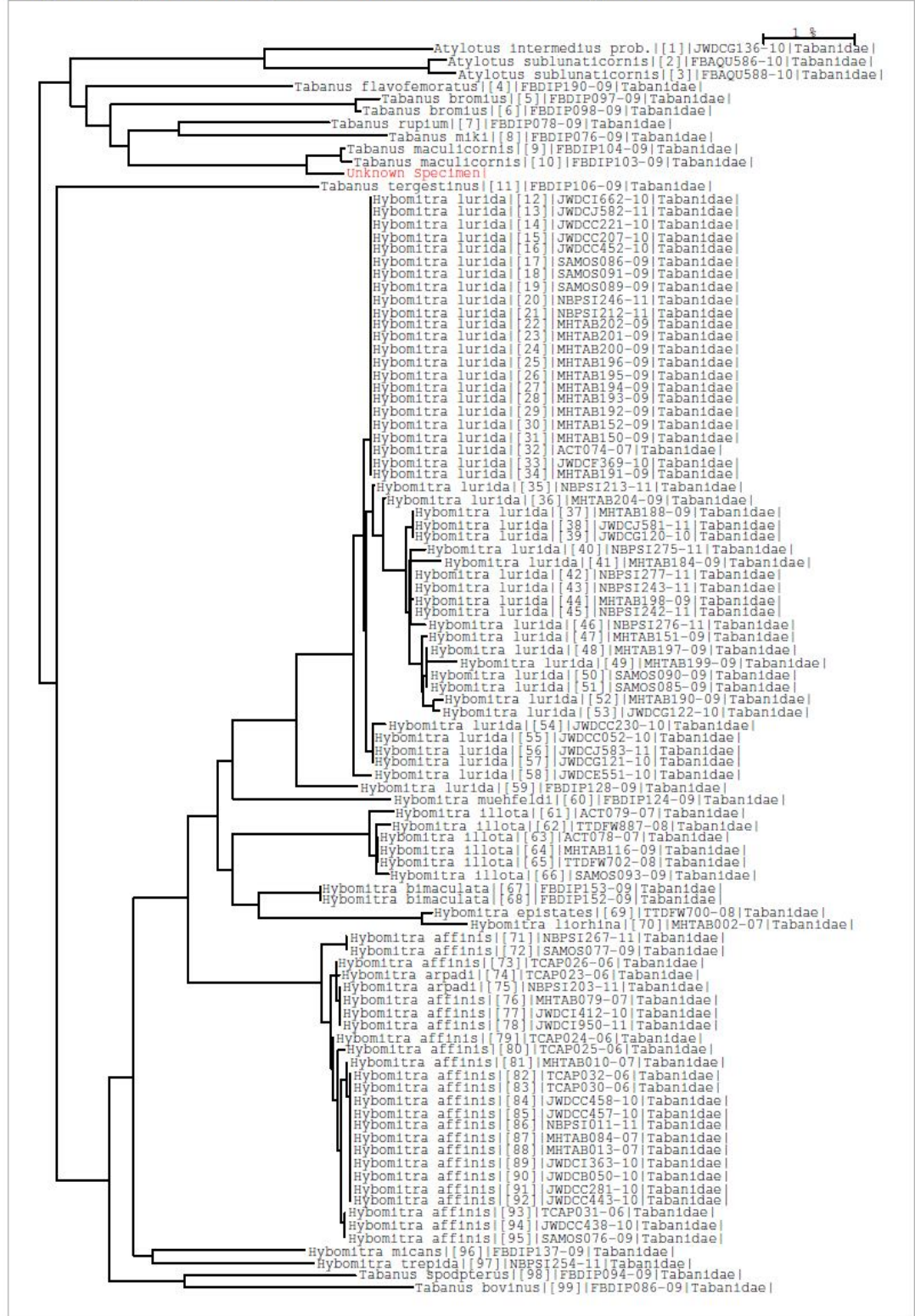
SY56



Ek-2 BOLD systems v 2.5 Veri tabanındaki 100 Tabanidae örneği ile Bromius grup üyelerinin COI gen bölgesinin 3 kodon pozisyonun Kimura2 parametresi kullanılarak karşılaştırılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar

Şekil 4.1. **Unknown specimen**; TT3-*T. armeniacus*

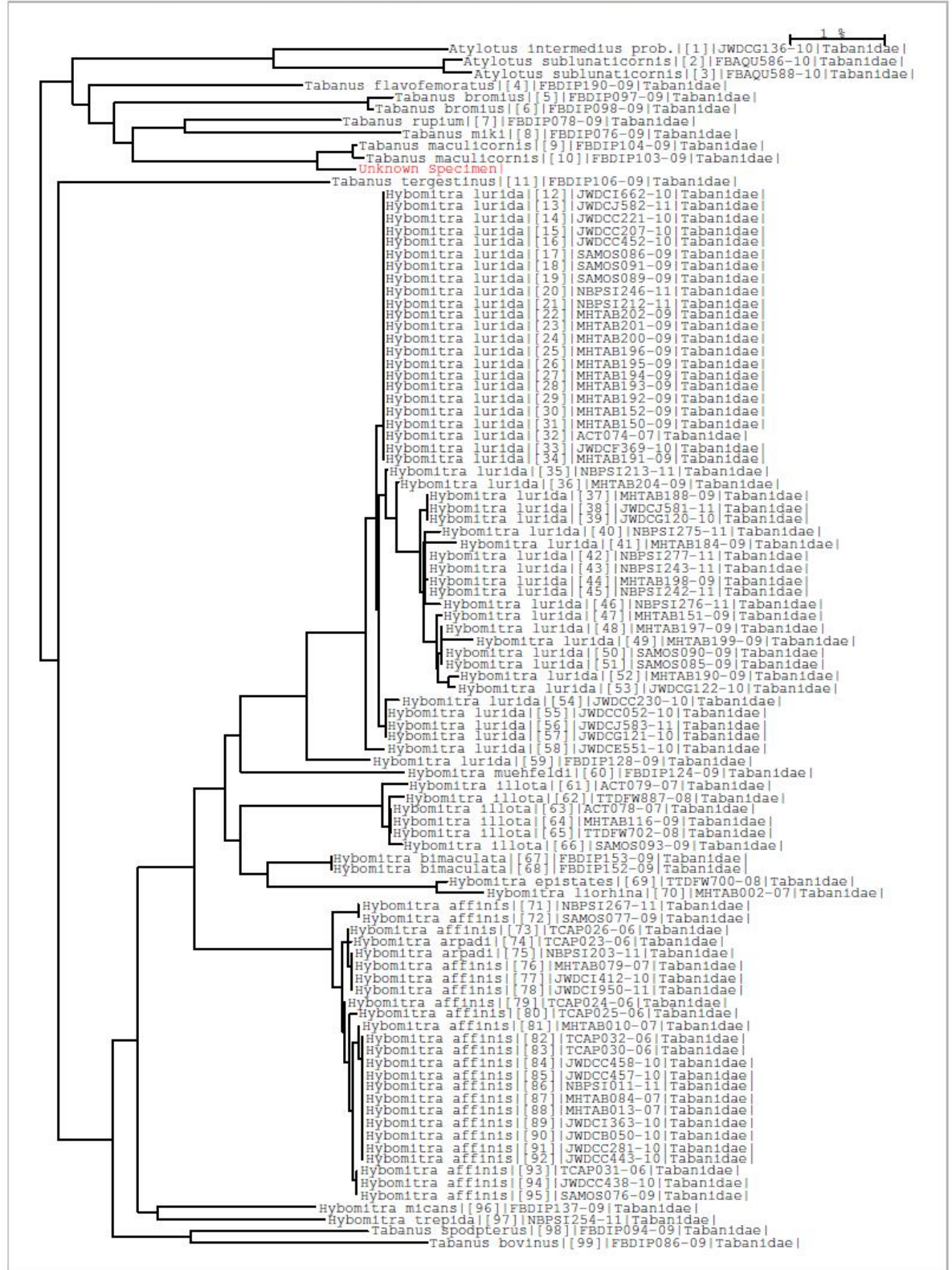
COI_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:28:08 2011 Page 1 of 1



Ek-2 devam

Şekil 4.2. **Unknown specimen**; TT5-*T. armeniacus*

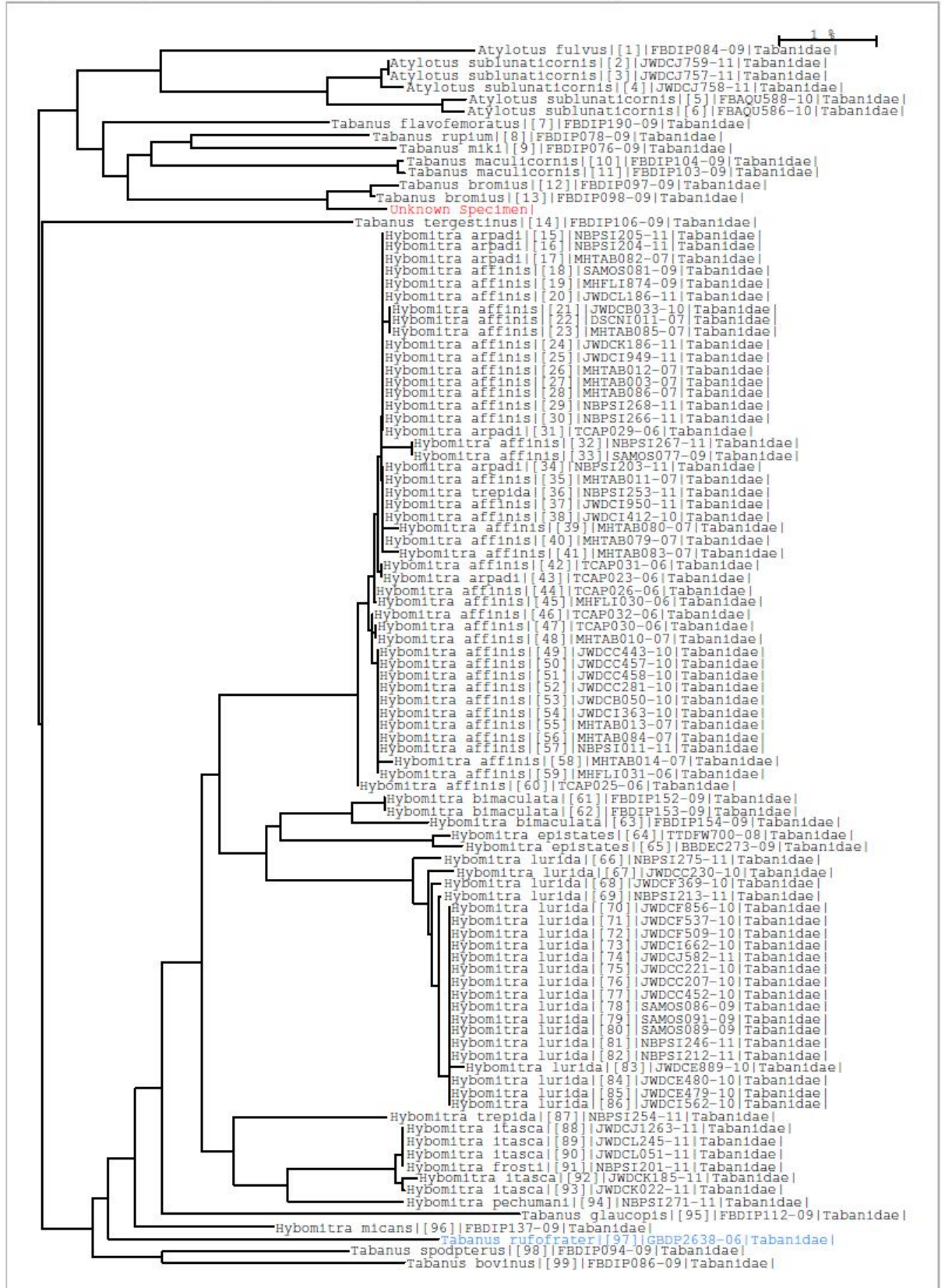
COI_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:32:54 2011 Page 1 of 1



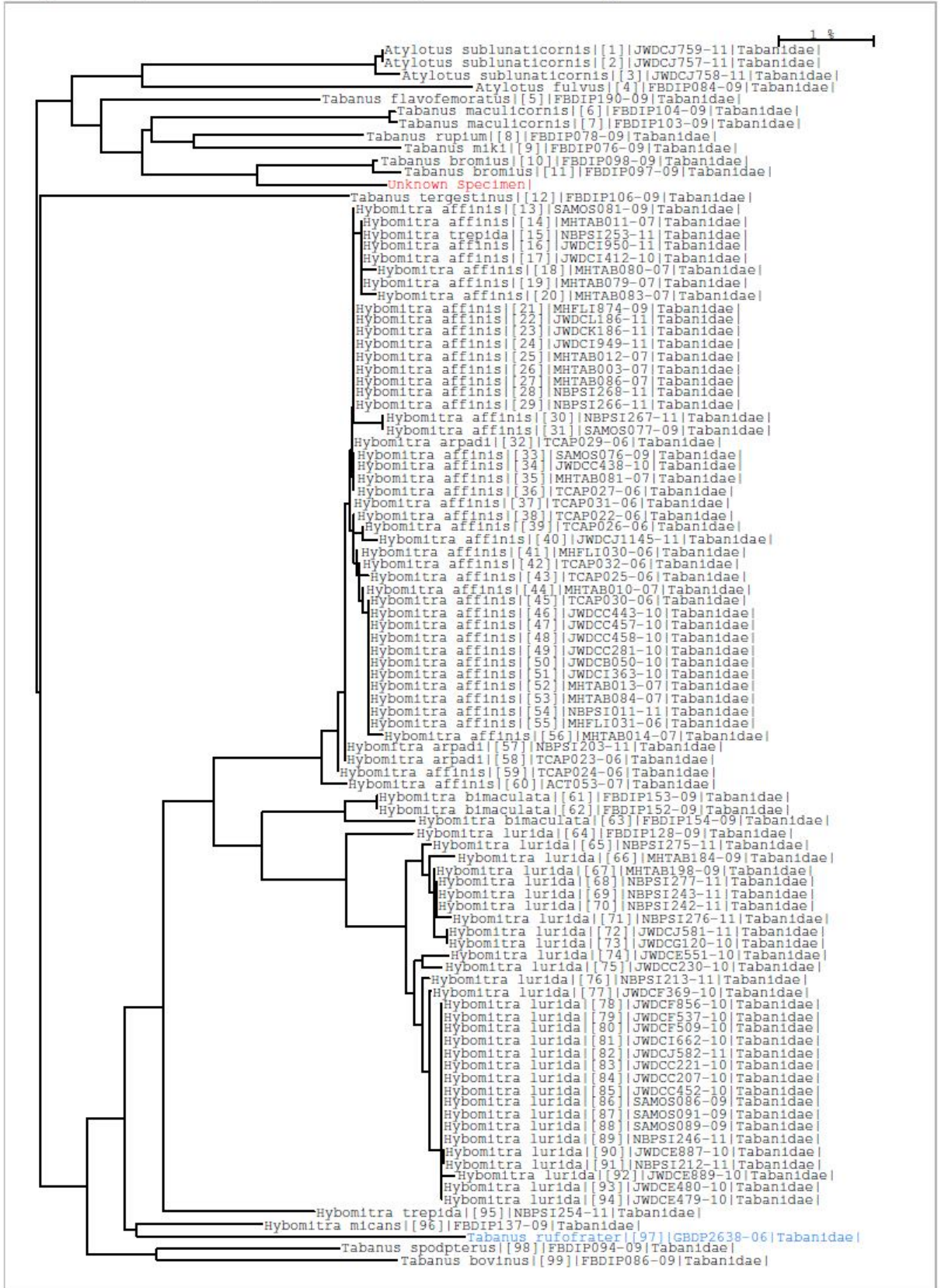
Ek-2 devam

Şekil 4.3. **Unknown specimen**; TT7-T. bromius

COI_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:35:26 2011 Page 1 of 1



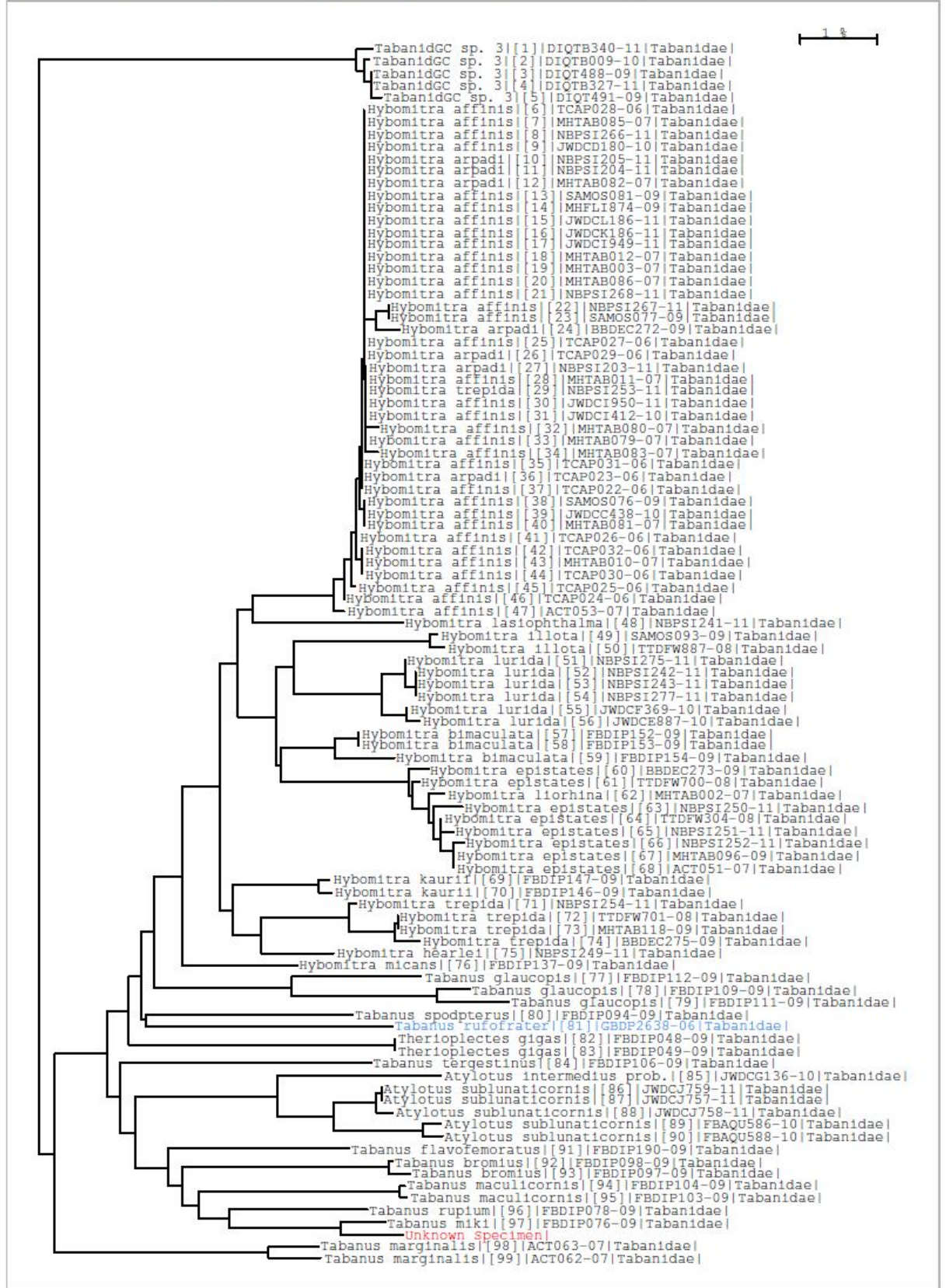
Şekil 4.4. **Unknown specimen**; TT8-*T. bromius*



Ek-2 devam

Şekil 4.5. **Unknown specimen**; TT13-*T. karaosus*

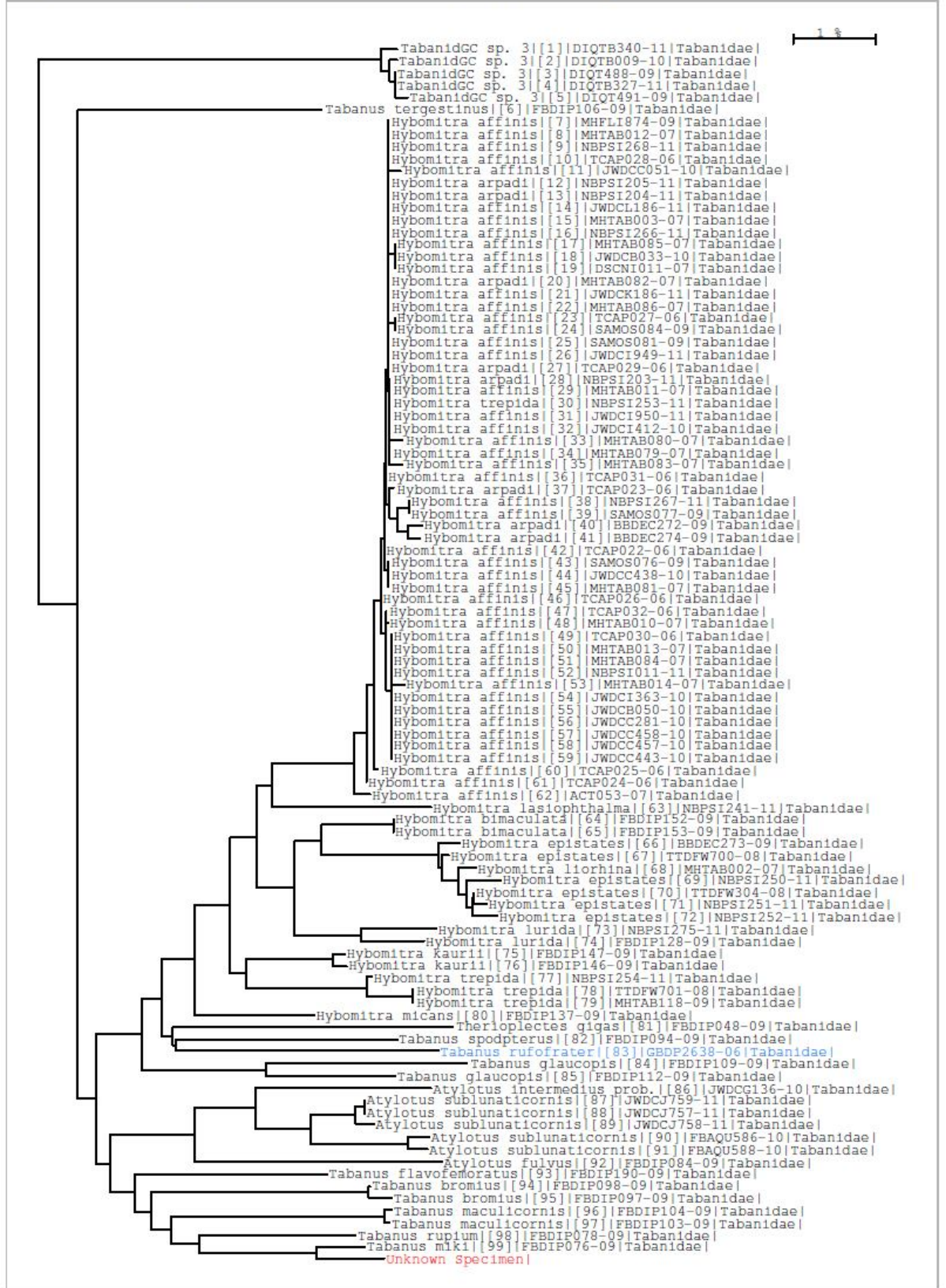
COI_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:39:23 2011 Page 1 of 1



Ek-2 devam

Şekil 4.6. **Unknown specimen**; TT14-*T. karaosus*

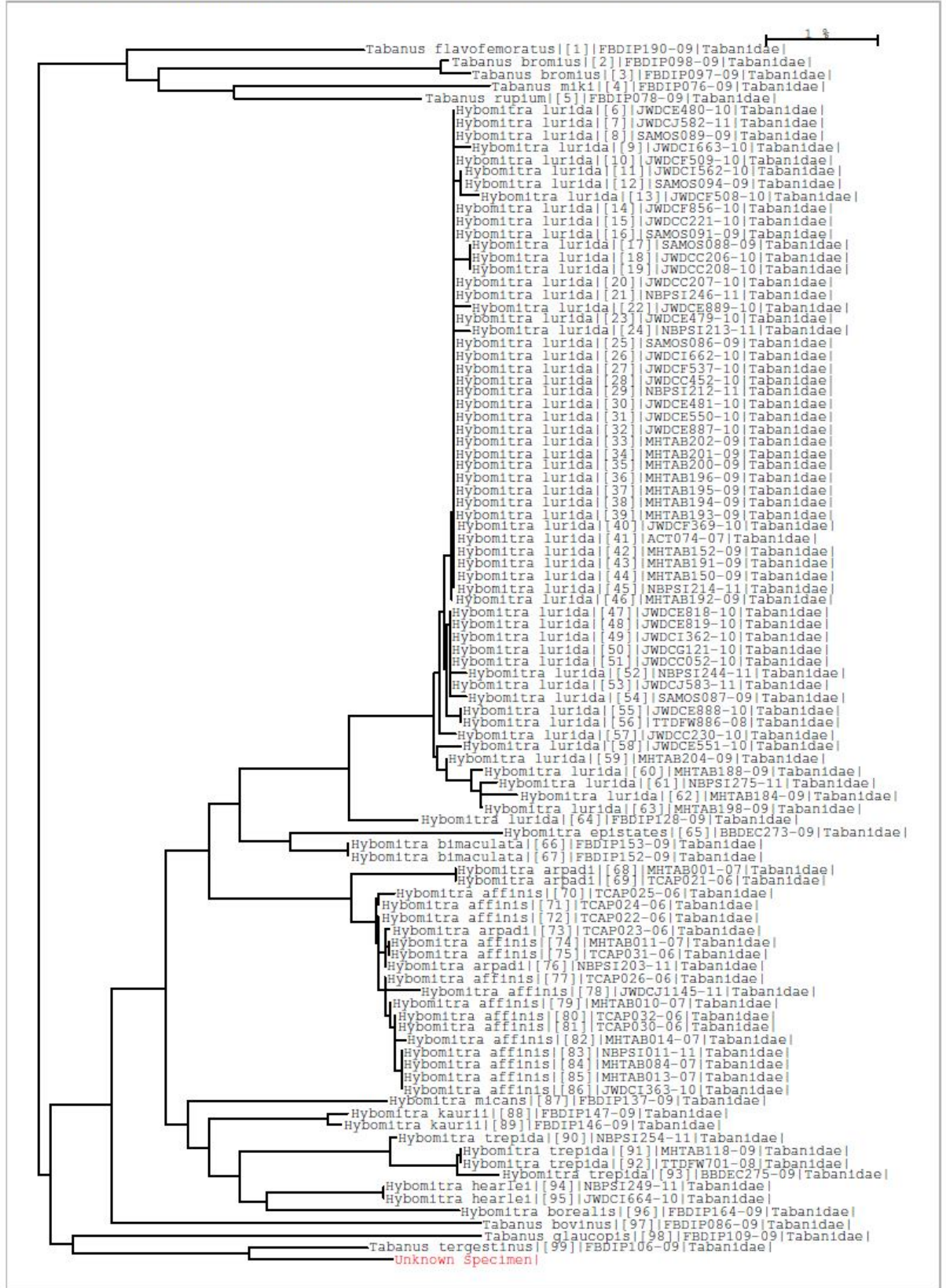
COI_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:40:24 2011 Page 1 of 1



Ek-2 devam

Şekil 4.7. **Unknown specimen**; TT15-*T. tergestinus*

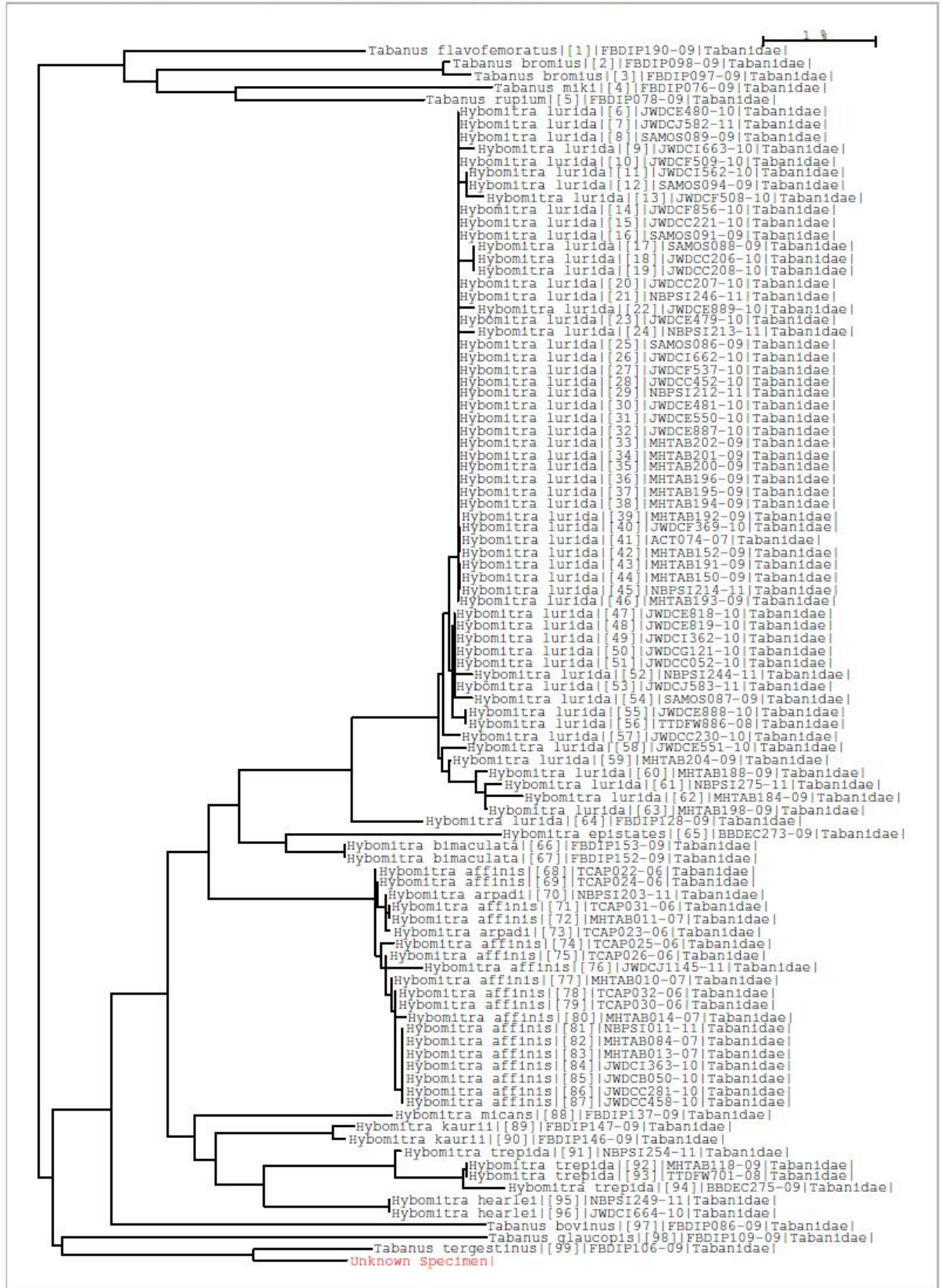
COL_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:41:18 2011 Page 1 of 1



Ek-2 devam

Şekil 4.8. **Unknown specimen**; TT16-*T. tergestinus*

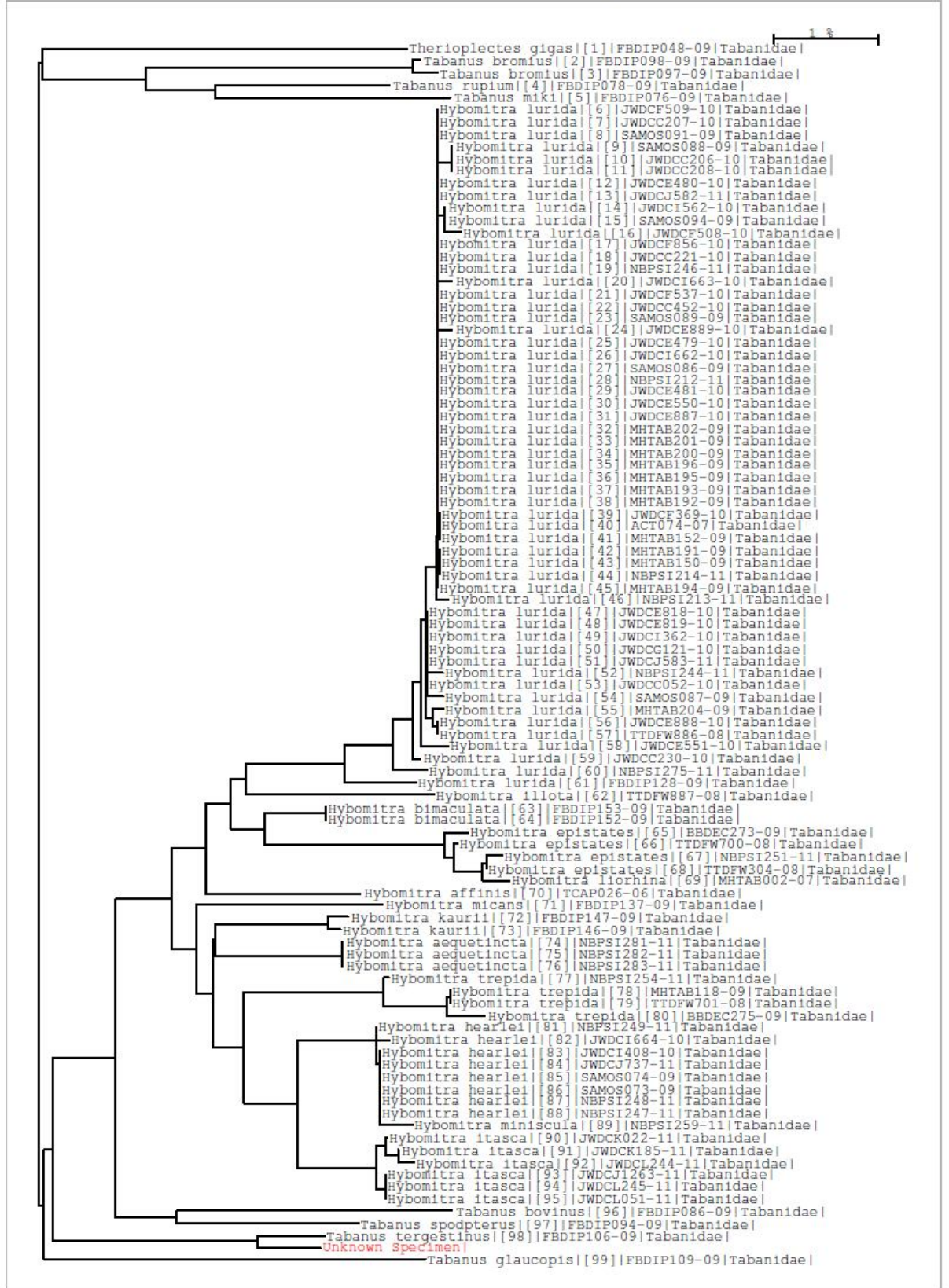
COL_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:42:49 2011 Page 1 of 1



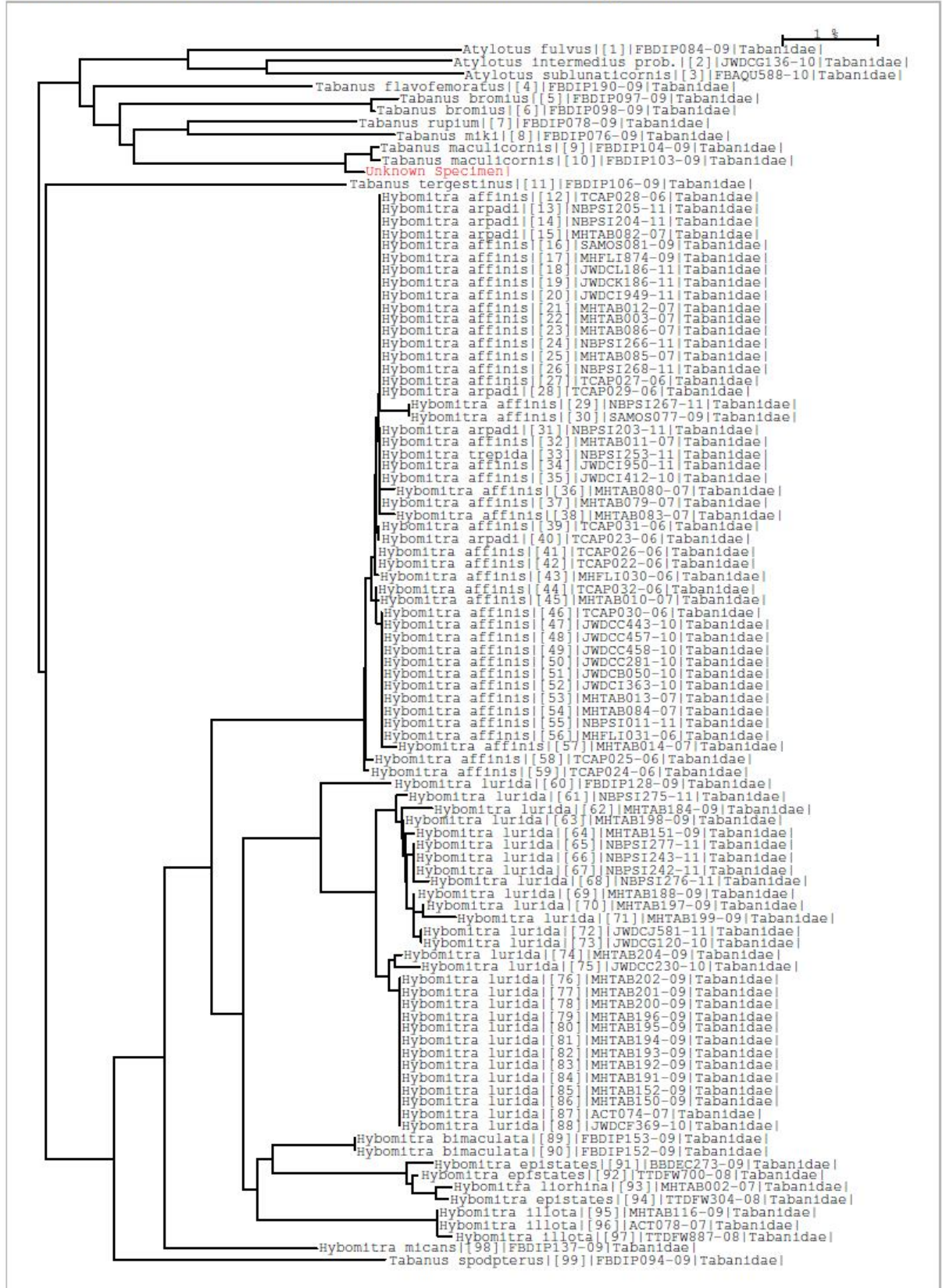
Ek-2 devam

Şekil 4.9. **Unknown specimen**; TT29-*T. tergestinus*

COL_SPECIES_DATABASE_Tree Tue Nov 29 12:47:54 2011 Page 1 of 1

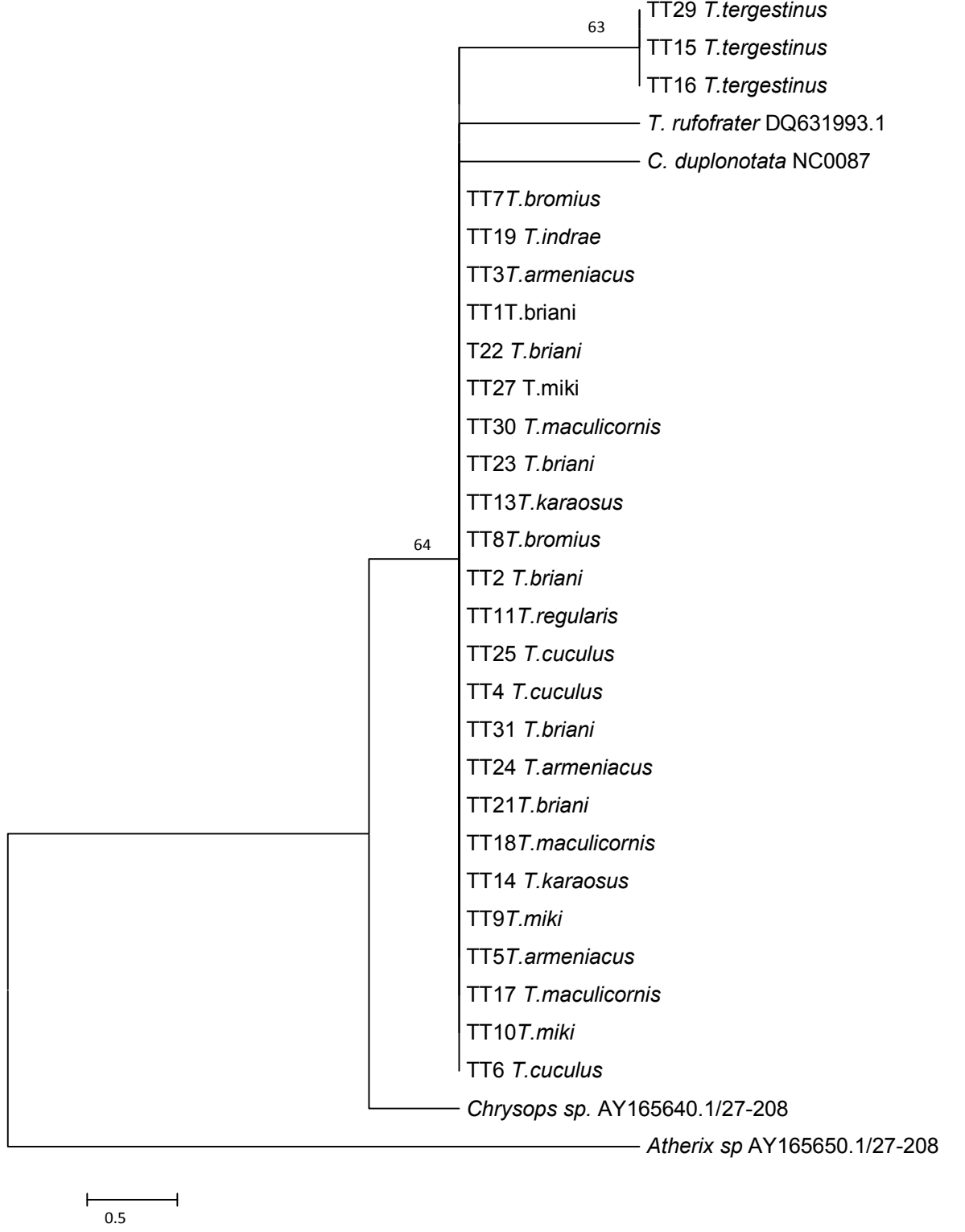


Şekil 4.10. TT30-*T. maculicornis*



Ek-3 Protein Hizalaması Sonucu

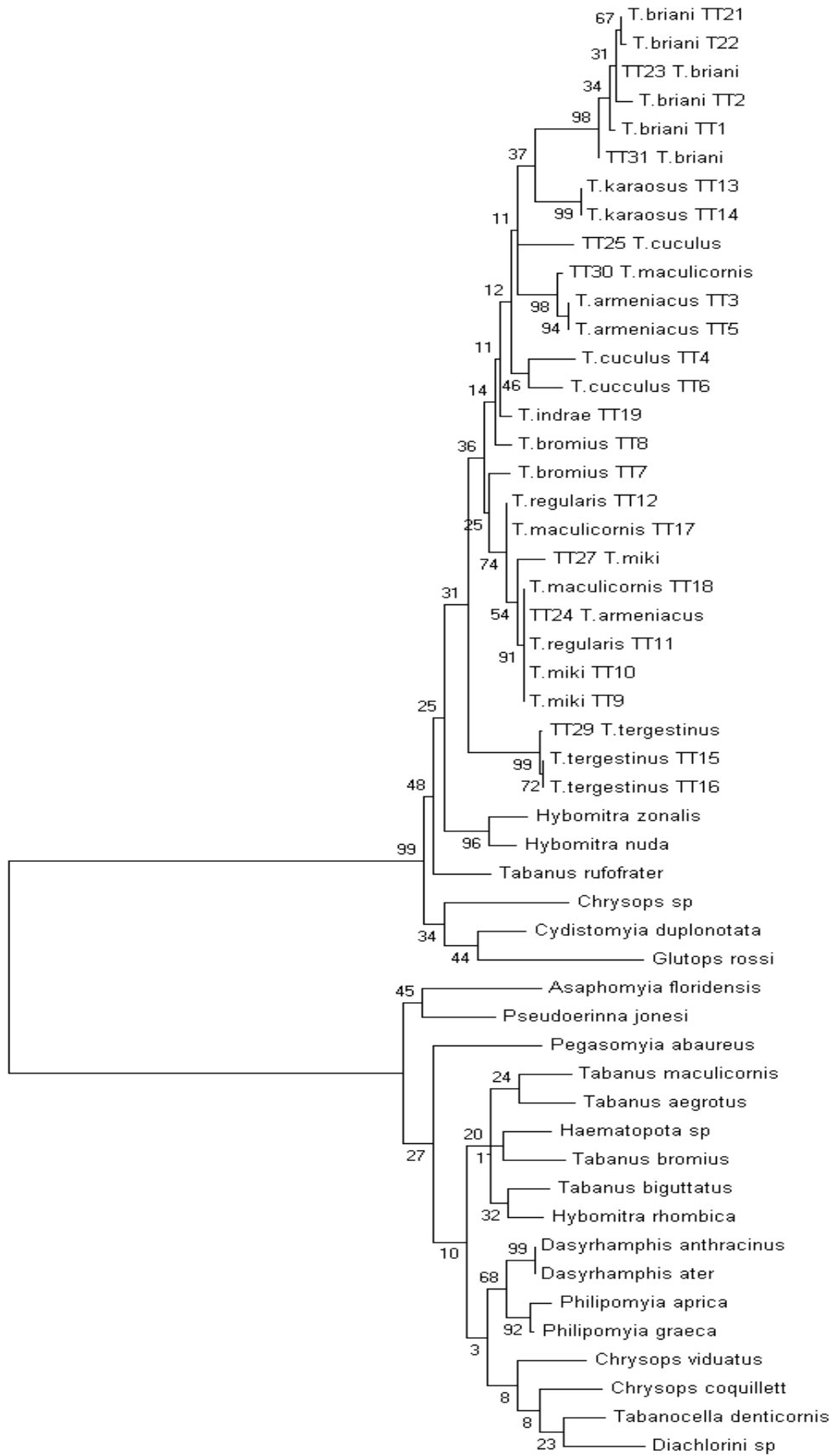
Şekil 4. 11. Gen bankasından 4 Tabanidae örneği ile birlikte protein hizalaması sonucu 1000 bootstrap ardından oluşan NJ filogenetik ağacı



Ek-4 Kimura-2 parametresiyle oluşan NJ ağacı



Ek-4 devam Kimura-2 parametresiyle oluşan ML ağacı



0.1



Ek-5 GTR ve Gamma distribution kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

