

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Anterastes (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) TÜRLERİNDE ITS2
SEKONDER YAPISI: TÜR KARAKTERİZASYONU, BARKOD POTANSİYELİ
VE FİLOGENETİK KULLANIMI

Onur ULUAR

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Anterastes (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) TÜRLERİNDE ITS2
SEKONDER YAPISI: TÜR KARAKTERİZASYONU, BARKOD POTANSİYELİ
VE FİLOGENETİK KULLANIMI

Onur ULUAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anterastes (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) TÜRLERİNDE ITS2
SEKONDER YAPISI: TÜR KARAKTERİZASYONU, BARKOD POTANSİYELİ
VE FİLOGENETİK KULLANIMI

Onur ULUAR

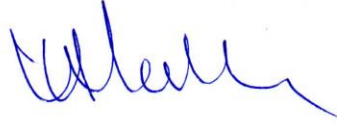
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 21/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Battal ÇIPLAK (Danışman)

Doç. Dr. Mahir BUDAK

Doç. Dr. Sarp KAYA



ÖZET

***Anterastes* (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) TÜRLERİNDE ITS2 SEKONDER YAPISI: TÜR KARAKTERİZASYONU, BARKOD POTANSİYELİ VE FİLOGENETİK KULLANIMI**

Onur ULUAR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Haziran, 2018; 63 sayfa

Biyçeşitliliği tanımlama araçları zaman içerisinde değişmiştir. Hem objektif bir veri kaynağı olması hem de bilgisayar ortamına uygunluğu nedeniyle DNA dizileri günümüzde en çok kullanılan araçlardan biridir. ITS2 transkriptleri birçok canlı grubunda türleri tanımlamada bir barkod belirteci olarak kullanılmaktadır. Ancak, hayvan gruplarındaki kullanışlılığı test edilmeyi beklemektedir. Bu çalışmada temsilci bir grup olarak *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae) türlerinde ITS2 geni transkriptlerinin primer dizi ve sekonder yapısının türleri karakterize etme, barkodlama ve filogenetik ilişkilerini tanımlamadaki kullanışlılığı araştırılmıştır.

Anterastes cinsine ait tüm türleri temsilen 142 örneğin ITS2 DNA dizileri kullanılarak bir veri matrisi oluşturulmuştur. Veri matrisinde 57 farklı haplotip belirlenmiştir. Yalancı gen kontrolü yapıldıktan sonra ITS2 geninin 267-278 baz uzunluğuna sahip oldukları belirlenmiştir. ITS2 lineer dizileri %60,58 GC oranı ile Animalia ortalamasının üzerinde bir değere sahiptir. Uygun paket programlarla hem haplotiplerden edinilen transkriptlerin sekonder yapıları belirlenmiş hem de lineer transkript dizisi ve sekonder yapıdan edinilen matrislere filogenetik analizler uygulanmıştır. Her iki filogenetik analiz çok düşük çözünürlüklü ağaçlarla sonuçlanmıştır. Bu haplotiplerden üretilen ITS2 sekonder yapıları Heliks I, Heliks IA, Heliks II, Heliks IIA ve Heliks III'ten oluşmaktadır ve tüm heliksler korunmuş dizilere sahiptir. Farklı olarak *A. disparalatus* ve *A. serbicus* türleri ayrıca Heliks IV'e de sahiptir. Çalışılan haplotiplerde telafi edici baz değişimi saptanmamıştır.

Bu veriler ışığında şu saptamalar yapılmıştır. (i) *Anterastes* ITS2 geni bilinen diğer tek orthopter olan *Poecilimon* türlerindeki daha uzun ancak Animalia ortalamasının altında bir uzunluğa sahiptir. (ii) ITS2 geni GC oranı Animalia ortalamasının üzerindedir. (iii) ITS2 sekonder yapıları diğer ökaryotlar için tanımlanandan sapan bir yapı göstermektedir. Heliks II ve Heliks III arasında var olan Heliks IIA varlığı Orthoptera içerisinde ve Heliks IA varlığı tüm ökaryotlar için ilk defa saptanmıştır. (iv) Her bir heliks oldukça korunmuştur ve haplotipler arası varyasyon heliks dışı bölgelerde yer alır, (v) ITS2 lineer dizilerinin filogenetik bilgi vericiliği sınırlıdır ve sekonder yapı bunu arttırmamıştır ve (vi) *Anterastes* ITS2 dizilerinde telafi edici baz değişimi saptanmamıştır ve buna paralel olarak barkod olarak kullanma potansiyeli sınırlıdır.

ANAHTAR KELİMELER: *Anterastes*, DNA Barkodlama, Filogenetik, Orthoptera, Sekonder yapı, ITS2.

JÜRİ: Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Doç. Dr. Mahir BUDAK

Doç. Dr. Sarp KAYA

ABSTRACT

THE SECONDARY STRUCTURE OF ITS2 IN *Anterastes* (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) SPECIES: IT'S UTILITY IN SPECIES CHARACTERISATION, BARCODING AND PHYLOGENY

Onur ULUAR

MSc. Thesis in BIOLOGY

Supervisor: Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

June 2018, 63 pages

The tools to define biodiversity have changed through time. DNA sequences are widely used to define biodiversity because of providing objective data and becoming suitable for computerisation. The ITS2 transcripts are using as species barcode markers in many lineages. Although, its potential as a barcode marker for animals waits to be tested. The aim of present study is characterization of ITS2 and to examine the utility of barcoding species and resolving phylogenetic relationships in the genus *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae)

A data matrix was established from 142 ITS2 samples representing all species in *Anterastes*. In total 57 unique haplotypes were detected from these 142 sequences. After checking for the pseudo genes the final length of the ITS2 sequences in the matrix was 267-268 base. The average GC content was %60, 58. The secondary structure of the transcripts were constructed using the appropriate softwares. Then both the matrices of linear sequences and secondary structures were subjected to phylogenetic analyses. Both data sets resulted in poorly resolved phylogenetic trees. The secondary structures produced by softwares contains the Helix I, Helix IA, Helix II, Helix IIA ve Helix III each with highly conserved sequences. Additionally, a forth helix was determined in the haplotypes from *A. disparalatus* ve *A. serbicus*. No compensatory base changes were determined in any of the haplotypes.

The following conclusions were arrived in the light of results: (i) The length of ITS2 sequences in *Anterastes* is below the average in other animals but higher than that of *Poecilimon*, the only known other Orthoptera, (ii) the GC content in *Anterastes* ITS2 sequences is over the content in other animals, (iii) The secondary structure of ITS2 sequences has some departures from other eukaryotes. The presence of Helix IA between Helix I and Helix II is unique among eukaryotes and that of Helix IIA between Helix II and Helix III is unique among Orthoptera, (iv) each helix is highly conserved and variations are in the regions outside helices, (v) the linear sequences of ITS2 are phylogenetically uninformative and the secondary structures have not provided additional phylogenetic information in *Anterastes*, and (vi) No compensatory base changes were determined and so the ITS2 marker has low potential for barcoding.

KEYWORDS: *Anterastes*, DNA Barcoding, Orthoptera, Phylogenetics, Secondary structure, ITS2.

COMMITTEE: Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Assoc. Prof. Dr. Mahir BUDAK

Assoc. Prof. Dr. Sarp KAYA

ÖNSÖZ

Avcı-toplayıcı toplulukların yerini tarım toplumunun alması ile birlikte, insan kendisini doğadan soyutlamaya başlamış ve doğanın varlığını yalnızca ekonomik bir tüketim kaynağı olarak görmeye başlamıştır. Son ikiyüz yılda hızla gelişen teknoloji, insan ve doğa arasındaki bu yabancılaşmayı hızlandırmış ve ortaya çıkan antroposentrik yaklaşım, dünya üzerindeki kaynakların geri döndürülemez bir biçimde yok edilmesine yol açmıştır. Bu süreç dünyayı bir biyoçeşitlilik krizi ile karşı karşıya bırakmıştır. Bu tez çalışması ile biyoçeşitliliğin temel kaynaklarını oluşturan tür çeşitliliği ve genetik çeşitlilik parametreleri ekseninde *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae) cinsi ele alınmıştır. *Anterastes* cinsi ITS2 bölgesi kullanılarak, cins içerisindeki tür çeşitliliği ve genetik çeşitliliğin ortaya konması, tür sınırlarının belirlenmesinde bu bölgenin lineer ve sekonder yapısı ile barkodlama potansiyeli araştırılarak, biyoçeşitlilik çalışmalarına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Geçirdiğim yüksek lisans dönemim boyunca desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bilim, etik ve insanlık değerlerini söylemekten hiçbir zaman çekinmeyerek yolumu aydınlatan danışman hocam Prof. Dr. Battal ÇIPLAK'a,

tüm yoğunluğuna rağmen her daim yönlendirmeleri ve değerlendirmeleri ile tez çalışmasına katkıda bulunan hocam Doç. Dr. Sarp KAYA'ya (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi),

tez çalışması kapsamında kullanılan moleküler verilerin eldesinde emeği geçen yüksek lisans öğrencileri Uğur KARŞI ve Pembe Nur ÖZTÜRK başta olmak üzere tüm MEVBİL ekibine,

sekonder yapı konusundaki tecrübelerini aktarmaktan asla tereddüt etmeyen Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ'a, Doç. Dr. Mahir BUDAK'a (Cumhuriyet Üniversitesi) ve gece gündüz demeden, karşılaştığım tüm sorunları özveriyle aşmama yardımcı olan Arş. Gör. Özgül DOĞAN'a (Cumhuriyet Üniversitesi),

tez çalışmasında kullanılan tüm moleküler verilerin elde edilmesinde 107T462 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

filogenetik analizlerin yapılması sırasında kodlama ile ilgili karşılaştığım sorunları çözmekte desteğini esirgemeyen can dostum Eren ADA'ya (University of Rhode Island, Integrative and Evolutionary Biology),

hayatım boyunca beni koşulsuzca seven ve destekleyen, ebeveyn olmaktan ziyade benim için bir dost olan annem Hülya GÖKÇEASLAN'a, tanışmamızın hayatımda bir dönüm noktası yarattığını düşündüğüm, her zaman yanımda olan ve olmaya devam edeceğine inandığım, kadim dostum Özgül YAHYAOĞLU'na ve başta Armanç Ömer ACAR olmak üzere, hayatımı güzel ve yaşanılabilir kılan herkese teşekkür ederim.

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Anterastes* (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) TÜRLERİNDE ITS2 SEKONDER YAPISI: TÜR KARAKTERİZASYONU, BARKOD POTANSİYELİ VE FİLOGENETİK KULLANIMI” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2018

ONUR ULUAR



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Biyoçeşitlilik Nedir ve Nasıl Tanımlanır?.....	3
2.1.1. Biyoçeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan araçlar	4
2.1.2. Tür kavramı ve tür taksonuna ilişkin yaklaşımlar	5
2.1.3. Klasik taksonomiden moleküler taksonomiye: tür sınırlarının çizilmesi	7
2.2. ITS2 Bölgesi.....	8
2.3. ITS2 Bölgesinin Sekonder Yapısı	10
2.4. TBD Tür Kavramı	12
2.5. <i>Anterastes</i> Cinsinin Taksonomik Problemleri.....	14
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Örneklem ve Veri Eldesi	17
3.2. Verilerin Analize Hazırlanması.....	19
3.3. Olası ITS2 Sekonder Yapılarının Üretilmesi	20
3.4. ITS2 Sekonder Yapısı Üzerinden Hizalama ve Filogenetik Analiz.....	20
3.5. TBD'lerin Belirlenmesi ve Tür Sınırlarının Çizilmesi.....	23
4. BULGULAR	25
4.1. <i>Anterastes</i> ITS2 Dizileri için Tanımlayıcı Özellikler.....	25
4.1.1. Yalancı gen (pseudogene) kontrolü	27
4.2. ITS2 Sekonder Yapısı	30
4.3. Filogenetik Analizler	35
4.4. Telafi Edici Baz Değişimleri (TBD/CBC)	38

5. TARTIŞMA	39
5.1 ITS2 Lineer Dizi Özellikleri.....	39
5.2 ITS2 Bölgesinin Sekonder Yapısı	41
5.3 ITS2 Bölgesinin Filogenetik Çözünürlüğü.....	43
5.4 Telafi Edici Baz Değişiklikleri Ekseninde ITS2 Barkod Potansiyeli.....	45
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

°C	santrigat derece
%	yüzde
ΔG	Gibbs serbest enerji değeri

Ondalık sayılar ‘,’ ile ayrılmıştır.

Kısaltmalar

A	: Adenin
AnteAkdagH1	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 1. haplotipi
AnteAkdagH2	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 2. haplotipi
AnteAkdagH3	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 3. haplotipi
AnteAkdagH4	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 4. haplotipi
AnteAkdagH5	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 5. haplotipi
AnteAkdagH6	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 6. haplotipi
AnteAkdagH7	: <i>A. antecessor</i> türü Antalya-Akdağ populasyonu 7. haplotipi
AntiKaraH1	: <i>A. antitauricus</i> türü Karaman-Tavşanlı populasyonu 1. haplotipi
AntiKartH1	: <i>A. antitauricus</i> türü Bolu-Kartalkaya populasyonu 1. haplotipi
AntiKonH1	: <i>A. antitauricus</i> türü Konya-Seydişehir populasyonu 1. haplotipi
AntiKonH2	: <i>A. antitauricus</i> türü Konya-Seydişehir populasyonu 2. haplotipi
AntiSuhutH1	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 1. haplotipi
AntiSuhutH2	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 2. haplotipi
AntiSuhutH3	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 3. haplotipi
AntiSuhutH4	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 4. haplotipi
AntiSuhutH5	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 5. haplotipi
AntiSuhutH6	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 6. haplotipi
AntiSuhutH7	: <i>A. antitauricus</i> türü Afyon-Şuhut populasyonu 7. haplotipi
BabaBabaH1	: <i>A. babadaghi</i> türü Denizli-Babadağ populasyonu 1. haplotipi
BabaBegisH1	: <i>A. babadaghi</i> türü Antalya-Beğiş populasyonu 1. haplotipi
BabaBegisH2	: <i>A. babadaghi</i> türü Antalya-Beğiş populasyonu 2. haplotipi
BabaBegisH3	: <i>A. babadaghi</i> türü Antalya-Beğiş populasyonu 3. haplotipi
BabaBegisH4	: <i>A. babadaghi</i> türü Antalya-Beğiş populasyonu 4. haplotipi
BabaErenH1	: <i>A. babadaghi</i> türü Antalya-Erentepe populasyonu 1. haplotipi
BurriBursaH1	: <i>A. burri</i> türü Bursa-Uludağ populasyonu 1. haplotipi
C	: Cytosin
CBC	: Compensatory base changes
CBOL	: Consortium for the Barcode of Life
CfBurriMdH1	: <i>A. cf. burri</i> türü Uşak-Muratdağı populasyonu 1. haplotipi
CfBurriMdH2	: <i>A. cf. burri</i> türü Uşak-Muratdağı populasyonu 2. haplotipi

CfBurriMdH3	: <i>A.cf. burri</i> türü Uşak-Muratdağı populasyonu 3. haplotipi
CfBurriMdH4	: <i>A.cf. burri</i> türü Uşak-Muratdağı populasyonu 4. haplotipi
CfBurriMdH5	: <i>A.cf. burri</i> türü Uşak-Muratdağı populasyonu 5. haplotipi
CfSerbCerkesH1	: <i>A.cf. serbicus</i> türü Çankırı-Çerkeş populasyonu 1. haplotipi
CfSerbCerkesH2	: <i>A.cf. serbicus</i> türü Çankırı-Çerkeş populasyonu 2. haplotipi
CfSerbGiresH1	: <i>A.cf. serbicus</i> türü Giresun-Şebinkarahisar Dağı populasyonu 1. haplotipi
CfSerbSivH1	: <i>A.cf. serbicus</i> türü Sivas-Kösedag populasyonu 1. haplotipi
CfUcariKonH1	: <i>A.cf. ucari</i> türü Konya-Kızılkayası populasyonu 1. haplotipi
CH ₄	: Metan
CO ₂	: Karbon dioksit
COI	: Cytochrome c oxidase subunit I
cpDNA	: Chloroplast deoxyribonucleic acid
DavrazensisH1	: <i>A.davrazensis</i> türü Isparta - Davraz Dağı populasyonu 1. haplotipi
DispKartH1	: <i>A.disparalatus</i> türü Bolu-Kartalkaya populasyonu 1. haplotipi
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DnaSP	: DNA Sequence Polymorphism
ETS	: External transcribed spacer
G	: Guanin
HMM	: Hidden Markov Model
IGS	: Intergenic spacer
ITS	: Internal transcribed spacer
ITS1	: Internal transcribed spacer 1
ITS2	: Internal transcribed spacer 2
IUCN	: International Union for Conservation of Nature
LSU	: Large subunit
matK	: Maturase K
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEVBİL	: Moleküler Evrim ve Biyocoğrafya Laboratuvarı
ML	: Maximum Likelihood
mtDNA	: Mitochondrial deoxyribonucleic acid
NigerCamliH1	: <i>A.niger</i> türü Tokat-Çamlıbel populasyonu 1. haplotipi
NigerKoseH1	: <i>A.niger</i> türü Sivas-Kösedag populasyonu 1. haplotipi
NO ₂	: Nitrojen dioksit
NTS	: Non – transcribed spacer
NUMTs	: Nuclear mitochondrial DNA segments
PAUP	: Phylogenetic Analysis Using Parsimony Program
PCR	: Polymerase chain reaction
rbcL	: Ribulose biphosphate carboxylase large chain
rDNA	: Ribosomal deoxyribonucleic acid
RNA	: Ribonucleic acid
rRNA	: Ribosomal ribonucleic acid
SerbBulgH1	: <i>A. serbicus</i> türü Bulgaristan populasyonu 1. haplotipi
SerbBulgH2	: <i>A. serbicus</i> türü Bulgaristan populasyonu 2. haplotipi
SSU	: Small subunit
T	: Thymine
TBD	: Telafi edici baz değişimleri

ToluIzmH1	: <i>A. tolunayi</i> türü İzmir-Bozdağ populasyonu 1. haplotipi
ToluIzmH2	: <i>A. tolunayi</i> türü İzmir-Bozdağ populasyonu 2. haplotipi
ToluIzmH3	: <i>A. tolunayi</i> türü İzmir-Bozdağ populasyonu 3. haplotipi
tRna – VAL	: Transfer ribonucleic acid valine
TurciTahtaH1	: <i>A. turcicus</i> türü Antalya-Tahtalıdağ populasyonu 1. haplotipi
TurciTahtaH2	: <i>A. turcicus</i> türü Antalya-Tahtalıdağ populasyonu 2. haplotipi
TurciTahtaH3	: <i>A. turcicus</i> türü Antalya-Tahtalıdağ populasyonu 3. haplotipi
UcaImeH1	: <i>A. ucari</i> türü Antalya-İmecik Yayla populasyonu 1. haplotipi
UcaImeH2	: <i>A. ucari</i> türü Antalya-İmecik Yayla populasyonu 2. haplotipi
UcariAntH1	: <i>A. ucari</i> türü Antalya-Çamkuyusu populasyonu 1. haplotipi
UcariAntH2	: <i>A. ucari</i> türü Antalya-Çamkuyusu populasyonu 2. haplotipi
UcariDavrazH1	: <i>A. ucari</i> türü Isparta-Davraz populasyonu 1. haplotipi
UludaghensisH1	: <i>A. uludaghensis</i> türü Bursa-Uludağ populasyonu 1. haplotipi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ribozomal genler (sarı renkte) ve bu genlerin çevresi (ETS) ve araya yerleşmiş internal transcribed spicer (ITS1 ve ITS2) boşluklar (mavi renkte).	9
Şekil 2.2. ITS2 sekonder yapı benzerlikleri.	11
Şekil 2.3. Maloideae familyasının üç üyesinde ((A) Amelanchier, (B) Mespilus ve (C) Photinia) oklarla gösterilen pirimidin – pirimidin kabarıklığı (U-U hatalı eşleşmesi) ve korunmuş Heliks III (Coleman 2009).	12
Şekil 2.4. TBD (CBC) ve yarı –TBD’nin (hemi – CBC) şematik gösterimi.	13
Şekil 3.1. The ITS2 Database – Annotation web sayfası ekran görüntüsü.	19
Şekil 3.2. Primer diziler ve sekonder yapılarının 4SALE programı üzerindeki ekran görüntüsü.	21
Şekil 4.1. 5.8S ve 28S bölgeleri eşleşme durumu örnekleri	29
Şekil 4.2. Yaygın sekonder yapı ve korunmuş motifler.	31
Şekil 4.3. Heliks IV taşıyan sekonder yapının gösterimi.	32
Şekil 4.4. <i>Anterastes antitauricus</i> türünün AntiSuhutH4 haplotipinde Heliks III üzerinde saptanan yan kolun (side arm) gösterimi.	33
Şekil 4.5. ITS2 primer ve sekonder yapıları kullanılarak hazırlanan ve seç bağla güvenilirlik değerlerini gösteren ML ağacı.	36
Şekil 4.6. Lineer ITS2 verisi kullanılarak hazırlanan ve seç bağla güvenilirlik değerlerini gösteren ML ağacı.	37
Şekil 4.7. Yarı –TBD 4SALE ekran görüntüsü.	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tür kavramları ve ilkeleri.	6
Çizelge 2.2. Tür grupları ve içerdikleri türler.	15
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan örneklere ilişkin detaylar.	18
Çizelge 4.1. Belirlenen ITS2 haplotipleri, ait oldukları tür ve populasyonlar, baz uzunlukları ve sekonder yapılara ait ΔG değerleri.	26
Çizelge 4.2. 5.8S + 28S eşleşmesi ve GC oranları.	28
Çizelge 4.3. Haplotiplere ait sekonder yapıların heliks baz uzunlukları.	34
Çizelge 5.1. Bazı Hexapoda üyelerinde ITS2 baz uzunlukları.	40

1. GİRİŞ

Bilim tarihinde, Aristoteles'den bugüne biyoçeşitlilik önemli bir araştırma alanı olmuş ve her dönemin kendine özgü koşulları ve ihtiyaçları doğrultusunda biçimlenmiştir. Biyoçeşitlilik çalışmaları son yarım yüzyıl içerisinde yeni bir dönüm noktasına gelmiştir. Günümüzde özellikle sosyoekonomik (sürdürülebilir olmayan ekonomi politikaları, kaynakların yanlış kullanımı/eşit dağıtılmaması, tüketici toplum yapısı vb.) koşulların doğurduğu küresel değişimler, biyoçeşitliliği de tehdit etmektedir. Bu küresel değişimlerin biyoçeşitlilik kaynaklarına yönelik tehdidi ve neden olduğu yok oluş, koruma biyolojisi (conservation biology) alanının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Karşılaşılan bu olumsuz durum ekoloji, biyocoğrafya, evrim ve genetik öncelikli olmak üzere multidisipliner nitelikte biyoçeşitlilik bilgisi üretimini zorunlu kılmıştır. Geleneksel biyoçeşitlilik ölçüm araçları, moleküler tekniklerin ve biyoinformatik alanının gelişmesi ile birlikte dönüşmüştür. Biyoçeşitlilik değerlendirme parametrelerinden birisi olan tür çeşitliliğinin tespit edilmesinde, morfoloji başta olmak üzere fenotipik karakterlerin kullanımının yanı sıra moleküler karakterler de sıklıkla kullanılmaktadır. Biyoçeşitliliğin yalnızca tür çeşitliliğine indirgenmediği klasik yaklaşım yerini tür çeşitliliği, genetik çeşitliliği ve ekosistem çeşitliliğini temel alan kapsamlı ve bütüncül bir biyoçeşitlilik yaklaşımına bırakmıştır. DNA verilerinin canlılardan kolaylıkla elde edilebilmesi ve çok yönlü kullanılabilme potansiyeli, biyoçeşitliliğin mikro (populasyon, tür, alttür) ve makro evrimsel (biyomlar komüniteler, biyocoğrafik birimler) ölçekte ele alınabilmesine olanak sağlamıştır. Biyoinformatik alanının gelişmesiyle birlikte, taksonomik çalışmalarda subjektif ve biaslı sınıflandırmaya neden olan göreceli parametrelerin (fenotipik veriler) yerini objektif sınıflandırmaya imkan veren moleküler verilere bırakmaya başlamıştır.

DNA verilerinin objektif ve çok yönlü değerlendirilebilir olması nedeniyle biyoçeşitliliğin tanımlanmasında belirli bir gen bölgesinin belirlenmesi (DNA barkodlama) görüşü ortaya çıkmıştır (Hebert vd. 2003). Barkodlama çalışmalarının izlenmesi, geliştirilmesi ve elde edilen verilerin depolanarak kütüphanelerinin oluşturulması amacıyla konsorsiyumlar ve farklı canlı gruplarına odaklanılarak alt birimler oluşturulmuştur (Balıklar için; Fish Barcode of Life ve kelebekler için; Lepidoptera Barcode of Life vb.). Doğaları farklı organizma gruplarında yapılan çalışmalar ile ortaya konmuş birçok barkod gen bölgesi biyoçeşitlilik ve sınıflandırma çalışmalarda kullanılmak üzere önerilmiştir. Bitkilerde *rbcL* (ribuloz-bifosfat karboksilaz geniş alt ünitesi) ve *matK* (maturase K) gibi kloroplast gen bölgeleri, hayvanlarda ise COI (sitokrom C oksidaz alt ünite 1 folmer bölgesi) mitokondriyal gen bölgesi (mtDNA) sınıflandırma çalışmalarında kullanılmak üzere barkod gen bölgesi olarak önerilmiştir. Önerilen bu barkod bölgelerinin yanı sıra, biyoçeşitlilik ve tür sınırlarının belirlenmesi amacıyla, genom içerisinde farklı gen bölgeleri çalışılmakta ve mevcut potansiyelleri araştırılmaktadır. Çekirdek ribozomal DNA'sı içerisinde yerleşmiş genler arası bir bölge olan ITS2 (internal transcribed spacer 2) bu kapsamda araştırılan gen bölgelerinden bir tanesidir. Hızla farklı canlı gruplarında denenilen ve barkodlama çalışmaları içerisinde önemli bir yer edinen ITS2, bitkilerin yanı sıra mantarlar için de tek barkod gen bölgesi olarak önerilmektedir (Chen vd. 2010). Hızlı evrimleşme ve

yüksek varyasyon kapasitesi nedeniyle tür ve alttür düzeyinde bilgi vericiliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Transkribe uğramasına rağmen olgun rRNA içerisinde yer almamaktadır. Ancak ribogenesiste (ribozom oluşumu) rol oynadığı bilinmektedir (Coleman 2003; Schultz vd. 2005). Bu nedenle sekonder yapılar oluşturmaktadır (Coleman 2003, 2007; Schultz vd. 2005) ve bu sekonder yapılar lineer dizi ile birlikte barkod potansiyeli oluşturmaktadır.

ITS2 bölgesi ile yapılan barkodlama çalışmaları, hayvan grupları için ise sınırlıdır ve ITS2'nin bu gruplar içerisindeki barkodlama potansiyeli ve filogenetik çözünürlüğüne dair oldukça az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma ile Orthoptera (Arthropoda, Animalia) takımına ait bir cins (*Anterastes*) çalışılarak bu bilimsel eksikliği gidermek amaçlanmaktadır. Hayvanlarda sınırlı sayıda temsilci grupta çalışılmış olan ITS2 geni transkriptlerinin sekonder yapısını daha önce hiç çalışılmamış olan Tettigoniinae altfamilyasına ait temsilci bir grupta tanımlanması amaçlanmaktadır. Önerilen bu çalışma ile *Anterastes* Brunner von Wattenwyl (Orthoptera, Tettigoniinae) cinsine ait türlerin MEVBİL (Moleküler Evrim ve Biyocoğrafya Laboratuvarı, Biyoloji Bölümü) laboratuvarında üretilmiş ITS2 ham dizilerini kullanarak transkriptlerin sekonder yapısını çalışmak ve barkodlamada bu gen bölgesinin sekonder yapısıyla beraber işlevselliğinin sınılanması hedeflenmektedir. *Anterastes* cinsi Orthoptera'nın iyi çalışılmış cinslerinden biridir. *Anterastes* cinsi biri aynı zamanda Balkanlar'da bulunan ve diğer 12'si Anadolu'ya endemik tanımlanmış toplam 13 tür içerir. Çıplak vd. (2015) tarafından yapılan revizyonda en az 3 kriptik türün daha olabileceğine işaret edilmiştir. ITS1 ve ITS2 dizileri ile üretilen filogenetik ağaç düşük çözünürlük vermiş ancak transkriptlerin sekonder yapıları çalışılmamıştır. Fenotipik karakterler bağlamında dokümanı yapılmış ve geleneksel taksonominin yanında filogenisine ilişkin bilgi de sağlandığından ve de taksonomisi tam olarak açıklığa kavuşturulamadığından *Anterastes* türlerinin ITS2'nin sekonder yapısının tür sınırlarını belirlemede kullanışlılığı ve Orthoptera için olan örüntünün saptanması açısından model olmaya aday bir soy hattı olduğu söylenebilir. Bu tez çalışması kapsamında; (i) Orthoptera için temsilci olarak *Anterastes* cinsi üyelerinde ITS2 geninin uzunluğunun belirlenmesi ve lineer dizi özelliklerinin saptanması, (ii) sekonder yapıda oluşan heliks sayısı, her bir heliksin baz kompozisyonu ve varyasyon durumunun diğer canlı grupları ile benzerliği/farklılığının ortaya konması, (iii) türleri ayırt edici tam veya yarım – TBD (telafi edici baz değişimleri) var olup olmadığının ve TBD örüntüsünün fenotipik türlerle uyumunun saptanması, (iv) ITS2 transkripti sekonder yapısının tür sınırlarını belirleme potansiyeline bağlı olarak, ITS2 geninin Tettigoniinae ve de Orthoptera için bir DNA barkod belirteci olarak kullanılma potansiyelinin test edilmesi, (v) sekonder yapıya dayalı olarak tanımlanacak karakterlerle oluşturulacak filogeninin primer dizilerin oluşturduğu filogeni ile karşılaştırılması ve tüm bunlar ışığında literatür verisi dikkate alınarak ribozomal genlerin evriminde ITS2 geninin etkisinin ne olduğunun saptanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Biyoçeşitlilik Nedir ve Nasıl Tanımlanır?

Biyoçeşitlilik algısı, *Homo* türlerinin öz bilinci kadar eskiye dayanmaktadır (Mayr 1998). Aristoteles, dünyanın dinamik yapısı ve organizmaların dünya üzerinde nasıl dağıldığına dair sorular sormuş ve türler hakkında ilk düşüncelerin (essentialism–özcülük) ortaya atılmasını sağlamıştır (Austin 2016). Onsekizinci yüzyıla kadar inanç sistemleri çerçevesinde ele alınan (genesis, yaratılış) (Sapp 2003) ve insanı biyolojik piramitin en tepesine koyan (Scala naturae) (Kutschera 2011) anlayışla biçimlenen biyoçeşitlilik algısı, 19. yüzyılla birlikte farklı alanların gelişmesi (örneklerin toplanıp, kataloglanması ve karşılaştırmalı morfoloji çalışmalarının başlaması) ile değişmeye başlamıştır. On sekizinci yüzyılda Carl von Linnaeus, türleri değişmez bir varlık olarak tanımlamış ve aynı zamanda günümüzde halen kullanılmakta olan tür sınıflandırma (hiyerarşik) ve binominal isimlendirme sistemini (ikili) geliştirerek çok sayıda tür isimlendirmiştir (Ruggiero vd. 2015; Linnaeus 1735). Georges - Louis Buffon iklimsel değişimlerin türler ve türlerin dağılım alanlarını etkilediğini öne sürmüştür (Kreft ve Jetz 2010'a göre Buffon 1778). Johann Reinhold Forster tür çeşitliliğinin enleme (Kreft ve Jetz 2010'a göre Forster 1778), Alexander von Humbolt ise yükseklik ile ilişkisi üzerine çalışmalarda bulunmuşlardır (Kreft ve Jetz 2010). Charles Lyell 1832 yılında yayınladığı 'Jeolojinin İlkeleri' isimli kitabında tarihsel bağlamda Dünya üzerinde gerçekleşen fiziksel süreçlerin devinimli olduğu ve fiziksel yasaların geçmiş ve günümüz için aynı şekilde işlediği (uniformitarianism) hipotezini ileri sürmüştür. Lyell aynı zamanda iklim değişimleri ve türlerin dağılımı arasında ilişki kurarak, türlerin yok olabileceğinden bahsetmiştir (Ospovat 1977). Charles Darwin uniformitarian anlayışın temeli olan 'günümüz, geçmişe giden anahtardır' yaklaşımından etkilenmiş ve Lyell'in bahsettiği, değişimin itici güçlerini biyolojik süreçlere uyarlayarak, Dünya üzerindeki çeşitliliğin kademeli olarak doğal seçim ile evrimleştiği fikrini ortaya atmıştır (Darwin 1859). Philip Lutley Sclater, zoocoğrafik bölgeleri tanımlamış ve türlerin dağılım alanları ile birlikte, her bir zoocoğrafik bölgenin içerdiği tür sayısını yayınlamıştır (Sclater 1958). Alfred R. Wallace türlerin çevresel faktörler, rekabet ve predasyon v.b. nedenlerle evrimleştiğini belirterek evrim teorisini geliştirmiştir (Beddall 1972; Kutschera 2011; Wallace 1876). Alfred Wegener 1912 yılında çıkardığı 'The origin of the continents and oceans – Kıtalar ve okyanusların kökeni' adlı kitabında kıtaların kayması teorisini ortaya atmıştır (Wegener 2002) ve bu teori ile birlikte türlerin dağılım alanlarının nasıl oluştuğuna dair farklı bakış açıları gelişmiştir. Tüm bu bilgi birikimi ile birlikte biyolojik çeşitlilik kavramı birçok farklı perspektifte incelenmeye ve değerlendirilmeye devam etmektedir.

Biyoçeşitlilik terimi, Walter G. Rosen tarafından biyolojik çeşitliliğin bir kısaltması olarak 1986 yılında, yeryüzündeki biyolojik çeşitlilik ve bu çeşitliliğin korunması kapsamlı bir forumda kullanılmıştır. Tarihsel süreçte dönemin bilgi birikimi ile değişen ve gelişen biyoçeşitlilik araştırmaları, son yarım yüzyılda artan bir ivme kazanmıştır. Sanayi Devrimi (1750 – 1840 yılları arası) ve sonrasındaki dönem boyunca, atmosferik karbon dioksit (CO₂), nitrojen dioksit (NO₂) ve metan (CH₄) gazları, stratosferik ozon tabakasının kaybı, yeryüzü sıcaklığı, okyanusların asitliği, tropik orman alanlarının kaybı, ıslah edilmiş araziler v.b. parametrelerde üstel (exponential) bir artış

gözlenmektedir (Steffen 2015). 2100 yılında toplam insan nüfusunun 11,18 milyar olacağı tahmin edilmektedir (Roser 2018). Biyoçeşitlilik üzerindeki temel baskı, insan nüfusunun kontrolsüz bir biçimde artması ve buna bağlı olarak kaynakların giderek daha çok ve vahşice kullanılması sonucu habitat bozulmalarının yaşanmasıdır (Papworth vd. 2009). İnsan temelli küresel iklim değişikliği, enerji kaynakları ve populasyon artışı, birçok canlı türünü tehdit etmektedir (Booth vd. 2017). Bu biyotik kriz, canlıların evrimsel dinamiklerini de değiştirebilmekte ve bu durum türlerin geleceklerinin öngörülememesine sebep olmaktadır (Myers ve Knoll 2001). Günümüzde halen devam etmekte olan bu küresel değişimler ve dalgalanmalar, sosyal ve ekonomik sorunların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Naemm vd. 2009; Czech 2008; Diamond 2005). Bu küresel kriz içerisinde, bilim insanları biyoçeşitliliğin korunması amacıyla, ilk olarak ekonomik değeri olan veya koruma önceliği olan tür ve ekosistemler üzerinde çalışmaktadır (Marris 2007).

2.1.1. Biyoçeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan araçlar

Biyoçeşitlilik kavramı, temel olarak tür çeşitliliği, genetik çeşitlilik ve ekosistem çeşitliliği bağlamında 3 ana başlıkta değerlendirilmektedir ve yaşamın sürdürülebilirliği açısından gereklidir (Levin 2001; McNeely vd. 1990). Tür çeşitliliği yeryüzündeki tüm canlı formlarını kapsamaktadır ve biyoçeşitlilik - koruma biyolojisi çalışmalarının ana odağı konumundadır (Morell 1999). Çevresel faktörler, iklim, jeolojik yaş ve topografya gibi abiyotik faktörler ve bir diğer çeşitlilik kavramı olan tür zenginliği arasında korelasyon bulunduğu birçok çalışmada açığa çıkarılmıştır (van Rensburg vd. 2002; Francis ve Currie 2003; Hawkins vd. 2003; Harrison vd. 2006). Genetik çeşitlilik ise aynı populasyon içerisindeki veya farklı populasyonlardaki bireyler arasında olan tür içi (intraspesific) nükleotit ve alel çeşitliliğini ifade eder. Genetik çeşitlilik, bir türün yaşamını devam ettirebilmesi için elzem olan direnç, uyum gücü (fitness) ve üreme yeteneği gibi özelliklerin sürekliliğini sağlar (Laikre vd. 2010). Genetik çeşitlilik birimleri ise haplotip çeşitliliği, nükleotit çeşitliliği ve heterozigotluk parametreleri temelinde incelenmektedir. Tür içi genetik çeşitlilik kaynak ve süreçlerinin (genetik sürüklenme, mutasyonlar, gen akışı ve doğal seçilim faktörleri) ortaya konması, biyoçeşitliliğin korunması ve yönetimi konusunda sıklıkla yardımcı olarak kullanılmaktadır (Goodall-Copestake 2012). Düşük genetik çeşitliliğin, türlerin çevresel değişikliklere adapte olma yeteneğini düşürmesi nedeniyle yok olma riski yarattığı düşünülür (Hobbs vd. 2013). Türlerin yok olma riskinin düşürülmesinde genetik çeşitliliğin korunmasının önemi IUCN (International Union for Conservation of Nature) tarafından vurgulanmış ve koruma önceliği altına alınmıştır (Frankham vd. 2010; McNeely vd. 1990). Ekosistem çeşitliliği, türlerin farklı çevre koşullarına verdikleri ortak yanıtın sonucu olarak tanımlanır (Primack 2010). Ekosistemler oldukça çeşitlidir ve türlerin devamlılığı açısından bu ekosistemlerin korunması gerekmektedir. Aynı şekilde bir ekosistem içerisindeki biyoçeşitliliğin veya bir türün yok olmasının, ekosistemin işlevi üzerinde kompleks ve tahmin edilemez etkileri olabileceği bilinmektedir (Vaughn 2010).

2.1.2. Tür kavramı ve tür taksonuna ilişkin yaklaşımlar

Biyçeşitliliğin temel birimlerinden olan ‘tür’ kavramı, sistematik biyoloji içerisinde oldukça tartışmalı bir konu olarak göze çarpmaktadır (De Queiroz 2007). Evrim, ekoloji, genetik ve sistematik çalışmaları içinde tür esas birim olarak düşünülmekteydi (Agapow vd. 2004; Birky vd. 2010; Blaxter vd. 2005; Claridge vd. 1997; Green 2005; Hull 1975; Reydon 2005). Ancak, türün empirik olarak değişken bir nesne olması, tür kavramının da devamlı olarak revize edilmesine neden olmuştur (Mishler ve Wilkins 2018). Türlerin tanımlanması ve tür sınırlarının belirlenmesi üzerine bilim insanlarının kendi dönemsel bilgileri ve araştırma konuları çerçevesinde oluşturmuş oldukları birçok farklı yaklaşım bulunmaktadır (Ciplak 2013) (Çizelge 2.1).

Tanımlanmış tür kavramları arasından, üreme birliğini temel alan biyolojik tür kavramı, birçok bilim insanı tarafından kabul edilmiştir (Mishler ve Wilkins 2018). Bu yaygın kabule rağmen eşeysiz üreyen organizmaların (Bogart 2003; Lodé 2013; Moritz ve Bi 2011), fosillerin ve hibritlerin bu kavram içerisine oturtulamaması sebebiyle farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur. De Quieroz, bileşik tür kavramı (unified species concept) ile türü birbirinden bağımsız olarak evrimleşen metapopulasyonların soyhatları olarak ele almış ve tür tanımını bu tek kriter üzerinden yapmıştır (De Quieroz 2007). Diğer tür kavramlarında, tür taksonunun sınırlarının çizilmesinde kullanılan, üreme birliği, ekolojik birlik, genotipik/fenotipik birlik olma ve belirli kriterlere göre küme oluşturma vb. özellikleri ikincil özellikler olarak tanımlayarak, bu özelliklerin ancak farklılaşma dereceleri ve sınırların çizilmesinde kullanılacak karakterler olarak tanımlamıştır (De Queiroz 2007). Bu tür kavramının, soy hatları ve filogenetik ilişkilere yönelik hipotezlerin test edilmesinde kullanışlı birimler olarak ele alınmasının yanı sıra klasik taksonomik yaklaşımda da doğal bir birim olarak ele alınabileceğini söyleyerek, bütüncül bir tür yaklaşımın gerekliliğini ortaya koymuştur (De Quieroz, 2005).

Çizelge 2.1. Tür kavramları ve ilkeleri.

Tür Kavramları	Tür Kavramının İlkeleri	Kaynak
Biyolojik	Yaşayabilir, verimli döl ile sonuçlanan, doğal üreme birliğine sahip populasyonlar bütünü	Wright 1940; Mayr 1942; Dobzhansky 1950
İzolasyon	Gen akışının üreme izolasyonu ile sınırlandırıldığı populasyonlar bütünü	Mayr 1942; Dobzhansky 1970
Tanımalı	Döllenme sisteminin özgül olarak paylaşıldığı kapsamlı populasyon	Paterson 1985; Masters vd. 1987; Lambert ve Spencer 1995
Ekolojik	Dağılım alanı içerisinde aynı niş veya adaptif zonu paylaşan organizmalar grubu	Van Valen 1976; Andersson 1990
Evrimsel	Özgün evrimsel rol, eğilim ve tarihsel öyküye sahip organizmalar grubu	Simpson 1951; Wiley 1978; Mayden 1997
Kohezyon	Genetik veya demografik kohezyon oluşturan bireyler topluluğu	Templeton 1989, 1998a
Filogenetik	İki türleşme olayı veya bir türleşme ile bir yokoluş olayı arasındaki soy hattı	Hennig 1966, Ridley 1989
Monofiletik	Ortak bir ata ve türev populasyonlarını kapsayan	Rosen 1979; Donoghue 1985; Mishler 1985
Genolojik	Ortak bir atadan gelen ancak diğer türlerle paylaşılmayan allellere sahiplik	Baum ve Shaw 1995; Avise ve Ball 1990
Diyagnostik	Nitel veya sabitlenmiş karakterlerle ayırt edilebilen	Nelson ve Platnick 1981; Cracraft 1983; Nixon ve Wheeler 1990
Fenetik	Fenetik bir küme oluşturan	Michener 1970; Sokal ve Crovello 1970; Sneath ve Sokal 1973
Genotipik	Genetik bir küme oluşturan	Mallet 1995

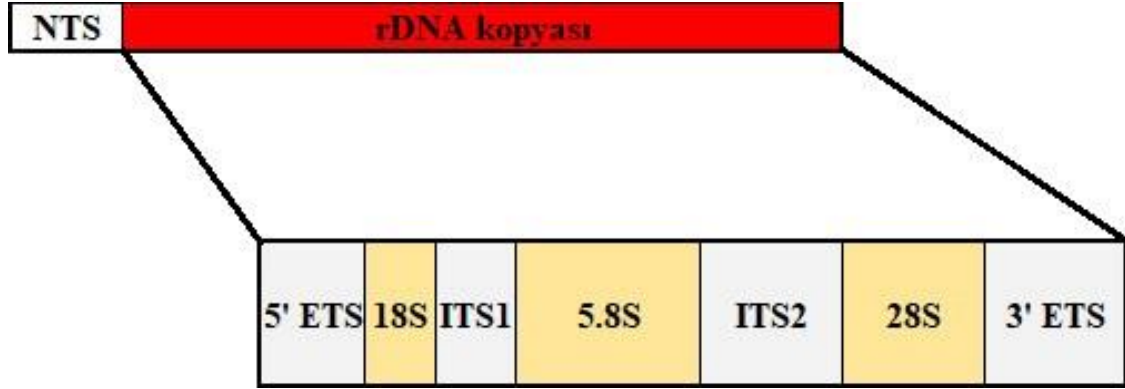
2.1.3. Klasik taksonomiden moleküler taksonomiye: tür sınırlarının çizilmesi

Türlerin betimlenmesi ve sınıflandırılmasındaki problemler oldukça yaygındır (Bicford vd. 2007; Haig vd. 2006). Özellikle morfolojik karakterler üzerinden yapılan klasik/geleneksel sınıflandırma yöntemleri, subjektifliğe sebep olabilecek birçok kısıtlılığa sahiptir (Knowlton vd. 1993; Jarman ve Elliott 2000; Hebert vd. 2003a; Ward vd. 2005; Frézal ve Leblois 2008; Lim vd. 2009). Moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte taksonomik çalışmalara paralel olarak moleküler sistematik yaklaşımlar da kullanılmaya başlanmıştır. DNA dizileri, tür sınırlarının belirlenmesinin yanı sıra, türler ve soy hatları arası akrabalık ilişkilerinin saptanması (filogeni), çeşitlenme süreçlerinin tanımlanması (türleşme) ve tüm bu süreçleri etkileyen faktörlerin belirlenmesine (filocoğrafya) olanak sağlayan, çok fonksiyonlu veriler üretilmesine olanak sağlamıştır. DNA ve diğer moleküler belirteçlerdeki farklılıklar ile birbirleri ile oldukça benzer morfolojiye sahip canlılar dahi birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Janzen vd. 2009). Morfolojik olarak ayrılması çok güç olan arkea, bakteri, protist ve virüsler gibi organizmalar için yeni moleküler yaklaşımların (Caron 2009) ve belirli gen bölgelerinin tür sınırlarının çizilmesinde kullanılması önerilmiştir (Hajibabaei 2007; Allander vd. 2001; Hamels vd. 2001). DNA'dan elde edilen verilerin objektif ve çok yönlü değerlendirilebilir olması nedeniyle biyoçeşitliliğin özellikle de türlerin tanımlanmasında genomdaki kısa bir gen bölgesinin kullanılması (DNA barkodlama) görüşü ortaya çıkmıştır (Hebert vd. 2003). DNA barkodlama, kısa gen bölgelerinin standartlaştırılmış tür içi etiketler olarak ele alınarak, hızlı ve doğru tür tanımlamalarının yapılmasında kullanılan bir sistemdir (Hebert ve Gregory 2005). Günümüzde DNA barkodlama sistemi hayvanlarda (Hebert vd. 2004a,2004b; Ward vd. 2005; Barrett ve Hebert 2005; Hajibabaei vd. 2006; Jansen vd. 2005), bitkilerde (Kress vd. 2005), alglerde (Saunders 2005), mantarlarda (Summerbell vd. 2005), protistalarda (Scicluna vd. 2006) ve bakterilerde (Sogin vd. 2006) tür sınırlarının çizilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Türlerin tanımlanmasında uluslararası bir standardın oturtulması amacıyla, Consortium for the Barcode of Life (CBOL, <http://barcoding.si.edu>) ve Barcode of Life Data Systems (<http://www.barcodinglife.org>) birliktelikleri oluşturularak barkodlama çalışmaları desteklenmiş ve barkodlama çalışmalarından elde edilen bilgiler bir araya getirilmiştir (Marshall 2005; Ratnasingham ve Hebert 2007). DNA barkodlama çalışmalarında birçok canlı grubunda kullanılmak üzere evrensel gen bölgeleri belirlenmektedir. Hayvanlarda Hexapoda takımı ile yapılan çalışmalar sonucunda, yaklaşık 650 baz çifti uzunluğundaki COI (sitokrom C oksidaz alt ünite 1) mitokondriyal gen bölgesi (mtDNA) (Hebert 2003; Frezal ve Leblois 2008), bitkilerde ise kloroplast gen bölgeleri (cpDNA) olan 1206 baz çifti uzunluğundaki rbcL (ribuloz-bifosfat karboksilaz geniş alt ünitesi) ve 1500 baz çifti uzunluğundaki matK (maturase K) canlı gruplarına özgü, evrensel barkod bölgeleri olarak önerilmiştir (CBOL Plant Working Group, 2009). Birçok farklı gen bölgesinin arasında COI, hayvanlarda tür sınırlarının belirlenmesinde kullanılan en yaygın gen bölgelerinden bir tanesidir (Avise 2009). COI sekansları aynı zamanda farklı taksonomik derecelerde filogenetik,

filocoğrafya ve populasyon genetiği çalışmalarında da kullanılmaktadır (Nimis ve Lebbe 2010). Ancak, COI'nin sadece maternal olarak kalıtılması (Hebert vd. 2004), mitokondriyal genomdan nükleer genoma kopyalanmış nükleer mitokondriyal DNA (NUMTs –nuclear mitochondrial DNA segments) kopyalarının varlığı (Williams ve Knowlton, 2001) ve bu NUMT'ların tespit edilmesindeki zorluklar (Thalman vd. 2004), COI'nin evrimleşme hızının canlı grupları içerisinde farklılıklara sahip olması (Strugnell ve Lindgren 2007; Erpenbeck vd. 2006; Wirth vd. 1999), özellikle metazoalar içerisinde yaygın olan simbiyotik ilişki ve farklı kademelerde gerçekleşen horizontal gen transferi ve hibritleşme olayları nedeniyle (Weeks vd. 2007; Rot vd. 2006; Hurst ve Jiggins 2005) bu canlılara ait mitokondriyal COI'nin çoğaltılması riskinin oluşması vb. nedenlerle DNA barkodlama çalışmaları sırasında COI'nin diğer moleküler belirteçlerle desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Frézal ve Leblois 2008; Yao vd. 2010)

2.2. ITS2 Bölgesi

Ribozomal genler (rRNA veya rDNA) COI dışında en sık kullanılan genlerdendir (Ankenbrand vd. 2015) ve sistematik çalışmalarda oldukça bilgi verici oldukları tespit edilmiştir (Poczai ve Hyvönen 2010; Dixon ve Hillis 1993). Ribozomda bulunan ve ribozom sentezinde görev alan rRNA, SSU (small subunit – küçük alt ünite) ve LSU (large subunit – büyük alt ünite) olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Ribozomal RNA (rRNA)'yı kodlayan gen kompleksi, küçük alt ünite (SSU) 'yi kodlayan 18S, 5.8S ve büyük alt üniteyi (LSU) kodlayan 28S rRNA genlerinden oluşur. Transkripte olan ancak kodlama yapmayan bu genlerin yanında 18S ile 5.8S arasına yerleşmiş ITS1 (internal transcribed spacer 1), 5.8S ile 28S arasına yerleşmiş ITS2 (internal transcribed spacer 2) ve 5' ve 3' uçlarına yerleşmiş ETS (external transcribed spacer) olmak üzere temel 3 farklı kodlama yapmayan bölge içerir (Coleman 2003). Bu genler arası boşluk bölgelerinin tümü, IGS (intergenic spacer) veya NTS (non – transcribed spacer) ismini almaktadır. rRNA genleri ve bu genler arası boşluk bölgelerin yerleşim planı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Ribozomal genler (sarı renkte) ve bu genlerin çevresi (ETS) ve araya yerleşmiş internal transcribed spicer (ITS1 ve ITS2) boşluklar (mavi renkte).

Kodlama yapan genler güçlü seçim baskısı altında olduklarından ökaryotik gruplarda oldukça korunumlu iken kodlama yapmayan ITS1 ve ITS2 ise daha az korunumludur ve daha fazla mutasyon biriktirebilmişlerdir (Caisova ve Melkonian 2014). Canlıların büyük çoğunluğunda, bu genler arası boşluk bölgelerinin uzunluğu 500 bazdan daha azdır (Coleman 2015). Ökaryotik ITS1 ve ITS2 yapılarına ilişkin ilk varsayım ise Hausner ve Wang 2005 tarafından yapılmıştır: Eğer bir boşluk bölgesi uzun ise diğer boşluk bölgesi de uzun, eğer biri kısa ise diğer de kısa olarak gözlenmektedir. Ribozomal gen bölgelerinde bulunan ve kopya sayıları yüzlere ulaşan ardışık tekrar dizileri (tandem repeats) ve genler arası boşluk bölgeleri, beraber evrimleşme yoluyla (concerted evolution) organizma içerisinde özdeş hale dönüşmektedir (Elder ve Turner 1995). Organizmaların büyük çoğunluğunda beraber evrim gerçekleşirken bir takım bitki gruplarında intragenomik düzeyde farklılıklar olabileceği de saptanmıştır (Harpke ve Peterson 2006). Bu genlerin evrimsel hızı çok düşük olmasına rağmen, genler arasındaki boşluklar olan ITS1 ve ITS2'nin evrimsel hızı bu bölgelere kıyasla 100 kat daha fazladır (Goldman vd. 1983). mtDNA'ya göre ise 30 kat daha yavaş evrimleşmektedir (Caccone vd. 2004). ITS2 genlerinin sahip oldukları fragman uzunlukları dahi türe özgü olabilir (Yao vd. 2010). ITS2 günümüzde mantarlar (Fungi) için belirlenmiş tek barkod bölgesidir ve bitkiler (Plantae) için de barkod genlerinden biri olarak kabul görmektedir (Yao vd. 2010; Li vd. 2011). ITS2 diğer moleküler belirteçlere kıyasla daha kısa ancak yüksek derecede korunmuş bir bölgedir (Coleman 2007, 2009; Schultz vd. 2005) ve hücrede çok sayıda kopya bulunması nedeniyle kolayca elde edilebilir (Baldwin 1995).

Tüm bu özelliklere sahip olması nedeniyle ITS genleri, özellikle daha istikrarlı bir yapı sergileyen ITS2, tür, cins ve familya düzeyinde taksonomik ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Coleman 2015). Bazı organizma gruplarında ise ITS2 verisi ile yapılan filogenetik analizlerin, gen sekansları ile yapılan filogenetik analizlere göre alttür, tür, cins, aile, takım ve üstü düzeylerde daha fazla

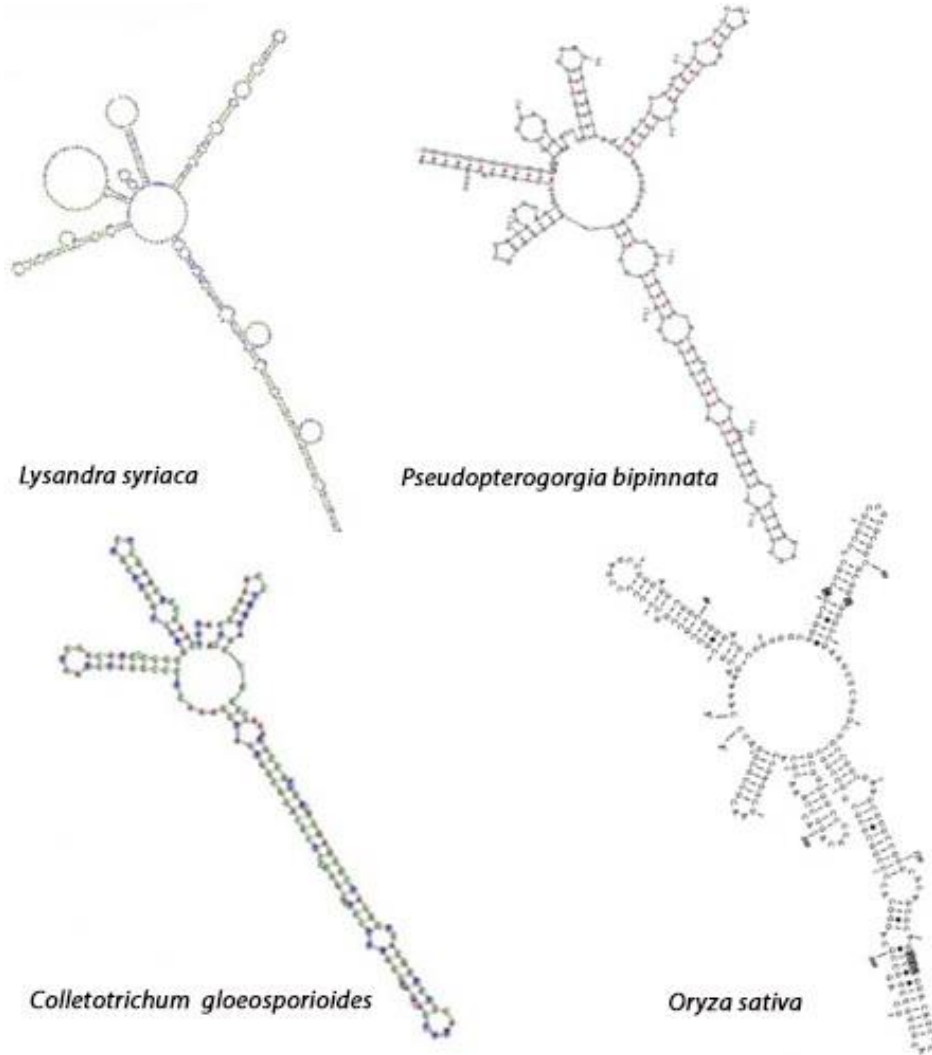
bilgi verici olduğu saptanmıştır. LSU ve SSU rDNA takım, aile, cins düzeyinde, rbcL takım, aile, cins ve tür düzeyinde, mtDNA cins, tür ve alttür düzeyinde, ITS aile, cins, tür ve alttür düzeyinde filogenetik açıdan bilgi vericidir (Coleman 2003). Bu durum, ITS2 veri tabanında önemli sayıda dizinin depolanması sağlanmıştır (Ankenbrand vd. 2015). ITS2'nin yüksek organizasyonlu canlı grupları için (Örn. Animalia) kullanışlı olabileceği düşünülmektedir (Coleman ve Vacquier 2002) ancak metazoalara ilişkin ITS2 ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (Wiemers vd. 2009).

2.3. ITS2 Bölgesinin Sekonder Yapısı

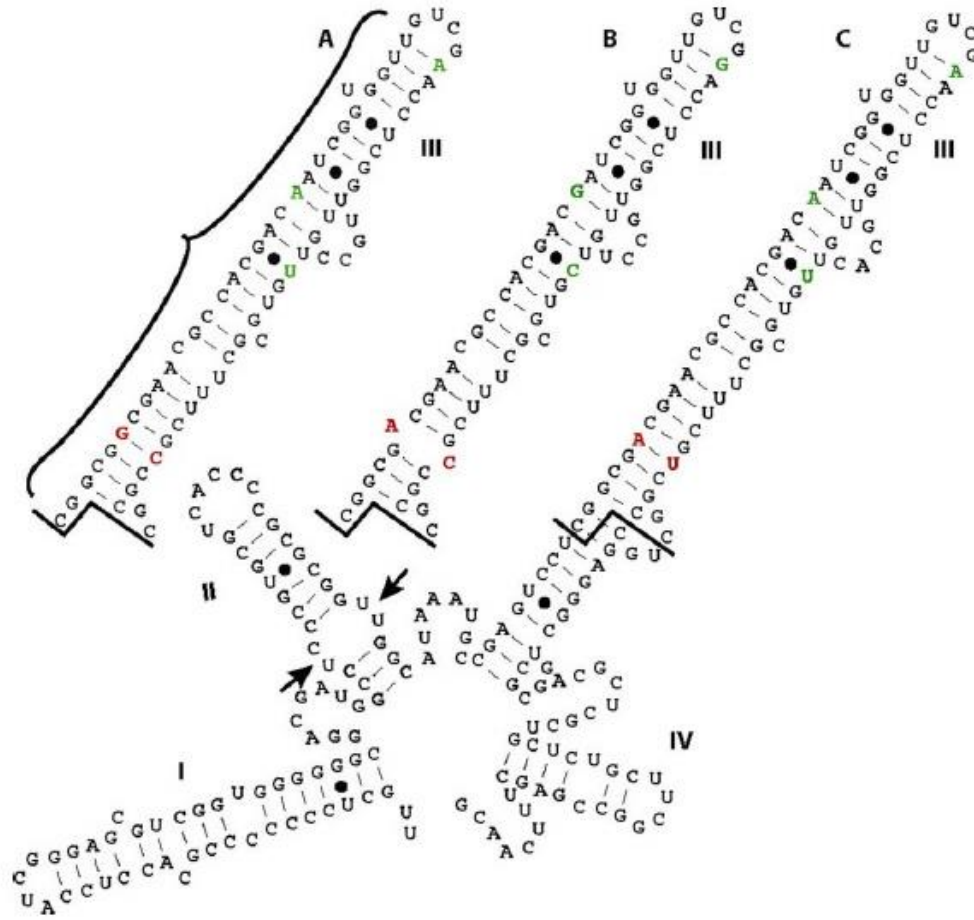
Filogenetik ağaçlar oluştururken RNA sekonder yapılarının analize dahil edilmesi ağaçların doğruluğunu ve bilgi vericiliğini arttırmaktadır (Keller vd. 2010; Schultz ve Wolf 2009). Google Scholar'a göre son 15 yıl içerisinde filogenetik çalışmaların sayısında durgunluk gözlenmekteyken, RNA sekonder yapılarının dahil edildiği çalışmalarının artan bir eğilimde olduğu belirlenmiştir (Coleman 2015). Yapılan çalışmalarla, ITS genlerinin primer dizilerinin tür düzeyinde çalışmalarda taksonomik bilgi vericiliğinin fazla, ancak filogenetik çözünürlüklerinin zayıf olduğu bulunmuştur (Chobanov vd. 2017). Primer dizilerin aksine bu genlerin ribozomal gen ürünlerinin katlanmasındaki rolü nedeniyle, ITS transkriptlerinin sekonder yapısının taksonomik ve filogenetik olarak oldukça kullanışlı araçlar sunduğu görülmüştür (Müller vd. 2007; Selig vd. 2008).

Ribozomal genler arası boşlukların sekonder yapılarının, doğru katlanmaları ribogenesis yani ribozom oluşumu için elzemdir (Joseph vd. 1999). Korunumlu 3'ETS bölgesinin ortadan kalkması halinde ITS2 ve 5.8S rRNA, ITS2'nin ortadan kalkması halinde ise büyük alt ünite (LSU) ve küçük alt ünite (SSU)'nin oluşumunun engellendiği görülmüştür (Melekhovets vd. 1994; Good vd. 1997; Hitchen vd. 1997). ITS2'nin terminal bölgesinde gerçekleşen pozisyon değişikliklerinin bu ünitelerin oluşumunun verimini düşürdüğü belirlenmiştir (Lee vd. 1995). Canlılar arasında en yaygın görülen ITS2 sekonder yapısı dört heliksli (Heliks I, Heliks II, Heliks III ve Heliks IV) yapıdadır (Coleman 2007) ve sekonder yapılar oldukça benzerlik gösterir (Şekil 2.2). Mayalarda yapılan ITS2 sekonder yapılarına bakıldığında, iki temel yapı tespit edilmiştir (Yeh ve Lee 1990; Joseph vd. 1999; Cote vd. 2002). Bu yapılar, merkez bir halka (central loop) ve etrafında bağlanan dört heliksle karakterize olan ring tipi (Joseph vd. 1999) ve çok sayıda halka ve yan dal içeren hairpin sekonder yapısıdır (Yeh ve Lee 1990). Heliks I ve IV, evrimsel olarak en değişken yapılarıdır ve varyasyonel olmaları nedeniyle türler arası ve tür içi karşılaştırmalarda kullanılabilecek çözünürlükte bilgi sunar (Coleman 2009). Heliks II ve III ise tüm ökaryotlarda gözlenebilen sabit özellikler barındırır, RNA transkript sürecine katılırlar, bu nedenle en korunmuş bölgelerdir (Coleman 2009, 2015; Schultz vd. 2005). Heliks II en az bir pirimidin – pirimidin (UxU, UxC, CxC) yanlış eşleşmesi (mismatch) içerir (Caisova vd. 2011). Heliks III diğer helikslere oranla oldukça uzundur, apikal bölgesi oldukça korunumludur ve sıklıkla 4 nükleotitten oluşan bir motife (UGGU) sahiptir (Coleman

2007; Schultz vd. 2005) (Şekil 2.3.). UGGU dışında UGGGU, UGG, veya GGU dizimleri de Heliks III içerisinde görülebilmektedir (Schultz vd. 2005). Heliks III'ün bu 5' ucuna yakın kısmı (distal kısım) tüm ITS2 içerisinde en korunmuş olan kısımdır (Coleman 2015; Coleman 2007; Schultz vd. 2005). Yalnızca birkaç ökaryotik canlı, ITS2'nin bu ortak özelliklerinden sapma gösterir (Coleman 2007; Coleman 2008) veya hiçbirini bulundurmaz (Peyretailade vd. 1998). Omurgalılar içerisinde ITS2 sekonder yapısının karmaşıklığının ITS bölgesinin uzunluğu ile orantılı olduğu bilinmektedir (Coleman 2013).



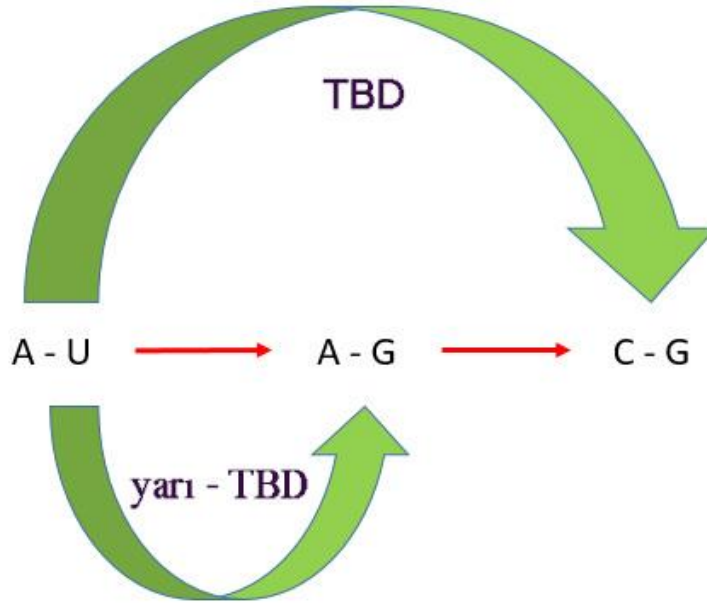
Şekil 2.2. ITS2 sekonder yapı benzerlikleri - *Lysandra syriaca* (Animalia) (Wiemers vd. 2009), *Pseudopterogorgia bipinnata* (Animalia) (Aguilar ve Sanchez 2007), *Colletotrichum gloeosporioides* (Fungi) (Rampersad 2014), *Oryza sativa* (Plantae) (Mai ve Coleman 1997).



Şekil 2.3. Maloideae familyasının üç üyesinde ((A) Amelanchier, (B) Mespilus ve (C) Photinia) oklarla gösterilen pirimidin – pirimidin kabarıklığı (U-U hatalı eşleşmesi) ve korunmuş Heliks III (Coleman 2009).

2.4. Telafi Edici Baz Değişimleri (TBD) Tür Kavramı

Birincil rRNA transkriptlerindeki eşleşmiş bazların her ikisinin değişmesi durumunda TBD (CBC - compensatory base changes) adı verilen telafi edici baz değişimleri ortaya çıkar (Örn: G-C → A-U) (Gutell vd. 1994). Katlanma sırasında zincirin tek tarafındaki bazın değişmesi ise hemi - TBD olarak (Örn: G-C → G-U) adlandırılmaktadır (Coleman ve Vacquier 2002) (Şekil 2.4.). TBD analizi ile morfolojik olarak çözümlenememiş ökaryotlar birbirlerinden ayrılabilir (Ruhl vd.2010). ITS2 sekonder yapısının tüm ökaryotlarda oldukça korunumlu olduğu ancak, transkriptte sekonder yapının korunmasına izin veren telafi edici baz değişikliklerinin (TBD) (CBC - compensatory base changes) evrimsel süreçte biriktirildiği görülmüştür (Ruhl vd. 2010). Yarı – TBD’lerin populasyon ve tür düzeyinde kullanışlı olabileceği belirtilmiştir (Torres-Suarez 2014) ancak taksonomik önemleri henüz farklı canlı gruplarında ortaya konmamıştır (Budak vd. 2016) .



Şekil 2.4. TBD (CBC) ve yarı-TBD'nin (hemi-CBC) şematik gösterimi.

ITS2 sekonder yapısı içerisinde tespit edilen telafi edici baz değişimleri (TBD) biyolojik tür konsepti ile ilişkilidir (Müller vd. 2007). Coleman (2000) *Volvocales* cinsine ait algleri çalışmış ve heliks II ve III üzerinde tanımladığı TBD'lerin varlığı ile tanımlanan kladlar arasındaki eşeysel uyumsuzluk arasında bir örüntü tespit etmiştir. Bu örüntüden yola çıkarak TBD tür kavramı ortaya atılmıştır (Coleman 2000). Potansiyel eşler arasındaki ITS2 farklılaşması arttıkça eşeysel uyum ve zigot üretkenliği düşüş göstermektedir (Coleman 2009). Örneğin *Gonium pectorale* türünün Kuzey ve Güney Yarımküre içerisinde yaşayan bireylerinde heliks III'te TBD olanlarda zigot oluşumu görülmezken, olmayanların bir kısmında zigot oluşumu gözlenmiştir (Fabry vd. 1999). Herhangi bir TBD bulunduran bireyler arasında hibritleşme görülmezken, yarı-TBD veya kabarıklık (bulge) bulunduranların bir kısmında bu durum görülebilir (Coleman 2009). İki yakın tür arasında görülen TBD varlığı türler arasında artık gen akışı olmadığı anlamına gelebilmektedir (Müller vd. 2007).

TBD'ler tür sınırlarının belirlenmesinde ve incelenen takson içerisindeki farklı türlerin sayısını belirlemede kullanılabilir (Coleman 2000; Coleman ve Vacquier 2002). TBD'lerin varlığı doğrudan bir türleşme olayını işaret etmemektedir (Müller vd. 2007; Wolf vd. 2013). Diğer taraftan TBD varlığının türler arası eşeysel uyumsuzlukla bağlantılı olduğu (Müller vd. 2007) ve üreme izolasyonuna yol açtığı deneysel olarak belirlenmiş ve ITS2 ikincil yapısında en az bir TBD varlığının iki farklı türün varlığına işaret olarak kabul edilmiştir (Coleman ve Vacquier 2002). 1300'den fazla yakın akraba organizma (bitki, mantar ve hayvan türleri) ve 25000 ITS2 sekonder yapısının kullanıldığı bir çalışmada telafi edici baz değişimlerinin (TBD) bulunduğu örneklerin %93'ünün farklı türlere ait olduğu belirlenmiştir (Müller vd. 2007). Özet olarak,

TBD'lerin varlığı farklı türleri ayırt etmede elverişli ancak türleşme olayının gerçekleşebilmesi için zorunlu bir kriter değildir (Schultz ve Wolf 2009). TBD analizi, hali hazırda çoklu veri matrisi içerisinde bulunan minimum tür sayısının tespit edilmesinde kullanılabilir (Coleman 2009; Müller vd. 2007; Wolf vd. 2007). Tüm bu bilgi verici özelliklerinden yola çıkarak, ITS2 gen bölgesinde görülen TBD'lerin ökaryot türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında genel bir belirteç olarak kullanılması önerilmiştir. Böyle olmasına karşın bu verilerin çoğu halen mantarlar ve bitkilere aittir (Li vd. 2011; Yao vd. 2010; Schoch vd. 2012) ve diğer ökaryot canlı gruplarında henüz sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır.

2.5. *Anterastes* Cinsinin Taksonomik Problemleri

Günümüzde isimlendirilmiş iki milyon kadar canlı türünden söz edilmektedir. Bunların yaklaşık %55-60'nı böcekler (Hexapoda) oluşturmaktadır. Ensifera (uzun antenli düz kanatlılar) alttakımı içerisinde bulunan *Anterastes* Brunner von Wattenwyl, 1882 (Orthoptera, Tettigoniidae) cinsi, 13 türü Anadolu'ya endemik, 1 türü (*A. serbicus*) ise Anadolu ve Balkanlar'da olmak üzere, tanımlanmış 14 farklı türe sahiptir. Bu türler 4 tür grubu altında sınıflandırılmaktadır (Çıplak 2004; Çıplak vd. 2015). Tür grupları ve içerdikleri türler Çizelge 2.2.'de verilmektedir.

Anterastes cinsinin bu üyeleri, erkek bireylerde cerci, anal tergum ve titillatör, dişi bireylerde subgenital plaka v.b. genital yapılarıdaki küçük farklılıklara ve renklenmelerine göre sınıflandırılmıştır (Uvarov 1934, 1939; Karabağ 1950, 1951; Ünal 2000; Cıplak 2004; Kaya ve Cıplak 2011). Ancak tek bir morfolojik karakter, cins içerisinde morfolojik olarak çözümlenmekte yetersiz kalmaktadır ve bu sınıflandırma işlemi gerçekleştirilirken populasyon içi ve populasyon arası varyasyonlar göz önünde bulundurulmamıştır (Cıplak 2004). *Anterastes* cinsi içerisindeki türlerin tamamı, yüksek alpin çayırıklarda (1300 – 2294 m) dağılım göstermektedir. Türlerin büyük kısmı, tek bir dağ zirvesinde oldukça kısıtlı alanlarda dağılım gösterirken, bir kısmı ise birden fazla zirvede ancak birbirinden izole populasyonlar halinde dağılım göstermektedir (Cıplak 2004, Cıplak vd. 2010, Kaya & Cıplak 2011, Kaya vd. 2012; Çıplak vd. 2015). Uçma özelliğine sahip olmamaları (erkeklerde bulunan kısa kanatlar ses çıkarma organı olarak görev yapmaktadır) ve kısa yaz dönemlerinde sadece bir kez döl vermeleri sebebiyle dağılıma (dispersal) kapasiteleri oldukça düşüktür (Cıplak vd. 2015).

Çizelge 2.2. Tür grupları ve içerdikleri türler.

Tür grupları	Türler
<i>Anterastes anatolicus</i> grubu	<i>Anterastes anatolicus</i> Uvarov, 1934
<i>Anterastes babadaghi</i> grubu	<i>Anterastes babadaghi</i> Uvarov, 1939 <i>Anterastes niger</i> Ünal, 2000 <i>Anterastes turcicus</i> Karabag, 1951 <i>Anterastes ucari</i> Çiplak, 2004
<i>Anterastes serbicus</i> grubu	<i>Anterastes serbicus</i> Brunner von Wattenwyl, 1882 <i>Anterastes tolunayi</i> Karabag, 1951 <i>Anterastes antitauricus</i> Çiplak, 2004 <i>Anterastes burri</i> Karabag, 1951
<i>Anterastes uludaghensis</i> grubu	<i>Anterastes antecessor</i> Kaya & Çiplak, 2011 <i>Anterastes davrazensis</i> Kaya, Chobanov & Çiplak, 2012 <i>Anterastes uludaghensis</i> Karabag, 1950

Çiplak vd. 2015 tarafından yapılan bir çalışmada, nükleer (ITS1 ve ITS2) ve mitokondriyal gen bölgeleri (COI, 16S) kullanılarak filogenetik ilişkiler çözümlenmeye çalışılmıştır. Daha önceki çalışmalarda da (Avisé 2000; Avisé 2009; Fenn vd. 2008) belirtildiği gibi nükleer gen bölgelerinin (ITS; ITS1 + 5.8S rDNA+ ITS2), mitokondriyal gen bölgelerine kıyasla daha az filogenetik çözünürlüğe sahip olduğu belirlenmiştir, ancak genler arası boşluk bölgelerinin sekonder yapıları çalışılmamıştır. Ancak, veriler ışığında *Anterastes* cinsinin 14 türün yanı sıra en az 3 kriptik tür daha içerebileceği belirtilmiş ve filogenetik ilişkilerde fenotip-genotip uyumsuzlukları tespit edilmiştir.

Eklembacaklılarda ITS2 geninin sekonder yapısının belirlenmesine ilişkin çalışmalar, diğer canlı alemleri ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça sınırlıdır. Böceklerden Diptera, Coleoptera ve Hymenoptera takımına ait az sayıda temsilci türlerle yapılmış çalışmalar mevcuttur (Wesson vd. 1992; Gomez-Zurita 2000; Budak vd. 2016). Bu çalışmalarda, ITS2 bölgesinin diğer canlılardakinden daha uzun olduğu (özellikle Hymenoptera ve Diptera), buna karşın temel olarak dört heliksli yapının korunduğunun bulunmuş olması diğer böcek takımlarının çalışılması yönünde bir gereklilik ortaya çıkarmaktadır. Orthoptera ~30 bin tür içeren en kalabalık böcek takımlarından biri olmasına karşın şimdiye kadar sadece Barbitistini (Phaneropterinae)

tribusuna ait az sayıda taksonda ITS2 sekonder yapısı çalışılmıştır (Ullrich vd. 2010). Bu çalışmada ise sadece sekonder yapının morfolojisi verilmiş ve primer diziler filogenetik olarak analiz edilmiştir. Sekonder yapıdaki heliks özellikleri, helikslerin dallanma gösterip göstermediği, TBD örüntüsünün türlere göre özgün durumlar gösterip göstermediği ve tür sınırlarını belirlemede kullanışlı olup olmadığı irdelenmemiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklem ve Veri Eldesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm veriler, TÜBİTAK tarafından desteklenen ve yürütücüsünün Prof. Dr. Battal ÇIPLAK olduğu 107T462 numaralı proje kapsamında elde edilmiştir. 2007-2011 yılları arasında *Anterastes* cinsinin dağılım alanını temsilen Anadolu ve Balkanlar'dan yeterli sayıda örneklem yapılmıştır. Toplanan örnekler Çıplak 2004, Kaya ve Çıplak 2011 ve Kaya vd. 2012'e göre teşhis edilmiştir ve sistematik açıdan türüne kesin karar verilemeyen örnekler için 'cf' eki kullanılmıştır. 'cf' eki sistematik çalışmalarda confer kelimesinin kısaltması olarak, teşhis edilemeyen türler için, bir başka türe benzerliği ifade edecek şekilde kullanılmaktadır.

Bu proje kapsamında kodlama yapmayan bir nükleer gen bölgesi olan ve ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinden oluşan ITS bölgesi, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'(Forward) ve 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5' (Reverse) primerleri ve uygun PCR protokolü kullanılarak çoğaltılmıştır (Çıplak vd. 2015). Çoğaltılan bu bölgeler, hizmet alımı yoluyla AB1 dosyaları (çift yönlü yani 5'-3' ve 3'-5' yönlerinde okutulan ham DNA sekansları) elde edilmiştir. Bu AB1 dosyaları Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde bulunan Moleküler Evrim ve Biyocoğrafya Laboratuvarı (MEVBİL) veri tabanına depo edilmiştir. MEVBİL veri tabanında depo edilen ve tez kapsamında kullanılan verilere ilişkin tür, lokalite, enlem, boylam, yükselti ve örnek sayısı gibi örneklem detayları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Örneklem *Anterastes* cinsinin Anadolu ve Balkanlar'dan örneklenmiş 12 türünü içermektedir. Bununla birlikte, 'cf' eki ile belirtilmiş örnekler bu çalışma içerisinde tür statüsünde değerlendirilip kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 15 türe ait 27 popülasyondan toplam 142 birey kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında Çizelge 3.1.'de belirtilen örneklerin AB1 ham dosyaları kullanılmıştır.

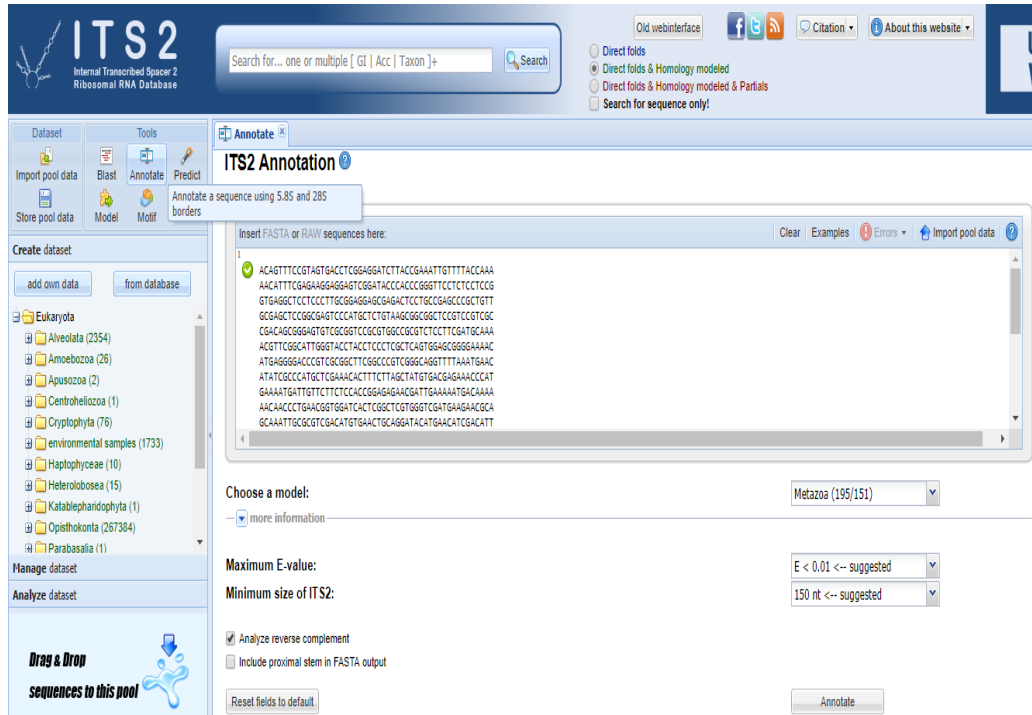
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan örneklere ilişkin detaylar.

Tür	Lokalite / Populasyon	Enlem	Boylam	Yükselti	N, ITS2
<i>A. disparalatus</i>	Bolu, Kartalkaya Dağı	40°35'47.0"K	31°46'59.3"D	2001m	5
<i>A. antecessor</i>	Antalya, Akdağ	36°34'56.4"K	29°34'49.9"D	2247m	7
<i>A. davrazensis</i>	Isparta, Davraz Dağı	37°46'18.7"K	30°44'34.2"D	1950m	2
<i>A. uludaghensis</i>	Bursa, Uludağ	40°07'18.2"K	29°08'57.0"D	1903m	1
<i>A. turcicus</i>	Antalya, Tahtalıdağ	26°32'12.4"K	30°26'21.7"D	1850m	4
<i>A. niger</i>	Tokat, Çamlıbel geçidi	39°57'48.6"K	36°30'27.1"D	1698m	3
<i>A. niger</i>	Sivas, Köseadağ	40°09'39.3"K	37°51'02.5"D	1809m	7
<i>A. babadaghi</i>	Denizli, Babadağ	37°47'45.8"K	28°46'03.7"D	1450m	3
<i>A. babadaghi</i>	Antalya, Söğüt	37°00'523"K	29° 56'505"	1415m	5
<i>A. babadaghi</i>	Antalya, Beğiş	36°56'10.6"K	30°05'38.2"D	1309m	10
<i>A. babadaghi</i>	Antalya, Ereentepe	36°44'22.1"K	29°38'27.4"D	1982m	3
<i>A. cf. ucari</i>	Konya, Kızkayası	38°05'19.7"K	32°16'56.0"D	1644m	4
<i>A. ucari</i>	Isparta, Davraz	37°46'18.5"K	30°44'34.9"D	1630m	4
<i>A. ucari</i>	Antalya, İmecik yayla	36°50'16.3"K	30°18'43.2"D	1790-2140m	15
<i>A. ucari</i>	Antalya, Çamkuyusu	36°36'11.0"K	29°37'49.4"D	2177m	8
<i>A. serbicus</i>	Bulgaristan - Stara Dağı, Osogovska Dağı, Rila Dağı	41°57'56.4"K	23°20'35.3"D	2100 - 2200m	4
<i>A. cf. serbicus</i>	Giresun, Şebinkarahisar Dağı	40°27'46.2"K	38°42'48.3"D	2294m	3
<i>A. cf. serbicus</i>	Sivas, Köseadağ	40°09'29.7"K	37°51'02.6"D	1802m	12
<i>A. cf. serbicus</i>	Çankırı, Çerkeş, Işık Dağı	40°41'27.8"K	32°44'06.4"D	1595m	3
<i>A. burri</i>	Bursa, Uludağ	40°07'19.2"K	29°08'57.3"D	1734m	5
<i>A. cf. burri</i>	Uşak, Murat Dağı	38°56'54.7"K	29°37'29.4"D	1785m	8
<i>A. tolunayi</i>	İzmir, Bozdağ	38°21'15.1"K	28°06'14.8"D	1478m	12
<i>A. antitauricus</i>	Bolu, Kartalkaya Dağı	40°35'47.4"K	31°46'52.6"D	2001m	1
<i>A. antitauricus</i>	Konya, Seydişehir	41°03'24.0"K	33°43'05.7"D	1551m	4
<i>A. antitauricus</i>	Afyon, Sandıklı-Şuhut	38°28'08.9"K	30°22'39.1"D	1802m	13
<i>A. antitauricus</i>	Karaman, Tavşanlı	37°01'30.7"K	33°16'45.4"D	1386m	1

3.2. Verilerin Analize Hazırlanması

Örneklerden elde edilen iki yönlü (forward ve reverse) ITS ham sekanslarının (ABI dosyaları) ikili hizalamaları (alignment), SEQUENCER 4.0.1 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, MI, USA) programı ile hatalı yapılan okumalar düzeltilerek yapılmıştır. Tüm örneklerin ikili hizalamaları yapıldıktan sonra konsensüs diziler elde edilmiştir. Elde edilen bu diziler Text (.txt) ve Bioedit v.5.0.9 (Hall 1999) programı kullanılarak fasta (.fas) formatında kayıt edilmiştir.

Her bir birey için elde edilen ve ITS1 + 5.8S + ITS2 bölgelerini kapsayan ITS dizilerinden, yalnızca ITS2 bölgesinin elde edilmesi amacıyla **Saklı Markov Modeli** (Hidden Markov Model) temelli (HMM-based) analizleri uygulayan **The ITS2 Database**– (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) (Ankenbrand vd. 2015) veri tabanı kullanılmıştır. ITS2 gen sınırlarının belirlenmesi için öncelikli olarak **Annotate** simgesine tıklanarak açılan sayfaya .txt halinde kayıt edilmiş olan konsensüs dizi kopyalanıp yapıştırılmıştır. Ardından **‘Choose a model: Metazoa (195/151)’**, **‘Maximum E-value: E < 0.01 <-- suggested’**, **‘Minimum size of ITS2: 150 nt <-- suggested’** parametreleri seçilerek verinin annotasyonu tekrar yapılmıştır. Sonuç alınmadığı durumlarda, yani dizinin ters yönlü olduğu durumlarda, **analyze reverse complement** kutucuğu seçilerek veri annotasyonu tekrarlanmıştır (Şekil 3.1.) .



Şekil 3.1.The ITS2 Database – Annotation web sayfası ekran görüntüsü.

Annotasyon işlemi sonucunda yalancı gen (pseudogene) kontrolü için, analize katılacak her bir bireye ait sırasıyla 5.8S’in 25 bazlık son kısmı, ITS2 bölgesi ve 28S’in

25 bazlık ilk kısmı .txt formatında kayıt edilmiştir. Elde edilen ITS2 .txt dosyaları Bioedit v.5.0.9 (Hall 1999) programı kullanılarak fasta (.fas) formatında kayıt edilmiştir.

Fasta formatında kayıt edilen ITS2 dizileri, MEGA 4.0 (Tamura vd. 2007) programı yardımı ile çoklu olarak hizalanmıştır ve tanımlayıcı bilgiler (indel varlığı/yokluğu, bulundurduğu baz sayısı ve yerleşimi; varyasyon oranı) edinilmiştir. Her bir türe ait populasyon içi haplotip analizi için, fasta uzantılı olan ITS2 dizileri DnaSP v.6 (Librado ve Rozas 2009) programı ile açılmış ve **Generate** sekmesinden **Haplotype Data File** tıklanarak ve **Invariable Sites: Included**, **'Sites with gaps/missing: Considered'** 'Generate: NEXUS Haplotype Data File' seçenekleri işaretlenerek haplotip analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çıktılar text (.txt) formatında kayıt edilmiştir.

3.3. Olası ITS2 Sekonder Yapılarının Üretilmesi

Olası ITS2 sekonder yapı eldesi için, 'The mfold Web Server'-
<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold> (Zuker ve Jacobson 1998) web sayfası kullanılmıştır. Mfold sitesinde sırasıyla Applications -> RNA Folding Form (version 2.3 energies) seçilerek buraya her bir haplotipe ait ITS2 dizisi isimlendirilerek yüklenmiştir. Folding Temperature yani katlanma sıcaklığı organizmanın biyolojisi gözetilerek 25 °C olarak seçilmiştir. Katlanma işlemi için gerekli diğer parametreler ise 'Default' halde bırakılmış ve Fold Rna sekmesine tıklanmıştır. Hesaplanan olası sekonder yapılar View Individual Structures kısmında incelenmiş ve ΔG 'si en küçük değerde olan yani en kararlı sekonder yapılar seçilmiştir. Üretilen bu yapılar pdf ve Vienna formatında kaydedilmiştir.

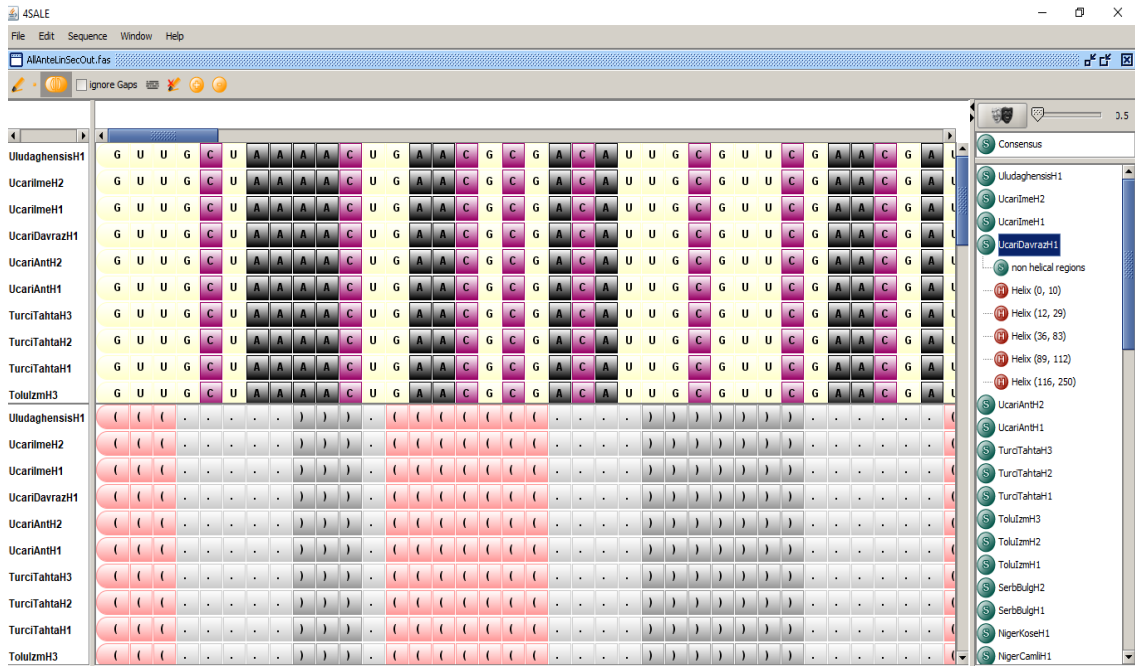
Olası ITS2 sekonder yapıları üretilirken, her bir haplotip için yalancı gen (pseudogene) kontrolleri yapılmıştır. İlk olarak, fasta formatına çevrilmiş olan her bir haplotipe ait ITS2 dosyaları Geneious 11.0.4 (Kearse vd. 2012) programına yüklenmiş ve AT / GC oranları belirlenmiştir. İkinci bir kontrol yöntemi olarak ise her bir haplotip için, 5.8S ve 28S rDNA'ya ait 25'er nükleotit, proximal stemi korumak amacıyla daha önceden elde edilmiş olan ITS2 primer dizilerinin uç ve son kısmına eklenmiştir. Ardından yukarıda anlatılan sekonder yapı eldesi yöntemi ile bu dizilere ait sekonder yapılar üretilmiştir ve 5.8S ve 28S'e ait 25'er nükleotitin birbirleri ile eşleşme durumu kontrol edilmiştir.

3.4. ITS2 Sekonder Yapısı Üzerinden Hizalama ve Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için kullanılacak olan dış grubun (outgroup) seçimi için ikili uzaklık (pairwise distance) analizi yapılmıştır. *Anterastes* cinsine ait fasta formatında kaydedilmiş olan tüm primer dizilere dış grup olarak seçilmesi düşünülen diziler eklenmiştir. MEGA 4.0 (Tamura vd. 2007) programında Data sekmesinden Phylogenetic Analyses seçeneği seçilmiş ve analizde kullanılacak olan filogenetik analiz dosyası oluşturulmuştur. Ardından Distance -> Compute Pairwise Distances...

seçeneği tıklanarak her bir haplotipin birbirleri ve dış grup ile ikili uzaklıkları belirlenmiş ve uygun uzaklıktaki tür filogenetik analizde dış grup olarak kullanılmak üzere seçilmiştir.

Sekonder yapı üretilmesi sırasında elde edilen Vienna formatındaki ITS2 primer ve sekonder yapıları MEGA 4.0 (Tamura vd. 2007) kullanılarak tek bir fasta dosyası haline getirilmiştir. 12 x 12 matris (Wolf vd. 2014) kullanan 4SALE 1.7. (Seibel vd. 2006, 2008) ve eklentili olarak çalışan local ClustalW (Larkin vd. 2007) programı üzerinde bu dosya açılarak, birlikte hizalanmıştır (Şekil 3.2.). Hizalanan bu veri one-letter-encoded formatında kayıt edilmiştir.



Şekil 3.2. Primer diziler ve sekonder yapılarının 4SALE programı üzerindeki ekran görüntüsü.

One-letter-encoded formatında kayıt edilen hizalı ITS2 primer ve sekonder dizilerinden maksimum olasılık (Maximum Likelihood _ ML) ağacı oluşturmak için, R 3.4.3 (R Development Core Team, 2008) ile eklentili çalışan bir arayüz olan RStudio (RStudio Team 2015) ve phangorn (Schliep 2011) paketi kullanılmıştır. Maximum Likelihood ağacı eldesi için gerekli olan komutlar, 4SALE web sayfasından (<http://4sale.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) alınmış ve kullanılan R komutları aşağıda verilmiştir.

```
install.packages("phangorn")

library(phangorn)

file = "c:/Users/onuru/Desktop/AlignAnteLinSecOC"

dat = read.phyDat(file,format="fasta", type="AA")

dm = dist.ml(dat)

tree = NJ(dm)

fitStart = pml(tree, dat, k=4, inv=.2)

fit = optim.pml (fitStart, TRUE, TRUE, TRUE, TRUE, TRUE,TRUE)

root_name = "BoluaSSV"

plot(ladderize(root(fit$tree, match(root_name,fit$tree$tip.label))),

     type="phylogram", show.node.label=T,underscore=T,cex=0.8,no.margin=T)

bs = bootstrap.pml(fit, bs=100, optNni=TRUE)

treeBS = plotBS(fit$tree, bs, type="phylogram", bs.col="red", bs.adj=NULL)

write.tree(fit$tree,file="ML_GTR_I_G.tre")

write.tree(treeBS,file="BS_ML_GTR_I_G.tre")
```

R 3.4.3 (R Development Core Team 2008) üzerinden elde edilen ağaçlar, filogenetik ağaç düzenlemelerine olanak veren FigTree v 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) programı ile Reroot ve Trees sekmesi içerisinde bulunan **ordering: increasing** seçeneği seçilerek düzenlenmiştir.

Elde edilen .tre uzantılı ML ağacı MEGA 4.0 kullanılarak önce Newick formatına ardından da DNAsp programı (Rozas vd. 2003) kullanılarak nexus formatına çevrilmiştir. Nexus uzantılı ML ağacı ve daha önceden elde edilmiş olan (dış grup ve haplotiplere ait ITS2 dizileri içeren) fasta uzantılı veri dosyası nexus formatına dönüştürülerek, TBD (CBC), yarı- TBD (hemi – CBC) ve TBD olmayan baz değişimlerinin (non – CBCs) belirlenmesi amacıyla PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) programına aktarılmıştır.

PAUP içerisinde “outgroup BoluaSSV;” komutu girilerek dış grup (Bolua SSV) programa tanımlanmıştır. Ardından “pset opt=DELTRAN;” komutu girilerek filogenetik analiz için optimizasyon modeli belirlenmiştir. ‘File’ kısmından ‘Log Output to File’ seçilerek sonuçların atanacağı klasör ve isim belirlenmiştir. Son olarak sonuç çıktısında görülmek istenen ‘list of apomorphies’, ‘phylogram’ ve ‘label internal nodes’ özelliklerini elde etmek amacıyla “describetrees 1/ plot=phylogram root=outgroup labelnode=yes aplist=yes;” komutları girilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen logfile dosyası TBD’lerin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Lineer ve sekonder yapı ile birlikte filogenetik analiz sonrasında elde edilen ağaçların bilgi vericiliğinin kıyaslanması amacıyla, yalnızca lineer ITS2 içeren veri matrisi kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. **The ITS2 Database** – (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) (Ankenbrand vd. 2015) veri tabanı üzerinden kesilen .txt formatındaki primer ITS2 verileri yukarıda da bahsedildiği gibi Bioedit v.5.0.9 (Hall 1999) programı kullanılarak fasta (.fas) formatında kayıt edilmiştir. Ardından, MEGA 4.0 (Tamura vd. 2007) programı ile çoklu olarak hizalanarak her bir haplotip ve dış gruba ait primer ITS2 verilerini içeren veri matrisi oluşturulmuştur. Fasta (.fst) formatında kayıt edilmiş olan veri matrisi, R 3.4.3 (R Development Core Team, 2008) ile eklentili çalışan bir ara yüz olan RStudio (RStudio Team 2015) ve phangorn (Schliep 2011) paketi kullanılarak maksimum olasılık ağacı (Maximum Likelihood _ ML) oluşturulmuştur. Bu filogenetik ağaç eldesi sırasında gerekli R komutları yukarıda detaylıca verilmiştir.

3.5. TBD’lerin Belirlenmesi ve Tür Sınırlarının Çizilmesi

PAUP programı ile elde edilen logfile dosyası üzerinden TBD kontrolü yapılmıştır. Bu dosya içerisinde analiz öncesinde girilen komutlar sayesinde oluşturulmuş, *Anterastes* cinsine ait apomorfi listesi ve üzerine ‘nod’ atanmış ML ağacı bulunmaktadır. Bu apomorfi listesi içerisinde her bir nod ve bu nodlarda gerçekleşen baz değişimleri verilmiştir. 4SALE üzerinden ClustalW ile hizalanmış primer ve

sekonder yapı dizilerini içeren .fas uzantılı fasta dosyası açılmış ve her bir baz değişimleri kontrol edilmiştir. Halkasal katlanma bölgelerine denk gelen karşılıklı (ikili) baz değişimleri TBD olarak tanımlanmıştır. Katlanma bölgelerinde zincirin tek bir tarafında gerçekleşen değişimler ise hemi - TBD olarak adlandırılmıştır. Bir haplotip için katlanma bölgesinde gerçekleşen değişim eğer atasal/diğer haplotiplerde katlanma bölgesinde değil ise veya böyle bir değişim bulunmuyorsa bu tür değişimler non –TBD olarak belirtilmiştir. Diğer apomorfik değişimler yani katlanma bölgeleri üzerinde gerçekleşmeyen değişimler tür sınırlarının çizilmesi bağlamında değerlendirmeye alınmamıştır. 4SALE programı üzerinden hizalanmış primer ve sekonder yapı dizileri üzerinden manuel olarak, ITS2'nin cins ve cinsler arası düzeyde korunumuna bakılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *Anterastes* ITS2 Dizileri için Tanımlayıcı Özellikler

İzole edilen ITS bölgesi ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinden oluşmaktadır. Bu bölgeler, tür içi ve türler arası, uzunluk ve AT / GC oranları bakımından farklılıklar göstermektedir. Her bir türün popülasyonları içerisinde yapılan haplotip analizi sonrasında *Anterastes* cinsinin 15 türüne ait 27 popülasyonun, insersiyon ve delesyonlar dahil olmak üzere toplam 53 farklı haplotipe sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

En fazla haplotip sayısı, 7 farklı haplotipe sahip *Anterastes antecessor* türünün Antalya – Akdağ popülasyonu ve yine 7 farklı haplotipe sahip *Anterastes antitauricus* türünün Afyon–Şuhut popülasyonunda bulunmuştur. Toplam 53 haplotip içerisinde, 267 baz uzunluğuyla *Anterastes davrazensis* türünün Isparta – Davraz popülasyonuna ait tek haplotip (DavrazensisH1) en kısa baz uzunluğuna sahip haplotip olarak bulunmuştur. *Anterastes serbicus* türünün Bulgaristan popülasyonlarına ait (Rila Dağı, Osogovska Dağı ve Stara Dağı) haplotipleri (SerbBulgH1 ve SerbBulgH2) 278 baz uzunluğuyla *Anterastes* cinsi içerisinde en uzun baz sayısına sahip haplotipler olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Elli üç haplotip içeren veri dosyası içerisinde karşılaştırmalar yapıldığında, toplam 289 pozisyon içerisinde 238 pozisyonun tüm haplotiplerde sabit, 51 pozisyonun varyasyonel olduğu ve 31 insersiyon – delesyon ve 20 nokta mutasyon içerdiği belirlenmiştir. Bu varyasyonel pozisyonların konumu dikkate alındığında, varyasyonların büyük çoğunluğunun lineer ITS2 dizisinin, 3' ETS bölgesine yakın olan son kısmında (240 – 289. pozisyon) yer aldığı yapılan analizler sonucu gözlenmiştir. *Anterastes* cinsinin ITS2 lineer dizisinin %82,35 oranında korunmuş olduğu belirlenmiştir.

ITS2 primer dizilerinden olası sekonder yapılar elde edilirken, ΔG değerinin (Gibbs Serbest Enerji Birimi) en küçük olduğu sekonder yapı seçilerek en kararlı yapılar elde edilmiştir. Elli üç haplotipin her birine ait sekonder yapı ΔG değerlikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Belirlenen ITS2 haplotipleri, ait oldukları tür ve populasyonlar, baz uzunlukları ve sekonder yapılar için ΔG değerleri.

Tür	Populasyon	Haplotipler	ITS2 Uzunlukları	Sekonder yapı ΔG değerleri
<i>Anterastes antecessor</i>	Antalya - Akdağ	AnteAkdagH1	274bp	-118,21
		AnteAkdagH2	276bp	-121,75
		AnteAkdagH3	275bp	-118,21
		AnteAkdagH4	277bp	-121,47
		AnteAkdagH5	276bp	-121,75
		AnteAkdagH6	274bp	-118,21
		AnteAkdagH7	268bp	-118,49
<i>Anterastes antitauricus</i>	Afyon - Şuhut	AntiSuhutH1	273bp	-118,49
		AntiSuhutH2	274bp	-118,49
		AntiSuhutH3	274bp	-118,39
		AntiSuhutH4	276bp	-119,46
		AntiSuhutH5	276bp	-117,54
		AntiSuhutH6	273bp	-117,54
		AntiSuhutH7	272bp	-118,49
	Bolu - Kartalkaya	AntiKartH1	274bp	-117,82
	Karaman - Tavşanlı	AntiKaraH1	276bp	-117,54
	Konya - Seydişehir	AntiKonH1	276bp	-117,54
AntiKonH2		275bp	-117,54	
<i>Anterastes babadaghi</i>	Antalya - Erentepe	BabaErenH1	271bp	-117,81
	Antalya - Beğiş	BabaBegisH1	269bp	-117,81
		BabaBegisH2	271bp	-119,29
		BabaBegisH3	270bp	-117,53
		BabaBegisH4	273bp	-116,15
Denizli - Babadağ	BabaBabaH1	270bp	-117,53	
<i>Anterastes burri</i>	Bursa - Uludağ	BurriBursaH1	273bp	-118,21
<i>Anterastes cf. burri</i>	Uşak - Muratdağı	CfBurriMdH1	274bp	-118,21
		CfBurriMdH2	275bp	-117,93
		CfBurriMdH3	274bp	-118,37
		CfBurriMdH4	276bp	-117,54
		CfBurriMdH5	273bp	-118,21
<i>Anterastes cf. serbicus</i>	Cankiri- Cerkes	CfSerbCerkesH1	274bp	-117,54
		CfSerbCerkesH2	274bp	-117,51
	Giresun - Şebinkarahisar	CfSerbGiresH1	272bp	-118,21
Sivas-Kosedag	CfSerbSivH1	272bp	-118,21	
<i>Anterastes cf. ucari</i>	Konya-Kızılkaya	CfUcariKonH1	269bp	-117,81
<i>Anterastes davrazensis</i>	Isparta - Davraz	DavrazensisH1	267bp	-120,24
<i>Anterastes disparalatus</i>	Bolu - Kartalkaya	DispKartH1	270bp	-116,71
<i>Anterastes niger</i>	Sivas - Kösedag	NigerKoseH1	268bp	-118,49
	Tokat - Çamlıbel	NigerCamliH1	268bp	-118,49
<i>Anterastes serbicus</i>	Bulgaristan, Rila Dağı, Osogovska Dağı, Stara Dağı	SerbBulgH1	278bp	-119,45
		SerbBulgH2	278bp	-118,18
<i>Anterastes tolunayi</i>	İzmir - Ödemiş, Bozdağ	ToluIzmH1	273bp	-118,21
		ToluIzmH2	273bp	-115,3
		ToluIzmH3	274bp	-115,02
<i>Anterastes turcicus</i>	Antalya - Tahtalıdağ	TurciTahtaH1	270bp	-117,53
		TurciTahtaH2	270bp	-118,11
		TurciTahtaH3	269bp	-117,81
<i>Anterastes ucari</i>	Antalya - Çamkuyusu	UcariAntH1	269bp	-117,81
		UcariAntH2	270bp	-117,53
	Antalya - İmecik Yayla	UcaImeH1	270bp	-117,53
		UcaImeH2	269bp	-117,81
	Isparta - Davraz	UcariDavrazH1	270bp	-117,53
<i>Anterastes uludaghensis</i>	Bursa - Uludağ	UludaghensisH1	268bp	-120,24

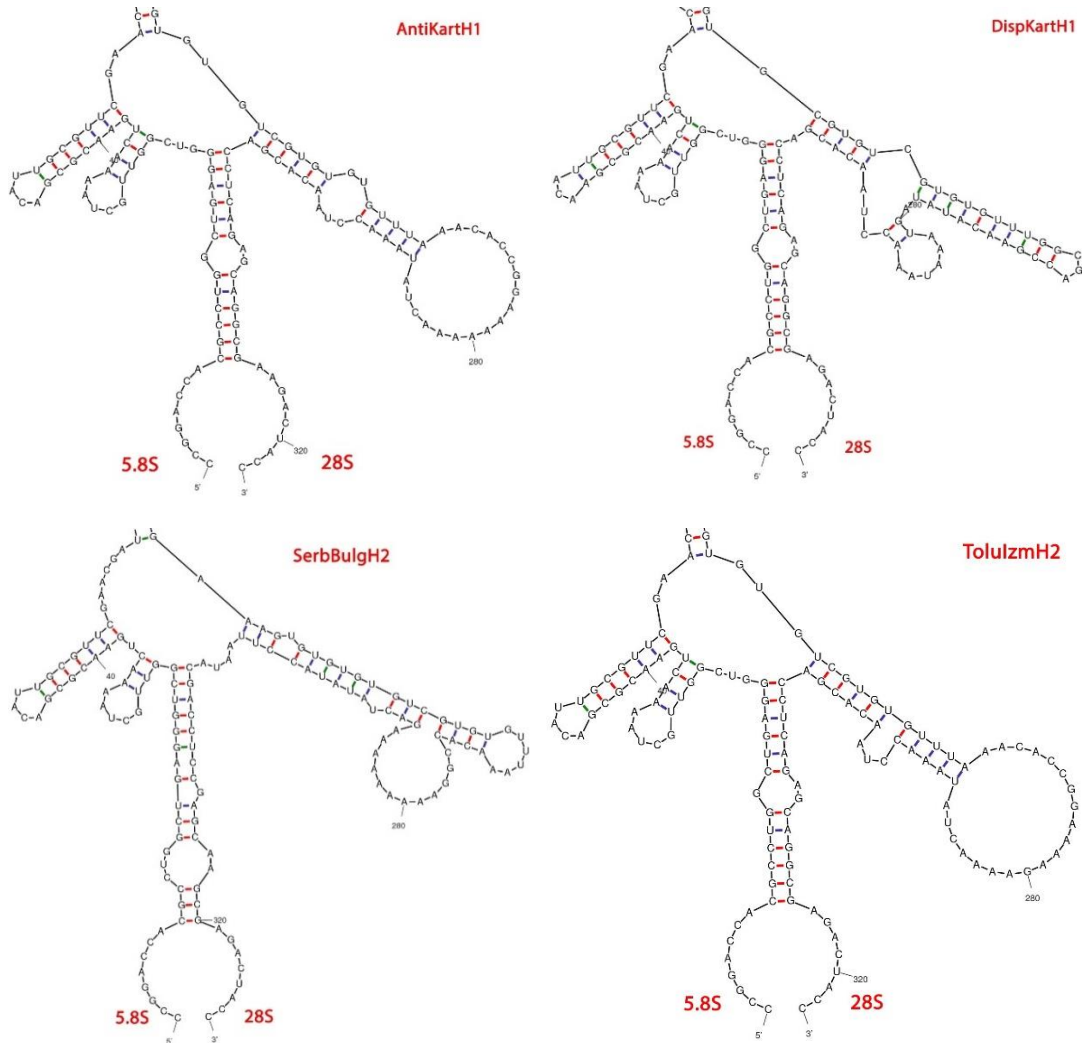
4.1.1. Yalancı gen (pseudogene) kontrolü

Çoğaltılan ITS bölgesinin yalancı gen (pseudogenes) olup olmadığının kontrolü için ilk olarak, her bir haplotipe ait ITS2 primer dizileri için GC oranları ölçülmüştür. *Anterastes serbicus* türünün Bulgaristan popülasyonuna ait haplotipleri SerbBulgH2 ve SerbBulgH1 sırası ile %59,4 ve %59,7 ile en düşük GC oranına sahiptir. Buna karşın, %62 değeri ile *Anterastes antecessor* türünün Antalya – Akdağ popülasyonuna ait haplotipi (AnteAkdagH1) en yüksek GC oranına sahiptir (Çizelge 4.2). *Anterastes* cinsi için ortalama GC oranı ise %60,58 olarak belirlenmiştir. GC oranı verileri herhangi bir haplotip için yalancı gen işareti vermemiştir.

Çizelge 4.2. 5.8S + 28S eşleşmesi ve GC oranları.

Tür	Populasyon	Haplotip	5.8S + 28S eşleşmesi	GC Oranı
<i>A. antitauricus</i>	Konya - Seydişehir	AntiKonH1	Var	60,3
		AntiKonH2	Var	60
	Afyon - Sandıklı, Şuhut	AntiSuhutH1	Var	60,4
		AntiSuhutH2	Var	60,2
		AntiSuhutH3	Var	60,2
		AntiSuhutH4	Var	60,5
		AntiSuhutH5	Var	59,8
		AntiSuhutH6	Var	60,8
		AntiSuhutH7	Var	60,7
	Bolu-Kartalkaya	AntiKartH1	Var	60,3
		AntiKaraH1	Var	60,6
<i>A. ucari</i>	Isparta - Davraz Dağı	UcariDavrazH1	Var	60,7
		UcariImeH1	Var	60,7
	Antalya - İmecik Yayla	UcariImeH2	Var	60,6
		UcariAnth1	Var	60,6
		UcariAnth2	Var	60,7
<i>A. cf. ucari</i>	Konya - Kızkaya	CfUcariKonH1	Var	60,6
<i>A. antecessor</i>	Antalya - Akdağ	AnteAkdagH1	Var	62
		AnteAkdagH2	Var	61,2
		AnteAkdagH3	Var	61,5
		AnteAkdagH4	Var	61,4
		AnteAkdagH5	Var	61,2
		AnteAkdagH6	Var	61,7
		AnteAkdagH7	Var	60,8
<i>A. cf. burri</i>	Uşak- Muratdağı	CfBurriMdH1	Var	59,9
		CfBurriMdH2	Var	60
		CfBurriMdH3	Var	60,6
		CfBurriMdH4	Var	59,8
		CfBurriMdH5	Var	60,1
<i>A. serbicus</i>	Bulgaristan - Rila Dağı, Osogovska Dağı, Stara Dağı	SerbBulgH1	Var	59,7
		SerbBulgH2	Var	59,4
<i>A. turcicus</i>	Antalya - Tahtalıdağ	TurciTahtaH1	Var	60,7
		TurciTahtaH2	Var	60,7
		TurciTahtaH3	Var	60,6
<i>A. babadaghi</i>	Antalya - Beğiş	BabaBegisH1	Var	60,6
		BabaBegisH2	Var	60,9
		BabaBegisH3	Var	60,7
		BabaBegisH4	Var	61,2
	Denizli - Babadağ	BabaBabaH1	Var	60,7
		BabaErenH1	Var	60,6
<i>A. burri</i>	Bursa - Uludağ	BurriBursH1	Var	60,1
<i>A. disparalatus</i>	Bolu - Kartalkaya	DispKartH1	Var	61,1
<i>A. tolunayi</i>	İzmir - Bozdağ	ToluIzmH1	Var	60,4
		ToluIzmH2	Var	60,1
		ToluIzmH3	Var	60,2
<i>A. cf. serbicus</i>	Giresun - Şebinkarahisar Çankırı - Çerkeş, Işık Dağı	CfSerbGiresH1	Var	61
		CfSerbCerkesH1	Var	60,6
		CfSerbCerkesH2	Var	60,2
	Sivas - Kösedag	CfSerbSivH1	Var	61
		NigerKoseH1	Var	60,8
<i>A. niger</i>	Sivas - Kösedag	NigerKoseH1	Var	60,8
	Tokat - Çamlıbel Geçidi	NigerCamliH1	Var	60,1
<i>A. uludaghensis</i>	Bursa - Uludağ	UludaghensisH1	Var	60,8
<i>A. davrazensis</i>	Isparta - Davraz Dağı	DavrazensisH1	Var	61

İkinci bir kontrol yöntemi olarak, sekonder yapının uç kısımlarını (proximal stem) korumak amacıyla, 5.8S ve 28S rDNA'dan elde edilmiş olan 25'er nükleotit, her bir haplotipe ait primer ITS2 dizisine eklenmiş ve bu nükleotitlerin karşılıklı olarak eşleşme durumuna bakılmıştır. Yapılan bu kontrol sonucunda, toplam 53 farklı haplotip ve dış gruba ait dizinin her birinde 5.8S ve 28S rDNA'ya ait 25'er bazın eşleştiği görülmüştür. *Anterastes antitauricus* türünün Bolu - Kartalkaya popülasyonunun tek haplotipi (AntiKartH1), *Anterastes disparalatus* türünün Bolu - Kartalkaya popülasyonunun tek haplotipi (DispKartH1), *Anterastes serbicus* türünün Bulgaristan popülasyonunun ikinci haplotipi (SerbBulgH2) ve *Anterastes tolunayi* türünün İzmir - Bozdağ popülasyonunun ikinci haplotipinde (TolulzmH2) 5.8S ve 28S eşleşme durumları örnek olarak verilmiştir (Şekil 4.1.).



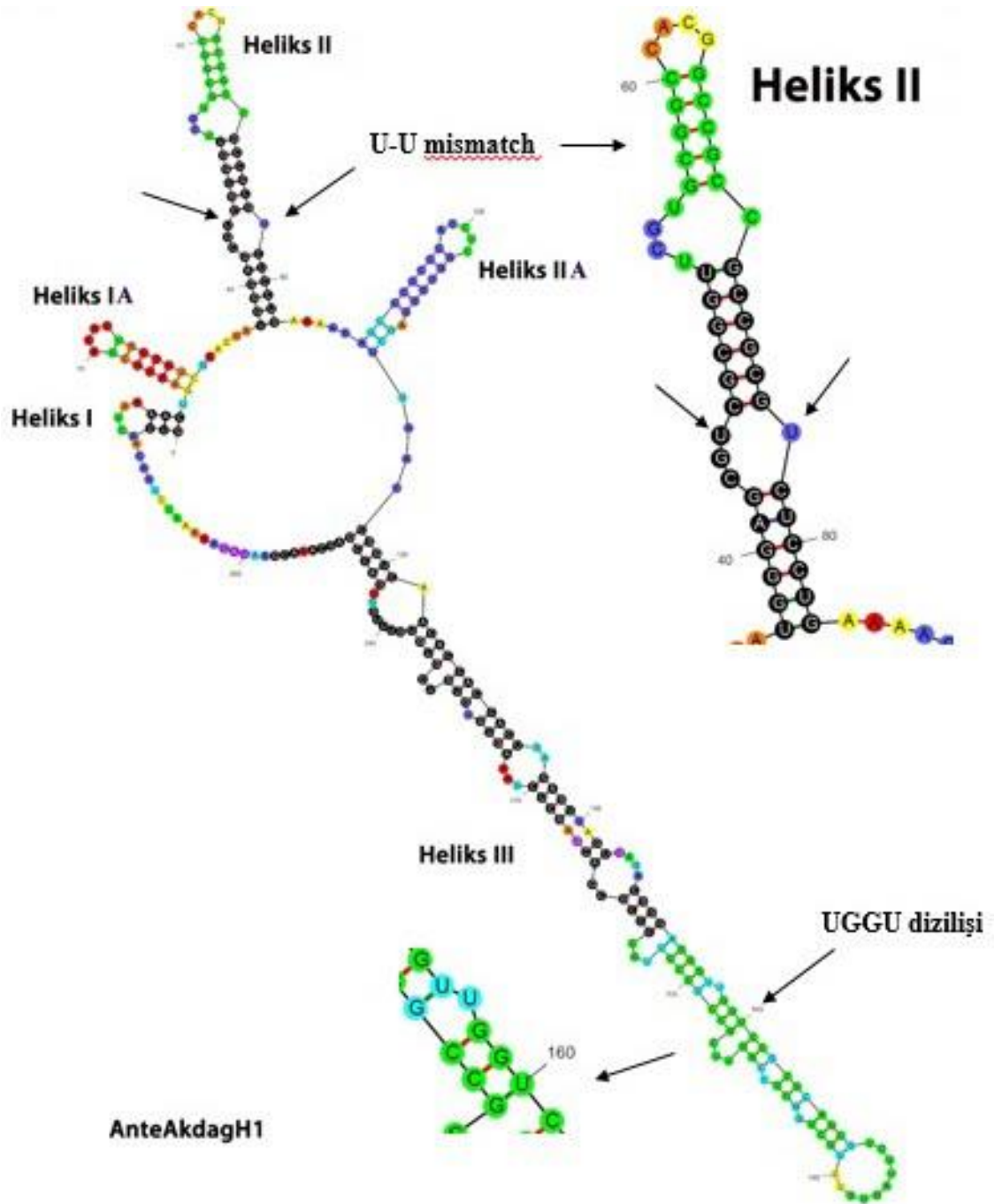
Şekil 4.1. 5.8S ve 28S bölgeleri eşleşme durumu örnekleri

4.2. ITS2 Sekonder Yapısı

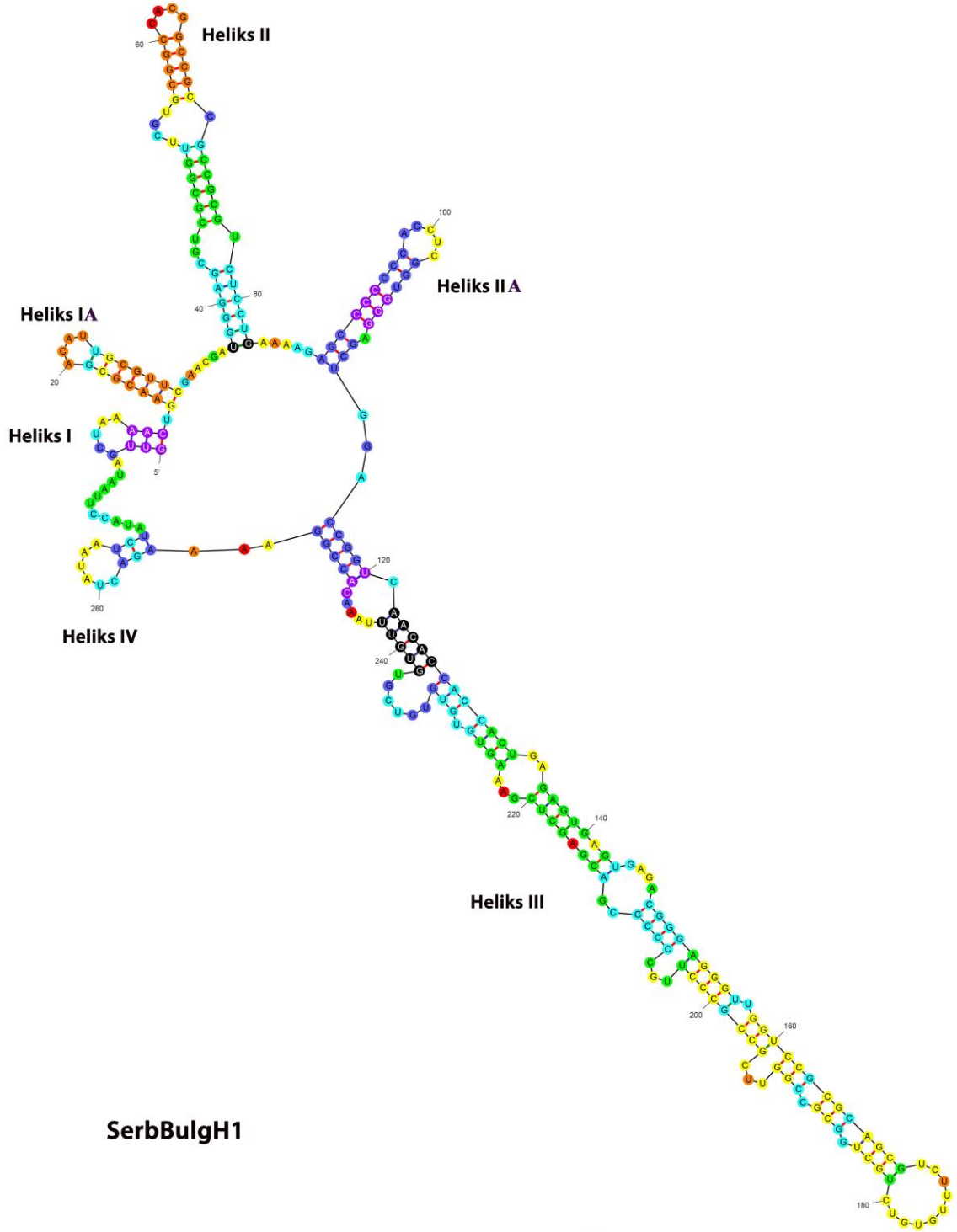
Mfold programı 53 haplotipin tümü için diğer ökaryotik gruplar için tanımlanan temel ITS2 sekonder yapısına benzer bir yapı vermiştir. Her bir heliks üzerinde bulunan korunumlu motifler (Örn. Heliks II için U-U yanlış eşleşmesi ve Heliks III için UGGU baz dizilişi) ve helikslerin sekonder yapı içerisindeki sıralanışlarına göre heliks adlandırmaları yapılmıştır.

Anterastes cinsinin tüm haplotipleri ökaryotlar için belirlenmiş korunmuş motifleri taşımaktadır. Sekonder yapı içerisinde, Heliks I'in farklı uzunluğa sahip iki heliksten oluştuğu gözlenmiştir ve bu heliksler, Heliks I ve Heliks IA olarak adlandırılmıştır. U-U yanlış eşleşmesi (U-U mismatch) taşıması ile farklılaşan Heliks II'nin, bu yanlış eşleşmeyi taşıyan heliks Heliks II, devamında gelen ve Heliks III arasında bulunan heliks ise Heliks IIA olarak adlandırılmıştır. Heliks II ve Heliks III arasında bulunan katlanma yapmayan tek zincirli baz diziliminin pürin bazlarınca zengindir. *Anterastes* türlerine bakıldığında bu bölgelerin %83,33 oranında pürin bazları içerdikleri tespit edilmiştir. En uzun heliks olma özelliği taşıyan ve 160. baz çevresinde UGGU korunmuş motifine sahip olmasıyla tanımlanan heliks, Heliks III olarak adlandırılmıştır. Buna göre, 53 haplotipe ait sekonder yapıların %87'sinin Helix I, Helix 1A, Helix II, Helix IIA ve Helix III'ten oluştuğu görülmektedir. En yaygın bulunan sekonder yapının ve helikslere ait korunumlu motiflerin gösterilmesi amacıyla, *Anterastes antecessor* türünün birinci haplotipinin (AnteAkdagH1) sekonder yapısı temsilen seçilmiş ve Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Anterastes disparalatus, *Anterastes serbicus* ve dış grup olarak seçilen *Bolua turkiyae* türlerine ait haplotiplerin sekonder yapılarının Helix I, Helix 1A, Helix II, Helix IIA, Helix III ve Heliks IV'ten oluştuğu saptanmıştır. En yaygın olarak bulunan bu ikinci yapısal örüntü, temsilen seçilen *Anterastes serbicus* türünün birinci haplotipi (SerbBulgH1) ile Şekil 4.3.'de verilmiştir.

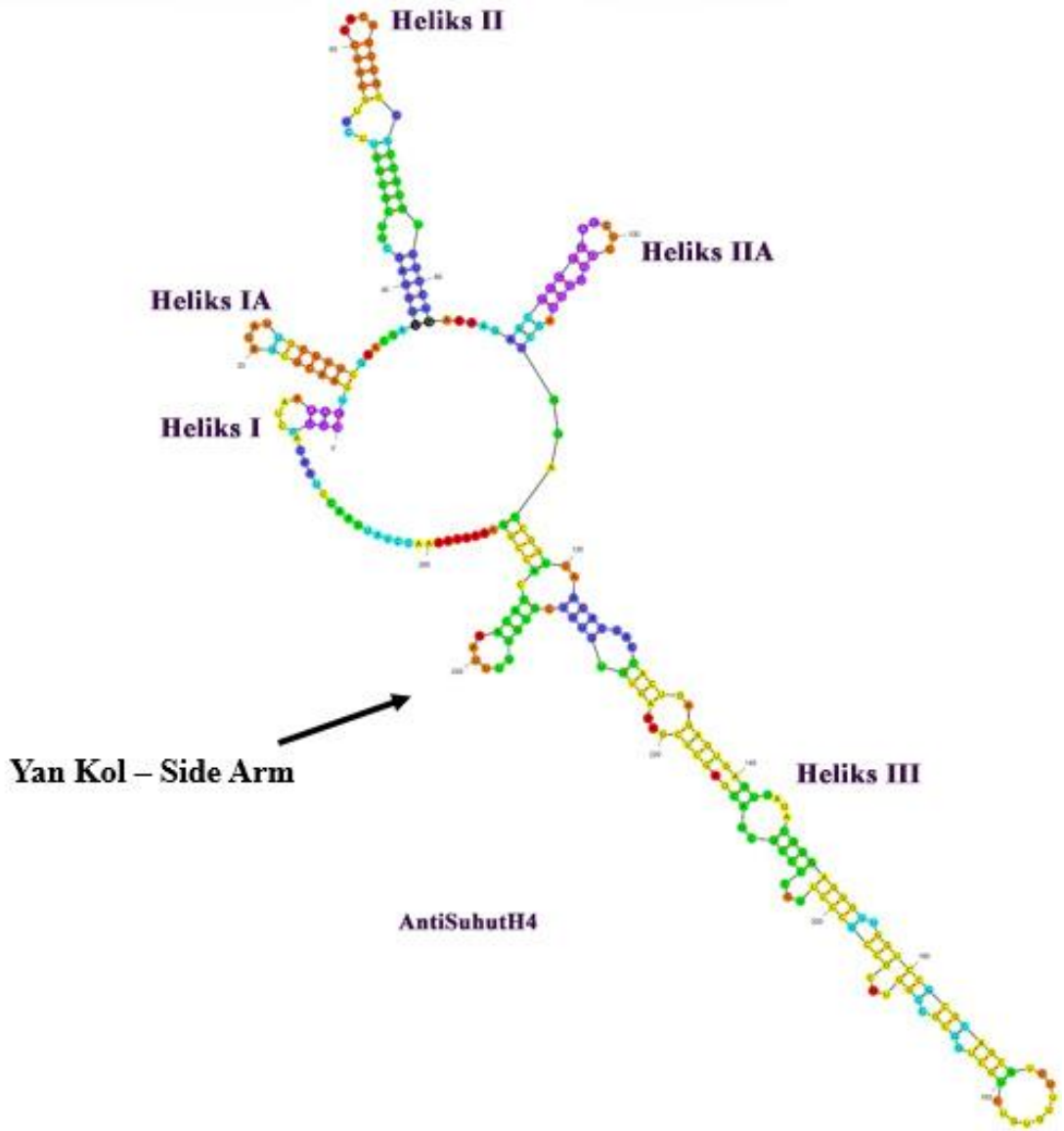


Şekil 4.2. Yaygın sekonder yapı ve korunmuş motifler.



Şekil 4.3. Heliks IV taşıyan sekonder yapının gösterimi.

Anterastes cinsi içerisinde en yaygın olarak görülen üç heliksli ve dört heliksli sekonder yapının yanısıra heliksler içerisinde de farklılıklar tespit edilmiştir. *Anterastes antitauricus* türünün Afyon – Şuhut populasyonunun dördüncü haplotipinin (AntiSuhutH4) sekonder yapısı incelendiğinde Heliks III üzerinde belirginleşmiş bir yan kol (side arm) tespit edilmiştir. *Anterastes* içerisinde yan kol farklılaşması sadece AntiSuhutH4 haplotipinde belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Haplotipler üzerinde tanımlanmış I, IA, II, IIA, III ve IV helikslerinin içerdiği baz uzunlukları Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. *Anterastes antitauricus* türünün AntiSuhutH4 haplotipinde Heliks III üzerinde saptanan yan kolun (side arm) gösterimi.

Çizelge 4.3. Haplotiplere ait sekonder yapıların heliks baz uzunlukları.

Haplotipler	Heliks I	Heliks IA	Heliks II	Heliks IIA	Heliks III	Heliks IV
AnteAkdagH1	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH2	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH3	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH4	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH5	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH6	11	18	47	28	145	YOK
AnteAkdagH7	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH1	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH2	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH3	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH4	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH5	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH6	11	18	47	28	147	YOK
AntiSuhutH7	11	18	47	28	147	YOK
AntiKartH1	11	18	47	28	147	YOK
AntiKaraH1	11	18	47	28	147	YOK
AntiKonH1	11	18	47	28	147	YOK
AntiKonH2	11	18	47	28	147	YOK
BabaErenH1	11	18	47	28	147	YOK
BabaBegisH1	11	18	47	28	147	YOK
BabaBegisH2	11	18	47	28	147	YOK
BabaBegisH3	11	18	47	28	147	YOK
BabaBegisH4	11	18	47	28	147	YOK
BabaBabaH1	11	18	47	28	147	YOK
BurriBursaH1	11	18	47	28	147	YOK
CfBurriMdh1	11	18	47	28	147	YOK
CfBurriMdh2	11	18	47	28	147	YOK
CfBurriMdh3	11	18	47	28	147	YOK
CfBurriMdh4	11	18	47	28	147	YOK
CfBurriMdh5	11	18	47	28	147	YOK
CfSerbCerkesH1	11	18	47	28	147	YOK
CfSerbCerkesH2	11	18	47	28	147	YOK
CfSerbGiresH1	11	18	47	28	147	YOK
CfSerbSivH1	11	18	47	28	147	YOK
CfUcariKonH1	11	18	47	28	147	YOK
DavrazensisH1	11	18	47	28	147	YOK
DispKartH1	11	18	47	28	145	18
NigerKoseH1	11	18	47	28	147	YOK
NigerCamliH1	11	18	47	28	147	YOK
SerbBulgH1	11	18	47	28	147	15
SerbBulgH2	11	18	47	28	147	22
ToluIzmH1	11	18	47	28	147	YOK
ToluIzmH2	11	18	47	28	147	YOK
ToluIzmH3	11	18	47	28	147	YOK
TurciTahtaH1	11	18	47	28	147	YOK
TurciTahtaH2	11	18	47	28	147	YOK
TurciTahtaH3	11	18	47	28	147	YOK
UcariAntH1	11	18	47	28	147	YOK
UcariAntH2	11	18	47	28	147	YOK
UcaImeH1	11	18	47	28	147	YOK
UcaImeH2	11	18	47	28	147	YOK
UcariDavrazH1	11	18	47	28	147	YOK
UludaghensisH1	11	18	47	28	147	YOK
BoluaSSV	11	18	47	28	145	25

Çizelge 4.2. içerisinde karşılaştırmalar yapıldığında, Heliks I, Heliks IA, Heliks II ve Heliks IIA'nin içerdikleri baz sayısının, *Anterastes* cinsinin tüm türlerinde ve dış grup olan *Bolua turkiyae* türünde tamamiyle korunduğu görülmüştür. Heliks I 11, Heliks IA 18, Heliks II 47 ve Heliks IIA 28 baz uzunluğuna sahiptir. Heliks III ise *Anterastes antecessor* türünün Akdağ popülasyonunun tüm haplotipleri, *Anterastes disparalatus* ve dış grup olan *Bolua turkiyae* türlerinde 145, diğer tüm haplotiplerde ise 147 baz uzunluğuna sahiptir. Heliks IV ise sadece yeşil renk ile verilmiş olan *Bolua turkiyae*, *Anterastes disparalatus* ve *Anterastes serbicus* türünün iki haplotipinde (SerbBulgH1, SerbBulgH2) belirlemiştir ve sırası ile 25, 18, 15 ve 22 baz uzunluğuna sahiptir.

4SALE üzerinden Clustal W ile hizalanmış primer ve sekonder yapı dizilerini içeren .fas dosyası açılmış ve cins içerisindeki varyasyonların konumuna bakılmıştır. Hesaplamalar sonucunda *Anterastes* cinsi içerisinde Heliks I, Heliks II, Heliks IIA ve heliks III'te herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir. Heliks IA katlanma bölgesinde (20. pozisyonda) ise *Anterastes disparalatus* türünde tespit edilen bir varyasyonel pozisyon (insersiyon - A) dışında herhangi bir varyasyon bulunmamaktadır.

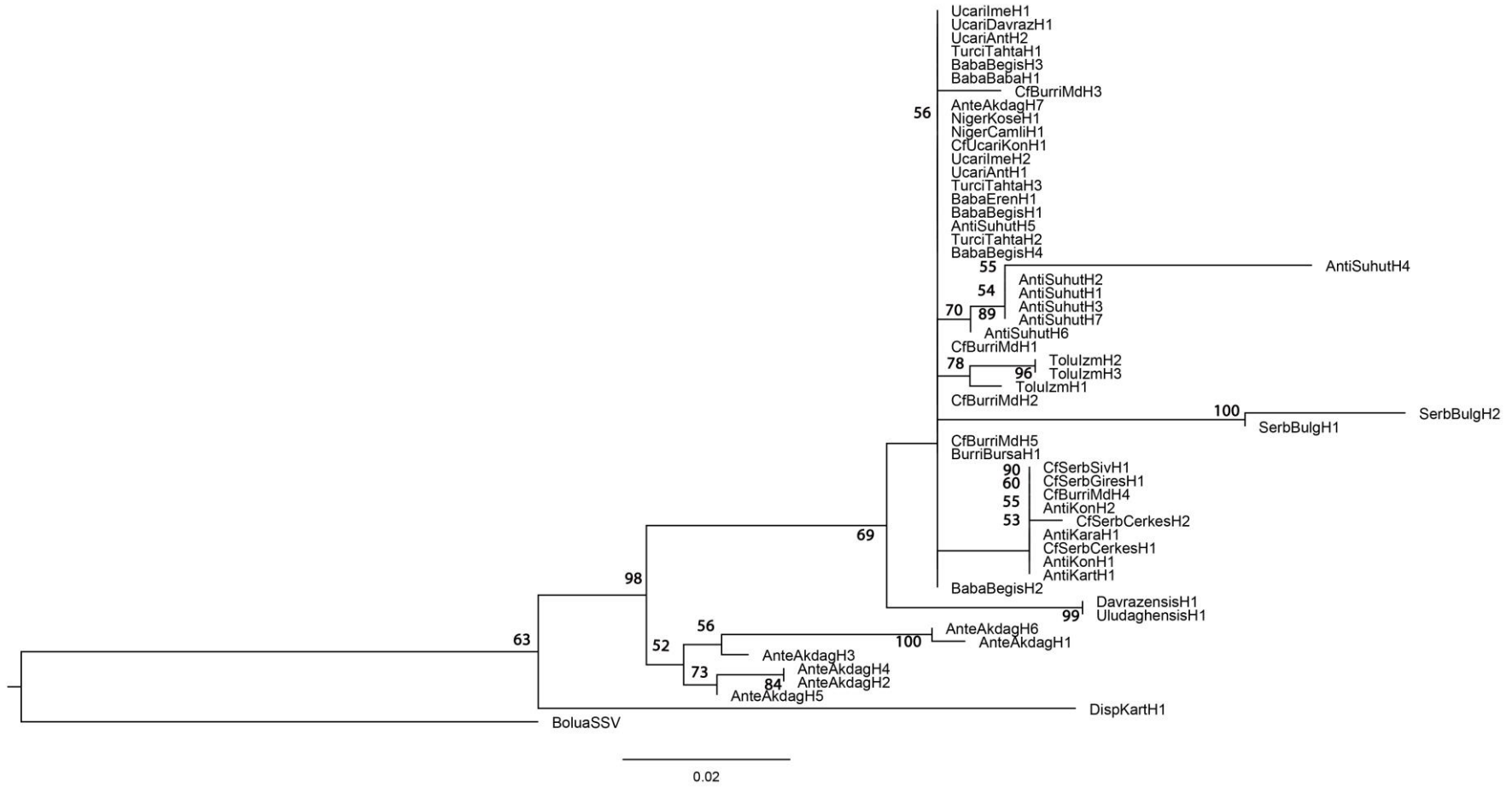
4.3. Filogenetik Analizler

Filogenetik analizlerde kullanılacak olan dış grubun seçilmesi için ikili uzaklık (pairwise distance) analizi yapılarak, *Anterastes* cinsine ait her bir haplotip ve aday dış gruplar arasındaki ikili uzaklık değerlerine bakılmıştır. *Anadolua schwarzi* ve *Bolua turkiyae* türlerine ait birer haplotip dış grup adayı olarak uzaklık testlerine tabi tutulmuştur. Uzaklık testleri *Anadolua schwarzi* için 0.071 – 0.075 ve *Bolua turkiyae* türü için 0.073 – 0.085 minimum ve maksimum uzaklık değerleri vermiştir. Bu karşılaştırmalar sonucunda, *Anterastes* cinsi haplotipleri arası uzaklıktan fazla değerlere sahip ve *Anterastes* cinsine en uygun uzaklıkta olan *Bolua turkiyae* türü filogenetik analizlerde kullanılmak üzere dış grup olarak seçilmiştir.

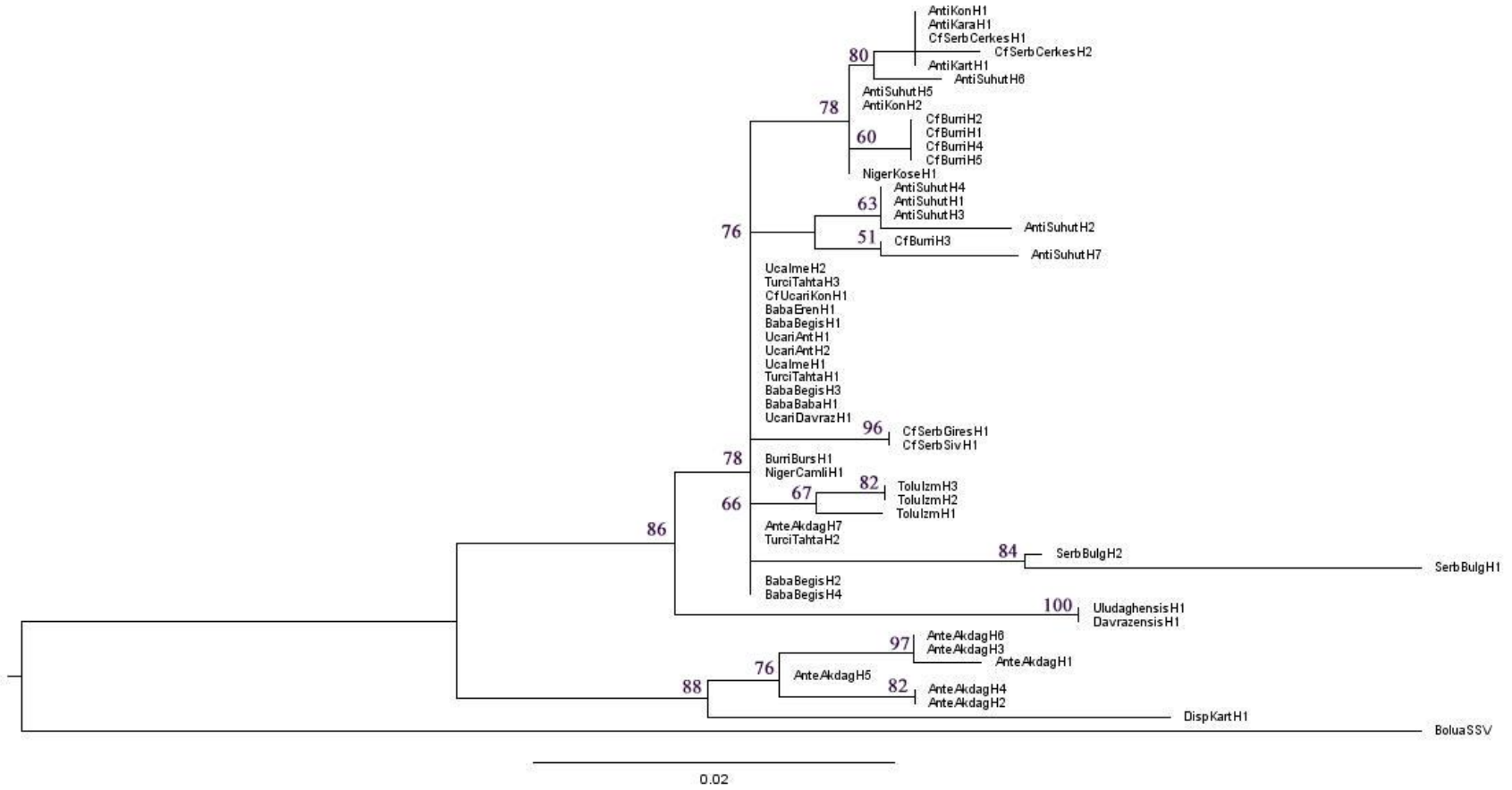
Anterastes cinsinin soyhatları arasındaki ilişkilerin anlaşılması için, her bir haplotipe ait ITS2 primer ve sekonder dizilerini içeren veri dosyaları kullanılmıştır. R 3.4.3 (R Development Core Team, 2008) programı kullanılarak, Maximum Likelihood ve Bootstrap Maximum Likelihood ağaçlarının ürettiği filogenetik Şekil 4.5.'te ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Tüm filogenetik ağaçlar üzerinde %50'nin üzerinde olan bootstrap güvenilirlik değerleri gösterilmektedir. Elde edilen maksimum olasılık ağacında dış grup olan *Bolua turkiyae* (*BoluaSSV*) ilk ve *A. disparalatus* (*DispKartH1*) ise ikinci olarak dallanmış ve kalan haplotipler bir filogrup oluşturmuşlardır. Bu son grup içerisinde *A. antecessor* türüne ait altı haplotip (*AnteAkdagH1*, *AnteAkdagH2*, *AnteAkdagH3*, *AnteAkdagH4*, *AnteAkdagH5*, *AnteAkdagH6*) bir filogrup oluşturur ve diğerlerine kardeş grup olarak yer alır. Sonraki basamakta biri *A. davrazensis* ve diğeri

A. uludaghensis türüne ait iki haplotipin (DavrazensisH1, UludaghensisH1) oluşturduğu filogrup kalan 48 haplotipin oluşturduğu filogruba kardeş grup oluşturacak şekilde yer alır. Veri seti bu son grup içerisindeki haplotiplerini arasındaki filogenetik ilişki çözümlenememiştir. Ancak içeride düşük destek alan bazı filogrular vardır. Bunlardan biri *A. antitauricus* türünün Afyon, Sandıklı – Şuhut popülasyonuna ait 7 haplotipin (AntiSuhutH1, AntiSuhutH2, AntiSuhutH3, AntiSuhut4, AntiSuhutH5, AntiSuhutH6, AntiSuhutH7), ikincisi *A. tolunayi* türünün İzmir–Bozdağ popülasyonuna ait 3 haplotipin (ToluIzmH1, ToluIzmH2, ToluIzmH3) ve üçüncüsü *A. serbicus* türüne ait iki haplotipin (SerbBulgH1, SerbBulgH2) oluşturduğu filogrulardır. Bu üç filogrubun düğümleri %50'nin üzerinde bir bootstrap desteği almışlardır. Diğer tüm haplotipler ise ağaçlar üzerinde politomik olarak konumlanmıştır.

ITS2 verisinin filogenetik çözünürlüğünü kapsamlı bir şekilde ortaya koymak amacıyla, birleştirilmiş sekonder yapı veri matrisiyle oluşturulan maksimum olasılık (maximum likelihood) analizinin yanı sıra yalnızca lineer dizi ile de filogenetik analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda seç – bağla (bootstrap) güvenilirlik değerlerini taşıyan maksimum olasılık (maximum likelihood) ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.6.). Elde edilen ağaç incelendiğinde, dış grup (*BoluaSSV – Bolua turkiyae*), bazal olarak dallanır ve tüm *Anterastes* türlerinin monofiletik bir grup oluşturur. Cins içerisinde sekonder yapı ağacının *Anterastes disparalatus* türünün (DispKartH1) diğer tüm haplotiplere kardeş grup olacak şekilde konumlandığı ve *Anterastes antecessor* türünün altı haplotipi (AnteAkdagH1, AnteAkdagH2, AnteAkdagH3, AnteAkdagH4, AnteAkdagH5, AnteAkdagH6) ile birlikte diğer haplotiplerden ayrı bir monofiletik grup oluşturdukları belirlenmiştir. Ağaç üzerinde bir sonraki basamağa ilerlendiğinde, *Anterastes uludaghensis* ve *Anterastes davrazensis* türlerinin 100 bootstrap değeriyle monofiletik, geriye kalan haplotipleri için bir kardeş grup (sister group) oluşturduğu görülmektedir. Ağacın diğer nodlarına bakıldığında ise, geriye kalan haplotipler arasındaki filogenetik ilişkinin çözülemediği, politomik dallanmalar olduğu ve oluşan dalların da ya bootstrap desteği olmadığı ya da düşük değerler aldıkları görülmektedir. Bu politomik grup içerisinde yalnızca *Anterastes serbicus* türünün haplotipleri (SerbBulgH1, SerbBulgH2) ve *Anterastes tolunayi* türünün haplotipleri (ToluIzmH1, ToluIzmH2, ToluIzmH3) arasındaki filogenetik ilişkinin, tam olarak çözüldüğü saptanmıştır. *Anterastes antitauricus* türünün Afyon – Şuhut popülasyonuna ait tüm haplotiplerinin ise sekonder yapı verisi kullanılarak elde edilen ağacın aksine monofiletik grup oluşturmamışlardır. Elde edilen bu filogenetik ağaçlar yolu ile ITS2'nin lineer ve sekonder yapısının filogenetik bilgi vericiliği değerlendirilmiştir.



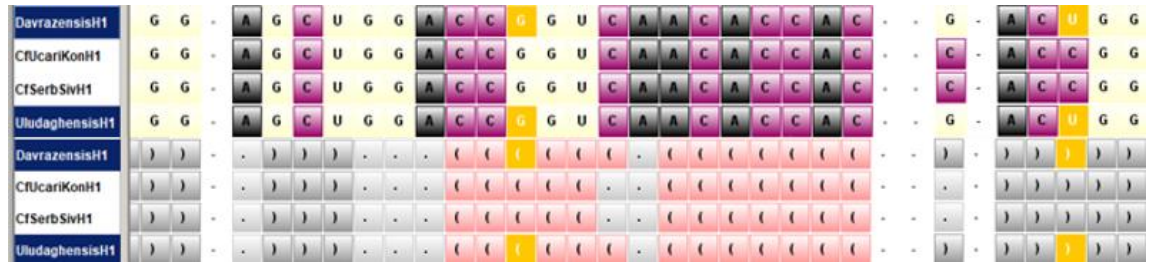
Şekil 4.5. ITS2 sekonder yapıları kullanılarak hazırlanan ve seç bağla güvenilirlik değerlerini gösteren ML ağacı.



Şekil 4.6. Lineer ITS2 verisi kullanılarak hazırlanan ve seç bağla güvenirlilik değerlerini gösteren ML ağacı.

4.4. Telafi Edici Baz Değişimleri (TBD/CBC)

PAUP programı üzerinden elde edilen apomorfi listesi içerisinde her bir nod ve bu nodların kapsadığı türlerde gerçekleşen baz değişimleri verilmiştir. Bu liste içerisinde her bir nod için verilmiş olan apormorfiler, yine her bir nodun gösterdiği türler için TBD'lerin belirlenmesi amacıyla 4SALE programı üzerinden kontrol edilmiştir. Yapılan kontroller sonucunda *Anterastes* cinsi içerisinde herhangi bir TBD'ye rastlanılamamıştır. *Anterastes uludaghensis* ve *Anterastes davrazensis* türlerinde 268. baz pozisyonunda C ==> T (U)'ye bir dönüşüm olduğu görülmüş ve sekonder yapı üzerinden gerçekleştirilen kontrol sonucunda atasal popülasyonun bu pozisyonda G – C eşleşmesi yaptığı ancak bu iki türün ilgili baz pozisyonunda G–U eşleşmesi yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Zincirin tek tarafında gerçekleşen bu dönüşüm yarı – TBD (hemi – CBC) olarak tanımlanmıştır. Her bir haplotip için katlanma bölgesinde gerçekleşen değişim diğer haplotiplerde katlanma bölgesinde değil ise veya böyle bir değişim bulunmuyorsa bu tür değişimler TBD olmayan değişim olarak belirlenmiştir. *Anterastes* cinsi içerisinde gerçekleşen toplam 4 pozisyondaki değişim TBD olmayan değişim (non – CBC) olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.7. Yarı –TBD 4SALE ekran görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Orthoptera takımı altüyeliler (Hexapoda) altşubesinin en fazla tür içeren altıncı takımı olmasına (Brusca ve Brusca 2003) ve çok sayıda çalışmada kullanılan gruptan biri olmasına karşın bir barkod geni olarak önerilen ITS2 geni sekonder yapısına ilişkin sadece bir çalışma mevcuttur (Ullrich vd. 2010). Bu tez çalışması ile Orthoptera takımından ikinci bir temsilci grup çalışılarak ITS2 geninin taksonomik ve filogenetik bilgi vericiliği irdelenmiştir. Elde edilen veriler ve bu verilere uygulanan analizlerin ortaya çıkardıkları dört ayrı yönüyle değerlendirilebilir: (i) ITS2 geni lineer dizi özellikleri, (ii) ITS2 geninin sekonder yapısı, (iii) ITS2 geninin filogenetik bilgi vericiliği ve (iv) ITS2 geni TBD ile barkod potansiyeli. Veriler aşağıda bu yönleri ile ele alınmıştır.

5.1. ITS2 Lineer Dizi Özellikleri

Ensifera (uzun antenli düz kanatlılar) alttakımı içerisinde bulunan *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae) cinsi üyelerinin ITS2 lineer ve sekonder yapısı üzerine yapılmış çalışmalar bu bağlamda oldukça sınırlıdır. Orthoptera takımı üyelerinin ITS2 yapısı üzerine yalnızca Ullrich vd. (2010) *Poecilimon* (Orthoptera, Tettigoniidae, Phaneropterinae, Barbitistini) cinsi içerisinde yer alan 140 çalı çekirgesi türünde yaptıkları çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada *Poecilimon* türlerine ait ITS2 uzunluğu ~167 baz olarak belirlenmiştir (Ullrich 2010). Orthoptera içerisinde yer alan, *Poecilimon* ve *Anterastes* cinsine ait ITS2 uzunlukları bu çalışma temel alınarak kıyaslandığında, *Anterastes* cinsi üyelerinin 268 – 278 baz uzunlukları ile *Poecilimon* cinsinden çok daha uzun bir ITS2 dizisine sahip olduğu görülmektedir. Hexapoda üyelerinde yapılmış diğer ITS2 çalışmalarına bakıldığında ise ITS2 baz uzunluğu değerlerinin farklı takımlar hatta farklı aileler ve cinsler içerisinde dahi oldukça varyasyonel olduğu görülmektedir (Çizelge 5.1). Canlılar alemi içerisinde ITS2 baz uzunlukları karşılaştırıldığında ise; 2010 yılına kadar üretilen ITS2 verileri ile (50,790 bitki ve 12,221 hayvan türü için) yapılan bir çalışmaya göre (Yao vd. 2010) ITS2 uzunluğu dikotiller ve yosunlar için 100 – 700 baz, monokotiller, gymnospermler ve eğrelti otları için 100 – 480 baz uzunluğunda bulunmuştur. Dikotiller, monokotiller, gymnospermler, eğrelti otları ve yosunların ortalama ITS2 uzunlukları değerleri ise sırasıyla 221, 236, 240, 224 ve 260 olarak belirlenmiştir. Hayvanlar dikkate alındığında ITS2 uzunluklarının 100 – 1209 baz aralığında (ağırlıklı olarak 195 – 510 bç aralığında) olduğu ve ortalama değerinin 306 baz uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Yao vd. 2010; Oh vd. 2013; Paredes-Esquivel ve Townson 2014). Ancak günümüz çalışmalarına bakıldığında ITS2 maksimum uzunluk sınırı 2052 baz uzunluğuna kadar çıkabilmektedir (Oh vd. 2013). Bu değerlere bakıldığında, *Anterastes* cinsi üyelerinin bitki türlerinin ITS2 bölgesinden daha fazla baza sahip olduğu ancak hayvan türleri içerisinde ortalama değerinin altında olduğu belirlenmiştir. Dikotiller, monokotiller, gymnospermler, eğrelti otları, yosunlar ve hayvanlara ait ITS2 dizilerinin GC oranlarının ortalaması ele alındığında, sırası ile % 59.4, % 61.3, % 62.9, % 55.5, %

64.7 ve % 48.3 değerlerine sahip oldukları bulunmuştur (Yao vd. 2010). *Anterastes* cinsinin yalancı genlerin belirlenmesi için saptanan ortalama GC % 60.58 değeriyle hayvanlar alemi ortalamasının üstündedir.

Çizelge 5.1. Bazı Hexapoda üyelerinde ITS2 baz uzunlukları.

Takım	Aile	Tür	ITS2 Uzunluğu (bp)	Kaynak	
Diptera	Culicidae	<i>Aedes sp.</i>	190-376	Wesson vd. 1992	
		<i>Haemagogus mesodentatus</i>	251	Wesson vd. 1992	
		<i>Anopheles maculipennis</i>	280	Marinucci vd. 1999	
		<i>Anopheles sp.</i>	300 - 1783	Beebe vd. 1999	
		<i>Anopheles sacharovi</i>	300	Marinucci vd. 1999	
		<i>Anopheles rivulorum</i>	380	Hackett vd. 2000	
		<i>Anopheles barbirostris</i>	1545-1730	Paredes-Esquivel ve Townson 2014	
		<i>Anopheles campestris</i>	1519	Paredes-Esquivel ve Townson 2014	
		<i>Anopheles vanderwulpi</i>	1727-1733	Paredes-Esquivel ve Townson 2014	
		<i>Anopheles stephenis</i>	466	Alam vd. 2008	
		Psychodidae	<i>Phlebotomus</i> grup	241-291	Muccio vd. 2000
		Simuliidae	<i>Simulium inthanonense</i>	247	Thanwisai vd. 2006
		Hymenoptera	Apidae	<i>Drosophila sp.</i>	320-429
<i>Simulium choochotei</i>	308			Thanwisai vd. 2006	
<i>Bombus ignitus</i>	2034 - 2052			Hyung Keun Oh vd. 2013	
<i>Bombus ardens</i>	1971 - 1984			Hyung Keun Oh vd. 2009	
<i>Melipona beecheii</i>	1728			De la Rua vd. 2007	
<i>Melipona yucatanica</i>	1789			De la Rua vd. 2007	
Agaonidae	<i>Galoglychia</i> grup			346-554	Erasmus vd. 2007
Formicidae	<i>Strumigenys spp.</i>			659 - 945	Hung vd. 2004
Ichneumonidae	<i>Diadegma</i> grup			613-700	Wagener vd. 2006
Trichogrammatidae	<i>Trichogramma sp.</i>			416-420	Stouthamer vd. 2000
Tenthredinidae	<i>Tenthredopsis sp.</i>	474-603	Budak vd. 2016		
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Timarcha</i>	486 - 574	Gómez-Zurita vd. 2000	
Siphonaptera	Pulicidae	<i>Ctenocephalides felis</i>	500	Vobis vd. 2004	
Odonata	Calopterygidae	<i>Calopteryx</i> grup	211-212	Weekers vd. 2001	
Orthoptera	Tettigonidae	<i>Poecilimon sp.</i>	~167	Ullrich vd. 2010	
	Tettigonidae	<i>Anadolua schwarzi</i>	272	Ciplak vd. 2015	
	Tettigonidae	<i>Bolua turkiyae</i>	277	TEZ	
	Tettigonidae	<i>Anterastes sp</i>	267 – 278	TEZ	

5.2. ITS2 Bölgesinin Sekonder Yapısı

Anterastes cinsine ait olası ITS2 sekonder yapısına bakıldığında tüm türlere ait haplotiplerin sekonder yapısının, mayalarla yapılan ITS2 çalışmalarında ortaya çıkarılan temel yapılardan biri olan ve merkezi bir halka ve etrafında dağılan helikslerle tanımlanan “ring” tipi (Joseph vd. 1999; Schultz vd. 2005; Coleman 2007) ile örtüştüğü görülmektedir. Ökaryotlarda ITS2 sekonder yapıları için tanımlanmış bir diğer model olan “hairpin” modeli ise *Anterastes* cinsi içerisinde tespit edilmemiştir. Tüm *Anterastes* haplotiplerinde merkezi bir halka ve etrafında dağılan üç veya dört heliks bulunmaktadır. Bir diğer Orthoptera cinsi olan *Poecilimon* (Tettigoniidae, Barbitistini) türlerinde (toplam 140 tür) yapılan çalışmada, daha önceki çalışmalarla belirlenmiş her iki ana konformasyonel yapının da (ring ve hairpin modelleri, Yeh ve Lee 1990; Joseph vd. 1999; Cote vd. 2002) bu türler için bulunduğu rapor edilmiştir (Ullrich vd. 2010).

Ökaryotlarda ITS2 sekonder yapısı, tipik olarak 4 heliksli bir yapıya sahiptir ancak, heliks sayısı farklılıklar gösterebilmektedir (Coleman 2007). Heliksler içerisinde yalnızca Heliks II ve Heliks III, tüm canlı grupları için ortaktır ve tipik baz dizilim motifleri ile tanımlanabilir (Coleman 2007). Distal bölgede pirimidin-pirimidin kabarıklığı (bulge) içeren Heliks II, bu özelliğinden dolayı tipik silli ITS2 sekonder yapısında ilk olarak tanımlanan helikstir (Coleman 2005, 2007). Heliks III ise 5' ucunda (Y)GG(Y) korunumlu motifini içermesi, aynı zamanda da en korunumlu ve uzun heliks yapısına sahip olması ile tanımlanabilir (Coleman 2007, 2015; Schultz vd. 2005). Bazı canlı grupları, özellikle de böcekler içerisinde heliks II ve heliks III arasında Heliks IIA olarak tanımlanan bir heliks bulunmaktadır (Coleman 2007).

Anterastes türlerinin olası sekonder yapısına bakıldığında Heliks I, Heliks IA, Heliks II, Heliks IIA, Heliks III ve bazı türlerde Heliks IV (*Anterastes disparalatus* ve *Anterastes serbicus* türlerinde) yapısının olduğu görülmektedir. *Anterastes* türleri içerisinde ökaryotlar için bildirilen genel yapının yanı sıra Heliks I ve Heliks II arasında yer alan 18 bazdan oluşan Heliks IA yapısı tanımlanmıştır. Ökaryotlarda Heliks I'in herhangi bir dallanmaya sahip olmadığı (non – dichotomous) düşünülmektedir (Caisova ve Melkonian 2014). *Anterastes* cinsi türleri ve *Bolua turkiyae* türünde Heliks I ve Heliks IA herhangi bir dallanmaya sahip değildir. Bu özelliği ile ökaryotlar içinde bir sapma göstermemektedir.

Heliks II üzerinde tüm canlı türleri için ortak olarak tanımlanmış olan pirimidin – pirimidin kabarıklığı ve U – U yanlış eşleşmesi (U-U mismatch) tanımlanmıştır. Coleman (2007) tarafından belirlenmiş olan ve böceklerde yaygın olarak bulunan Heliks IIA yapısı, tüm *Anterastes* türlerinde ve dış grup olan *Bolua* cinsinde Heliks II ve Heliks III arasında tespit edilmiştir. Heliks II ve Heliks III arasında yer alan ancak katlanmaya katılmayan tek zincirli bölgelerin tüm canlı gruplarında pürinlerce (A ve G) zengin olduğu ve bu bölgenin primer dizi içerisindeki en korunumlu bölge olduğu bildirilmiştir (Coleman 2015). *Anterastes* cinsinin sekonder yapısına bakıldığında bu bölgelerin %83

oranında pürinlerden oluştuğu ve dizi içerisinde tamamiyle korunmuş olduğu görülmüştür. Bu açıdan *Anterastes* cinsinin sekonder yapısı literatür bilgisi ile örtüşmektedir.

Tüm helikslerin uzunluklarına bakıldığında heliks I 11 baz, Heliks IA 18 baz, Heliks II 47 baz, Heliks IIA 28 baz, Heliks III 145 – 147 baz ve Heliks IV olan *A. disparalatus* türünde 18 baz, *A.serbicus* türünde ise 15 -22 baz uzunluğuna sahiptir. Bu bilgiler ışığında heliks IIA'nın hemen ardından gelen Heliks III, *Anterastes* ve *Bolua* cinsleri için de literatürde belirtildiği gibi en uzun heliks olma özelliğini korumaktadır. Aynı zamanda tüm *Anterastes* türleri ve *Bolua turkiyae* türünün ITS2 sekonder yapısına bakıldığında Heliks III'ün UGGU korunmuş motifini taşıdıkları görülmektedir. Ullrich vd. (2010) yılında *Poecilimon* türleriyle yapmış oldukları çalışmada türlerin bir kısmında buldukları ring modeli yapısında çalı çekirgelerinin dört heliksli ve Heliks II'nin distal kısmında yer alan korunmuş motif olan pirimidin - pirimidin kabarıklığı içeren bir sekonder yapı ortaya konmuştur. Ancak, Coleman'ın (2007) önerdiğinin aksine, Ullrich vd. (2010) böceklerle özdeşleşen ve Heliks II ile en uzun heliks (Heliks III) arasında kalan, Heliks IIA adlandırmasının yerine, bu heliks için Heliks III adlandırması yapılmıştır. Bu nedenle en uzun olan ve 5' ucunda UGGU korunmuş motifini taşıyan helikse Heliks IV ismi verilmiştir. Bu nedenle korunmuş UGGU motifinin Heliks III üzerinde değil, Heliks IV'ün 5' ucunda olduğu bildirilmiştir. Canlı gruplarında Heliks II dışında tüm helikslerde dallanma (branched) görülebileceği bilinmektedir (Caisova ve Melkonian, 2014). *Anterastes* cinsi içerisinde yalnızca *Anterastes antitauricus* türünün Afyon – Şuhut popülasyonunun dördüncü haplotipinde (AntiSuhutH4), 14 baz uzunluğunda bir yan kol (side arm) yani dallanma tanımlanmıştır.

Anterastes cinsi içerisinde yalnızca *A. disparalatus* ve *A. serbicus* türlerinde dört heliksli sekonder yapı belirlenmiştir. *A. disparalatus* türünde 18 baz, *A.serbicus* türünün birinci haplotipinde (SerbBulGH1) 15 baz ve *A.serbicus* türünün ikinci haplotipinde (SerbBulGH2) 22 baz uzunluğundadır. Bu özelliğiyle bu türler, dış grup olarak seçilen *Bolua turkiyae*'nin ITS2 sekonder yapısı ile benzerlik göstermektedir.

Heliks I ve Heliks IV tüm sekonder yapı içerisinde en varyasyonel heliksler olduğu ve tür ve alttür düzeyinde özgüllük gösterdikleri kabul edilmektedir (Coleman 2007, 2015; Schultz 2005). *Anterastes* cinsi içerisinde Heliks I, Heliks II, Heliks IIA ve Heliks III'te herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir. Heliks IA katlanma bölgesinde (20. pozisyonda) ise *Anterastes disparalatus* türünde tespit edilen bir varyasyonel pozisyon (insersiyon - A) dışında herhangi bir varyasyon bulunmamaktadır. *A. disparalatus* ve *A. serbicus* türlerinde belirlenmiş olan Heliks IV yapısı, katlanma bölgeleri ve bu bölgelerin yerleşimi bağlamında en varyasyonel heliks olarak göze çarpmaktadır.

5.3. ITS2 Bölgesinin Filogenetik Çözünürlüğü

ITS2 bölgesinin filogenetik çözünürlüğünün test edilmesi kapsamında ITS lineer ve sekonder yapıları ile maksimum olasılık ağaçları elde edilmiştir. Lineer dizi ile elde edilen maksimum olasılık ağacı içerisinde her bir nod için hesaplanan bootstrap (seç-bağla) değerlerinin (ağaç üzerinde 50 ve üzeri güvenilirlik değerleri gösterilmiştir), sekonder yapı veri matrisi ile oluşturulan maksimum olasılık ağacı değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen ağaçlar arasındaki en belirgin fark, *Anterastes disparalatus* türünün ağaçlar üzerindeki konumu olarak göze çarpmaktadır. *Anterastes disparalatus* türü lineer veri ile oluşturulan maksimum olasılık ağacında tüm filogruplara kardeş olarak konumlanırken, sekonder veri setiyle oluşturulan maksimum olasılık ağacında *Anterastes antecessor* türünün Antalya –Akdağ popülasyonunun ilk altı haplotipi (AnteAkdagH1, AnteAkdagH2, AnteAkdagH3, AnteAkdagH4, AnteAkdagH5, AnteAkdagH6) ile birlikte bir monofiletik grup oluşturmuş ve birlikte diğer tüm haplotiplere kardeş filogrup olacak şekilde konumlanmışlardır. Ağaçlar üzerinde devam edildiğinde sırası ile lineer ve sekonder maksimum olasılık ağaçları büyük bir oranda benzerlik göstermektedir. Her iki filogenetik ağaçta da sırası ile *Anterastes davrazensis* ve *Anterastes uludaghensis* türleri, *Anterastes serbicus* türünün tüm haplotipleri (SerbBulgH1, SerbBulgH2) ve *Anterastes tolunayi* türünün tüm haplotipleri (ToluIzmH1, ToluIzmH2, ToluIzmH3) kendi içlerinde monofiletik birer grup oluşturmuşlardır. Lineer veri ile oluşturulan ağaç üzerinde *Anterastes antitauricus* türünün Afyon –Şuhut popülasyonuna ait haplotipleri olan AntiSuhutH1, AntiSuhutH2, AntiSuhutH3, AntiSuhutH3, AntiSuhutH7 monofiletik bir grup oluşturmuştur. Ancak sekonder yapı verisi ile elde edilen maksimum olasılık ağacında AntiSuhutH6 haplotipi de yukarıda sayılan haplotiplere eklenerek bir monofiletik grup oluşturmuştur. Tüm bu özelliklere bakıldığında, sekonder yapı benzerlikleri ve farklılıklarının tür gruplarının ağaçlar üzerindeki konumunu zayıf olarak etkilediği görülmektedir. Bu veriler ışığında sekonder yapının sağladığı ek filogenetik bilginin *Anterastes* cinsi içerisinde tür düzeyinde kararlar vermek için kullanışlı olmadığı söylenebilir.

Çıplak vd. 2015 tarafından *Anterastes* cinsinden elde edilen ITS1 + 5.8S + ITS2 verisi kullanılarak yapılan çalışmada, maksimum parsimoni, maksimum olasılık ve bayesian filogenetik analizleri uygulanmıştır. Bu nükleer genler, *Anterastes serbicus* ve *Anterastes babadaghi* tür gruplarını belirlemede başarılı olmuştur ancak düşük varyasyon içermesi nedeniyle mitokondriyal belirteçlere kıyasla daha az bilgi verici oldukları tespit edilmiştir. ITS1 + 5.8S + ITS2 nükleer genleri bu grup içi filogenileri çözmekte yetersiz kalmıştır ve güvenilir olmayan kronogramlar oluşturmuştur (Çıplak vd. 2015). Chobanov vd. 2016 çalışmasında bir diğer Tettigoniidae üyesi *Isophya* cinsinin ITS1+ITS2 dizileri kullanılmış ve Bayesian analizi yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda ITS1 ve ITS2 veri matrislerinin filogenetik ilişkileri çözmekte başarısız olduğu ve aynı popülasyon içerisindeki örneklerin dahi ağaç içerisinde yanlış konumlandığı görülmüştür. Ancak, nükleer gen filogenisinin morfo – akustik türlerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Orthoptera, Tettigoniidae içerisinde ilk defa ITS2 sekonder yapısı çalışılmış olan *Poecilimon* cinsi ile yapılan filogenetik analizlerde, cinsin iki konformasyonel (ring ve hairpin) sekonder yapı içermesi sebebiyle farklı yapılara sahip olan türlerin karşılaştırılmaması sorunu ortaya çıkmıştır. Ancak her iki farklı yapıdan elde edilen verilerin birbirleri ile örtüşmesi sonucu bu sorun ortadan kalkmıştır (Ullrich vd. 2010). Çalışmada ITS1 ve ITS2'ye ait sekonder yapı verileri ile 16S rRNA, tRNA-Val ve 12S rRNA mitokondriyal genleri kullanılarak yapılan maksimum parsimoni analizleri karşılaştırılmıştır. Nükleer genler (ITS1 ve ITS2) kullanılarak elde edilen ağaçlardaki seç – bağla (bootstrap) değerlerinin mitokondriyal genlerle elde edilen değerlere göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (> %94). Nükleer genlerin (ITS1 ve ITS2) çok derin ayrılmaları, tür kümeleri (clusters) ve kardeş takson ilişkilerini çözmekte başarılı olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda taksona özgü sekonder yapıların filogenetik çıkarımların geliştirilmesinde ve oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin artırılmasında yardımcı olacağı önerisine yer verilmektedir (Ullrich vd. 2010).

ITS2 lineer yapısı ile yapılan en kapsamlı araştırmalardan bir tanesine bakıldığında, tür ve türler arası uzaklık değerleri kullanılarak yapılan BLAST1 analizi ile 50790 bitki ve 12221 hayvan türüne ait ITS2 lineer yapısının, türlerin ayrılmasında kullanılabilirliği test edilmiştir. Dikotiledonlar, monokotiledonlar, gymnospermler, eğrelti otları, yosunlar ve hayvanlarda sırası ile %76,1, %74,2, %67,1, %88,1, %77,4 ve %91,7 oranında türler başarı ile birbirinden ayrılmıştır. Çalışmada aynı zamanda ITS2 sekonder yapısının moleküler morfolojik karakterler olarak ele alınması ve türlerin tanımlanmasında kullanılmasının yapılan çalışmalarda bilgi verici olabileceği belirtilmiştir (Yao vd. 2010).

Tüm bu çalışmaların aksine ITS2 lineer ve sekonder veri setleri ile yapılan filogenetik analizlerin *Anterastes* cinsinin taksonomik sorunlarını çözmekte yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Monofiletik yerleşim gösteren az sayıda filogrubun dışında kalan tüm haplotipler her iki ağaçta da politomik olarak konumlanmıştır. Morfolojik tür teşhisi ile hangi türe ait oldukları belirlenemeyen ve cf eki ile belirtilmiş populasyonların tür durumları filogenetik ağaçlar üzerinden elde edilen bilgilerle açıklığa kavuşturulamamıştır. ITS2'nin hızlı evrimleşen yapısı sinapomorfik karakterlerin dizi içerisine yerleşimine izin vermemiş ve bu durum da *Anterastes* cinsi için ITS2 bölgesinin filogenetik bilgi vericiliğini zayıflatmıştır. Çıplak vd. (2015) tarafından uygulanan SYMETREE analizi bazal olarak ayrılan dallar sonrasında *A. serbicus* grubu + *A. babadaghi* filogrubunun atasal nodunda substitüsyon oranında bir sapma olduğunu göstermiştir. Bu tez kapsamında yapılan analizlerde ITS2 geninin filogenetik bilgi vericiliğinin özellikle bu iki grubun içinde düşük bulunması substitüsyon oranında uyumludur ve bu aşamadan sonra hızlı bir çeşitlenmeye işaret olarak kabul edilebilir. Hızlı değişim homolojilerin kayıp edildiği şekilde yorumlanabilir.

5.4. Telafi Edici Baz Değişiklikleri Ekseninde ITS2 Barkod Potansiyeli

TBD çalışmalarına bakıldığında Müller vd. 2007 yılında 945 bitki, 412 mantar ve 16 hayvan türü ile TBD analizleri yapmış ve bu gruplar içerisinde sırası ile 42, 29 ve 1 telafi edici baz değişimine rastlanmıştır. TBD bulunduran türlerin %93 oranında farklı türlere ait olduğu belirlenmiştir (Müller vd. 2007).

Orthoptera, Tettigoniidae içerisinde TBD (CBC) varlığının tartışabilmesi yeterli çalışma bulunmaması nedeniyle mümkün değildir. Ancak Hexapoda içerisinde yer alan canlılarla yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu gruplardan bir tanesi olan *Tenthredopsis* (Tenthredinidae: Hymenoptera) cinsinde toplam 14 türü temsil eden 67 örnekle yapılan TBD analizi sonucunda *Tenthredopsis* monofilisini destekleyen toplam 18 telafi edici baz değişikliği (TBD) bulunmuştur. Toplam 67 örneğin her biri Heliks III'ün korunmuş bölgesinde ortak TBD paylaşmaktadır. Bu çalışma Müller vd. 2007 çalışmasının Hymenoptera grupları için uygulanabilir olduğunu ancak daha fazla deneysel kanıtı ihtiyacı olduğunu göstermektedir (Budak vd. 2016).

Orthoptera, Tettigoniidae içerisinde TBD analizi ilk defa bu tez çalışması kapsamında yapılmıştır. Ancak yapılan analizler sonucunda eşeyssel uyumsuzluğa sebep olduğu bilinen (Fabry vd. 1999; Coleman 2000, 2009; Müller vd. 2007) telafi edici baz değişikliklerine *Anterastes* cinsi içerisinde rastlanılmamıştır. *Anterastes uludaghensis* ve *Anterastes davrazensis* türlerinde 268. baz pozisyonunda C ==> T (U)'ye bir dönüşüm olduğu görülmüş ve zincirin tek tarafında gerçekleşen bu dönüşüm yarı – TBD olarak tanımlanmıştır. Tespit edilen bu yarı –TBD'nin tür ve populasyon düzeyinde bilgi verici olabileceği bilinmektedir (Torres-Suarez 2014) ancak taksonomik değerleri üzerine daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır (Budak vd. 2016). TBD olmaması veya türlerle uyumlu baz kompozisyonlarına rastlanılmaması ITS2 geninin *Anterastes* cinsi ve olasılıkla diğer Tettigoniinae üyelerinde barkod belirteci olarak kullanılma potansiyelinin olmadığına işaret etmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında Phaneropterinae altfamilyasına ait *Poecilimon* cinsi (Ullrich vd. 2010) dışında ilk defa, başka bir Orthoptera Tettigoniidae familyasına ait olan Tettigoniinae altfamilyası cinsi olan *Anterastes*'de ITS2 transkriptinin lineer ve sekonder yapısı çalışılmıştır. *Anterastes* cinsi üyelerinin ITS2 lineer dizisinin, Plantae üyeleri ITS2 bölgesinden daha fazla baz sayısına sahip olduğu ancak Animalia içerisinde ortalama baz uzunluğunun altında olduğu belirlenmiştir. *Anterastes* ITS2 lineer dizisi, 267- 278 baz uzunluğu ile Orthoptera takımı içerisinde belirlenmiş en uzun ITS2 dizisi olma özelliği taşımaktadır (*Poecilimon* cinsi için 167 baz). Lineer dizi GC oranları kıyaslandığında ise %60,58 oranı ile Animalia ortalamasının üzerinde bir değere sahiptir.

Orthoptera takımının ITS2 sekonder yapı çalışmaları içerisinde, *Poecilimon* cinsinin ring ve hairpin model olarak tanımlanan iki farklı konformasyonel sekonder yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Ullrich vd. 2010). Ancak *Anterastes* cinsi içerisinde yalnızca ring model sekonder yapı gözlenmiştir. Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae içerisinde bulunan *Anterastes* cinsi ITS2 sekonder yapıları ele alındığında, ökaryotlar için temel olarak tanımlanmış dört heliksli (Coleman 2007) yapıdan sapma olduğu görülmektedir. *Anterastes* cinsinin 13 türü üç heliksli bir sekonder yapıya sahipken, *Anterastes disparalatus* ve *Anterastes serbicus* türleri temel olarak tanımlanmış dört heliksli yapıya sahiptir. Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri tüm canlılar arasında ilk defa ITS2 sekonder yapısı içerisinde Heliks IA yapısı varlığı tanımlanmıştır. Buna ek olarak, bazı canlı grupları özellikle de Hexapoda içerisinde varlığı bilinen ve heliks II ile heliks III arasında Heliks IIA olarak tanımlanan (Coleman 2007) heliksin varlığı ise Orthoptera 'da ilk defa tespit edilmiştir.

ITS2 sekonder yapısı üzerinde heliks tanımlayıcı korunmuş motiflerden, Heliks II için tanımlanmış pirimidin – pirimidin uyumsuzluğu veya U-U yanlış eşleşmesi *Anterastes* cinsi içerisindeki tüm haplotiplerde belirlenmiştir. Aynı şekilde Heliks III'ün 5' ucunda belirlenen UGGU korunmuş dizisi tüm haplotiplerde tespit edilmiştir. *Anterastes* cinsinde Heliks III üzerinde UGGU korunmuş motifi Orthoptera takımı için ilk defa tanımlanmıştır. Heliks III, ITS2 sekonder yapısı içerisinde tanımlanmış en uzun helikstir (Coleman 2007; Schultz vd. 2005). *Anterastes* cinsi sekonder yapı heliksleri karşılaştırıldığında 145 – 147 baz uzunluğuna sahip Heliks III, heliksler içerisinde en uzun heliks olma özelliğine sahiptir. *Anterastes* cinsinin ITS2 sekonder yapısına ait korunmuş motifler ve heliks uzunluklarının literatür verileri ile örtüştüğü ancak heliks adlandırmalarının farklı yapılması sebebiyle Orthoptera: Tettigoniidae içerisinde yer alan *Poecilimon* cinsi sekonder yapısından farklı olduğu saptanmıştır. Bu nedenle tür düzeyinde olmasa da cins düzeyinde taksonların sınırlarını çizmede kullanışlı bir belirteç olma potansiyeli vardır. Bu potansiyel araştırılmayı beklemektedir.

Tüm heliksler içerisinde Heliks I ve IV'ün en değişken heliksler olduğu ve tür düzeyinde özgün bilgi içereceği savunulmuştur (Coleman 2009). Ancak, *Anterastes* cinsi ITS2 sekonder yapı helikslerine bakıldığında Heliks I, Heliks II, Heliks IIA ve Heliks III'te herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir. Heliks IV yalnızca *Anterastes disparalatus* ve *Anterastes serbicus* üzerinde tanımlanmışsa da, Heliks IV'ün bu türlerin haplotipleri arasında yerleşiminin dahi birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu

bağlamda elde edilen helikslerin sahip olduğu varyasyon oranlarına dair literatür bilgisi ile tez çalışması sonucunda elde edilen veriler kısmi olarak örtüşmektedir.

COI bölgesine ek bir barkod bölgesi olarak, ITS2 lineer ve sekonder yapı verileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerin tür sınırlarının belirlenmesi ve tür içi - türler arası filogenetik ilişkilerin çözümlenmesinde yararlı olabileceği bilinmektedir (Yao vd. 2010). Ancak, *Anterastes* cinsi ITS2 lineer yapılarının oldukça kısa ve korunumlu (%83,35) olmaları nedeniyle ITS2 ile yapılan filogenetik analizler, tür ve türler arası ilişkiler çözümlenmesinde yetersiz kalmıştır. Sekonder yapı lineer dizinin barındırdığına ek bir filogenetik bilgi sağlamamıştır. Elde edilen veriler TBD tür kavramı çerçevesinde değerlendirildiğinde ise *Anterastes* cinsi içerisinde herhangi bir telafi edici baz değişikliğine rastlanılamaması nedeniyle, TBD tür kavramının *Anterastes* için uygulanamayacağı sonucuna varılmıştır. *Poecilimon* cinsine ilişkin veriler (Ullrich vd. 2010) TBD açısından değerlendirilmemiştir. Ancak, şimdiki veriler ışığında TBD tür kavramının Tettigoniidae ve de Orthoptera için de geçerli olabileceğine işaret etmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Agapow, P.M., Olaf, R. P., Bininda-Emonds, K. A. Crandall, John L. Gittleman, Georgina M. Mace, Jonathon C. Marshall, and Andy Purvis. 2004. "The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies." *The Quarterly Review of Biology* 79 (2): 161–179.
- Aguilar, C., Sánchez, J. A. 2007. Phylogenetic hypotheses of gorgoniid octocorals according to ITS2 and their predicted RNA secondary structures. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3), 774–786.
- Alam, M. T., Bora, H., Das, M. K., & Sharma, Y. D. 2008. The type and mysorensis forms of the *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in India exhibit identical ribosomal DNA ITS2 and domain-3 sequences. *Parasitology Research*, 103(1), 75–80.
- Allander, T., Emerson, S.U., Engle, R. E., Purcell, R.H. ve Bukh, J. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 11 609–11 614.
- Andersson, L. 1990. The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon* 39: 375–382.
- Ankenbrand, M.J., Keller, A., Wolf, M., Schultz, J. & Forster, F. 2015. ITS2 database V: Twice as much. *Molecular Biology and Evolution*, 32(11), 3030–3032.
- Austin, C. J. 2016. Aristotelian essentialism: essence in the age of evolution. *Synthese*, 194(7), 2539–2556.
- Avise, J. C., R. M. Ball, Jr. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7: 45–67.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1), 3–15.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA - a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247–277.
- Baum, D. A., K. L. Shaw. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pages 289–303 in *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (P. C. Hoch, and A. G. Stephenson, eds.). Missouri Botanical Garden, St. Louis.

- Beddall, B.G. 1972. Wallace, Darwin, and Edward Blyth: Further notes on the development of evolution theory. *Journal of the History of Biology*, 5(1), 153–158.
- Beebe, N. W., Ellis, J. T., Cooper, R. D., Saul, A. 1999. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Molecular Biology*, 8(3), 381-390.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155.
- Birky, C. W., Adams, J., Gemmel, M., & Perry, J. 2010. Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. *PLoS ONE*, 5(5).
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., and Abebe, E. 2005. “Defining Operational Taxonomic Units Using DNA Barcode Data.” *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 360 (1462): 1935–1943.
- Bogart, J. P. 2003. “Genetics and Systematics of Hybrid Species.” *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela* 1: 109–134.
- Booth, D. J., Poloczanska, E. , Donelson, J. M., Molinos, J. G. and Burrows, M. 2017. Biodiversity and Climate Change in the Oceans. In *Climate Change Impacts on Fisheries and Aquaculture* (eds B. F. Phillips and M. Pérez-Ramírez).
- Brunner von Wattenwyl, C. 1882. *Prodromus der Europäischen Orthop- teren*. Leipzig: Engelmann.
- Brusca R.C., Brusca G. J., 2003. *Invertebrates* (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Budak, M., Güler, M., Korkmaz, E.M., Hastaoğlu Ö. S. & Başibüyük, H.H. 2016. The characterisation and taxonomic utility of ITS2 in *Tenthredopsis Costa, 1859* (Tenthredinidae: Hymenoptera) with some new records from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 76–85.
- Buffon, G. L. L. 1778. Époques de la nature. In *Histoire naturelle, générale et particulière, supplément 5*. L’Imprimerie Royale, Paris, France.
- Caccone, A., Gentile, G., Burns, C.E., Sezzi, E., Bergman, W., Ruelle, M., Saltonstall, K., Powell, J.R., 2004. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 794–798.
- Caisová, L., Marin, B., & Melkonian, M. 2011. A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta , Viridiplantae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 262.

- Caisová, L., Melkonian, M. 2014. Evolution of helix formation in the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) and its significance for RNA secondary structures. *Journal of Molecular Evolution*, 78(6), 324–337.
- Caron, D. A. 2009. New Accomplishments and Approaches for Assessing Protistan Diversity and Ecology in Natural Ecosystems. *BioScience*, 59(4), 287–299.
- CBOL Plant Working Group, 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10.1073/pnas.0905845106
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1), 1–8.
- Chobanov, D. P., Kaya, S., Grzywacz, B., Warchałowska-Śliwa, E., & Çıplak, B. 2017. The Anatolio-Balkan phylogeographic fault: a snapshot from the genus *Isophya* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Zoologica Scripta*, 46(2), 165–179.
- Claridge, Michael F., H. A. Dawah, and M. R. Wilson. 1997. *Species: The Units of Biodiversity*. xvi, 439. London; New York: Chapman & Hall. 439 p.
- Coleman A. W. 2009. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Mol Phylogenet & Evol* 2009, 50: 197-203.
- Coleman A. W., van Oppen, M. J. H. 2008. Secondary structure of the rRNA ITS2 region reveals key evolutionary patterns in acroporid corals. *Journal of Molecular Evolution* 67 (4):389-396.
- Coleman, A. W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*, 151(1), 1–9.
- Coleman, A. W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*.
- Coleman, A. W. 2013. Analysis of mammalian rDNA Internal Transcribed Spacers. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10.
- Coleman, A. W. 2015. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd.
- Coleman, A. W., Vacquier, V. D. 2002. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution*, 54(2), 246–257.
- Coleman, A.W. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 35, 3322–3329.
- Cote, CA., Greer, CL., Peculis, BA., 2002 Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA* 8: 786–797

- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1: 159–187.
- Czech, B. 2008, Prospects for Reconciling the Conflict between Economic Growth and Biodiversity Conservation with Technological Progress. *Conservation Biology*, 22: 1389-1398.
- Çıplak, B. 2013. Bölüm 3: Tür Kavramları, Türleşme ve Tür Taksonu, 46 sf.
- Çıplak, B. 2004. Systematics, phylogeny and biogeography of *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae): Evolution within a refugium. *Zoologica Scripta*, 33(1), 19–44.
- Çıplak, B., Kaya, S., & Gündüz, I. 2010. Phylogeography of *anterastes serbicus* species group (Orthoptera, Tettigoniidae): Phylogroups correlate with mountain belts, but not with the morphospecies. *Journal of Orthoptera Research*, 19(1), 89–100.
- Çıplak, B., Kaya, S., Boztepe, Z., & Gündüz, I. 2015. Mountainous genus *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae): Autochthonous survival across several glacial ages via vertical range shifts. *Zoologica Scripta*, 44(5), 534–549.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life.* London: J. Murray. 476p.
- De La Rúa, P., May-Itzá, W. D. J., Serrano, J., & Quezada-Euán, J. J. G. 2007. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal DNA in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 54(4), 418–423.
- De Queiroz, K. 2005. “Ernst Mayr and the Modern Concept of Species.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (Supp. 1): 6600–6607.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886.
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., & Gramiccia, M. 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(5), 387–393. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00012-6)
- Diamond, J. 2005. *Collapse: How Societies Choose to Fail or Succeed.* Penguin Books, New York.
- Dixon, M. T., Hillis, D. M. 1993. Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 10(1), 256–267.
- Dobzhansky, T 1970. *Genetics of the evolutionary process.* Columbia University Press, New York.

- Dobzhansky, T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *American Naturalists* 84, 401–418.
- Donoghue, M. J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88: 172–181.
- Elder, J. F., Turner, B. J. 1995. Evolution of repetitive in Eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70(3), 297–320.
- Erasmus, J. C., Van Noort, S., Jouselin, E., Greeff, J. M. 2007. Molecular phylogeny of fig wasp pollinators (Agaonidae, Hymenoptera) of *Ficus* section *Galoglychia*. *Zoologica Scripta*, 36(1), 61–78. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2007.00259.x>
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Worheide, G., 2006. CO1 phylogenies in diploblasts and the ‘Barcoding of Life’—are we sequencing a suboptimal partition? *Mol. Ecol. Notes* 6, 550–553.
- Fabry, S., Köhler, A., Coleman, A. W. 1999. Intraspecies analysis: comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), 94–101.
- Fenn, J. D., Song, H., Cameron, S. L., Whiting, M. F. 2008. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49,59–68.
- Forster, J. R. 1778. Observations made during a voyage round the world, on physical geography, natural history, and ethic philosophy. G. Robinson, London.
- Francis, A. P., Currie, D. J. 2003: "A Globally Consistent Richness-Climate Relationship for Angiosperms.," *The American Naturalist* 161, no. 4 : 523-536.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*; Cambridge University Press 2. Edition: Cambridge, UK, 642 p.
- Frézal, L., Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727–736.
- Goldman, W. E., G. Goldberg, L. H. Bowman, D. Steinmetz, and D. Schlessinger. 1983. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1488–1500.
- Gomez-Zurita, J. 2000. Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer (its2) in the timarctid leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae), 9(6), 591–604.
- Good, L., Intine, R. V. A., & Nazar, R. N. 1997. Interdependence in the processing of ribosomal RNAs in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Molecular Biology*, 273(4), 782–788.

- Goodall-Copestake, W. P., Tarling G. A., Murphy E. J., 2012. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*. 109(1): 50-56.
- Green, David M. 2005. "Designatable Units for Status Assessment of Endangered Species." *Conservation Biology* 19 (6): 1813–1820.
- Gutell, R. R., Larsen, N., Woese, C. R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* 58: 10–26.
- Hackett, B. J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., Costantini, C., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., Besansky, N. J. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Molecular Biology*, 9(March), 369–374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00198.x>
- Haig, S. M., Beever, E. A., Chambers, S. M., Draheim, H. M., Dugger, B. D., Dunham, S., Sheffield, L. M. 2006. Taxonomic considerations in listing subspecies under the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology*, 20(6), 1584–1594.
- 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*, 103(4), 968–971.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167–172.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.
- Hamels, J., Gala, L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammateo, N. ve Remacle, J. 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques*, 31, 1364–1372.
- Harpke, D., Peterson, A. 2006. Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 579–593.
- Harrison, S. , Safford, H. D., Grace, J. B., Viers, J. H. and Davies, K. F. 2006, Regional And Local Species Richness In An Insular Environment: Serpentine Plants In California. *Ecological Monographs*, 76: 41-56.
- Hausner, G., Wang, X. 2005 Unusual compact rDNA gene arrangements within some members of the Ascomycota: evidence for molecular co-evolution between ITS1 and ITS2. *Genome* 48, 648–660
- Hawkins, B. A., Field, R. , Cornell, H. V., Currie, D. J., Guégan, J. , Kaufman, D. M., Kerr, J. T., Mittelbach, G. G., Oberdorff, T. , O'Brien, E. M., Porter, E. E. and

- Turner, J. R. 2003, Energy, Water, And Broad-Scale Geographic Patterns Of Species Richness. *Ecology*, 84: 3105-3117.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10).
- Hebert, P. D. N., Gregory, T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859.
- Hennig, W., 1966. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hitchen, J., Ivakine, E., Melekhovets, Y. F., Lalev, A., Nazar, R. N., 1997. Structural features in the 3' external transcribed spacer affecting intragenic processing of yeast rRNA. *J Mol Biol.* 12;274(4):481–490.
- Hobbs, J. P. A., Herwerden, L. van, Jerry, D. R., Jones, G. P., & Munday, P. L. 2013. High genetic diversity in geographically remote populations of endemic and widespread coral reef angelfishes (genus: *Centropyge*). *Diversity*, 5(1), 39–50.
- Hull, David L. 1975. "The Ontological Status of Species as Evolutionary Units." In *Foundational Problems in the Special Sciences: Proceedings of the Fifth International Congress of Logic, Methodology, and Philosophy of Science*, London, Ontario, Canada, edited by Robert E. Butts and Jaakko Hintikka. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland. 444p.
- Hung, Y. T., Chen, C. A., Wu, W. J., Lin, C. C., Shih, C. J. 2004. Phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 in *Strumigenys* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 407–415.
- Hurst, G.D., Jiggins, F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. Biol. Sci.* 272, 1525–1534.
- Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Burns, J. M., Hallwachs, W., Remigio, E., Hebert, P. D. N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1835–1845.

- Jarman, S.N., Elliott, N.G. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *J. Evol. Biol.*, 13, 624–633.
- Joseph, N., Krauskopf, E., Vera, M. I., Michot, B. 1999. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research*, 27(23), 4533–4540.
- Karabag, T. 1950. Some new Decticinae (Orthoptera, Tettigoniidae) from Turkey. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*, 19 (B), 157–161.
- Karabag, T. 1951. Revision of the genus *Anterastes* Brunner (Orthoptera, Tettigoniidae). *Annals and Magazine of Natural History*, 4, 1043–1051.
- Kaya, S., Ciplak, B. 2011. Taxonomy of *Anterastes* and related genera: a new synonym and a new species of *Anterastes*. *Zootaxa*, 2771, 41–52.
- Kaya, S., Chobanov, D., Ciplak, B. 2012a. *Anterastes davrazensis* sp. n. (Orthoptera, Tettigoniidae): morphology, song and 16S rDNA phylogeny. *Zootaxa*, 3401, 49–59.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Keller, A., Förster, F., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., & Wolf, M. 2010. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct*, 5(1), 4.
- Knowlton, N., Weigt L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260, 1629–1632.
- Kreft, H. and Jetz, W. 2010, A framework for delineating biogeographical regions based on species distributions. *Journal of Biogeography*, 37: 2029-2053.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369–8374.
- Kress, W.J., Erickson DL. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(8):2761-2762.
- Kutschera, U. 2011. From the scala naturae to the symbiogenetic and dynamic tree of life. *Biology Direct*, 6, 1–25.
- Laikre, L., Allendorf, F. W., Aroner, L. C., Baker, C. S., Gregovich, D. P., Hansen, M. M., Waples, R. S. 2010. Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity. *Conservation Biology*, 24(1), 86–88.

- Lambert, D. M., and H. G. Spencer (eds.) 1995. Speciation and the recognition concept: Theory and application. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Lee, Y., Melekhovets, Y. F., & Nazar, R. N. 1995. Termination as a factor in “quality control” during ribosome biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28003–5.
- Levin S.A. (ed.). 2001. *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, San Diego, CA. 4666 pp.
- Li, D.-Z., Gao, L.-M., Li, H.-T., Wang, H., Ge, X.-J., Liu, J.-Q., Duan, G.-W. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641–19646.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Lim, J., Kim, S.Y., Kim, S., Eo, H.S., Kim, C.B., Paek, W.K., Kim, W. ve Bhak, J. 2009. BioBarcode: a general DNA barcoding database and server platform for Asian biodiversity resources. *BMC Genomics*, 10(Suppl 3):S8.
- Linnaeus, C. 1735. *Systema naturae, sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera et species*, Lugduni Batavorum, 12 pp.
- Lodé, T. 2013. “Adaptive Significance and Long-Term Survival of Asexual Lineages.” *Evolutionary Biology* 40 (3): 450–460.
- Mai, J.C., Coleman, A.W., 1997. The Internal Transcribed Spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *J. Mol. Evol.* 44, 258–271.
- Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends Ecol. Evol.* 10: 294–299.
- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Di Luca, M., & Severini, C. 1999. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Molecular Biology*, 8(4), 469–480.
- Marris, E. 2007. What to let go. *Nature* 450:152 – 155.
- Marshall, E. 2005 Taxonomy. Will DNA bar codes breathe life into classification? *Science* 307, 1037.
- Masters, J. C., R. J. Rayner, I. J. McKay, A. D. Potts, D. Nails, J. W. Ferguson, B. K. Weissenbacher, M. Allsopp, and M. L. Anderson. 1987. The concept of species: Recognition versus isolation. *S. Afr. J. Sci.* 83: 534–537.

- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pages 381–424 in *Species: The units of biodiversity* (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds.). Chapman and Hall, London.
- Mayr E, Provine B (eds). *The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology; with a new preface by Ernst Mayr*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1998. (1st Edn: 1980).
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Cambridge, Harvard University Press.
- MCNeely, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A., Werner, T.B. 1990. *Conserving the World's biological diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.
- Melekhovets, Y. F., Good, L., Abou Elela, S. and Nazar, R. N. 1994. *J. Mol. Biol.*, 239, 170–180.
- Michener, C. D. 1970. Diverse approaches to systematics. *Evol. Biol.* 4: 1–38.
- Mishler, B. D. 1985. The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *Bryologist* 88:207–214.
- Mishler, B. D., & Wilkins, J. S. 2018. The Hunting of the SNaRC: A Snarky Solution to the Species Problem. *Philos Theor Pract Biol*, 10(1), 1–18.
- Morell, V. 1999. The variety of life. *National Geographic Magazine* 195 (February): 6–32.
- Moritz, C. and Ke B. 2011. “Spontaneous Speciation by Ploidy Elevation: Laboratory Synthesis of a New Clonal Vertebrate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (24): 9733–9734.
- Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J., & Wolf, M. 2007. Distinguishing species. *RNA*, 13(9), 1469–1472.
- Myers N, Knoll A. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 5389–5392.
- Naeem, S., D.E. Bunker, A. Hector, M. Loreau, and C. Perrings (eds.). 2009. *Biodiversity, Ecosystem Functioning, & Human Wellbeing: An Ecological and Economic Perspective*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Nelson, G., and N. I. Platnick. 1981. *Systematics and biogeography*. Columbia University Press, New York.
- Nimis, P., & Lebbe, R. V. 2010. Strength and Limitations of DNA Barcode under the Multidimensional Species Perspective. *Researchgate.Net*, 275–280.
- Nixon, K. C., and Q. D. Wheeler. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211–223.

- Oh, H. K., Yoon, H. J., Kim, M. J., Jeong, H. U., Kim, S. R., Hwang, J. S., Kim, I. 2009. ITS2 ribosomal DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). *Genes & Genomics*, 31(4), 293-303.
- Oh, H. K., Yoon, H. J., Kim, M. J., Jeong, H. U., Kim, S. R., Hwang, J. S., Kim, I. 2013. Population Genetic Structure of the Bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae), Based on Mitochondrial COI Gene and Nuclear Ribosomal ITS2 Sequences. *Int. J. Indust. Entomol.* 27(1) 142-158
- Ospovat, D. 1977. Lyell ' s Theory of Climate. *Journal of the History of Biology*, 10(2), 317–339.
- Papworth, S., Rist, J., Coad, L. and Milner-Gulland, E. 2009, Evidence for shifting baseline syndrome in conservation. *Conservation Letters*, 2: 93-100.
- Paredes-Esquivel, C. C., Townson, H. 2014. Functional constraints and evolutionary dynamics of the repeats in the rDNA internal transcribed spacer 2 of members of the *Anopheles barbirostris* group. *Parasites & Vectors*, 7, 106. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-106>
- Paterson, H. E. H. 1985. The recognition concept of species. Vrba ES (ed) *Species and speciation*. Ss. 21–29, Transvaal Museum, Pretoria.
- Peyretailade, E., Biderre, C., Peyret, P., Duffieux, F., Méténier, G., Gouy, M., Michot, B., Vivaré, C. P. 1998. Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Research* 26(15):3513-3520.
- Poczai, P., Hyvönen, J. 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects. *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1897–1912.
- Primack, R. 2010. *Essentials of Conservation Biology*. 5th Edition. Sinauer Associates.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A., 2012. FigTree v. 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rampersad, S. N. 2014. ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato species complex. *SpringerPlus*, 3(1), 684.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. 2007. BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(April 2016), 355–364.
- Reydon, Thomas A. C. 2005. *Species as Units of Generalization in Biological Science: A Philosophical Analysis*. Rotterdam: Self-published. 153 p.

- Ridley, M. 1989. The cladistic solution to the species problem. *Biol. Philos.* 4:1–16.
- Rosen, D. E. 1979. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 162:267–376.
- Roser, M. 2018. "Future Population Growth". *Published online at OurWorldInData.org*. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/future-population-growth' [Online Resource].
- Rot, C., Goldfarb, I., Ilan, M., Huchon, D., 2006. Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria. *BMC Evol. Biol.* 6 (71).
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- RStudio Team, 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Kirk, P. M. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, 10(4), 1–60.
- Ruhl, M. W., Wolf, M., & Jenkins, T. M. 2010. Compensatory base changes illuminate morphologically difficult taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 664–669.
- Sapp, J. 2003. *GENESIS: The Evolution of Biology*, Oxford University Press, New York, 384p.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 1879–1888.
- Schliep, K. P. 2011. phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592–593.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Schultz, J., & Wolf, M. 2009. Molecular Phylogenetics and Evolution ITS2 sequence – structure analysis in phylogenetics : A how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2), 520–523.

- Schultz, J., Maisel S, Gerlach D, Müller T, Wolf M. 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11(4):361-364.
- Scicluna, S. M., Tawari, B., & Clark, C. G. 2006. DNA barcoding of Blastocystis. *Protist*, 157(1), 77–85.
- Sclater, P. L. 1858, On the general Geographical Distribution of the Members of the Class Aves, *Zoological Journal of the Linnean Society*, Volume 2, Issue 7, Pages 130–136.
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., M. Wolf, 2006. 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:498.
- Seibel, P.N., Müller T, Dandekar T., M. Wolf, 2008. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE *BMC Research Notes* 2008, 1:91.
- Selig, C., Wolf, M., Muller., Dandekar T., Schultz J., 2008. The ITS2 database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. *Nucl Acids Res* 36:D377–D380.
- Sequencher® version 4.0.1 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA
- Simpson, G. G. 1951. The species concept. *Evolution* 5:285–298.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the under- explored “rare biosphere.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12115–12120.
- Sokal, R. R., and T. J. Crovello. 1970. The biological species concept: A critical evaluation. *Am. Nat.* 104:127–153.
- Steffen, W., Broadgate, W., Deutsch, L., Gaffney, O., & Ludwig, C. 2015. The trajectory of the anthropocene: The great acceleration. *Anthropocene Review*, 2(1), 81–98.
- Stouthamer, R., Gai, Y., Koopmanschap, A. B., Platner, G. R., & Pinto, J. D. 2000. ITS-2 sequences do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95(1), 105–111.
- Strugnell, J.M., Lindgren, A.R., 2007. A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns. *Rev. Fish Biol. Fish.* 17, 337–344.

- Summerbell, R. C., Levesque, C. A., Seifert, K. A., Bovers, M., Fell, J. W., Diaz, M. R., Boekhout, T., de Hoog, G. S., Stalpers, J., Crous, P. W. 2005. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1897–1903.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.
- Tamura, K., Dudley J, Nei, M. & Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. Pages 3–27 in *Speciation and its consequences* (D. Otte and J. A. Endler, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Templeton, A. R. 1998a. Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. Pages 32–43 in *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, New York.
- Thalmann, O., Hebler, J., Poinar, H.N., Paabo, S., Vigilant, L., 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Mol. Ecol.* 13, 321–335.
- Thanwisai, A., Kuvangkadilok, C., & Baimai, V. 2006. Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica*, 128(1–3), 177–204.
- Torres-Suarez, O.L., 2014. *Gorgonia mariae* and *Antillogorgia bipinnata* populations inferred from compensatory base change analysis of the internal transcribed spacer 2. *Mol. Phylogenet. Evol.* 79, 240e248
- Ullrich, B., Reinhold, K., Niehuis, O. & Misof, B. 2010. Secondary structure and phylogenetic analysis of the internal transcribed spacers 1 and 2 of bush crickets (Orthoptera: Tettigoniidae: Barbitistini). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48(3), 219–228.
- Uvarov, B. P. 1934. Studies in the Orthoptera of Turkey, Iraq and Syria. *Revista Espanola de Entomologia*, Madrid, 10, 21–119.
- Uvarov, B. P. 1939. New and less-known Palaearctic Tettigoniidae. *Annals and Magazine of Natural History*, 4, 132–138.
- Ünal, M. 2000. A new *Anterastes* Brunner von Wattenwyl from Turkey (Orthoptera: Tettigoniidae). *Centre for Entomological Studies, Miscellaneous Papers*, 65/66, 5–7.
- van Rensburg, B. J., Chown, S. L., Gaston, K. J. 2002. "Species Richness, Environmental Correlates, and Spatial Scale: A Test Using South African Birds.," *The American Naturalist* 159, no. 5: 566-577.
- Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25:233–239.

- Vaughn, C. C. 2010. Biodiversity Losses and Ecosystem Function in Freshwaters: Emerging Conclusions and Research Directions. *BioScience*, 60(1), 25–35.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., Mencke, N., Blagburn, B. L., Bond, R., Bledsoe, D. 2004. Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94(3), 219–226.
- Wagener, B., Reineke, A., Löhr, B., & Zebitz, C. P. W. 2006. Phylogenetic study of *Diadegma* species (Hymenoptera: Ichneumonidae) inferred from analysis of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Biological Control*, 37(2), 131–140.
- Wallace, A. R. 1876. The geographical distribution of animals; with a study of the relations of living and extinct faunas as elucidating the past changes of the Earth's surface. New York: Harper & Brothers. Volume 1, 503 p.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. ve Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 1716, 11.
- Weekers, P. H. H., De Jonckheere, J. F., & Dumont, H. J. 2001. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(1), 89–99.
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., Hoffmann, A.A., 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *Plos Biol.* 5 (5).
- Wegener, A., & von Huene, R. 2002. The origins of continents. *International Journal of Earth Sciences*, 91, S4–S17.
- Wesson, D. M., Porter, C. H., & Collins, F. H. 1992. Sequence and secondary structure comparisons mosquitoes (Diptera: Culicidae) of ITS rDNA in. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(4), 253–269.
- Wiemers, M., Keller, A., & Wolf, M. 2009. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 300.
- Wiley, E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27: 17–26.
- Willams, S.T., Knowlton, N., 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1484–1493.

- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60 (5), 1136–1151.
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., Ankenbrand, M., & Müller, T. 2013. Compensatory Base Changes in ITS2 Secondary Structures Correlate with the Biological Species Concept Despite Intragenomic Variability in ITS2 Sequences - A Proof of Concept. *PLoS ONE*, 8(6), 1–5.
- Wolf, M., Koetschan, C., & Müller, T. 2014. ITS2, 18S, 16S or any other RNA - simply aligning sequences and their individual secondary structures simultaneously by an automatic approach. *Gene*, 546(2), 145–149.
- Wright, S. 1940. Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalists* 74, 232-48.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y. ve Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, 5(10).
- Yeh, L-C. C., Lee, J. C., 1990 Structural analysis of the internal transcribed spacer 2 of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 211:699–712.
- Young, I., Coleman, A. W. 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: A *Drosophila* example. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), 236–242.
- Zuker, M., Jacobson, A. B. 1998. Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *Rna*, 4(6), 669–679.

ÖZGEÇMİŞ

ONUR ULUAR

onuruluar@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans Yatay Geçiş, 2017 – 2018	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2015 - 2017	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara
Lisans 2011-2015	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2017- Devam Ediyor	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya
---	---

ESERLER:

Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Uluar O., Elverici C., Ada E., Perktaş U. The Pleistocene history of a passerine bird species: phylogeography and ecological niche modeling of the blackcap. 2nd Ecology and Evolutionary Biology Symposium, August 6-7, 2015, Turkey. (Poster Sunumu)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Subaşı B., Özsoy B., Gözübüyük M., Yörgüç C., **Uluar O.**, Ayhan N., Güler P., Önder B. Ş. Farklı yüksekliklerden toplanmış *Drosophila melanogaster* populasyonlarında soğuk direncinin ve vücut büyüklüğü ile ilişkisinin araştırılması. 20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 24-27 Haziran 2013, Bülent Ecevit Üniversitesi, Zonguldak, Türkiye. (Poster Sunumu)