ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METABARKODLAMA VE BİYOİNFORMATİK ENTEGRASYON İLE YÜKSEK VERİMLİ BÖCEK BİYOİZLEME

Metehan Arıkan

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Emre Keskin

Aralık

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Metehan Arıkan

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Metabarkodlama ve Biyoinformatik Entegrasyon ile Yüksek Verimli Böcek Biyoizleme

Metehan Arıkan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Emre Keskin

Belirli bir habitatta yaşayan canlı çeşitliliğini araştırmak ve o habitatın yapısını çözmek hep bir merak odağı olmuştur. Günümüzde dünya üzerinde birçok araştırmacı tarafından yürütülen çalışmalarda tanımlanan türler ve türler arası ilişkiler ortaya konmaktadır. Son yıllarda canlılarla yapılan çalışmalarda moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler sayesinde faunayı, taksonomi uzmanı olmaksızın mevcut yöntemlerden daha hassas ve daha hızlı bir şekilde listelemek mümkün olmaktadır. Bu çalışmalar içerisine böcek türlerinin tespitinde görece uzun süren arazi çalışmaları, tür teşhislerindeki zorluklara karşı yeni bir protokol geliştirilmesi ve mevcut DNA referans kütüphanelerinde kayıt altına alınması ulusal ve uluslararası düzeyde önem taşımaktadır. Bu noktadan hareketle bu çalışmada biyolojik çeşitlilik açısından önemli olan böcekler üzerinden yeni bir protokol oluşturulmuştur. Bu protokol ile çevre araştırmalarında hızlı bir şekilde sonuç alınabilecektir.

2021, 123 sayfa

Anahtar kelimeler: Metabarkodlama, Biyoinformatik, Yüksek Verimli Dizileme, Böcekler, Biyolojik İzleme

ABSTRACT

MSc Thesis

High Throughput Insect Biomonitoring with Metabarcoding and Bioinformatics

Metehan Arıkan

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Emre Keskin

Researching the diversity of species that living in a particular habitat and solving the structure of that habitat has always been a focus of interest. Today, the defined species and inter-species relations are revealed in studies carried out by many researchers around the world. In recent years, molecular methods have been used in research with species. Thanks to these methods, it is possible to list the fauna more precisely and faster than the existing methods without a taxonomy expert. Among these studies, relatively long field studies in the detection of insect species, developing a new protocol against the difficulties in species identification and recording it in existing DNA reference libraries are of national and international importance. From this point of view, in this study, a new protocol was created on insects, which are important in terms of biological diversity. With this protocol, it will be possible to get results quickly in environmental research and the results will be recorded.

2021, 123 pages

Keywords: Metabarcoding, Bioinformatics, High Throughput Sequencing, Insects, Biomonitoring

TEŞEKKÜR

Başta hayatımın tümünde karşılıksız desteklerini sunan, her şeyimi borçlu olduğum aileme,

Eğitimimin başından beri benden hiçbir yardımını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Emre Keskin'e,

Çok sevdiğim ve pek çok eğlenceli anımı paylaştığım Evrimsel Genetik Laboratuvarı ekibine,

TEŞEKKÜRLER!

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Bp	Baz çifti
DNA	Deoksiribonükleik asit
L	Litre
BOLD	Barcode of Life Database
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
uM	Mikromolar
dk	Dakika
sn	Saniye

1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanlar etkileşimde bulundukları çevre hakkında devamlı bir merak içerisindedir. Bu merak ile canlıları gözlemlemiş, kayıt tutmuş ve onları isimlendirmiştir (1). Canlılar arasında birey ve tür sayısı bakımından en zengin takson olarak böcekler yer almaktadır (1-3). Bu özellikleri sayesinde dünyanın her coğrafyasında ve her ekosistemde böceklerle karşılaşmak mümkündür. Omurgasız canlılar arasında Arhtropoda şubesinde Insecta sınıfında yer alırlar. Morfolojik ve gelişimsel özelliklerine (örn. kanat yapısı, embriyonik olarak kanat bulundurup bulundurmama, başkalaşım tipi), fiziksel yapılarına (ağız yapısı, vücut segmentleri, kanat yapıları) göre farklı takımlara ve familyalara ayrılırlar.

Böcekler yaşadıkları habitatta birçok farklı canlıyla etkileşim halinde bulunurlar. Bu etkileşim av-avcı ilişkisinden, parazitliğe kadar geniş yelpazede değerlendirilebilir. Diğer canlılarla etkileşimlerinin yanı sıra böcekler kendi içinde de etkileşimde bulunurlar. Canlıların birbiriyle olan etkileşimlerini anlamak, dünyanın işleyiş dinamiklerini öğrenmek ve olası gelecek senaryolarını çizebilmek açısından önemlidir. Bu nedenle dünyada yaşayan canlıların en kalabalık sınıfı olan böceklerin biyolojilerini, ekolojilerini ve doğal sınıflandırılmalarını anlamak, insan için hayati olarak adlandırılabilecek iklim değişimi, tarım, bulaşıcı hastalıklar gibi birçok etkeni anlayabilmek için kilit rol oynar. Günümüzde canlı taksonomisi ve canlı davranışları, böceklerin sınıflandırılması ve sistematiğinde klasik verilerle birlikte biyocoğrafya, ekoloji, genetik, moleküler biyoloji gibi biyolojinin temel alt disiplinleri kullanılarak araştırılmaktadır. Tarihsel gelişim sürecinde Carl Von Linneaus'den bugüne gelen, canlıları morfolojik gözleme dayalı sınıflandırma, gelişen teknoloji ve bilgi birikimi ile canlıların genetik materyalleri kullanılarak yapılan moleküler genetik analizler ile hızlı ve pratik olan ve insanın doğası gereği var olan ikilemleri ortadan kaldıran bir sistem olarak yapılabilme olanağı sunmaktadır. Gelişen bilgi ve teknolojik olanaklar klasik takson tanımı anlayışını sorgulamış olup morfolojik tür anlayışından filogenetik tür yaklaşımına doğru evrilen ve farklı canlı gruplarının taksonomik problemlerine çözüm üreten çeşitlilikte tür tanımları ortaya çıkmıştır. Gelinen noktada canlıların DNA'sı kullanılarak tür/cins/familya düzeyinde tanımlama yapabilen filogenetik benzerlik ile ilişik gen bölgeleri kullanılmaktadır (4-7). Bu şekilde tanımlama yapmayı sağlayan yöntemin adı DNA barkodlamadır. DNA barkodlama/Metabarkodlama yöntemi ile yapılan analizlerin sonucu genlere ait dizilerin günümüz teknolojisi ile dizilenmesiyle elde edilen veri dünyanın tüm

her yerinden araştırmacılara açık platformlarda paylaşılması hem bilimsel doğrulama ortamını oluşturmak hem de dünya ve canlıları anlayabilmek adına gerekli bilgi birikimini oluşturmak açısından olumlu bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Metabarkodlamanın cevap üretmeye çalıştığı sorular şunlardır;

- Tüm canlıların DNA barkod dizileri ortaya çıkarılabilir mi?
- Taksonlara ilişkin tanım ve sınıflandırma girişimlerini sadece DNA dizilerine göre yapabilmek olası mıdır?
- Biyoçeşitliliği dijital kayıtlar haline getirebilir miyiz?

Bu tezde örnekleme için Bozalan/Muğla bölgesi seçilmiştir. Bu bölge canlı çeşitliliği ve bolluğu açısından zengin bir bölgedir. Aynı zamanda biyolojik sıcak nokta olarak nitelendirilen Akdeniz kıyısındadır (8). Ancak gelişen turizm, artan nüfus ve termik santral gibi olası ekosistem harabiyetine neden olan bölgelerin ortasında yer almaktadır. Bu şekildeki koruma gereksinimi bulunan bölgeleri izlemek ve çevre değişikliklerini yakından takip edebilmek amacıyla çevre araştırmalarının önemi artmaktadır. Gerekli koruma planlarının oluşturulması için biyoizleme çalışmaları yapılmaktadır. Bu nedenle Bozalan ’da böcek çeşitliliği ve bolluğunu öğrenmek amacıyla, vejetasyon döneminde Malaise tuzağı (Malaise trap) kullanılarak örnekleme yapılmıştır. Aynı zamanda bu tezde geliştirilen yeni protokol denenmiştir. Bu örnekleme sonrasında DNA Metabarkodlama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile bölgeye ait tür bilgi listesi çıkarılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. TAKSONOMİ VE TÜR ADLANDIRMALARI

Dünya gezegeninde insan var olduğundan bu yana çevreyle hep etkileşim halinde olmuştur. Yaşadığı coğrafyaya uyum sağlamış ya da yaşamın daha kolay olduğu bölgelerde popülasyon oluşturmuştur. Bu süreçte besin olarak kullanmak başta olmak üzere faydalanmak ve kullanmak için canlılarla iç içe olmuşlardır. Bu etkileşim sürecinde belirli kelimeler ve sesler ile canlıları adlandırmışlar ve tanımlamaya çalışmışlardır. Bilim tarihine bakıldığında ise M.Ö. 4. Yüzyıllara dayanan canlı canlı sınıflandırma girşimi karşımıza çıkmaktadır. İlk olarak Yunan filozof Aristo çevresinde gördüğü canlılar belirgin farklılıklarına göre adlandırmış ve bunları kayıt altına almıştır. Bu sınıflandırma oldukça basit olup sadece canlının özelliğini taşıyan bir sisteme dayanır. (boy, kilo, ayak sayısı vb.) Tarihsel süreçte biyoloji bilimi açısından çok önemli bir olgu olan Carl von Linné tarafından ortaya atılan binomial (ikili) adlandırma kullanılmaya başlamıştır (9). Tür ve cins ismi olarak iki kelimeden oluşan bu isimlendirme sonrası taksonomi bilimi gelişmeye başlamıştır. Çevrede görülen canlıların sınıflandırılması ne için kullanılabileceği, morfolojik özelliği, yaşadığı ekosistem dahil olmak üzere birçok parametrede canlılar adlandırılmaya başlanmıştır. Daha sonraları Alexander von Humboldt ile beraber canlıların dünya üzerinde dağılımları ve benzer iklim koşullarında benzer canlıların görülmesiyle biyocoğrafya bilimi keşfedilmiştir (10, 11). Bu gelişmeler sayesinde taksonomi ve canlılar evrensel bir araştırma noktasına gelmiştir. Zamanla dünyadaki canlıların birçoğu adlandırılmış ve benzerlik ilişkilerine göre akrabalık durumları ortaya konmuştur.

2.2. DNA BARKODLAMA

Canlıların genetik materyali kullanılarak yapılan tür, cins, familya düzeyinde moleküler teşhis yöntemi DNA barkodlama olarak adlandırılır (12). Canlı DNA'sının laboratuvar koşullarında elde edilmesinin ardından türe özgü ya da evrensel primerlerle barkod bölgeleri sentetik olarak çoğaltılır. Bu barkod bölgelerini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılır. Çoğaltılan barkod bölgelerinin dizilenmesi sonucu nükleotid dizileri elde edilmiş olur. Tek bir birey üzerinden devam eden bu iş akışı sonucu o bireye ait barkod bölge dizisi ortaya çıkarılmış olur. Bu aşamadan sonra barkodlama, canlının tür

bilgilerini bir barkod dizisine entegre edilerek oluşturulur. Barkod dizisine türün adı, familyası, yaşadığı bölge ve popülasyon bilgileri entegre edilerek barkod indeks bilgileri (BIN) oluşturulur. Bu barkod dizileri daha sonra araştırmalarda kullanılmak üzere dijital olarak veri tabanında saklanır. Bu şekilde daha sonra yapılan araştırmalarda canlıların yalnızca barkodları kullanılarak bilgilerine ulaşılır. Bu yöntem insan kaynaklı ikilemleri ortadan kaldırarak canlı araştırmalarında büyük kolaylıklar sağlar.

DNA barkodlamada COI, COI2, 16S, 12S gibi gen bölgeleri kullanılır (7, 13, 14). Bu bölgelerin seçilmesinin asıl amacı tür içi nükleotid dizilerinin aynı olması, türler arası farklılıkların bulunmasıdır. Dolayısıyla bir canlının tür adı ve cins adına erişebilmek için elde edilen barkod bölge dizileri o canlıyı diğer yakın türlerden ayırabilecek özgünlükte olmalıdır. Bu özgünlüğün bulunduğu bölgelere göre tek zincirli, barkod bölgesine uygun primerler tasarlanır. PZR yöntemiyle çoğaltılan bölgeler sonucunda da türler hakkında yorum yapılabilir, yeni araştırma soruları oluşturulabilir.

2.3. DNA METABARKODLAMA

Tek bir canlı birey üzerinden işleyen DNA barkodlama yöntemi, aynı anda birden çok bireyle çalışmaya uyarlanırsa bu yöntem DNA Metabarkodlama olarak adlandırılmaktadır (15, 16). DNA Barkodlamada tek bir bireye ait DNA dizileri ve Sanger dizileme metodu kullanılır. Bu metotla sentetik olarak çoğaltılan barkod bölgelerinin nükleotid dizisine ulaşılmış olur. Fakat birden çok bireyle, farklı DNA dizileriyle, çalışmak için Sanger metodu yetersiz kalmaktadır (17). Sanger metodu aynı diziden oluşan tek tip DNA ile çalışabilir. Bunu aşmak için Illumina, PacBio, Ion Torrent, Oxford Nanopore gibi Yüksek Verimli Dizileme Sistemleri kullanılmaktadır (18-22). Bu sistemler sayesinde karışık birçok DNA/RNA dizi bilgileri aynı anda, tek bir reaksiyon sonunda öğrenilebilir (19, 23). Bu nedenle barkodlama tek bir bireyle sınırlı kalırken, metabarkodlamada çalışılacak canlı sayısının bir sınırı yoktur. Tüm bu üstünlükleri ile Metabarkodlama, çevre ve ekosistem araştırmalarında biyoçeşitliliği ortaya çıkarmak amacıyla kullanılabileceği gibi sağlık ve tıp alanında mikrobiyom çalışmalarında da ağırlıklı olarak kullanılmaktadır (24-26).

2.4. BÖCEKLERDE METABARKODLAMA

Canlıların nükleotid dizilerinin kullanılmasıyla yapılan tanımlamaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ökaryotik canlılardan prokaryotlara ve hatta virüsler de dahil olmak üzere metabarkodlama yapılabilmektedir. Böceklerde metabarkodlama da çokça çalışılmaktadır. Bu çalışmalar bölgeye özgü veya türe özgü olabilmektedir. Bazı soyu tükenmekte olan böceklerle de bu çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmaların sonucunda elde edilen dijital veriler ve moleküler kayıtlar canlıyı izleme ve gelecek senaryoları oluşturma açısından önemli olmaktadır. Örneğin dünya popülasyonunun riskte olduğu yusufçuk türleriyle (Dragonfly) yapılan çalışmalarla popülasyon tahminleri yapılmakta ve tehlikede olan türler net bir şekilde ortaya konabilmektedir (27, 28). Böceklerin gözlenmesi ve yakalanması uzun süren ve iş gücü isteyen arazi çalışmalarını gerektirmektedir. Bu gereksinim nedeniyle arazide tüm böcekleri kapsayacak şekilde tür tanımlamalar yapılamamaktadır. Bu durumun yanı sıra taksonomistler geniş grupların taksonomik problemlerinin çözümünün uzun zaman alması gibi güçlükler nedeniyle takım düzeyinde uzmanlaşabilmektedir. Çok fazla çeşitlilik barındıran canlılar olmaları ve sibling türler veya filogenetik olarak yakın zamanda ayrışmaya başlamış türlerde taksonları ayırma gibi sorunlarla birlikte insan bilgi birikiminin bu çeşitliliğe yetemeyeceğidir. Hatta arazi şartlarında tanımlama yapılamayacak derecede minör farklılıklar barındıran türler bulunmaktadır. Bu sebeple laboratuvar altyapısı gerekebilmektedir. Mikroskop altında yapılan morfolojik tür tanımlamalarında çok küçük fiziksel detaylar türleri birbirinden ayırmaktadır. Bu nedenle her takımın kendi içinde tür teşhisi yapılması gerekmektedir. Ayrıca türlerin yaşadıkları coğrafyaya göre farklılıkları bulunmakta tür teşhislerinde ikilemler yaratabilmektedir. Moleküler teşhis yöntemleriyle yalnızca böceklerde değil diğer tüm canlıların teşhisinde ikilemleri ortadan kaldırmaya yönelik sistemler geliştirilmektedir. Metabarkodlama çalışmalarında en önemli aşamalardan biri canlılardan DNA eldesidir. Böceklerde yapılan çalışmalarda böceklerin antenleri, bacakları veya tüm vücutları kullanılmaktadır (29). Karışık olan örneklerden DNA elde edebilmek için her bir canlıdan doku örneğinin tekrar bir karışım haline getirilerek izolasyon gerçekleştirilebildiği gibi direkt canlının kendisi homojen bir yapıya getirilerek de izolasyon gerçekleşebilmektedir (30). Bu noktadan hareketle böceklerde de diğer ökaryotlarda olduğu gibi 12S, 16S, COI, COX2 gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bu bölgelerden bazıları sadece belirli taksonlar için tanımlayıcıyken bazı bölgeler tür düzeyinde tanımlamalar yapabilmektedir. Yapılacak

çalışmanın amacına ve niteliğine göre uygun primer seçimi yapılması çalışmanın sonuçlandırılması açısından önem arz etmektedir. Dizileme kısmında ise yoğun olarak Illumina platformu kullanılmasının yanında PacBio ve Oxford Nanopore ile yapılan çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Bu şekilde çoklu platformlarla yapılan çalışmalar neticesinde veri doğruluğu birkaç farklı kanaldan sağlanmaktadır.

2.5. PRİMER TASARIMI VE PZR

Barkodlama ve Metabarkodlama yöntemlerinde, barkodlanacak canlıların taksonomik sınıflarına göre daha önceden tasarlanmış evrensel primerler kullanılır ya da çalışmaya özgün primerler tasarlanır (7, 31, 32). Bu primerler çalışmanın niteliğine göre seçilir. Örneğin, balıklar için yapılan çalışmada yalnızca balık türlerini moleküler olarak birbirinden ayırmayı sağlayan primerler kullanılabilir (33). Ya da çevresel örneklerin (su, dışkı, toprak vs.) omurgasız canlı kompozisyonu öğrenilmek istenirse omurgasız canlılara özgün evrensel primerler kullanılabilir. Evrensel primerler şubeye veya sınıfa özgü olabilir. Yalnızca o taksona ait türleri ortaya çıkarabilirken diğer taksonlarda gerekli işlevi görmez. Bu sayede verimli çalışan bir primer kullanılmış olur. Barkodlama için tasarlanan primerler kısa bölgelere (~100-300 bp) özgü olabileceği gibi genellikle uzun bölgelere (~500-1000 bp) de özgü olabilir (12). Kısa bölgeler genellikle metabarkodlama için kullanılır. Çünkü yüksek verimli dizileme için Illumina platformu bir standart haline gelmiş ve bu platformun kendi içinde sınırlamaları nedeniyle kısa bölgeler tercih edilmektedir. Literatürde bu şekilde önceden tasarlanmış birçok primere ulaşmak mümkündür.

2.6. YÜKSEK VERİMLİ DİZİLEME

İnsan genom projesiyle birlikte büyük bir teknoloji ihtiyacının olduğu fark edildi ve buna paralel olarak birçok bilimsel disiplin aynı amaç uğruna birleşmiş oldu (34). Bu sayede geliştirilen birçok yeni teknoloji biyoloji, biyoteknoloji araştırmalarında kullanılabilmiştir. Gen, genom dizilerinin bilinmesi birçok yeni bilimsel buluşa da katkı sağlamıştır. Örneğin insan genomunun bilinmesiyle nadir hastalıklarda rol alan genler tanımlanmış ve moleküler tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (35). Aynı şekilde insan dışındaki tüm canlıların genetik analizlerinin yapılabilmesi, insanın çevreyi anlayabilmesi ve sorunlara çözüm üretebilmesi açısından çok büyük rol oynamaktadır. Nükleotid dizilemenin son geldiği teknoloji günümüzde yüksek verimli dizileme olarak adlandırılmaktadır. Çok yüksek çıktılar

vermesinden ve büyük boyutta veri sağlamasından dolayı iş yükünü azaltmış ve sonuca varma sürecini kısaltmıştır. Buna da en iyi örnek insan genom projesi sürecinde her bir gen bölgesinin ayrı ayrı dizilenmesi ve daha sonra uygun genom bölgesine yerleştirilmesi işi yüksek verimli dizilemeyle günümüzde saatler hatta dakikalar almaktadır (36). Günümüzde kullanılan yüksek verimli platformları şu şekilde üreticilerinin isimleriyle bilinmektedir; Illumina, IoN Torrent, Oxford Nanopore, PacBio. Her yüksek verimli dizileme platformlarının kendine özgü yöntemleri bulunmaktadır. Fakat hepsinin ortak noktası yüksek verimle ve yüksek çıktıyla (0.1 GB- 6 TB) gen ve genomu dizileyebilmeleridir (37). Günümüzde en çok kullanılan ve kullanıcı tarafından da en çok geliştirilen dolayısıyla altın standart haline gelmekte olan Illumina platformudur. Bu platform tıp, sağlık, çevre gibi birçok alanda rutin olarak kullanılmaktadır (38).

Yüksek verimli dizileme sayesinde çok nadir dizileri tespit edebilmek mümkün hale gelmiştir. Karışık DNA örneklerinin dizilenmesi sonucu karışım içinde yoğunluğu düşük olan dizilerin de tespiti mümkün hale gelmiştir. Çevresel DNA çalışmalarında bu kullanım epey kullanışlı olmaktadır. Örneğin bir gölden elde edilmiş su örneğinde görece az sayıda ve bollukta bulunan canlıların ortama bıraktıkları DNA'yı (eDNA) tespit etmek için yüksek verimli dizileme platformları yol gösterici konumdadır.

2.7. VERİTABANLARI

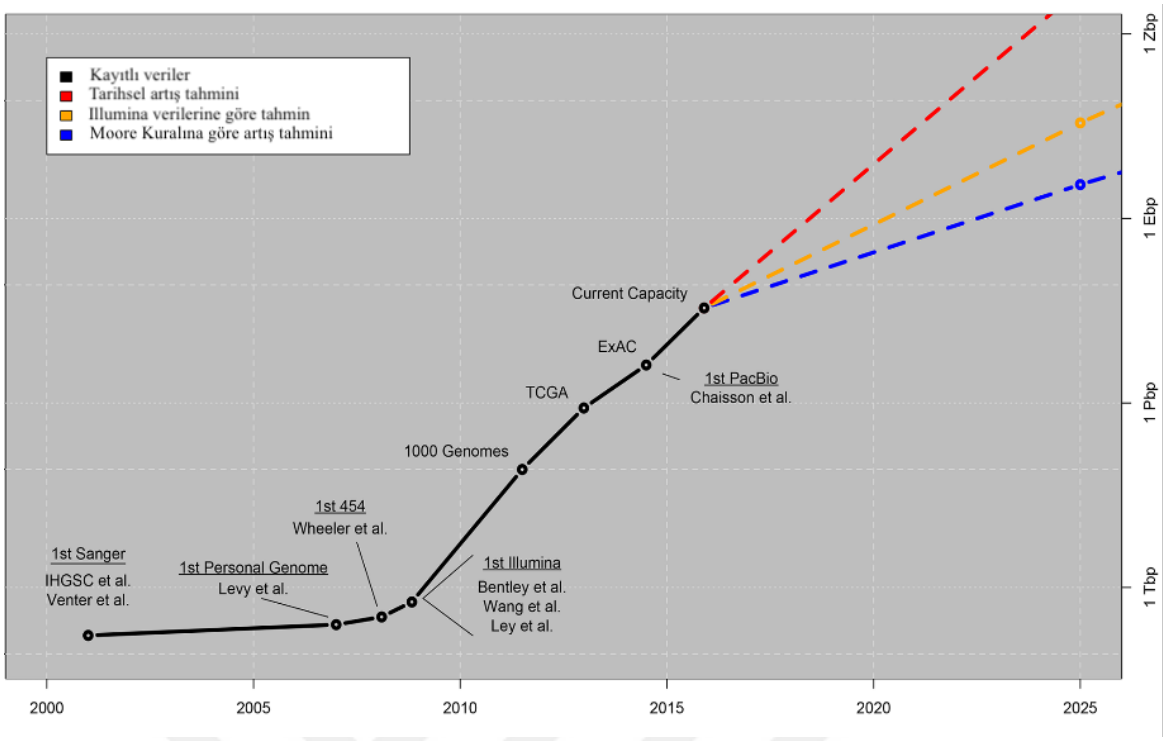
Genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik gibi yöntemlerin en önem arz eden kısmı elde edilen verileri dijital olarak depolamak, daha sonraki çalışmalarda kullanılabilir durumda saklamak ve aynı zamanda bu verilerin hem güvenirliğini hem güvenliğini sağlamaktır. Bunun için birtakım otoritelerce evrensel olarak araştırmacıların kullanımına açık dijital veritabanları kurulmuştur. Bu veritabanlarının dünya çapında en çok kullanılanına örnek olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) bir birimi olan National Center for Biotechnology Information (NCBI) verilebilir. Bu veri tabanında gen, genom, transkriptom, proteom vb. gibi çalışmalara ait verilere erişmek ve verileri saklamak mümkündür. Aynı zamanda bu veri tabanında yer alan verilere dayalı yeni çalışmalar tasarlamak, veri madenciliği gibi uygulamalar yapılabilmektedir. İnsan dışındaki tüm canlılara ait çoklu omik veriye ulaşılabilir. Bu gibi faydalarıyla çevre ve diğer canlılar için yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Örneğin canlıların barkodlanması sürecinde genomik bilgilerin burada depolanması ve analizler sonucu elde edilen barkod

dizisinin karşılaştırılması sonucu diziye ait bireyin taksonomik tüm bilgilerine erişebilmek mümkündür.

Genel veri tabanların yanı sıra tek bir amaca özgü veri tabanları da geliştirilmiştir. Tek bir canlıya, tek bir gene, tek bir bölgeye ait birçok veri tabanı bulunmaktadır. Araştırmacılar çalışmalarını bu veri tabanlarını kullanarak tasarlamaktadır.

2.8. BİYOİNFORMATİK

Genomik veri üretimi günden güne artmaktadır. "Astronomik veri" kullanımı artık "genomik" kelimesiyle yer değiştirmiş ve hesaplamalı bilimlerde yeni alanların oluşmasına ve rekabetin artmasına neden olmuştur (39). Üretilen her yeni veri tipi ve veri sayısı arttıkça yeni ihtiyaçlar ortaya çıkarmaktadır. Bu ihtiyaçların karşılanması için bilgisayar bilimlerinden faydalanılır. Yüksek işlem kapasiteli bilgisayarlar kullanılarak biyolojik veri anlamlandırılır. Bilgisayar biliminin gelişmesi ve biyolojik bilginin insan tarafından hesaplanamaz duruma gelmesiyle biyoinformatik disiplini gelişmiştir (40). Biyoinformatik kısaca sayısallaştırılmış biyolojik veriyi anlamlandırma olarak tanımlanır. Bunun için birçok farklı işlemciler, işletim sistemleri, farklı kodlama dilleri kullanılmaktadır. Bunun sebebi her yazılım ve donanımın belirli kısıtlamalarının olmasıdır. Genellikle UNIX tabanlı sistemler geliştirilmektedir. Açık kaynak kodlu olması, çoklu dosya işlemlerini sağlaması ve basit bir kullanıcı ara yüzü olması nedeniyle geliştiriciler tarafından tercih edilmektedir (41). Genomik veri analizi için ise dizileme platformlarına göre tasarlanmış araçlar kullanılır. Örneğin Illumina platformu için fastq formatında çalışabilir araçlar geliştirilmiştir. Diğer platformlara özgü çıktılar için de her geçen gün yeni araçlar geliştirilmektedir.



Şekil 2.1. Üretilen genomik verinin zamansal değişimini gösteren şekil (39)

Metabarkodlamada kullanılan biyoinformatik araçlar bazı küçük farklılıklar barındırmaktadır. Verilerin kalitesi tür tanımlamalarının yüksek doğrulukla gerçekleşebilmesi açısından çok önemlidir. Aksi durumda tür tanımlamaları hatalı sonuçlar verecek ve çalışmalar farklı şekilde yorumlanabilecektir. Hatta farklı iş akışlarıyla analiz edilen verilerde dahi farklı sonuçlar elde etmek mümkün olabilmektedir. Bu nedenle belirli optimize edilmiş ya da yalnızca metabarkodlamaya özgü biyoinformatik iş akışları veya araçlar geliştirilmektedir. Metabarkodlama yapılan canlıların barkod dizilerinin, benzerlik derecesiyle tür tanımları yapılmaktadır. Bu noktadan hareketle dizileme sonuçlarındaki okumaların çok kritik parametrelerle filtrelenmesi gerekmektedir. Örneğin benzer okumalar cihaz kaynaklı sorunlar, PZR hataları, DNA kontaminasyonu gibi durumlar neticesinde oluşmuş olabilir ve tür eşleşmelerinde hatalı ve beklenmeyen sonuçlar verebilmektedir. Biyoinformatik iş akışında bu hataları tespit edip ayıklayabilmek çok önemlidir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

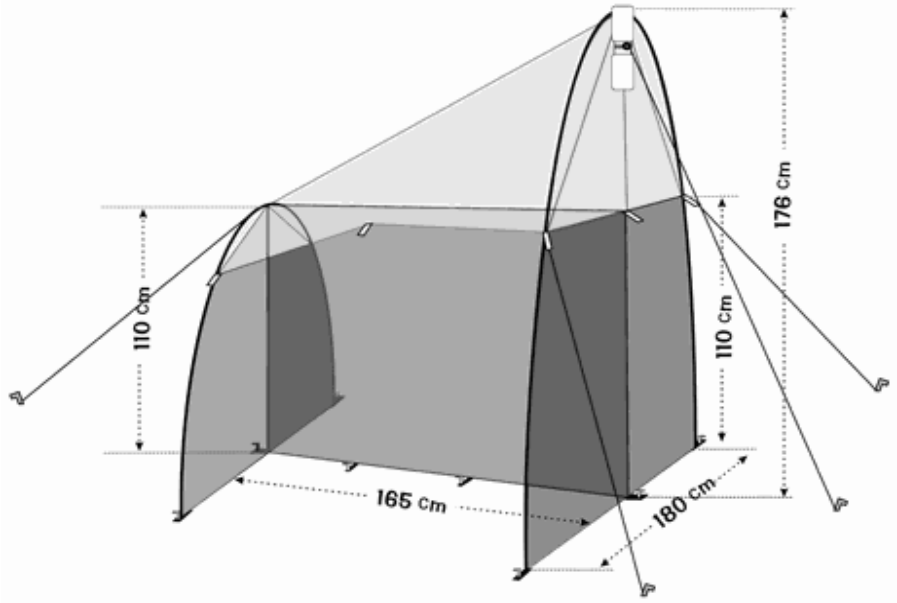
Böcekler dünya üzerinde her ekosistemde yaşayabilen canlılardır. Dünya üzerinde yaşayan böceklerin tespiti ve ekolojik nişlerinin ortaya çıkarılması ekosistemleri anlamak açısından oldukça önemlidir. Böceklerin nişleri ekosistemde belirleyici rol oynayabilir. Örneğin belirli bir bitki türünün üremesini sağlayan polen taşıyabilen böcek türü, bölgede bitkinin dağılımını ve popülasyon büyüklüğünü etkileyebilir. Aynı zamanda vejetasyon kaynaklı iklimsel koşulları da etkileyebilir duruma gelecektir. Kuşların, sürüngenlerin, memelilerin, diğer omurgasız gruplarının ve hatta böcek yiyen bitkilerin beslenmesinde besin kaynağı görevi görmelerinden dolayı da biyoçeşitliliği etkileyebilecek konumdadırlar. Böceklerin kendi içindeki ilişkileri de göz önüne alınırsa tür ve birey bazında çevreye olan etkileri oldukça fazladır. Böceklerin çeşitliliğini öğrenmek ise o bölge ve ekosistem hakkında bilgi verici olmaktadır. Belirli türler hakkında çıkarımlar yapılmakta, diğer canlılar ile olan ilişkileri açığa çıkarılabilmektedir. Böcek biyoçeşitliliğini ortaya çıkarabilmek için arazi çalışmalarında morfolojik gözlem yapılmaktadır. Arazi şartlarında böcekleri tanımak ve tanımlamak yüksek bilgi birikimi ve tecrübe gerektirmektedir. Çünkü böceklerin var olan yüksek çeşitliliği uzmanların her böceği tanımasında ve tanımlamasında zorluklar yaşatmaktadır.

Bu araştırmada böceklerin arazideki dağılımları ve tür kompozisyonlarını tespit ve tayin etmek amacıyla metabarkodlama yöntemiyle sonuç elde etmek amaçlanmıştır. Son yıllardaki çalışmalar geleneksel morfolojiye dayalı biyoçeşitlilik tayini ile ekosistem çalışmalarının zorluğuna bir çözüm olarak geliştirilmiş olan barkodlama ve metabarkodlama yöntemleri kullanılmaktadır (13, 30, 42-45). Bu doğrultuda moleküler genetik analizler yapılmıştır. Bu analizler neticesinde elde edilen veriler daha sonra gerçekleştirilecek biyoizleme çalışmalarında kullanılabilecektir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Tezde kullanılan örnekler Şekil 4.1.'de gösterilmiş olan Malaise tuzağı kullanılarak elde edilmiştir. Malaise tuzağı çadır tipli kurulumu kolay bir tuzaktır. İlk olarak Rene Malaise tarafından 1934 yılında icat tasarlanmıştır. Bu tuzak ağırlıklı olarak uçucu böcekler için tasarlanmıştır. Örneğin Neuroptera, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera takımları bu tuzakla kolaylıkla yakalanabilen takımlardır. Bazı örneklemelerde Arthropoda şubesine ait bazı gruplar, Coleoptera gibi takımların da yakalandığı bildirilse de anlamlı sonuçlar vermemiştir. Malaise tuzağı böceklerin uçuş davranışlarına göre tasarlanmıştır. Siyah iç kısım ve ışığın geldiği beyaz bir kısımdan oluşmaktadır. Bu şekilde uçucu böcekler ışığa (güneşe) doğru ve yerçekimine zıt yönde hareket ettikleri için en üst kısımda bulunan toplama şişesinde toplanırlar. Bu araştırmada Malez tuzağındaki toplama şişesi %96'lık etil alkol barındırmaktadır. Bu sayede toplama şişesinde toplanan böcekler ve genetik materyalleri örnekleme periyotları boyunca biyolojik bozunmadan korunmuşlardır. Malaise tuzağı Bozalan/Milas bölgesine kurulmuştur. Bu bölgeden tek lokasyonda 14 günlük 2 farklı örneklemeyle böcekler toplanmıştır. Toplanan böcekler analiz için laboratuvara taşınmıştır.



Şekil 4.1. Malaise tuzağının teknik özelliklerini gösteren şekil (46)

Çizelge 4.1. Arazide kullanılan malzeme listesi

	Adet	Miktar
Absolute Etanol	1	2,5 L
Küt Uçlu Pens	2	2
50 mL Falcon Tüp	1	25 pcs
Nalgene Bottle 500 mL	5	5
Plastik örnek kabı	1	1
Atrap	1	1
Kurutma Kâğıdı	4	4
Malaise Trap	1	1

Malaise tuzağından elde edilmiş örneklerin korunması bu aşamada çok önemlidir. Bunun için örnekler Nalgene şişelerde %96'lık etil alkol içerisinde -30 °C'de saklanmıştır. Bu koşullar genetik materyali ve böcekleri deneyin yapılacağı vakte kadar korur.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. ARAZİ ÇALIŞMASI

Arazi örneklemesi tuzağın kurulduğu 14 Haziran 2021 tarihinden itibaren iki haftalık süreyi kapsamaktadır. Örneklemeler 21 ve 28 Haziran 2021 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Bu dönem Bozalan bölgesinde yaz mevsimi ve böceklerin uçuş dönemi olduğu için araştırma için uygun olacağı öngörülmüştür. Deniz formasyonuna yakınlığı, ormanlık alan ve sulak alanları içerdiğinden dolayı bu araştırma için Bozalan/Muğla bölgesi seçilmiştir.

Çizelge 4.2. Arazi planlamasını gösteren çizelge

	1.Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6.Gün	7.Gün
1.Hafta	Malaise Trap Kurulması	Malaise Trap örnek yoğunluk	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Nalgene şişelerin malaise traptan alınması.
2.Hafta	Malaise Trap'e yeni alkol içeren şişenin yerleştirilmesi	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Malaise Trap örnek yoğunluk kontrolü	Nalgene şişelerin malaise traptan alınması.

Şekil 4.2. Malaise Tuzaklarının kurulduğu bölgeleri gösteren şekil

Şekil 4.3. Örnekleme bölgesi denize yaklaşık 3,6 km uzaklıkta ve ~500 m rakımdadır (37°02°44°N 27°49°08°E)

Tuzak, en üst kısmı ve aynı zamanda örnek toplama kabının bulunduğu kısım güney yönüne bakacak şekilde kurulmuştur. Bu şekilde yerleştirilmiş tuzak örneklem sayısında artış sağlamaktadır. Tuzak içerisine giren böcekler en üst kısımda bulunan toplama kabında toplanırlar. Böylece kabın belirli aralıklarla kontrolü, örnekleme kolaylığı sağlamaktadır. Daha sonra örnekler 500mL'lik plastik şişeler içerisinde muhafaza edilmiştir.

Şekil 4.4. Araziden alınan örneklerin fiziksel gözlemi sırasında çekilmiş görüntü

Laboratuvara getirilen örnekler önce morfolojik olarak gözlenmiştir. Belirli familya ve türler göz ile teşhis için kontrol edilmiştir. Alkol içerisinde bekleyen örnekler depigmentasyona uğramıştır. Tür teşhisi için bireylerin ışık mikroskobunda detaylı incelemesi yapılmış ve fotoğraflanmıştır. Bu fotoğraflar araştırma sonucunda moleküler olarak tespit edilecek türler için kayıt oluşturmuştur. Ayrıca araştırma sonucunda veri doğruluğunu karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmeyi sağlamıştır.

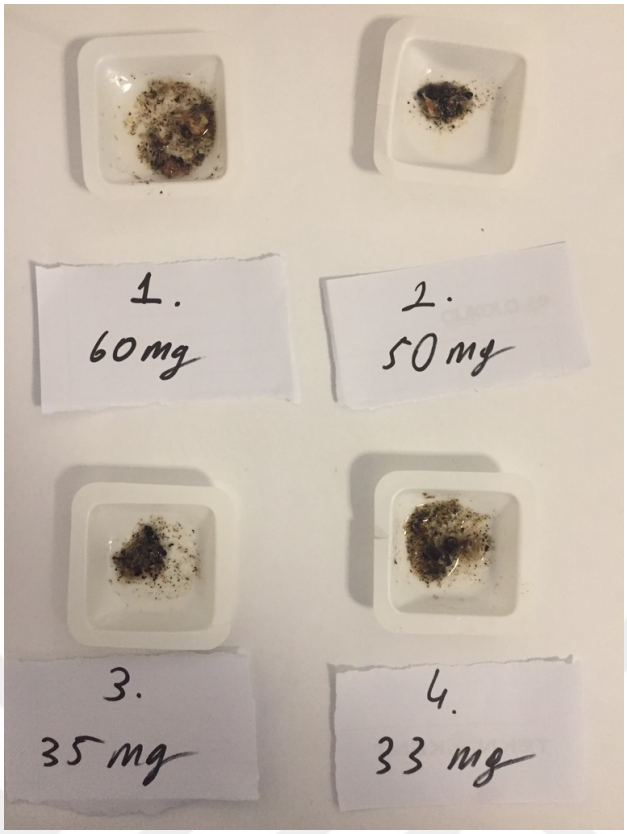
Örneklerin tek tek fotoğraflanmasının ardından karışık olarak DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada kritik olan işlem böcek örneklerinin homojen bir yapı haline getirilmesidir. Bunu sağlamak için her bireyin DNA'sını eşit miktarda alabilmek gerekmekteydi. Bu sebeple sert kitinize dokuları parçalamak ve her vücut parçasını homojen

hale getirebilmek için blender kullanılmıştır. Blender sayesinde dokular yüksek hızda dönen bıçaklarla parçalanmış ve homojen bir yapı haline getirilmiştir.

Şekil 4.5. Vejetasyonun zengin olduğu Malaise tuzağının kurulu olduğu bölgeden çekilmiş görüntü

4.2.2. DNA İZOLASYONU

Homojen hale getirilmiş örneklerden DNA eldesi için EuRX Tissue&Bacterial Kiti kullanılmıştır. Süreç için kite ait üretici protokolü aynen izlemiştir. Dört farklı tekrarla izolasyon gerçekleştirilmiştir. Karışım doku içerisinden örnekler tartım kabına alınmıştır. Tekrarlar hassas terazide ölçümü gerçekleştirilen 60 mg, 50 mg, 35 mg ve 33 mg ağırlıktaki homojen doku örnekleriyle yapılmıştır. Bu noktada tekrarlı örneklerin benzer ağırlıkta olması gerekmektedir.



Şekil 4.6. Tekrarlı DNA izolasyonu doku görüntüleri

İzolasyon protokolü üretici protokolü ile aynıdır ve şu şekildedir;

1- DNA Binding Spin Column'ların filtre kısmı 40 µl Buffer T kullanılarak aktive edilir.

2- 20-50 mg olan doku örnekleri 2mL'lik tüplere koyulur.

3- Her bir örneğe 350 µl Lyse T Buffer eklenir.

4- 2 µl RNaseA ve 20 µl Proteinase K eklenir.

5- Karışım vortexlenir ya da alt üst edilir.

6- Dokular şeffaflaşıncaya kadar 56°C'de 1-3 saat inkübe edilir.

7- İnkübasyondan sonra 350 µl Sol T Buffer eklenir.

8- Karışım 70°C'de 10 dakika inkübe edilir.

9- 350 µl %96'lık absolute etanol eklenir.

10- Karışım 12.000 rpm 1 dakika santrifüjlenir.

11- Süpernatanttan 600 µl içerisinde DNA Binding Spin Column bulunan tüplere aktarılır.

12- 12.000 rpm 1 dakika santrifüjlenir (

13- Spin Column çıkarılır, fazla sıvı dökülür, geri yerleştirilir.

14- DNA binding spin-column üzerine 500 µl Wash TX1 buffer eklenir.

15- 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir.

16- DNA binding spin-column üzerine 500 µl Wash T s2 buffer eklenir.

17- 2 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir.

18- DNA binding spin-column yeni 2 ml'lik tüpe aktarılır.

19- 50 µl Elution Buffer eklenir.

20- 3 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

21- 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir

22- DNA binding spin-column çıkartılır, kapak kapatılır, +4 veya -20'de saklanır.

4.2.3. PZR

Tüm polimeraz zincir reaksiyonları için New England Biolabs Q5 High-Fidelity 2X Master Mix kullanılmıştır. Primerlerin *in silico* bağlanma sıcaklıklarından emin olmak için kademeli sıcaklık değişimiyle PZR yapılmıştır. Reaksiyonlar 200uL'lik şeffaf tüplerde gerçekleştirilmiştir. Toplam hacim 10uL ve primer son konsantrasyonu 0,5 uM olacak şekilde DNA örneklerinden bir örnek ile PZR yapılmıştır. Her bir primer için 48 ve 60 derece arasında değişen 12 farklı bağlanma sıcaklık derecesi kullanılmıştır. PZR sonuçları %2'lik ve etidyum bromürlü agaroz jelde UV ışık altında görüntülenerek kontrol edilmiştir. PZR bantlarının büyüklüğüne göre ve bantların yoğunluğuna göre değerlendirme yapılmıştır. Bu PZR sonuçlarına göre primerlerin en uygun bağlanma sıcaklıkları tespit edilmiş ve ileri analizlerde kullanılmak üzere optimize edilmiştir.

Primerlerin sıcaklıkları optimize edildikten sonra Çizelge 4.4.'teki indeksli primerlerle de aynı şekilde kademeli sıcaklıklı PZR yapılmış ve indeks eklenmiş primer dizilerinin bağlanma sıcaklıkları tespit edilmiştir. Aynı şekilde tek bir DNA örneği alınarak 10 uL toplam hacimde reaksiyon gerçekleşmiştir. PZR sonuçları %2'lik etidyum bromürlü agaroz jelde UV ışık altında kontrol edilmiştir. Bu kontrol sonucunda istenmeyen bantlar gözlenmiştir. Bu bantlardan kurtulmak ve verimli PZR gerçekleştirebilmek için protokolde farklılıklar yapılmıştır. Bu farklıklar toplam hacimdeki primer konsantrasyonunu yarıya düşürmek olmuştur. 10uL toplam hacimde 0.25 uM son primer konantrasyonu olacak şekilde yeniden PZR yapılmış ve etidyum bromürlü agaroz jelde UV ışık altında görüntülenmiştir.

Şekil 4.7. Böcekler için literatürde bulunan ve bu araştırmada kullanılan primerlerinin Integrative Genome Browser (IGV) (47) yazılımı kullanılarak, *Musca domestica* genomu üzerinde fiziksel olarak lokasyonlarını göstmektedir. Bazların sayısal lokasyonlarına göre primerin çoğalttığı bölgelerin uzunluğu hesaplanmıştır

Çizelge 4.3. Kullanılan primerler ve primerlere ait bilgiler

Primer	Primer Dizisi	Gen Bölgesi	Referans	Çoğalttığı Bölge
INS_F	RGACGAGAAGACCCTATARA	16S	(48)	~157 BP
INS_R	ACGCTGTTATCCCTAARGTA	16S	(48)	~157 BP
Ins16S_1	TRRGACGAGAAGACCCTATA	16S	(49)	~216 BP
Ins16S_1_R	TCTTAATCCAACATCGAGGTC	16S	(49)	~216 BP
Hex12SF2	ACTWTGTTACGACTTDTY	12S	(49)	~391 BP
Hex12SR2	AGGATTAGATACCCTDBT	12S	(49)	~391 BP
HEXCOIF4	HCCHGAYATRGCHTTYCC	COI	(49)	~322 BP
HEXCOIR4	TATDGTRATDGCHCCNGC	COI	(49)	~322 BP
HEXCOX2F3	GGNCRHCARTGRTAYTGA	COX2	(49)	~260 BP
HEXCOX2R3	RATYTCDGARCAYTGNCC	COX2	(49)	~260 BP

Çizelge 4.4. İndeks dizilerinin bulunduğu primerlerin listesi

Primer	**Dizisi**
INS_F	**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**RGACGAGAAGACCCTATARA
INS_R	**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**ACGCTGTTATCCCTAARGTA
Ins16S_1	**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**TRRGACGAGAAGACCCTATA
Ins16S_1_R	**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**TCTTAATCCAACATCGAGGTC
Hex12SF2	**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**ACTWTGTTACGACTTDTY
Hex12SR2	**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA**GAGGATTAGATACCCTDBT
HexCOIF4	**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**HCCHGAYATRGCHTTYCC
HexCOIR4	**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA**GTATDGTRATDGCHCCNGC
HexCOX2F3	**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**GGNCRHCARTGRTAYTGA
HexCOX2R3	**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA**GRATYTCDGARCAYTGNCC

Çizelge 4.5. Q5 High-Fidelity 2X Master Mix PZR protokolü

Mix	5 uL
Primerler	1 uL
Su	3 uL
DNA	1 uL
Toplam	10 uL

Çizelge 4.6. PZR koşulları

Ön Denatürasyon	98°C	30 sn	
Denatürasyon	98°C	5 sn	30 döngü
Primer Bağlanma	48-60°C	10 sn	
Sentez	72°C	20 sn	
Son Sentez	72°C	2 dk	
Bekleme	4°C	∞	

4.2.4. DİZİLEME

Dizileme kütüphanesi oluşturmak için Illumina Nextera DNA Library Prep Kit kullanılmıştır. Barkod primerleriyle gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonunda enzimler ve istenmeyen diğer ürünleri uzaklaştırmak ve nükleotit dizilerini saflaştırmak için AMPure XP Beads kullanılmıştır. Kit içindeki polimeraz enzimi kullanılarak PZR ile indeks dizileriyle Illumina adaptörleri birleştirilmiştir. Tekrar AMPure XP Beads kullanılarak pürifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada PZR ürünleri kütüphane oluşturmaya hazır durumdadır Daha sonra BioAnlayzer cihazının DNA 1000 çipi kullanılarak PZR ürünlerinin boyutları tespit edilmiştir. DNA konsantrasyonu hesaplanarak kütüphane hazırlanmiştir. Bu aşamada 0,2 N NaOH ve hibridazsyon solüsyonu kullanılmiştir. Kütüphane hazırlandıktan sonra PZR örnekleri cihaza yüklemek için hazır duruma gelmiştir.

Illumina NextSeq cihazında 100.000 okuma ve 2x150 uzunlukta dizileme gerçekleşmiştir.

4.2.5. BİYOİNFORMATİK

Dizileme sonucu ileri ve geri okumalara ait ".fastq" uzantılı dijital veri elde edilmiştir. Bu veri çoklu işlem yapabilen bilgisayar ortamında analiz edilerek yorumlanmıştır. Python tabanlı geliştirilmiş olan OBITools (50) iş akışı kullanılarak UNIX/LINUX işletim sistemi arayüzüyle veriler analiz edilmiştir. Analiz öncesi okumaların kalitesi FASTQC (51) programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu iş akışı kalite kontrol, ileri ve geri okumaların birleştirilmesi, tekrarlı okumaların birleştirilmesi, hatalı/eksik-fazla okumaların filtrelenmesi ve taksonomik eşleşmenin yapılması gibi basamakları içermektedir. Beş farklı primer için dizilenmiş veriler için aşağıdaki iş akışı uygulanmıştır.

1- İleri ve geri okumalar illuminapairedend komutu kullanılarak birleştirilir.

2- Birleşmeyen okumalar obigrep komutu kullanılarak veriden ayıklanır.

3- Tagcleaner programı kullanılarak primer dizisi okumalardan silinmiştir.

4- Tekrarlı ve aynı okumalar obiuniq komutu kullanarak tek bir okuma haline getirilmiştir.

5- Bu kısımda okumaların header kısmında bir takım istatistiksel bilgiler mevcuttur. Bu bilgilerin yalnızca count sayılarını alabilmek için obiannotate komutu kullanılır.

6- Primerlerin çoğalttığı bölgeye ve count sayılarına göre bir filtreleme için obigrep komutu kullanılmıştır.

7- Verinin en temiz haline ve asıl dizilere erişmek için obiclean komutu kullanılarak okumalar arasındaki %99,5 benzerlik oranına göre temizlenmiştir.

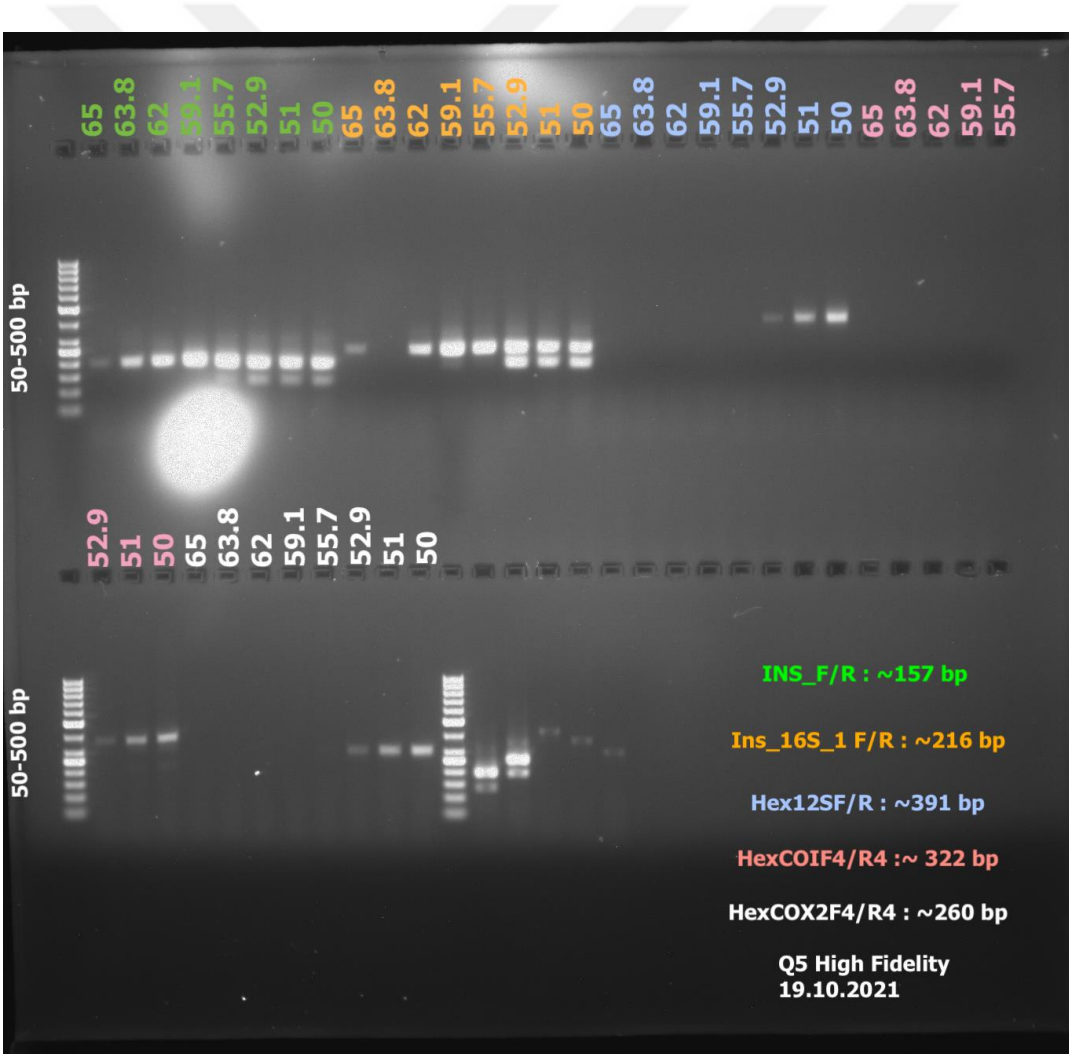
Bu aşamada veriler temizlenmiş durumdadır. Verilerin daha kaliteli eşleşmeler verebilmesi için bu iş akışı kullanılmıştır. Daha sonra her okuma BLAST algoritması kullanılarak taksonomik eşleşmeler gerçekleştirilmiştir. Bu eşleşmeler için NCBI veri tabanındaki nükleotid veri tabanı kullanılmıştır. Bu eşleştirmelerin benzerlik oranlarına göre tür/takım listesi oluşturulmuştur. BLAST sonuçlarında yer alan türlerin veri tabanındaki giriş numaraları kullanılarak NCBI Entrez komut sistemi kullanılarak türlerin taksonomik sınıflandırma bilgileri elde edilmiştir. Bu şekilde bir takım listesi oluşturulmuştur (52).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

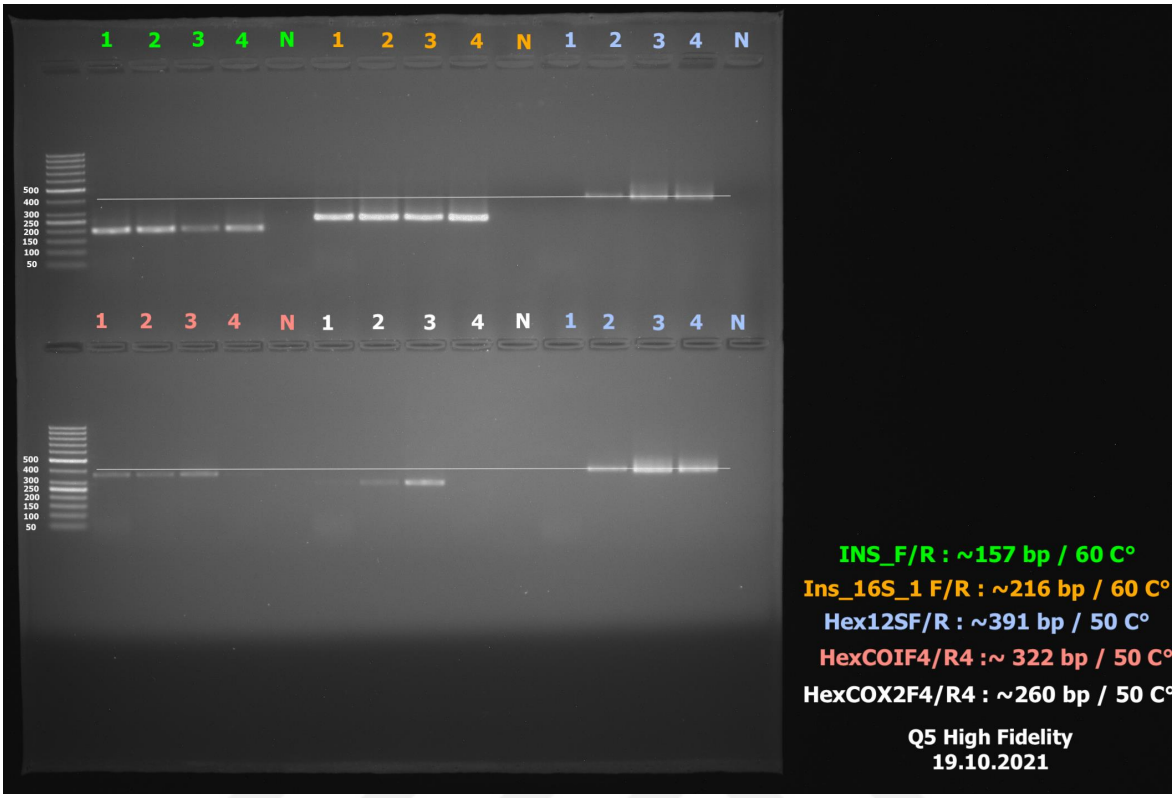
Islak laboratuvar uygulamaları ve bilgisayar sistemlerinde yapılmış olan analiz sonuçları görselleştirilmiştir. PZR aşaması için jel görüntüleri Şekil 5.1'den Şekil 5.4.'.e kadar eklenmişti. Tüm analizler sonucu tespi edilen türler primerlere göre listelenmiştir.

Çizelge 5.1. İzole edilen DNA'ların spektrofotometre sonuçları

Örnek	1	2	3	4
Konsantrasyon	78,945681	26,657592	24,979793	39,534708
A260/A280	2,066649	2,013053	1,817465	1,92809
A260/A230	1,785694	2,129584	1,111302	1,255057

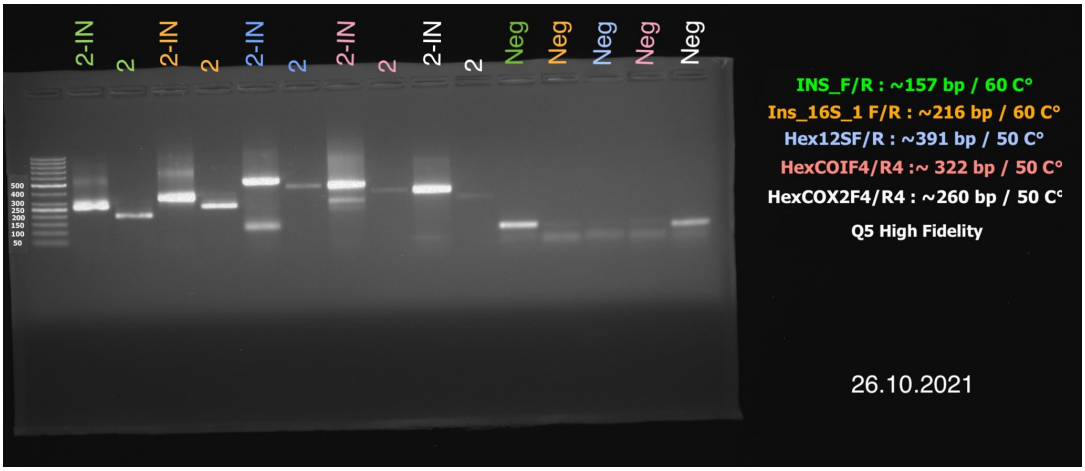


Şekil 5.1. Beş farklı primer ile yapılmış gradient PZR jel görüntüsü

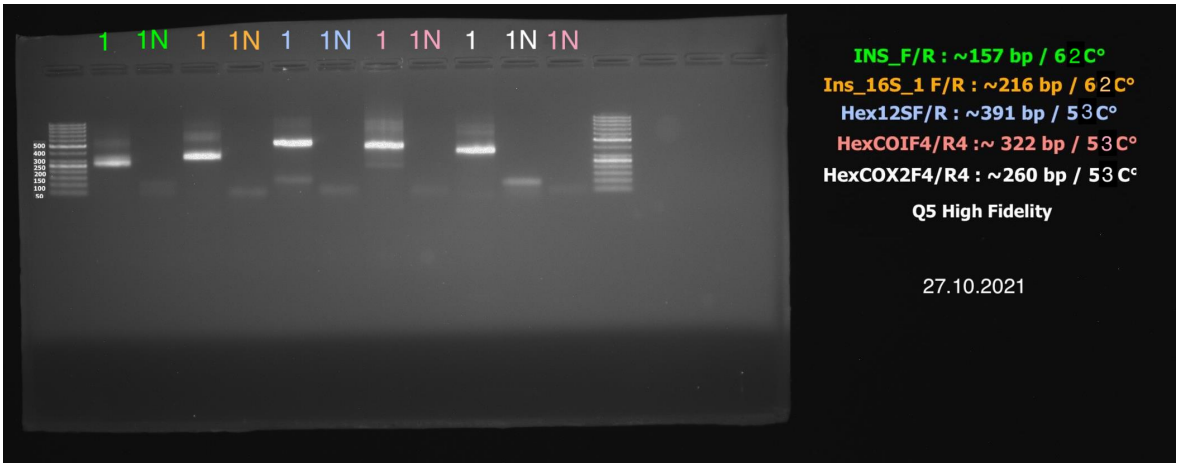


Şekil 5.2. Sıcaklıkları optimize edilmiş primerlerle yapılmış PZR jel görüntüsü

Primer bağlanma sıcaklıklarına karar verildikten sonra 4 örnek için PZR yapılmıştır. Jel görüntüsü Şekil 5.2. ‘deki gibidir.



Şekil 5.3. İndeksli primerlerle yapılan PZR jel görüntüsü



Şekil 5.4. İndeksli primer konstantrasyonunun yarıya indirilmesiyle gerçekleşen PZR jel görüntüsü

Çizelge 5.2. INS primeriyle tespit edilen türlerin listesi

Türler	**Eşleşen Bölge**	**Eşleşme Oranı**
Palpares libelloides	177	96,045
Eupholidoptera smyrnensis	176	99,432
Oedipoda charpentieri	176	94,318
Empusa sp.	175	96,571
Chorthippus biguttulus	175	98,286
Melanotus okinawensis	175	93,714
Comptosia sp.	188	90,426
Oedemera sexualis	173	87,861
Dermestes laniarius	173	94,220
Oedemera testaceithorax	117	88,889
Diptera sp.	184	88,043
Sciaridae sp.	128	85,156
Trox strigosus	179	86,592
Papilio antonio	181	82,320
Oecanthus sinensis	177	94,350
Anaspis sp.	176	90,909
Bothrideridae sp.	183	80,328
Psorodonotus specularis	176	93,182
Melipotis sp.	180	92,778
Dryopomera kurosai	119	88,235
Parapholidoptera distincta	176	92,045
Cicadellidae sp.	114	85,965
Parapholidoptera spinulosa	178	89,326
Eupholidoptera hesperica	176	94,886
Psorodonotus davisi	176	86,364
Psorodonotus sp.	176	92,045
Eupholidoptera magnifica	176	95,455
Eupholidoptera marashensis	100	99,000
Ceracris pui	177	92,090
Japanagallia neohamata	36	97,222
Empusa guttula	175	94,857
Psophus stridulus	139	94,245
Cis nitidus	138	81,884
Empusa pennicornis	175	94,429
Medetera signaticornis	178	95,506
Caledopteryx sp.	39	94,872
Microserica sp.	180	87,222
Phytocoris nowichy	176	93,182

Larinus turbinatus	175	94,286
TPA_asm: Pheidole	179	83,799
Deraeocoris sp.	184	93,478
Gomphocerippus rufus	174	98,851
Lampyris noctiluca	159	93,711
Paracymoriza distinctalis	181	85,083
Scymnus sp.	175	89,714
Ronderosia piceomaculata	117	100,000
Divales haemorrhoidalis	175	91,429
Bootettix argentatus	94	96,809
Spondylis buprestoides	178	87,079
Dasyhippus peipingensis	74	95,946
Gelechiidae sp.	181	88,398
Ochterus sp.	119	84,034
Bombus securus	178	80,899
Calliteara taiwana	186	87,634
Megochterus occidentalis	121	81,818
Nanos vadoni	99	81,818
Melanostoma mellinum	177	98,870
Chorthippus hammarstroemi	175	98,286

Çizelge 5.3. INS16S primeriyle tespit edilen türlerin listesi

Türler	**Eşleşen Bölge**	**Eşleşme Oranı**
Oedipoda charpentieri	237	95,359
Oedipoda caerulescens	238	97,479
Eupholidoptera smyrnensis	236	99,153
Chorthippus biguttulus	233	93,562
Empusa pennicornis	238	96,639
Ceracris pui	238	93,277
Oedipoda coerulescens	240	94,583
Hoplomachidea consors	236	91,102
Calliptamus barbarus	236	99,576
Melanotus similis	232	93,534
Chorthippus albonemus	236	96,610
Dermestes laniarius	232	95,259
Larinus turbinatus	234	95,726
Eupholidoptera bimucronata	236	98,305
Palpares libelloides	236	96,186
Eupholidoptera danconai	174	100,000
Empusa guttula	238	93,697
Xyela sp.	177	89,266
Comptosia sp.	211	90,521
Chorthippus sp.	176	98,864
Melanotus okinawensis	200	92,500
Oedemera manicata	237	89,873
Eupholidoptera hesperica	236	96,610
Choroedocus robustus	238	93,277
Anaspis sp.	235	93,191
Eupholidoptera megastyla	236	95,339
Eupholidoptera marashensis	224	95,536
Chrysobothris affinis	235	94,894
Acmaeodera lugubris	219	88,128
Eupholidoptera magnifica	236	96,186
Diptera sp.	245	89,388
Iris oratoria	237	93,249
Xylotrechus grayii	212	87,264
Mantis religiosa	124	97,581
Eupholidoptera uvarovi	180	91,667
Yemmalysus parallelus	239	87,029
Eupholidoptera mersinensis	225	95,556
Leptopeza flavipes	181	92,818

Parapholidoptera signata	238	90,336
Musca vitripennis	239	99,163
Mioscirtus wagneri	237	89,873
Choroedocus violaceipes	236	96,610
Catocala electa	242	93,388
Salentia mongolica	241	90,871
Adelphocoris suturalis	178	98,876
Kingdonella pienbaensis	236	94,068
Parepistaurus sp.	175	97,714
Oedipoda fuscocincta	233	90,987
Iselma lorenzettii	178	87,079
Eupholidoptera garganica	239	89,540
Sinodendron rugosum	176	87,500
Gomphocerippus rufus	232	99,569
Eupeodes luniger	237	96,624
Psorodonotus venosus	236	91,949
Embiidae sp.	241	86,722
Dasyhippus barbipes	153	97,386
Empusa sp.	226	96,903
Oedemera podagrariae	235	94,894
Macroxyela ferruginea	179	89,944
Medetera saxatilis	240	97,500
Austracris guttulosa	120	95,000
Ronderosia piceomaculata	176	97,727
Chorthippus hammarstroemi	236	93,220
Agrilus hyperici	236	98,305
Stomoxys calcitrans	244	86,066
Bryodema gebleri	227	90,308
Elimaea cheni	178	91,011
Oecanthus sinensis	238	95,378
Drino sp.	237	94,093
Flexamia abbreviata	240	85,000
Panorpa nebulosa	194	84,536
Ronderosia forcipata	238	93,277
Chorthippus maritimus	236	97,034
Phytomia errans	239	92,469
Araneus angulatus	191	91,099
Spondylis buprestoides	241	83,402
Anthrax proconcisus	246	89,837
Alsophila japonensis	248	88,710

Epistrophe lamellata	237	100,000
Bothrideridae sp.	242	83,058
Mythicomyia sp.	185	87,568
Thraulus sp.	110	84,545
Bryodema kozlovi	178	96,629

Çizelge 5.4. HEX12SF2 primeriyle tespit edilen türlerin listesi

Türler	**Eşleşme Bölgesi**	**Eşleşme Oranı**
Epacanthaclisis banksi	151	88,079
Dermestes dimidiatus	133	97,744
Eupholidoptera smyrnensis	107	100,000
Gomphocerippus rufus	152	100,000
Pedicia sp.	151	93,377
Oedipoda coerulescens	151	96,689
Eupholidoptera megastyla	147	100,000
Zichya tenggerensis	132	93,182
Botanophila fugax	156	99,359
Mordellidae sp.	135	86,667
Rivellia syngenesiae	125	89,600
Musca vitripennis	164	98,171
Calliptamus barbarus	157	99,363
Malus domestica	28	100,000
Peribatodes rhomboidaria	28	100,000
Pterostichus oblongopunctatus	159	93,082
Uvaroviola multispinosa	136	93,382
Delia platura	156	99,359
Wohlfahrtia magnifica	138	92,754
Metatropis longirostris	132	84,091
Chironomus flaviplumus	141	93,617
Sphingonotus tsinlingensis	147	89,116
PREDICTED: Stegodyphus	32	100,000
Polystoechotes punctatus	148	86,486
Autographa pulchrina	248	85,081
Melanotus sakishimensis	128	96,875
Melanotus villosus	156	96,154
Metrioptera ussuriana	154	92,208
Chorthippus aethalinus	119	96,639
Acanthoscelides anoditus	147	91,156
Gomphocerus sibiricus	166	97,590
Gampsocleis gratiosa	137	91,241
Chrysoteuchia culmella	140	84,286
Empusa pennicornis	133	99,248
Dolichopus latilimbatus	151	98,675
Osmylus atomatus	152	90,789
PREDICTED: Acyrthosiphon	137	96,350
PREDICTED: Nomia	153	92,810

Locusta migratoria	133	87,970
Dermestes maculatus	110	99,091
Isoptericola sp.	150	100,000
Sarcophaga peregrina	151	91,391
Libelloides macaronius	216	88,889
Vespa crabro	292	85,616
Goniophyto honshuensis	152	99,342
Oedipoda charpentieri	144	97,917
Eupholidoptera bimucronata	147	98,639
Therioaphis trifolii	133	100,000
Lixus subtilis	109	95,413
Orinhippus tibetanus	117	96,581
Ctenochauliodes yangi	149	89,933
Scaphoideus nigrivalveus	139	88,489
Osmylus zheanus	152	90,789
Ocypus olens	30	100,000
Psorodonotus venosus	131	92,366
Ennomos fuscantarius	62	95,161
Brunneria borealis	134	87,313
Bittacomorpha clavipes	148	91,892
Nysson spinosus	43	93,023
Osmia bicornis	178	87,640
Sisyra aurorae	165	87,879
Cerapanorpa obtusa	136	92,647
Trupanea amoena	134	96,269
Angaracris barabensis	136	93,382
Eupholidoptera magnifica	150	97,333
Spilosoma lubricipeda	97	92,784
Empis livida	152	88,816
Diamphipnopsis sp.	137	92,701
Rickettsia felis	184	96,739
Augilina triaina	41	95,122
Tachina fera	184	82,065
Pseudomictis brevicornis	131	88,550

Çizelge 5.5. HexCOIF primeriyle tespit edilen türlerin listesi

Türler	**Eşleşen Bölge**	**Eşleşme Oranı**
Palpares libelluloides	151	94,040
Chorthippus brunneus	124	100,000
Oedipoda miniata	123	99,187
Eupholidoptera megastyla	132	99,242
Caelifera sp.	124	100,000
Empusa pennicornis	133	93,985
Catocala nymphagoga	151	98,013
Araneus uyemurai	132	91,667
Eupholidoptera smyrnensis	151	97,351
Musca vitripennis	133	100,000
Araneus angulatus	178	92,135
Chorthippus yersini	124	100,000
Malthodes sp.	134	90,299

Çizelge 5.6. HexCOX2F primeriyle tespit edilen tür listesi

Türler	**Eşleşen Bölge**	**Eşleşme Oranı**
Araneus ventricosus	269	90,706
Agelena silvatica	260	91,154
Gomphocerippus rufus	149	98,658
Chorthippus maritimus	149	97,987
Bactrocera albistrigata	71	83,099
Erragonalia choui	247	78,543
Dipseliopoda biannulata	284	78,873
Argiope catenulata	216	83,796
Velamysta pupilla	143	76,923
Pholis gunnellus	29	100,000
Drabescus ineffectus	147	84,354
Eutomostethus vegetus	127	86,614
Dolichopus latilimbatus	290	82,759
Psorodonotus venosus	281	81,139
Oryzaephilus surinamensis	69	88,406
Argiope perforata	217	87,558
Pirata subpiraticus	271	80,074
Myrmeleon immaculatus	279	82,437
Dendarus zariquieyi	41	92,683
Nesophrosyne sp.	279	77,061

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. ARAZİ ÇALIŞMASI VE TUZAK VERİMLİLİĞİ

Arazi şartlarında Malaise tuzağıyla örnek alınması uçucu böceklerin birçoğunu yakalamak için ideal yöntemlerden biridir. Arazide geçirilen zaman ve iş gücünü en aza indirir. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen arazi çalışması Haziran ayında yapılmıştır. Bu ay genellikle böcekler için uçuş dönemidir ve bu sayede örneklem sayısı yüksek ve çeşitlilik çok olmuştur (53, 54). Farklı zaman dilimlerinde örnekleme yapmanın yakalanan böceklerin çeşitliliğinde etkisi olacaktır. Fakat hedef tür veya taksona göre böceğin biyolojik olarak aktif olduğu dönemler seçilebilir. Yalnızca belirli bir mevsim ya da belirli bir zaman dilimi içerisinde örneklemenin yapılması gerekiyorsa Malaise tuzağı kullanılarak arazi çalışması gerçekleştirilebilir.

Malaise tuzağının yanı sıra arazide bireysel örneklemeler de yapılmıştır. Böylelikle deneysel olarak tuzakla yakalanmayan bireylerin örneklenmesi ile bölgenin böcek çeşitliliğinin ortaya çıkarılması da test edilmiştir.

Arazi örneklerinde fiziksel gözlem ile birçok böcek takımı tespit edilirken Arachnida sınıfından bireyler de bulunmaktaydı. Tuzağın bu canlılara özgü olmaması göz önüne alınarak tesadüfi ya da av-avcı ilişkilerinden dolayı tuzağa girmiş olabileceği yorumunda bulunuldu. Ağırlıklı olarak Hymenoptera, Diptera gözleniyordu (55).

6.1.2. LABORATUVAR UYGULAMALARI

Laboratuvara getirilen örneklerin stereo mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir. Bu moleküler teşhis sonucunda veri doğruluğu açısından kontrol amaçlı yapılmıştır ve aynı zamanda türlerin barkod indekslerinin oluşturulması için fiziksel bir kaydın da tutulması için gereklidir (15). Örnek kabından çıkarılan her birey fotoğraflanmış ve tekrar örnek kabına geri koyulmuştur. Bu aşamada uzmanlar tarafından türlerin teşhisinin yapılması moleküler olarak teşhis sonrasında daha net bir kontrol olabileceği gibi yeni türlerin ve varyasyonların tespiti açısından da oldukça önemli olmaktadır. Tuzakta bulunan alkolde toplanan böcek örneklerinden Lepidoptera takımındaki bireylerin kanat yapıları alkole karşı dayanıklı

olmamasından ötürü bu çalışmada fiziksel tür teşhisi için uygun bir yöntem olamamaktadır (56).

Alkol içerisinde bekleyen örnekler yüksek hızda dönen kesici bıçaklar sayesinde parçalanarak homojen hale getirilmiştir. Bu şekilde daha homojen bir yapı elde edilmesi hedeflenmiştir. Fakat canlıların vücut büyüklükleri göz önüne alındığında bu homojenizasyon yönteminde büyük vücutlu canlıların görece daha fazla dokusunun bulunduğu söylenebilir (29). Başka bir yöntem olarak böcekleri vücut büyüklüklerine göre sınıflandırarak daha sonra homojenizasyon yapılması daha etkili olabilir. Bu noktada asıl önemli olan her bireyden aynı miktarda DNA eldesidir. Bu sebeple izolasyon tekrarları yapılmıştır. Bu basamakta DNA izolasyon tekrarı, sayıca az ve fiziksel olarak küçük bir türün DNA'sına erişim açısından önemli olabileceği düşünülmüştür.

PZR aşamasında 5 farklı primer kullanılmıştır. Primer kullanımı bu aşamada oldukça önemlidir. Farklı primerlerin farklı türleri yakalayabilme olasılığı bulunmaktadır. Bunun nedeni o gen bölgesine ait veri tabanlarında yeterli girişin olmaması yahut çoğaltılan gen bölgesinin tür ve cinsleri birbirinden ayırabilmek için yeterli farklılık barındırmaması olabilir. Primerlerin kısa bölgeler çoğaltması dizileme için Illumina platformunun verimli kullanılmasını sağlar. Uzun bölgeler için uzun okuma yapabilen diğer dizileme platformları kullanılabilir.

6.1.3. DİZİLEME PLATFORMU VE BİYOİNFORMATİK

Primerlerin çoğalttığı bölgelerde 300bp ve üstü diziler için NextSeq cihazı yerine Illumina platformlarının diğer cihazlarına ihtiyaç duyulabilir. Okuma sayısının artırılmasıyla tespit edilen türlerin artması konusunda tartışmalar halen sürmektedir. Bu tez çalışması için okuma sayısının artırılması daha fazla tür teşhisini sağlayabilmektedir.

Elde edilen dizileme verileri OBITools iş akışı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu iş akışı özel olarak metabarkodlama çalışmaları için geliştirilmiştir. İleri ve geri okumaların birleştirilmesi sırasında birleştirilemeyen NextSeq cihazının okuma kapasitesinin üzerinde uzunluktaki diziler ham veriden ayıklanmamıştır. Bunun nedeni 2x150 uzunluğu aşan okumaların tam olarak birleşmeyeceği için veri kaybının önüne geçmektir. 12S ve COI bölgeleri 300 bp üzerinde uzunluklar barındırdığı için tüm diziyi elde edecek şekilde

dizileme gerçekleşememiştir. Gerekli filtreleme aşamalarından sonra verinin taksonomik eşleştirmesi için NCBI veri tabanı kullanılmıştır. Dünyada birçok araştırmacı tarafından kullanıldığı için çok fazla veri barındırmasından dolayı seçilmiştir. Yalnızca böceklere ait veya barkodlama çalışmaları için geliştirilmiş olan BOLD (57) veri tabanı yalnızca COI bölgesine ait bilgileri barındırdığından dolayı tercih edilmemiştir. Kullanılan 5 primere ait 5 farklı fastq uzantılı dosya aynı biyoinformatik iş akışıyla analiz edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda primerler bazında farklılıklar ortaya konmuştur. Buradan hareketle 16S bölgesine özgü primerler daha gerçekçi sonuçlar vermiştir. Kısa bir bölgeyi çoğaltmasından dolayı da kullanılabilirliği açısından pratiktir.

Okumaların taksonomik tür teşhisinde başarılı olabilmesi ve deney tasarımının en başından beri hatasız sonuçlanmasından biyoinformatik aşamaları sorumlu olmaktadır. İleri ve geri dizilerin hatasız birleştirilmesi, birleşmeyen dizilerin veriden atılması, benzerlik oranına göre okumaların tek bir okuma şekline getirilmesi ve bu aynı dizilerin ham veri içindeki sayısı gibi basamaklardaki basit hatalar ya da eksiklikler, araştırmayı neticelendirmek için çok önemli bir konumdadır. Obitools iş akışında ise illuminapairedend, obiuniq gibi komutlar bu işlemleri gerçekleştirmektedir. Bu komutlara eklenecek her parametre sonuçları etkilemektedir.

6.1.4. PRİMERLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Primerlerin literatürde de görüldüğü üzere farklı takım ve familyalarda tür tespit etme verileri görülmekteydi. Deneysel olarak bu çalışmada da karşılaştırma yapılmış ve bölgeye ait nihai türlerin listesi oluşturulmuştur.

Biyoinformatik analiz neticesinde tür tespiti yapılan dizilerin ham veriye oranla ne kadar okuma sayısıyla eşleşme verdikleri gösterilmiştir. Beş primer arasında 16S bölgesini çoğaltan bölgeleri yüksek okuma sayısı olan birkaç dizisinden sonra büyük sayıda çeşitliliği gösteren eşleşmelerin okuması düşük olmuştur. COI ve COX2 primerleri görece daha beklenen bir dağılım göstermiştir. Bu sonuçlardan hareketle COI ve COX2 bölgesi böceklerde karışık örneklerde tüm türlerin tespit edilebilmesi açısından başarısız görülmektedir. Bu tezde oluşturulmuş iş akışında kullanılması çok uygun olmayacaktır.

Çizelge 6.1. Tespit edilen türlerin primerlere göre dağılımını gösteren tablo

Türler	**INS**	**INS16S**	**Hex12SF**	**HexCOI**	**HexCOX2**
Palpares libelloides					
Eupholidoptera smyrnensis					
Oedipoda charpentieri					
Empusa sp.					
Chorthippus biguttulus					
Melanotus okinawensis					
Comptosia sp.					
Oedemera sexualis					
Dermestes laniarius					
Oedemera testaceithorax					
Diptera sp.					
Sciaridae sp.					
Trox strigosus					
Papilio antonio					
Oecanthus sinensis					
Anaspis sp.					
Bothrideridae sp.					
Psorodonotus specularis					
Melipotis sp.					
Dryopomera kurosai					
Parapholidoptera distincta					
Cicadellidae sp.					
Parapholidoptera spinulosa					
Eupholidoptera hesperica					
Psorodonotus davisi					
Psorodonotus sp.					
Eupholidoptera magnifica					
Eupholidoptera marashensis					
Ceracris pui					
Japanagallia neohamata					
Empusa guttula					
Psophus stridulus					
Cis nitidus					
Empusa pennicornis					
Medetera signaticornis					
Caledopteryx sp.					
Microserica sp.					

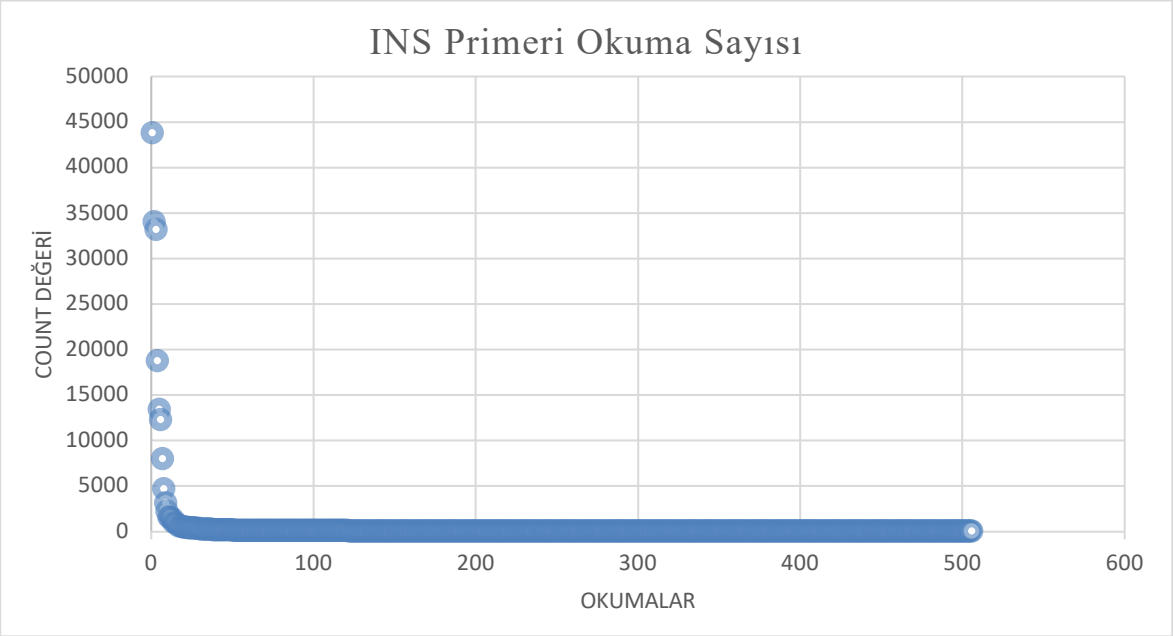
Phytocoris nowichy					
Larinus turbinatus					
TPA_asm: Pheidole					
Deraeocoris sp.					
Gomphocerippus rufus					
Lampyris noctiluca					
Paracymoriza distinctalis					
Scymnus sp.					
Ronderosia piceomaculata					
Divales haemorrhoidalis					
Bootettix argentatus					
Spondylis buprestoides					
Dasyhippus peipingensis					
Gelechiidae sp.					
Ochterus sp.					
Bombus securus					
Calliteara taiwana					
Megochterus occidentalis					
Nanos vadoni					
Melanostoma mellinum					
Chorthippus hammarstroemi					
Oedipoda caerulescens					
Oedipoda coerulescens					
Hoplomachidea consors					
Calliptamus barbarus					
Melanotus similis					
Chorthippus albonemus					
Eupholidoptera bimucronata					
Eupholidoptera danconai					
Xyela sp.					
Chorthippus sp.					
Oedemera manicata					
Choroedocus robustus					
Eupholidoptera megastyla					
Chrysobothris affinis					
Acmaeodera lugubris					
Iris oratoria					
Xylotrechus grayii					
Mantis religiosa					

Eupholidoptera uvarovi					
Yemmalysus parallelus					
Eupholidoptera mersinensis					
Leptopeza flavipes					
Parapholidoptera signata					
Musca vitripennis					
Mioscirtus wagneri					
Choroedocus violaceipes					
Catocala electa					
Salentia mongolica					
Adelphocoris suturalis					
Kingdonella pienbaensis					
Parepistaurus sp.					
Oedipoda fuscocincta					
Iselma lorenzettii					
Eupholidoptera garganica					
Sinodendron rugosum					
Eupeodes luniger					
Psorodonotus venosus					
Embiidae sp.					
Dasyhippus barbipes					
Oedemera podagrariae					
Macroxyela ferruginea					
Medetera saxatilis					
Austracris guttulosa					
Agrilus hyperici					
Stomoxys calcitrans					
Bryodema gebleri					
Elimaea cheni					
Drino sp.					
Flexamia abbreviata					
Panorpa nebulosa					
Ronderosia forcipata					
Chorthippus maritimus					
Phytomia errans					
Araneus angulatus					
Anthrax proconcisus					
Alsophila japonensis					
Epistrophe lamellata					
Mythicomyia sp.					

Thraulus sp.					
Bryodema kozlovi					
Epacanthaclisis banksi					
Dermestes dimidiatus					
Pedicia sp.					
Zichya tenggerensis					
Botanophila fugax					
Mordellidae sp.					
Rivellia syngenesiae					
Malus domestica					
Peribatodes rhomboidaria					
Pterostichus oblongopunctatus					
Uvaroviola multispinosa					
Delia platura					
Wohlfahrtia magnifica					
Metatropis longirostris					
Chironomus flaviplumus					
Sphingonotus tsinlingensis					
PREDICTED: Stegodyphus					
Polystoechotes punctatus					
Autographa pulchrina					
Melanotus sakishimensis					
Melanotus villosus					
Metrioptera ussuriana					
Chorthippus aethalinus					
Acanthoscelides anoditus					
Gomphocerus sibiricus					
Gampsocleis gratiosa					
Chrysoteuchia culmella					
Dolichopus latilimbatus					
Osmylus atomatus					
PREDICTED: Acyrthosiphon					
PREDICTED: Nomia					
Locusta migratoria					
Dermestes maculatus					
Isoptericola sp.					
Sarcophaga peregrina					
Libelloides macaronius					
Vespa crabro					

Goniophyto honshuensis					
Therioaphis trifolii					
Lixus subtilis					
Orinhippus tibetanus					
Ctenochauliodes yangi					
Scaphoideus nigrivalveus					
Osmylus zheanus					
Ocypus olens					
Ennomos fuscantarius					
Brunneria borealis					
Bittacomorpha clavipes					
Nysson spinosus					
Osmia bicornis					
Sisyra aurorae					
Cerapanorpa obtusa					
Trupanea amoena					
Angaracris barabensis					
Spilosoma lubricipeda					
Empis livida					
Diamphipnopsis sp.					
Rickettsia felis					
Augilina triaina					
Tachina fera					
Pseudomictis brevicornis					
Palpares libelluloides					
Chorthippus brunneus					
Oedipoda miniata					
Caelifera sp.					
Catocala nymphagoga					
Araneus uyemurai					
Chorthippus yersini					
Malthodes sp.					
Araneus ventricosus					
Agelena silvatica					
Bactrocera albistrigata					
Erragonalia choui					
Dipseliopoda biannulata					
Argiope catenulata					
Velamysta pupilla					
Pholis gunnellus					

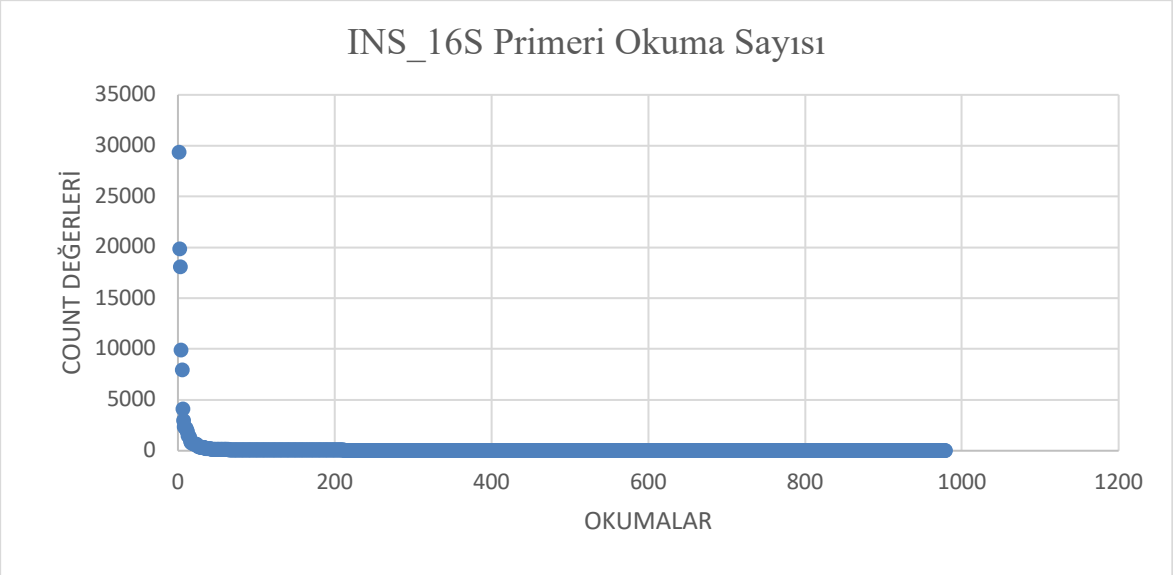
Drabescus ineffectus					
Eutomostethus vegetus					
Oryzaephilus surinamensis					
Argiope perforata					
Pirata subpiraticus					
Myrmeleon immaculatus					
Dendarus zariquieyi					
Nesophrosyne sp.					



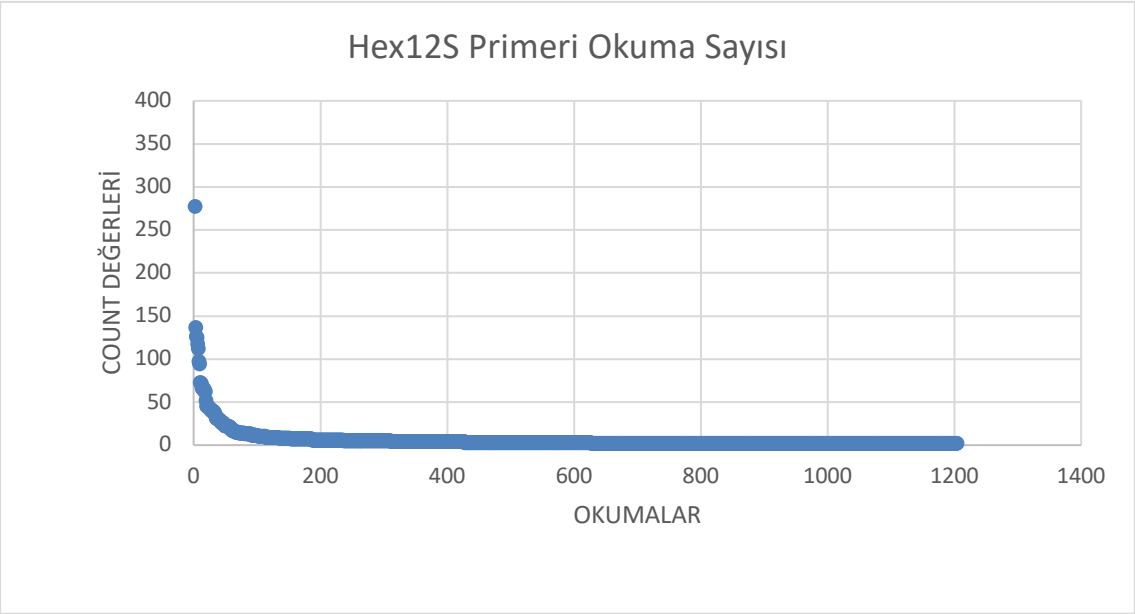
Şekil 6.1. INS dizilerinin okuma sayısının dağılımı gösteren şekil

Metabarkodlama çalışmalarında önemli bir veri olarak, dizilerin ham veride temsil edildikleri sayıları count olarak tanımlamaktayız. Biyoinformatik iş akışı sırasında elde edilir. Dizilerin benzerlik ilişkilerinden yola çıkılarak oluşturulur. Aynı olan dizilerin sayısının fastq dosyasında kaç adet olduğuna ilişkin bir veridir. Bu veri sayesinde deneysel aşamaların tümü üzerinde yorum yapabilmek mümkündür. Örneğin Şekil 6.1.'de eşit olmayan dağılımlı count verisi görünmekte. Bu veri taksonomik türlerin eşleştirildiği dizilerin count değerlerinin görselleştirilmiş halidir. Şekle bakarak 45 bin – 5 bin değerleri tüm veriye oranla küçük bir yer kaplamaktadır. Fakat verinin büyük bir çoğunluğu ~5 count'da dağılım göstermektedir. Bu dağılımı çok fazla okunan aynı dizinin olduğu fakat diğer okumaların sayısının çok fazla olmadığı şeklinde yorumlayabiliriz. Bu yorumlar

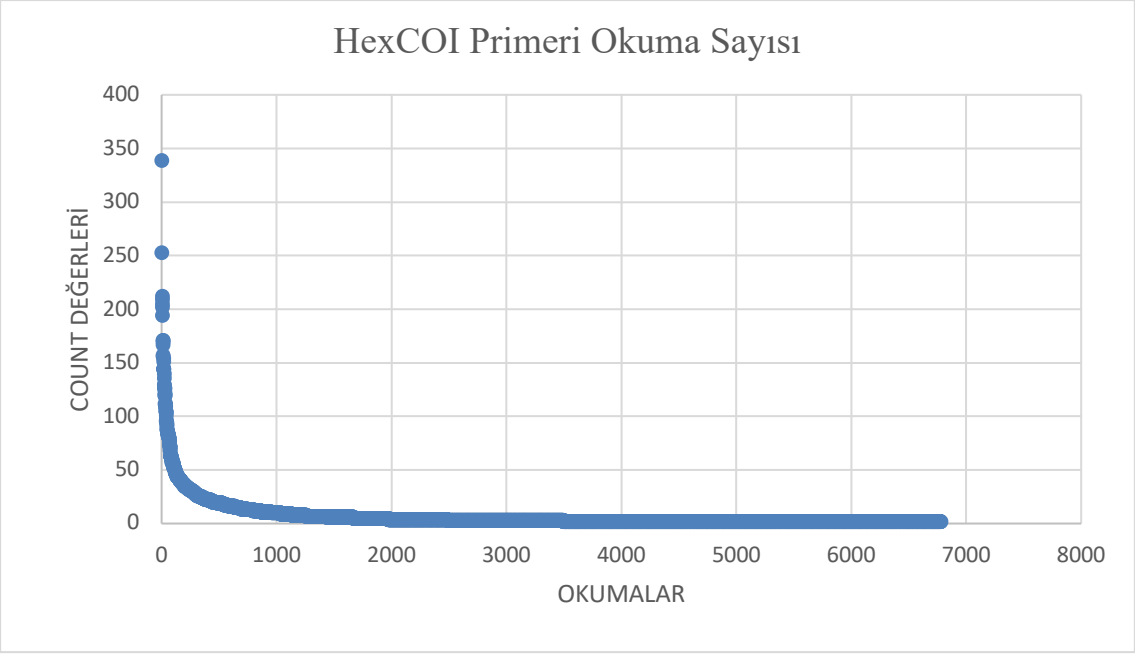
laboratuvar deneylerine de yansıtılabilir. Bu çalışmada yapılan DNA izolasyon metodu karışık örneklerin vücutlarının tamamımın homojenize edilmesiydi. Örnekler farklı vücut büyüklüklerine sahipti. Bu farklılık 4-5 cm ölçek büyüklüğündeki Orthoptera türünden 5 mm'lik ölçek büyüklüğündeki Hymenoptera türüne kadar değişmekteydi. DNA izolasyonu basamağında vücut büyüklüklerine paralel oranda DNA elde edilmiş olabilir. Bu durumda karışık DNA örneklerinde ağırlıklı olarak büyük boyuttaki canlıların DNA'sına rastlamak mümkün olmuştur. Aynı zamanda PZR aşamasında polimeraz enzimi daha çok yoğunlukta bulunan dizileri çoğaltmış nadir olarak anlamlandırılabilecek küçük boyuttaki canlıdan gelen DNA'yı yeteri oranda çoğaltamamış olabilir. Aynı şekilde yine dizileme sırasında yoğun olan diziler okunacak ve bu dizilerin okuma sayıları ve biyoinformatik iş akışındaki count değerleri görece baskın olacaktır. Bu durum baskın olan türleri bulmak açısından faydalı olabilir. Fakat count tablolarına bakıldığında küçük boyuttaki türlere ulaşmak zor olabilir. Özel bir türle çalışılmıyor, genel bir biyoçeşitlilik çalışması yapılıyor ise bu noktada vücut büyüklükleri önemli olacaktır. Karışık fakat birkaç türün bulunduğu örneklemelerde göz ardı edilebilir verim elde edilebilir. Fakat çok çeşitli ve karışık aynı zamanda vücut büyüklüğü dağılımı çok geniş olan örneklemelerde türlerin hepsine moleküler anlamda ulaşmak, bu tezde oluşturulan iş akışında mümkün olmayabilir.



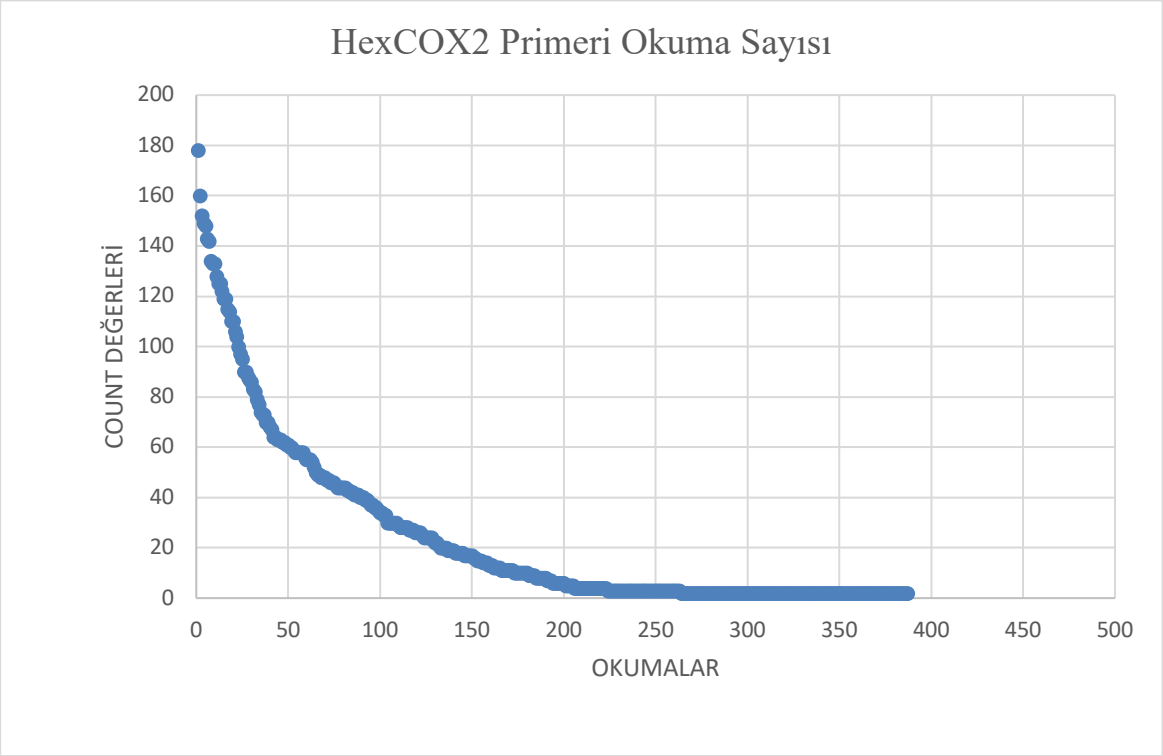
Şekil 6.2. INS_16S dizilerinin okuma sayısı dağılımını gösteren şekil



Şekil 6.3. HEX12S dizilerinin okuma sayılarını gösteren şekil

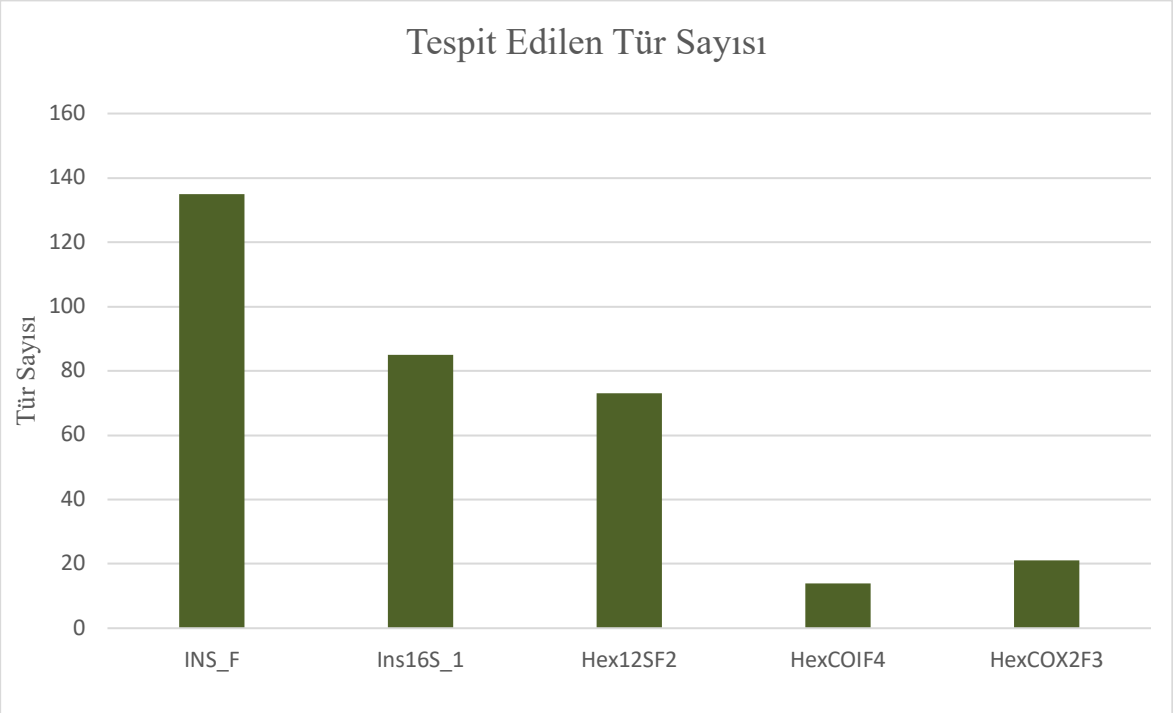


Şekil 6.4. HexCOI dizilerinin okuma sayılarını gösteren şekil



Şekil 6.5. HexCOX2 dizilerinin okuma sayılarını gösteren şekil

Count değerlerinin dağılımları kullanılan primerlere göre farklılık gösterebilmektedir. Böceklere spesifik literatürde bulunan primerler kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda tür teşhislerinde başarıları değerlendirildi. Bu değerlendirmeler kontrollü deney ortamlarında yapılmıştır. Bu tezde ise uygulamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Her primer için ayrı dizileme verisi elde edilmiştir. Bu dizileme verileri yanı biyoinformatik iş akışında analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen count verileri şekil 6.1.'den Şekil 6.5.'e kadar gösterilmiştir. Count değerlerinin dağılımlarına bakıldığında tür teşhisinin görece daha güvenilir olabileceğini gösteren veri HEXCOX2 primeri olarak görünmekte. Belirli oranda dağılım göstermekte. Diğer primerler benzer dağılımdadır. Aynı DNA örneklerinden aynı iş akışı sonucunda oluşan bu farklılığın oluşmasında primerler rol oynamış olabilir. Primerlerin özgüllüğü ve karışık DNA örneklerindeki verimliliği bu farklılığa sebep olmuş olabilir. Primerler farklı daha çok türün DNA'sını çoğaltmış ve belirli bir dağılım yakalamış denebilir. Count verilerinde 16S primerlerinde durum dokudan (vücut büyüklüğü) gelen yoğun DNA'nın daha çok çoğaltılması şeklinde yorumlanabilirken COI primerlerinde yoğunluğa karşın daha eşit dağılış göstermiş gibi görünmektedir.



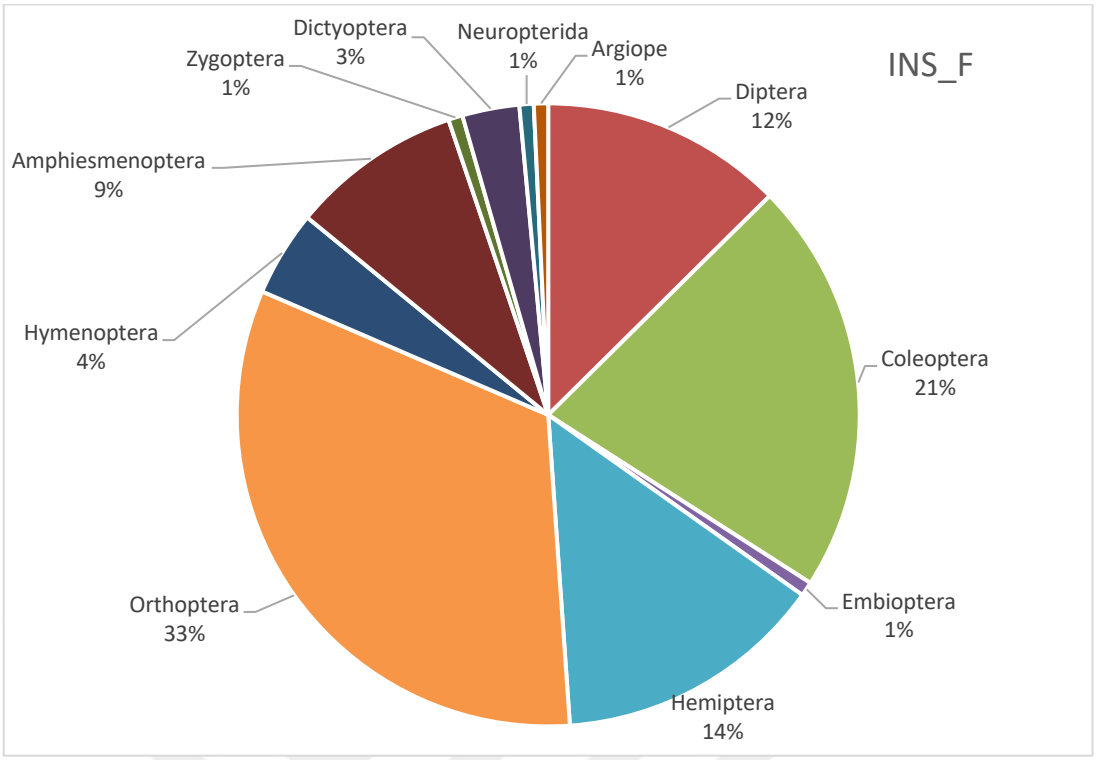
Şekil 6.6. Primerlere göre tespit edilen türlerin dağılımını gösteren şekil

Uzun yıllardır en çok kullanılan primer COI gen bölgesine özgü primerlerdir. Çok fazla veri üretilmiş ve optimize edilmiş bir primerdir. Barkodlama ve metabarkodlama çalışmalarında standart olarak kullanılan mitokondriyal COI bölgesine özgü tasarlanmış birçok primer bulunabilir. Böceklerde ise HCO-LCO, LepF-R, UniMiniBar, HexCOI ve HexCOX2 gibi COI hedefli primerler çok kullanılmaktadır. Son yıllarda farklı bölgelere tasarlanan primerlerin tür teşhislerindeki verimliliği tartışılmaktadır. Her geçen gün yeni veriler ortaya atılmakta ve primerler *in vitro* ve in *silico* olarak test edilmektedir. Bu çalışmada görece yeni tasarlanan COI, COX2, 16S ve 12S primerleri karşılaştırılmıştır. Primerlerin barkodlama çalışmalarında en önemli görevleri tür teşhis başarılarıdır. Şekil 6.6'da görüleceği üzere primerlerin bu tezde oluşturulan iş akışına göre tespit edilen türlerin sayısı görselleştirilmiştir. Bu şekle göre primerlerin tespit ettiği tür sayılarına bakıldığında 16S primerleri diğer primerlere göre daha fazla tür tespit edebilmiştir. Beklenenin aksine COI primeri ise en az tür yakalamıştır. Tespit edilen tür sayılarına bakıldığında birbirine yaklaşık değerler görünmemektedir. İki, üç kat fazla türün tespit edildiği karşılaştırmalar mevcuttur. Örneğin COI primeri ve INS (16S) primerleri karşılaştırıldığında fark oldukça fazladır. Bu farklılık çalışma dizaynında primer seçiminin önemini göstermektedir. Primerlere göre tespit edilen türler ve bu verilerin doğruluğu üzerinde durulmaktadır. Bu tezde oluşturulan iş

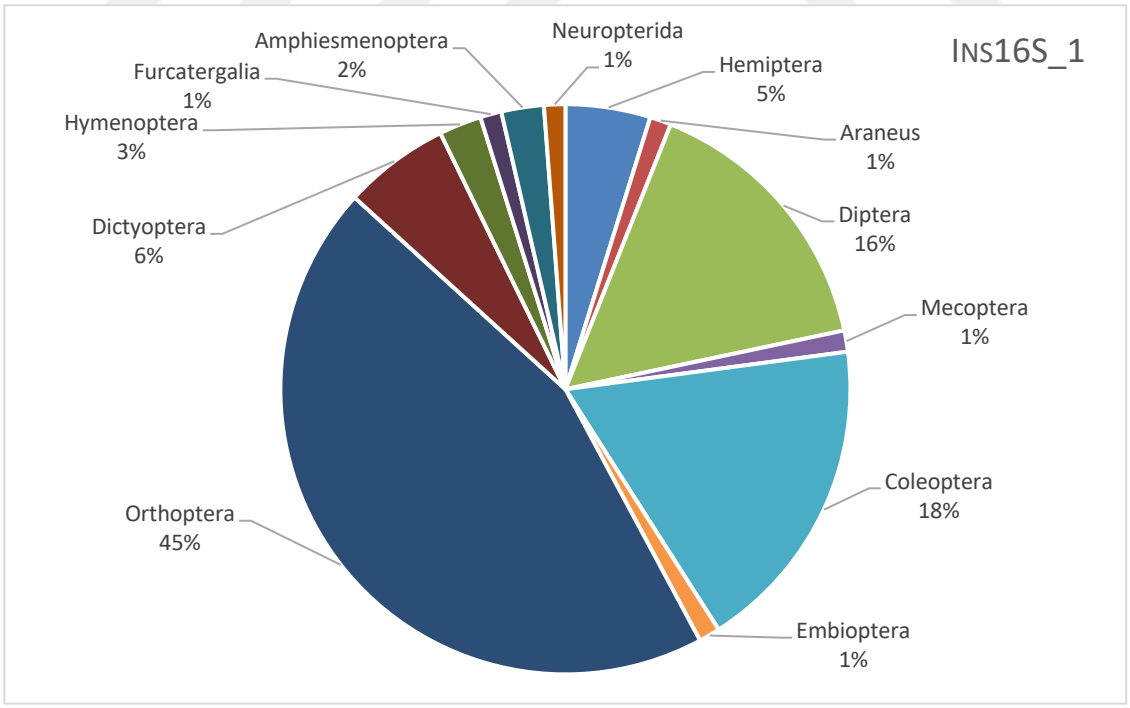
akışında en uyumlu ve verimli primerin INS primeri olduğu söylenebilir. Fakat çalışmalarda baz alınan veriler ışığında count verileriyle tür tespit sayıları karşılaştırıldığında çok eşit dağılım göstermeyen INS primerinde en çok tür elde edilirken görece daha eşit dağılım gösteren HexCOX2 primerinde çok az tür tespit edilmiştir. INS primeri için dizileme verisinde az da olsa ifade edilen diziler tür teşhisinde özgüllük taşımaktadır yorumu yapılabilir. HexCOX2 primerinin ne kadar count değerleri görece daha eşit dağılım göstermişse de tür teşhisinde başarısız gözükmektedir.

Tür teşhislerinde kullanılan veri tabanındaki verilerin sayısı ve niteliği çok önemlidir. Tür teşhisi aşamasında primerlerin verimliliği ölçülürken referans alınan veri tabanındaki verilerin primere özgü veriler olması gerekir. Örneğin NCBI nükleotid veri tabanında COI bölgesi için böceklere ait 2,500,320 adet veri girişi bulunurken böceklere ait 16S verisi 85,849 de kalmıştır. Fakat tezde yapılan çalışma sonucunda veri tabanında da daha az veri bulunmasına rağmen daha çok tür teşhis edilebilmiştir. Bu da veri tabanında yer alan bilgileri sayısından çok özgüllüğünün önemini de öne çıkarmaktadır.

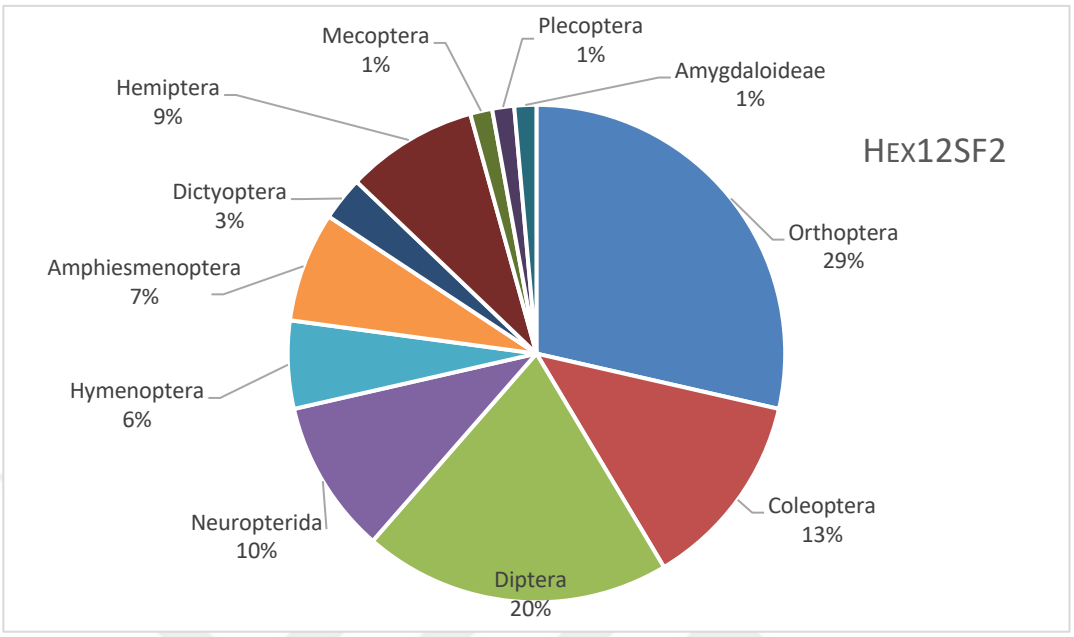
Hem kısa bölge çoğaltmasından hem de en fazla çeşitliliğin yakalanmasından dolayı literatürde de olduğu gibi INS primeri bu çalışmada başarılı gözükmektedir (48). Taksonomik veri tabanının değiştirilmesi ya da böceklere özgü veri tabanlarının kullanılması bu verileri değiştirebilir. Aynı zamanda literatürde ağırlıklı olarak kullanılan gen bölgelerinden daha çok dizi araştırıcılar tarafından girilmiş olabilir ve bu durum eşleşme sayıları ve tür listesini değiştirebilir durumda olmaktadır.



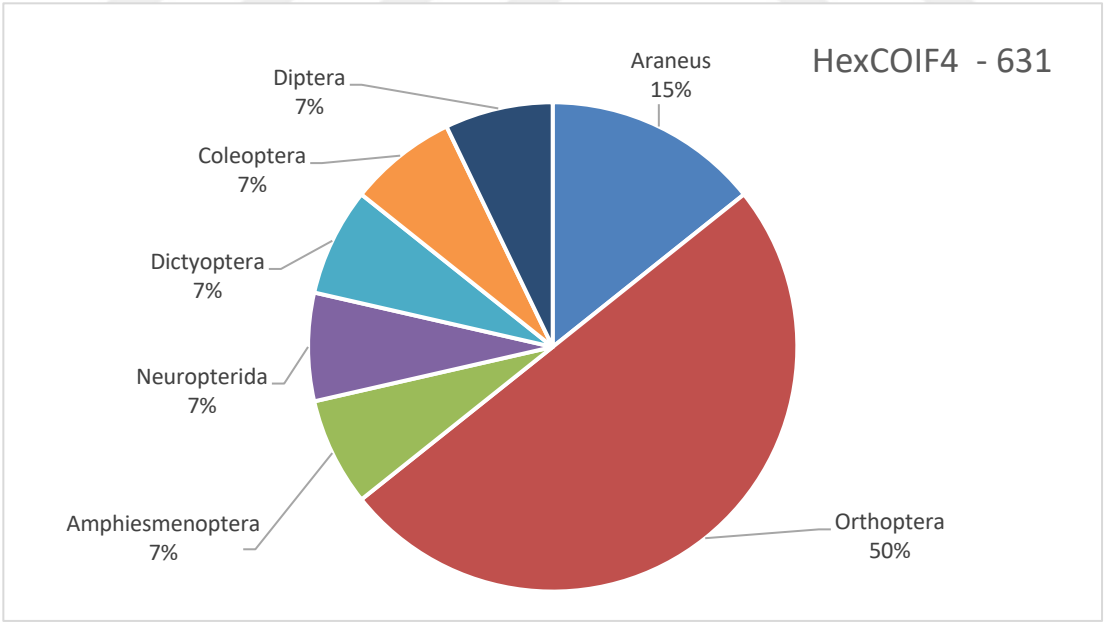
Şekil 6.7. INS primeriyle tespit edilen türlerin takımlarına göre dağılımını gösteren şekil



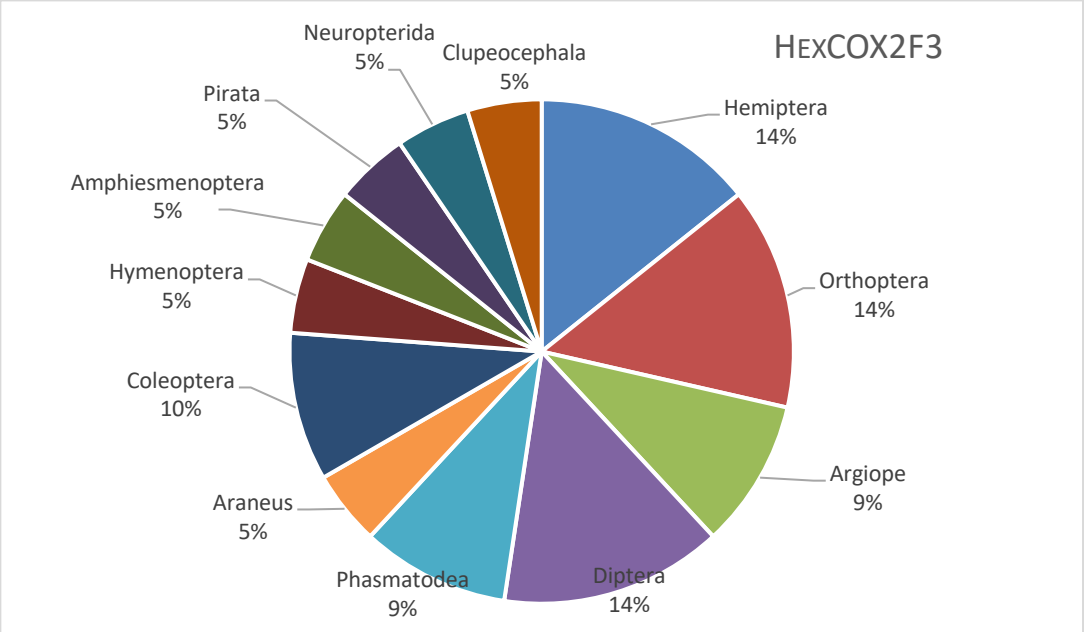
Şekil 6.8. INS16S_1 primeriyle tespit edien türlerin takımlarına göre dağılımını gösteren şekil



Şekil 6.9. HEX12SF primeriyle tespit edilen türlerin takımlarına göre dağılımlarını gösteren şekil



Şekil 6.10. HexCOI primeriyle tespit edilen türlerin takımlarına göre dağılımını gösteren şekil



Şekil 6.11. HexCOX2 primeriyle tespit edilen türlerin takımlarına göre dağılımını gösteren şekil

Böceklerin biyoçeşitliliğinin araştırılmasında taksonomik basamaklar kullanılmaktadır. Takımlar üzerinden araştırmalar yapılmakta ve sonuçlar takımlar üzerinden yorumlanabilmektedir. Her takımın ayırt edici belirli bir morfolojisi vardır. Bölgeye, habitata göre dağılımlar morfolojik olarak tespit edilebilir. Moleküler olarak da bu takımlar birbirinden ayırabilmek mümkündür. Barkodlama çalışmaları sonucunda elde edilen dizileme verileri ile taksonomik eşleşmelerin elde edilmesinden sonra türlerin bulunduğu takımlar oluşturularak dağılım açığa çıkarılabilir. Bu çalışma neticesindeki sonuçların takım dağılım grafikleri Şekil 6.7.'den Şekil 6.11.'e kadar gösterilmiştir. Her bir diziye karşılık gelen türlerin listesi oluşturulduktan sonra türlerin NCBI veri tabanındaki sınıflandırma referans alınmıştır. Her bir benzersiz tür ismine ait takımlar belirlenmiştir. Daha sonra bu takımlar sayısal veriye aktarılarak pasta grafikleri oluşturulmuştur. Tür sonuçlarına göre tür çeşitliliğine paralel olarak takım çeşitliliği beklenmekteydi. Fakat görece az tür tespit edilen HexCOX2 primerinde 12 takım bulunurken INS primerinde 11 adet takım tespit edilmiştir. COI primeri ise en az takım teşhisinde karşımıza çıkmaktadır. Bu grafikler ışığında Orthoptera takımı her primerde temsil edilmiştir. Yoğunluk veya vücut büyüklüğü ile yorumlanabilir. Aynı zamanda her primer için hedeflenebilir takım olarak Diptera karşımıza çıkmaktadır. Her primer için sonuç vermiştir. Fiziksel gözlem ve fotoğraf kayıtlarında tür

yoğunluğu olarak Hymenoptera takımına ait bireyler baskın gibi gözükse de primerlerin takım teşhislerinde bu oran aynı şekilde gözlenmemiştir. Aynı zamanda çok fazla ve çeşitte Orhoptera takımına ait birey fiziksel gözlemlerle gözlenmemesine rağmen baskın olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum Vücut büyüklüğüne dayalı analizlerin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. PZR'da ve dizilemede daha çok ifade edilmiş durumdadır. Fakat çok farklı türler örneklem içinde bulunmamaktadır. Bu denli baskın olmamasın birden fazla nedeni olabilir. Bunlardan biri yoğun DNA miktarı olabilir. Fakat aynı zamanda biyoinformatik iş akışında Orthoptera'ya ait dizilerin belirli bazı nükleotid farkları hatalı türlerle eşleşmeye sebep olmuş olan sonuçlar elde edilmiş olabilir. Bu noktada biyoinformatik iş akışında uniq basamağında yapılan benzersiz dizileri aynı okumada birleştirme basamağı, benzersizlik oranındaki parametrelerde değişiklik yapılarak bu sorun ortadan kaldırılabilir.

6.2. SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Takımların dağılımına bakıldığında Orthoptera tüm primerlerde de ağırlıklı olarak tespit edilen takımdır. INS primeri için Orhoptera, Coleoptera, Hemiptera en fazla tespit edilen takımlarken, COI primeri için Orthoptera ve Araneuslar bulunur. Hymenoptera takımı COI primeriyle hiçbir şekilde tespit edilememiştir. Literatürdeki araştırmaya göre COI primerleriyle Hymenoptera takımından bireyler tespit edilebilmektedir (49). Fakat bu araştırma *in silico* olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulamada ise veri vermemiştir. Bu durum yalnızca örnekler sebepli olmayıp PZR, dizileme ve biyoinformatik araçlar neticesinde olmuş olabilir. Diğer yoğunluklu olan takımlarda ise vücut büyüklükleri ve sayılarından dolayı bu şekilde bir sonuca ulaşılmış olabilir. COX2 primeri diğer tüm primerlere göre daha fazla takım tespit edebilirken tür sayısı ve çeşitliliği konusunda en az durumdadır. Ayrıca COX2 örümcekler için daha uygun bir primer olduğu yorumu yapılabilir. Örneklerin içinde yer alan örümceklerin tespit edildiği tek primer olarak karşımıza çıkmaktadır. COI'nin farklı bölgelerini çoğaltan literatürdeki primerlerin türleri teşhis edebilme yetenekleri farklı olabilmektedir. Bu yapılan çalışmalarda rutinde de kullanılmış olup mevsimsel değişimlerde dahi türlerin barkodlanması için COI primerleri kullanılmıştır (7, 58).

Elbrecht ve ark. tarafından yapılan çalışmada 16S bölgesini çoğaltan primerle COI ve COX2'ye göre daha fazla tür tanımlayabilmişlerdir (48). Bu çalışmaya paralel olarak bu tez çalışmasındaki veriler de bu sonucu doğrulamaktadır. Malaise trap kullanımıyla yapılan bu

şekildeki çalışmalardaki asıl hedef çok fazla tür yakalayabilmektir. Bunun için birçok parametre kullanılabilir. Sadece primer kullanımı değil biyoinformatik iş akışlarındaki değişiklikler, arazi örneklemesinin yeri ve süresi, örneklerin DNA izolasyon teknikleri, PZR koşulları ve enzimi gibi değişkenler sonuçları etkileyebilmektedir (7, 45, 48, 49, 59, 60). Metabarkodlama ile türlerin morfolojik gözleminden daha fazla tür elde edilmiştir. Bu durum doku homojenizasyonu sırasında canlıların yedikleri besin içeriklerinin de açığa çıkmış olma ihtimali olabilir. Bu şekilde av-avcı ilişkisi ile homojenizasyon sırasında açığa çıkan DNA tür teşhislerinde farklılıklar oluşturabilir (61). Tüm sonuçlar hakkında biyoinformatik iş akışı açısından dizilerin count verileri ve tür eşleşmeleri üzerinden bir değerlendirme yapmak mümkündür. Count verileri düzensiz dağılmıştır. Bu düzensizlik ıslak laboratuvar uygulamalarından kaynaklanmıştır diyebiliriz. Fakat düşük count verilerinin de tür eşleşmesi verebilir olması biyoinformatik iş akışı açısından güvenilir olmayan bir noktaya getirmiştir. Yüz bin okuma sayısıyla elde edilen dizileme verisinde yalnızca beş adet temsil edilen dizi oransal olarak çok düşüktür. Bu biyoinformatik iş akışında verilerin tekrar analizi veya farklı analiz yöntemleri kullanılarak doğruluğu test edilebilir. Bu sayede veriler ve tür sonuçları daha güvenilir olabilir.

6.3. SONUÇ

Belirli bir bölgede yaşayan böcekleri moleküler yöntemler kullanarak tespit etmeye yönelik olarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Belirli coğrafyalarda ve belirli durumlarda (yangın, çevre felaketi vb.) biyoçeşitliliğin bilinmesi önem arz edebilir. Bu amaçla böcek çeşitliliğini tespit edebilmek için gerekli zamanı, iş gücünü en aza indirmek hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında Bozalan bölgesine ait Haziran ayı örneklemesi yapılmış ve moleküler olarak türler teşhis edilmiştir. Kullanılan tuzağın her böcek takımına uygun olmamasına bağımlı olarak yakalanan türler açığa çıkarılmıştır. Kullanılan primerlere bağımlı olarak farklı tür teşhisleri gerçekleşmiştir. 16S primerleri daha fazla tür yakalarken, COX2 primerinde en az çeşitlilik gözlenmektedir.

Bu tezdeki iş akışı sayesinde birçok araştırma için kullanılabilir bir yöntem geliştirilmiştir. Tekrar edilebilir bir yöntem olmasının yanı sıra verilerin dijitalleşmesi konusunda önemli bir noktada yer almaktadır. Bu tez böceklerin dijital ve genetik bilgilerinin kayıt altına alınabilmesini sağlayan bir yöntemdir ve dünya canlı envanterinin çıkarılması açısından hızlı

ve pratik bir yöntem ortaya sürmüştür. Ayrıca endemik, soyu tükenmekte olan canlılar hızlı bir şekilde tespit edilebilir ve kayıt altına alınabilir.

KAYNAKLAR

1. Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJ, Collen B. Defaunation in the Anthropocene. Science. 2014;345(6195):401-6. doi: 10.1126/science.1251817. PubMed PMID: 25061202.

2. Stork NE. Biodiversity: world of insects. Nature. 2007;448(7154):657-8. doi: 10.1038/448657a. PubMed PMID: 17687315.

3. Stork NE. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? Annu Rev Entomol. 2018;63:31-45. Epub 20170922. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043348. PubMed PMID: 28938083.

4. Behura SK. Insect phylogenomics. Insect Mol Biol. 2015;24(4):403-11. Epub 20150512. doi: 10.1111/imb.12174. PubMed PMID: 25963452; PubMed Central PMCID: PMC4503476.

5. Brandon-Mong GJ, Gan HM, Sing KW, Lee PS, Lim PE, Wilson JJ. DNA metabarcoding of insects and allies: an evaluation of primers and pipelines. Bull Entomol Res. 2015;105(6):717-27. Epub 20150907. doi: 10.1017/S0007485315000681. PubMed PMID: 26344799.

6. Clarke LJ, Soubrier J, Weyrich LS, Cooper A. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. Mol Ecol Resour. 2014;14(6):1160-70. Epub 20140514. doi: 10.1111/1755-0998.12265. PubMed PMID: 24751203.

7. Elbrecht V, Braukmann TWA, Ivanova NV, Prosser SWJ, Hajibabaei M, Wright M, et al. Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. PeerJ. 2019;7:e7745. Epub 20191007. doi: 10.7717/peerj.7745. PubMed PMID: 31608170; PubMed Central PMCID: PMC6786254.

8. Sekercioglu CH, Anderson S, Akcay E, Bilgin R, Can OE, Semiz G, et al. Turkey's globally important biodiversity in crisis. Biol Conserv. 2011;144(12):2752-69. doi: 10.1016/j.biocon.2011.06.025. PubMed PMID: WOS:000298521500007.

9. Mikic A, Zoric L, Zlatkovic B. Origin of the binomial Linneaus nomenclature used to name some Old World legume species. Iheringia Ser Bot. 2015;70(1):173-6. PubMed PMID: WOS:000360780300015.

10. Pausas JG, Bond WJ. Humboldt and the reinvention of nature. J Ecol. 2019;107(3):1031-7. doi: 10.1111/1365-2745.13109. PubMed PMID: WOS:000467417500001.

11. Mohan AV, Tamma K. The Lasting Contribution of Alexander von Humboldt to Our Understanding of the Natural World. Resonance. 2021;26(8):1041-50. doi: 10.1007/s12045-021-1207-z. PubMed PMID: WOS:000686587800004.

12. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: methods and protocols. Methods Mol Biol. 2012;858:3-8. doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_1. PubMed PMID: 22684949.

13. Jusino MA, Banik MT, Palmer JM, Wray AK, Xiao L, Pelton E, et al. An improved method for utilizing high-throughput amplicon sequencing to determine the diets of insectivorous animals. Mol Ecol Resour. 2019;19(1):176-90. doi: 10.1111/1755-0998.12951. PubMed PMID: 30281913.

14. Piper AM, Batovska J, Cogan NOI, Weiss J, Cunningham JP, Rodoni BC, et al. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. Gigascience. 2019;8(8). doi: 10.1093/gigascience/giz092. PubMed PMID: 31363753; PubMed Central PMCID: PMC6667344.

15. Adamowicz SJ, Boatwright JS, Chain F, Fisher BL, Hogg ID, Leese F, et al. Trends in DNA barcoding and metabarcoding. Genome. 2019;62(3):v-viii. doi: 10.1139/gen-2019-0054. PubMed PMID: 30998119.

16. Deiner K, Bik HM, Machler E, Seymour M, Lacoursiere-Roussel A, Altermatt F, et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Mol Ecol. 2017;26(21):5872-95. Epub 20171026. doi: 10.1111/mec.14350. PubMed PMID: 28921802.

17. Beck TF, Mullikin JC, Program NCS, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. Clin Chem. 2016;62(4):647-54. Epub 20160204. doi: 10.1373/clinchem.2015.249623. PubMed PMID: 26847218; PubMed Central PMCID: PMC4878677.

18. Harvey NR, Albury CL, Stuart S, Benton MC, Eccles DA, Connell JR, et al. Ion torrent high throughput mitochondrial genome sequencing (HTMGS). PLoS One. 2019;14(11):e0224847. Epub 20191115. doi: 10.1371/journal.pone.0224847. PubMed PMID: 31730669; PubMed Central PMCID: PMC6857855.

19. Levy SE, Boone BE. Next-Generation Sequencing Strategies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(7). Epub 20190701. doi: 10.1101/cshperspect.a025791. PubMed PMID: 30323017; PubMed Central PMCID: PMC6601457.

20. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016;14(5):265-79. Epub 20160917. doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004. PubMed PMID: 27646134; PubMed Central PMCID: PMC5093776.

21. Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. Methods Mol Biol. 2018;1706:223-32. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12. PubMed PMID: 29423801.

22. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2015;13(5):278-89. Epub 20151102. doi: 10.1016/j.gpb.2015.08.002. PubMed PMID: 26542840; PubMed Central PMCID: PMC4678779.

23. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2016;17:95-115. Epub 20160609. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022413. PubMed PMID: 27362342.

24. Batovska J, Lynch SE, Cogan NOI, Brown K, Darbro JM, Kho EA, et al. Effective mosquito and arbovirus surveillance using metabarcoding. Mol Ecol Resour. 2018;18(1):32-40. Epub 20170515. doi: 10.1111/1755-0998.12682. PubMed PMID: 28417591; PubMed Central PMCID: PMC5811807.

25. Beng KC, Tomlinson KW, Shen XH, Surget-Groba Y, Hughes AC, Corlett RT, et al. The utility of DNA metabarcoding for studying the response of arthropod diversity and composition to land-use change in the tropics. Sci Rep. 2016;6:24965. Epub 20160426. doi: 10.1038/srep24965. PubMed PMID: 27112993; PubMed Central PMCID: PMC4844954.

26. Yoccoz NG. The future of environmental DNA in ecology. Mol Ecol. 2012;21(8):2031-8. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05505.x. PubMed PMID: 22486823.

27. Ferreira S, Velo-Anton G, Brochard C, Vieira C, Alves PC, Thompson DJ, et al. A Critically Endangered new dragonfly species from Morocco: Onychogomphus boudoti sp. nov. (Odonata: Gomphidae). Zootaxa. 2014;3856(3):349-65. Epub 20140825. doi: 10.11646/zootaxa.3856.3.3. PubMed PMID: 25284663.

28. Schmidt KJ, Soluk DA, Maestas SEM, Britten HB. Persistence and accumulation of environmental DNA from an endangered dragonfly. Sci Rep. 2021;11(1):18987. Epub 20210923. doi: 10.1038/s41598-021-98099-1. PubMed PMID: 34556696; PubMed Central PMCID: PMC8460674.

29. Elbrecht V, Bourlat SJ, Horren T, Lindner A, Mordente A, Noll NW, et al. Pooling size sorted Malaise trap fractions to maximize taxon recovery with metabarcoding. PeerJ. 2021;9:e12177. Epub 20211005. doi: 10.7717/peerj.12177. PubMed PMID: 34707928; PubMed Central PMCID: PMC8500090.

30. Toju H, Baba YG. DNA metabarcoding of spiders, insects, and springtails for exploring potential linkage between above- and below-ground food webs. Zoological Lett. 2018;4:4. Epub 20180215. doi: 10.1186/s40851-018-0088-9. PubMed PMID: 29468086; PubMed Central PMCID: PMC5815251.

31. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods. 2003;55(3):541-55. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009. PubMed PMID: 14607398.

32. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. Int J Legal Med. 2007;121(5):423-7. Epub 20060715. doi: 10.1007/s00414-006-0113-y. PubMed PMID: 16845543.

33. Hossain MAM, Uddin SMK, Chowdhury ZZ, Sultana S, Johan MR, Rohman A, et al. Universal mitochondrial 16s rRNA biomarker for mini-barcode to identify fish species in Malaysian fish products. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk

Assess. 2019;36(4):493-506. Epub 20190313. doi: 10.1080/19440049.2019.1580389. PubMed PMID: 30865559.

34. Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. Nature. 2015;526(7571):29-31. doi: 10.1038/526029a. PubMed PMID: 26432225; PubMed Central PMCID: PMC5101944.

35. Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S, Couce ML. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research , Diagnosis and Treatment. Curr Med Chem. 2018;25(3):404-32. doi: 10.2174/0929867324666170718101946. PubMed PMID: 28721829; PubMed Central PMCID: PMC5815091.

36. Morris PJ. From Mendel to the Human Genome Project. N C Med J. 2013;74(6):477. PubMed PMID: 24316768.

37. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(10):1932-41. Epub 20140701. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015. PubMed PMID: 24995601.

38. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. Arch Pathol Lab Med. 2017;141(11):1544-57. Epub 20170807. doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA. PubMed PMID: 28782984.

39. Stephens ZD, Lee SY, Faghri F, Campbell RH, Zhai CX, Efron MJ, et al. Big Data: Astronomical or Genomical? Plos Biol. 2015;13(7). doi: ARTN e1002195

10.1371/journal.pbio.1002195. PubMed PMID: WOS:000360617100009.

40. Greene AC, Giffin KA, Greene CS, Moore JH. Adapting bioinformatics curricula for big data. Brief Bioinform. 2016;17(1):43-50. Epub 20150330. doi: 10.1093/bib/bbv018. PubMed PMID: 25829469; PubMed Central PMCID: PMC4719066.

41. Stein LD. Unix Survival Guide. Curr Protoc Bioinformatics. 2015;51:A1 C -A C 27. Epub 20150903. doi: 10.1002/0471250953.bia01cs51. PubMed PMID: 26334925.

42. Hausmann A, Segerer AH, Greifenstein T, Knubben J, Moriniere J, Bozicevic V, et al. Toward a standardized quantitative and qualitative insect monitoring scheme. Ecol Evol. 2020;10(9):4009-20. Epub 20200402. doi: 10.1002/ece3.6166. PubMed PMID: 32489627; PubMed Central PMCID: PMC7244892.

43. Li F, Zhao X, Li M, He K, Huang C, Zhou Y, et al. Insect genomes: progress and challenges. Insect Mol Biol. 2019;28(6):739-58. Epub 20190617. doi: 10.1111/imb.12599. PubMed PMID: 31120160.

44. Svenningsen CS, Froslev TG, Bladt J, Pedersen LB, Larsen JC, Ejrnaes R, et al. Detecting flying insects using car nets and DNA metabarcoding. Biol Lett. 2021;17(3):20200833. Epub 20210331. doi: 10.1098/rsbl.2020.0833. PubMed PMID: 33784872; PubMed Central PMCID: PMC8086955.

45. Zhang XM, Shi ZY, Zhang SQ, Zhang P, Wilson JJ, Shih C, et al. Plant-herbivorous insect networks: who is eating what revealed by long barcodes using high-throughput sequencing and Trinity assembly. Insect Sci. 2021;28(1):127-43. Epub 20200413. doi: 10.1111/1744-7917.12749. PubMed PMID: 31880864.

46. MALAISE TRAPS – TOWNES STYLE [cited 2021 25.12]. Available from: https://www.entosupplies.com.au/equipment/field/traps/malaise-traps-townes-style/.

47. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Brief Bioinform. 2013;14(2):178-92. Epub 20120419. doi: 10.1093/bib/bbs017. PubMed PMID: 22517427; PubMed Central PMCID: PMC3603213.

48. Elbrecht V, Taberlet P, Dejean T, Valentini A, Usseglio-Polatera P, Beisel JN, et al. Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. PeerJ. 2016;4:e1966. Epub 20160419. doi: 10.7717/peerj.1966. PubMed PMID: 27114891; PubMed Central PMCID: PMC4841222.

49. Marquina D, Andersson AF, Ronquist F. New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. Mol Ecol Resour. 2019;19(1):90-104. Epub 20181016. doi: 10.1111/1755-0998.12942. PubMed PMID: 30226026; PubMed Central PMCID: PMC7379581.

50. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. Mol Ecol Resour. 2016;16(1):176-82. Epub 20150526. doi: 10.1111/1755-0998.12428. PubMed PMID: 25959493.

51. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Res. 2018;7:1338. Epub 20180824. doi: 10.12688/f1000research.15931.2. PubMed PMID: 30254741; PubMed Central PMCID: PMC6124377.

52. Gibney G, Baxevanis AD. Searching NCBI Databases Using Entrez. Curr Protoc Hum Genet. 2011;Chapter 6:Unit6 10. doi: 10.1002/0471142905.hg0610s71. PubMed PMID: 21975942.

53. Zipf L, Williams EH, Primack RB, Stichter S. Climate effects on late-season flight times of Massachusetts butterflies. Int J Biometeorol. 2017;61(9):1667-73. Epub 20170405. doi: 10.1007/s00484-017-1347-8. PubMed PMID: 28382376.

54. Robinet C, Roques A. Direct impacts of recent climate warming on insect populations. Integr Zool. 2010;5(2):132-42. doi: 10.1111/j.1749-4877.2010.00196.x. PubMed PMID: 21392331.

55. Marquina D, Esparza-Salas R, Roslin T, Ronquist F. Establishing arthropod community composition using metabarcoding: Surprising inconsistencies between soil samples and preservative ethanol and homogenate from Malaise trap catches. Mol Ecol Resour. 2019;19(6):1516-30. Epub 20190918. doi: 10.1111/1755-0998.13071. PubMed PMID: 31379089; PubMed Central PMCID: PMC6899807.

56. Schmidt O, Schmidt S, Hauser CL, Hausmann A, Van Vu L. Using Malaise traps for collecting Lepidoptera (Insecta), with notes on the preparation of Macrolepidoptera from ethanol. Biodivers Data J. 2019(7):e32192. Epub 20190220. doi: 10.3897/BDJ.7.e32192. PubMed PMID: 30918447; PubMed Central PMCID: PMC6426827.

57. Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Mol Ecol Notes. 2007;7(3):355-64. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x. PubMed PMID: 18784790; PubMed Central PMCID: PMC1890991.

58. Brandon-Mong GJ, Gan HM, Sing KW, Lee PS, Lim PE, Wilson JJ. Optimizing metabarcoding of tropical Malaise trap samples and preliminary results on seasonal changes in insect diversity in Penisular Malaysia. Genome. 2015;58(5):200-. PubMed PMID: WOS:000360861200058.

59. Suaste-Dzul AP, Rodriguez-Velez JM, Rodriguez-Velez B, Arredondo-Bernal HC, Gallou A. Non-destructive DNA extraction methods for entomophagous insects with emphasis on biological control. Genome. 2019;62(4):287-93. Epub 20190228. doi: 10.1139/gen-2018-0045. PubMed PMID: 30817213.

60. Andujar C, Arribas P, Yu DW, Vogler AP, Emerson BC. Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. Mol Ecol. 2018;27(20):3968-75. Epub 20180917. doi: 10.1111/mec.14844. PubMed PMID: 30129071.

61. Buchner D, Beermann AJ, Leese F, Weiss M. Cooking small and large portions of "biodiversity-soup": Miniaturized DNA metabarcoding PCRs perform as good as large-volume PCRs. Ecology and Evolution. 2021;11(13):9092-9. doi: 10.1002/ece3.7753. PubMed PMID: WOS:000659867800001.

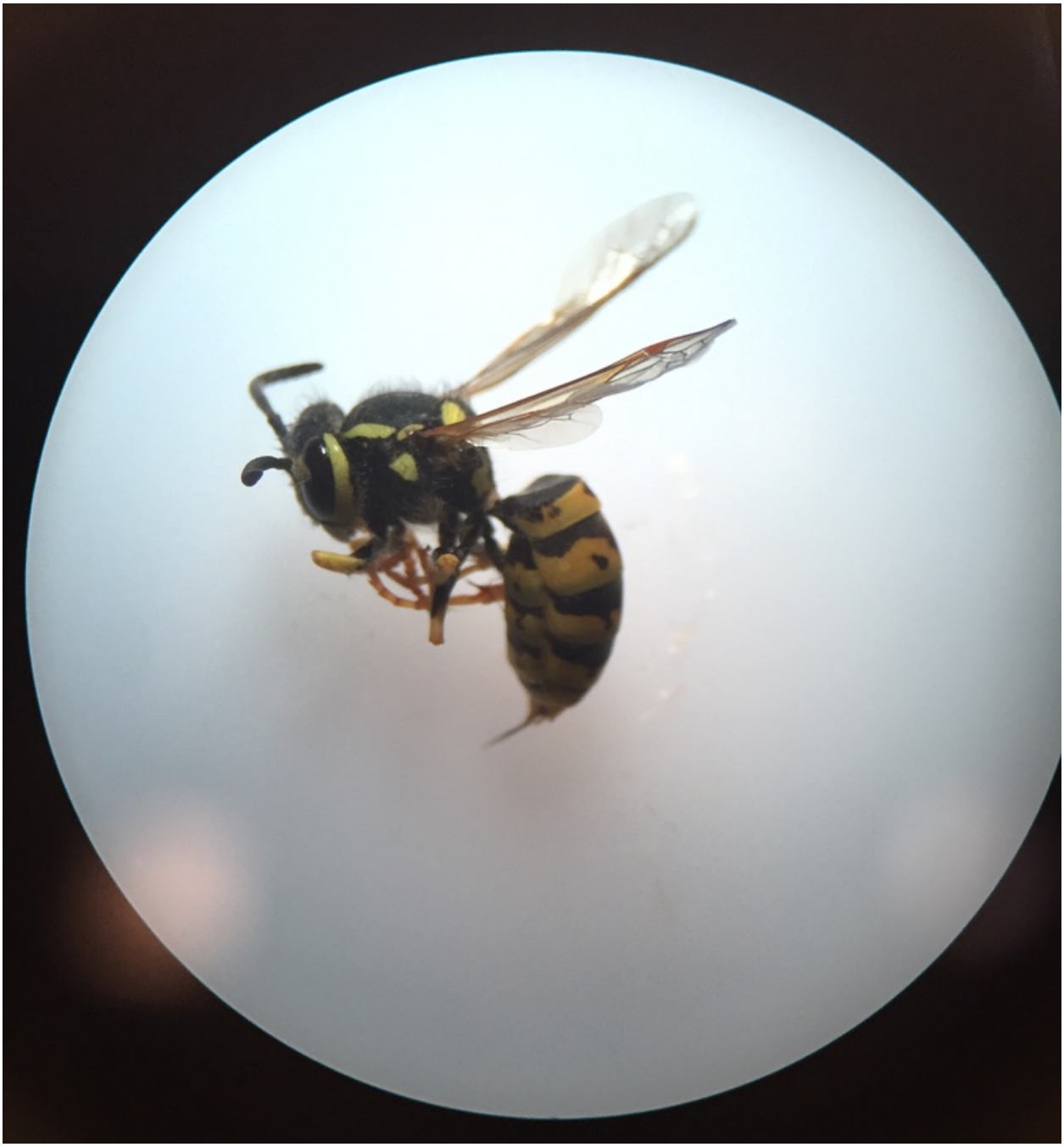
EKLER

Böcek örneklerinin laboratuvar ortamında ışık mikroskobu atında çekilmiş fotoğrafları ekte verilmiştir. Ayırca biyoinformatik analiz aşamasında oluşturulmuş olan bash betiği de ekte sunulmuştur.

EK 1: BÖCEK ÖRNEKLERİNİN FOTOĞRAFLARI

Örnek 1’in mikroskop altındaki görüntüsü.

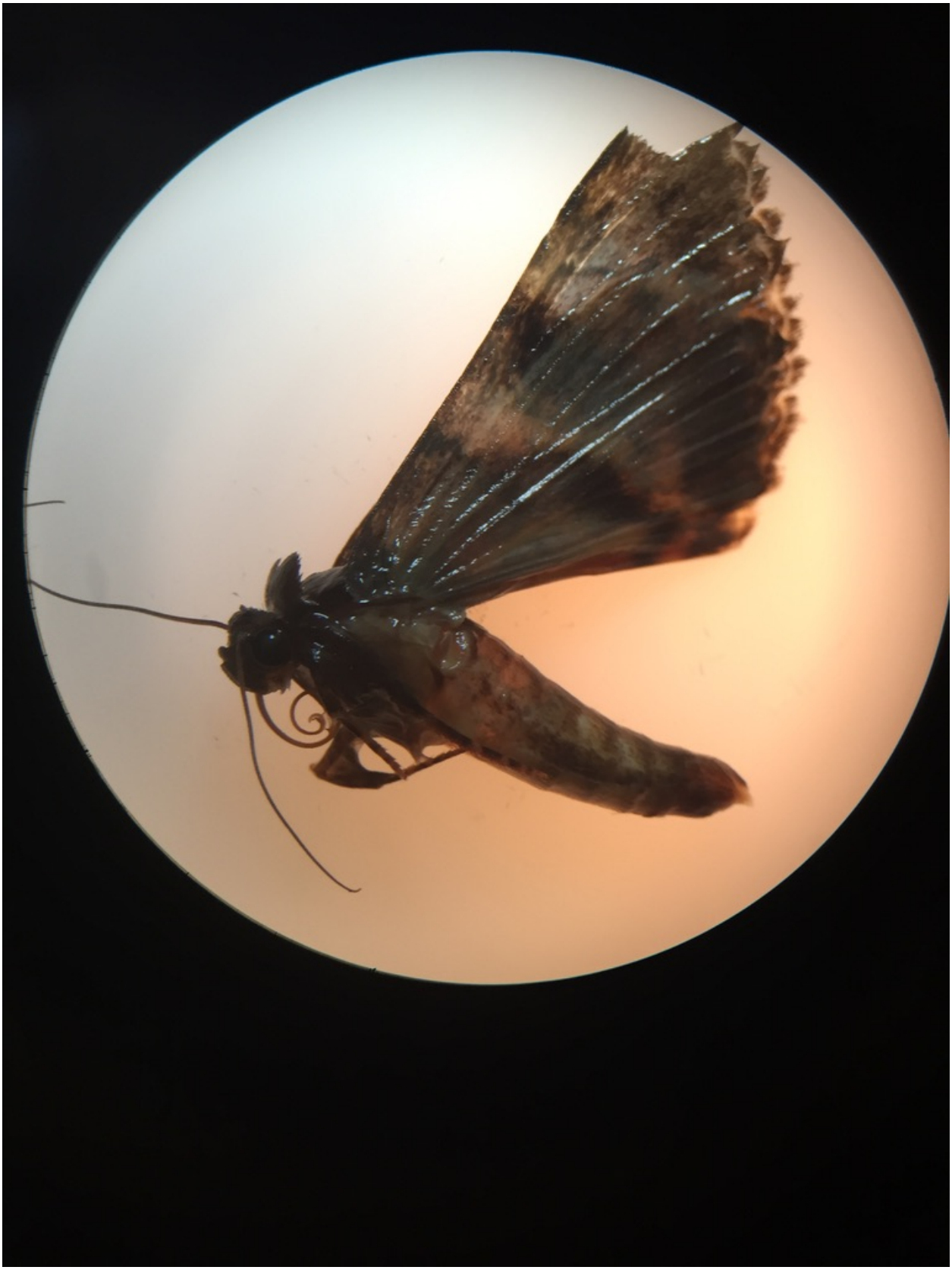
Örnek 2’nin mikroskop altındaki görüntüsü.



Örmek 3’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

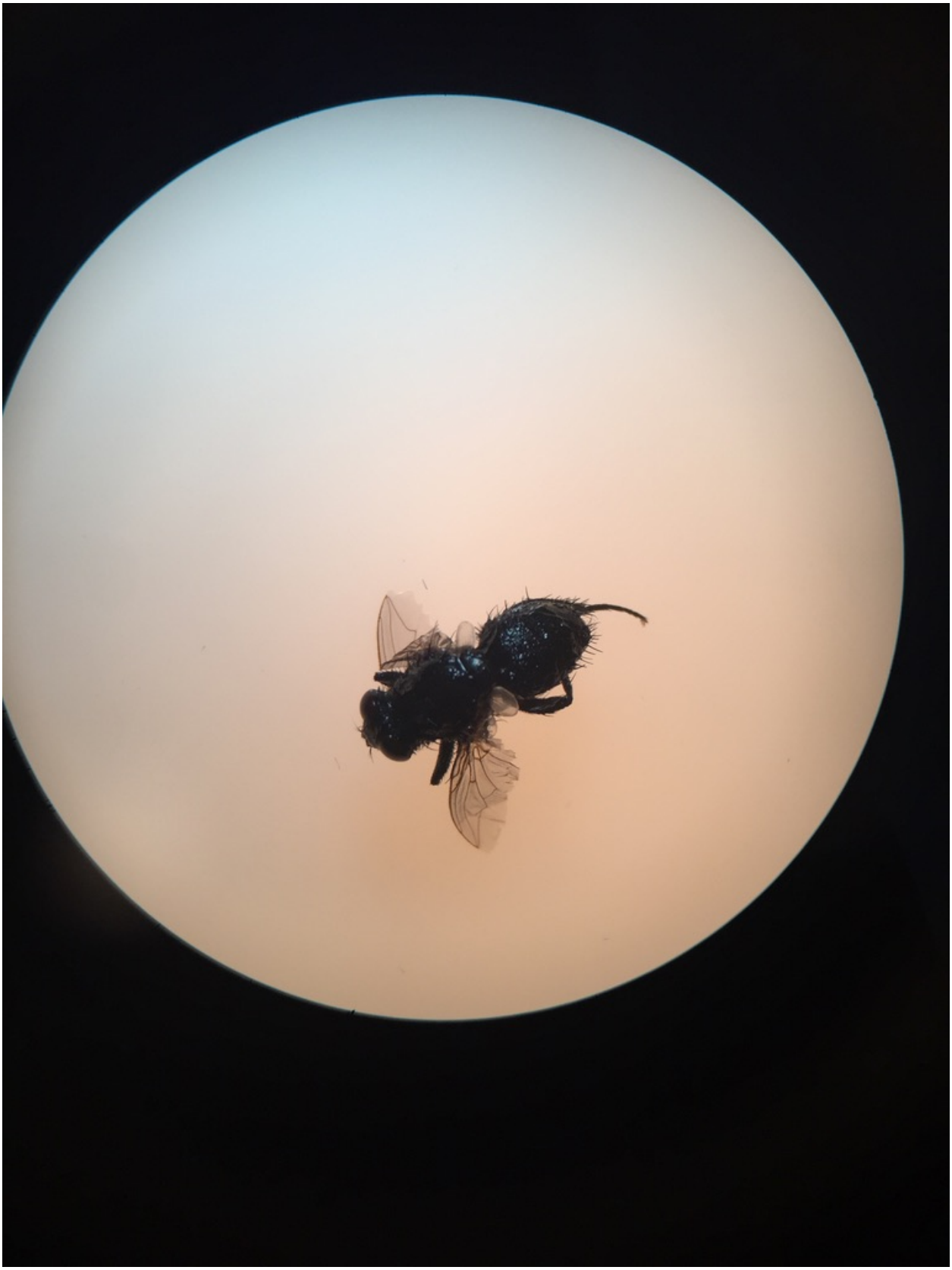
Örnek 4’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 5’in mikroskop altındaki görüntüsü.



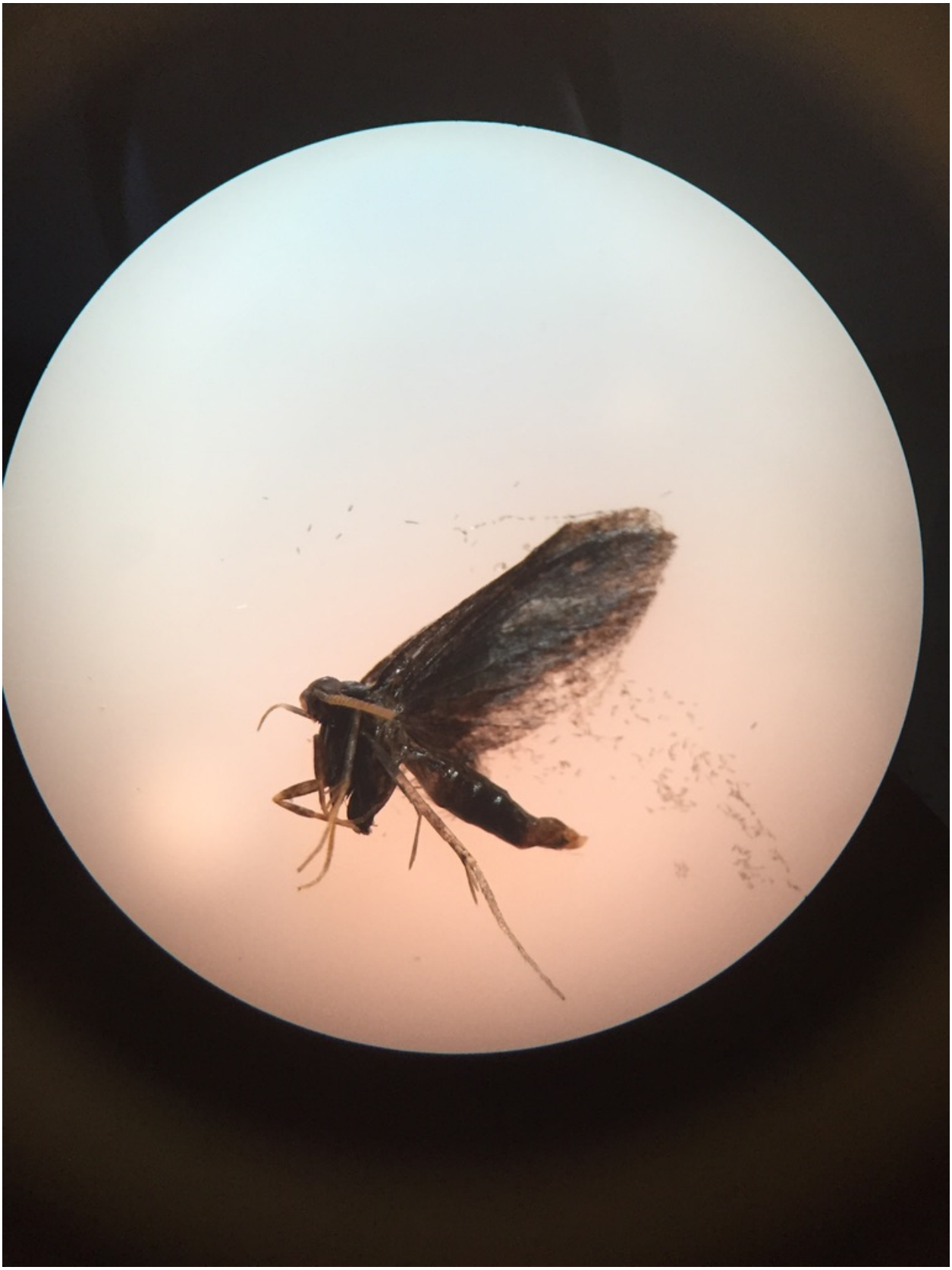
Örnek 6’nın mikroskop altındaki görüntüsü

Örnek 7’nin mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 8’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 9’un mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 10’un mikroskop altındaki görüntüsü.

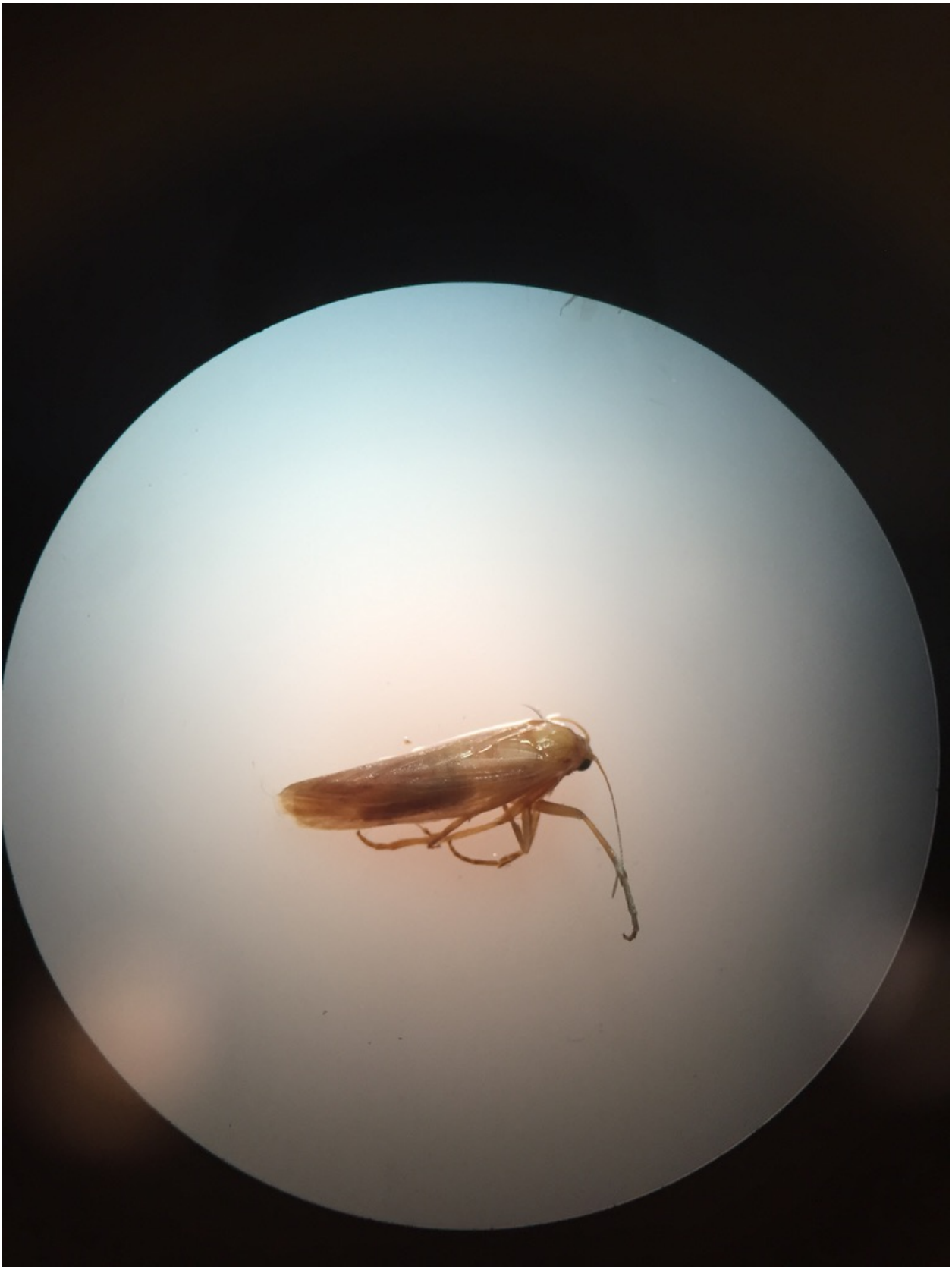
Örnek 11’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 12’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 13’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 14’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 15’in mikroskop altındaki görüntüsü.



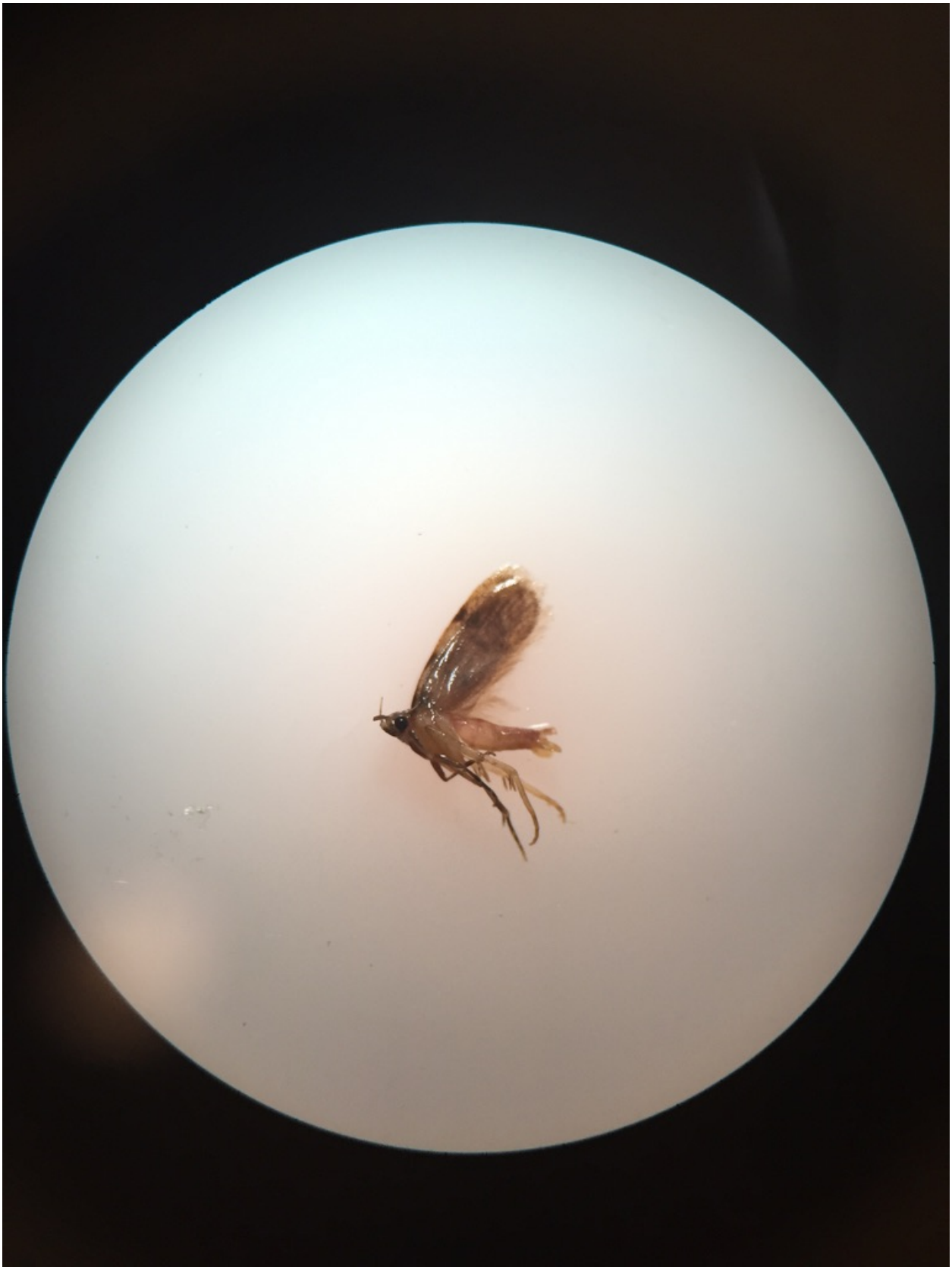
Örnek 16’nın mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 17’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

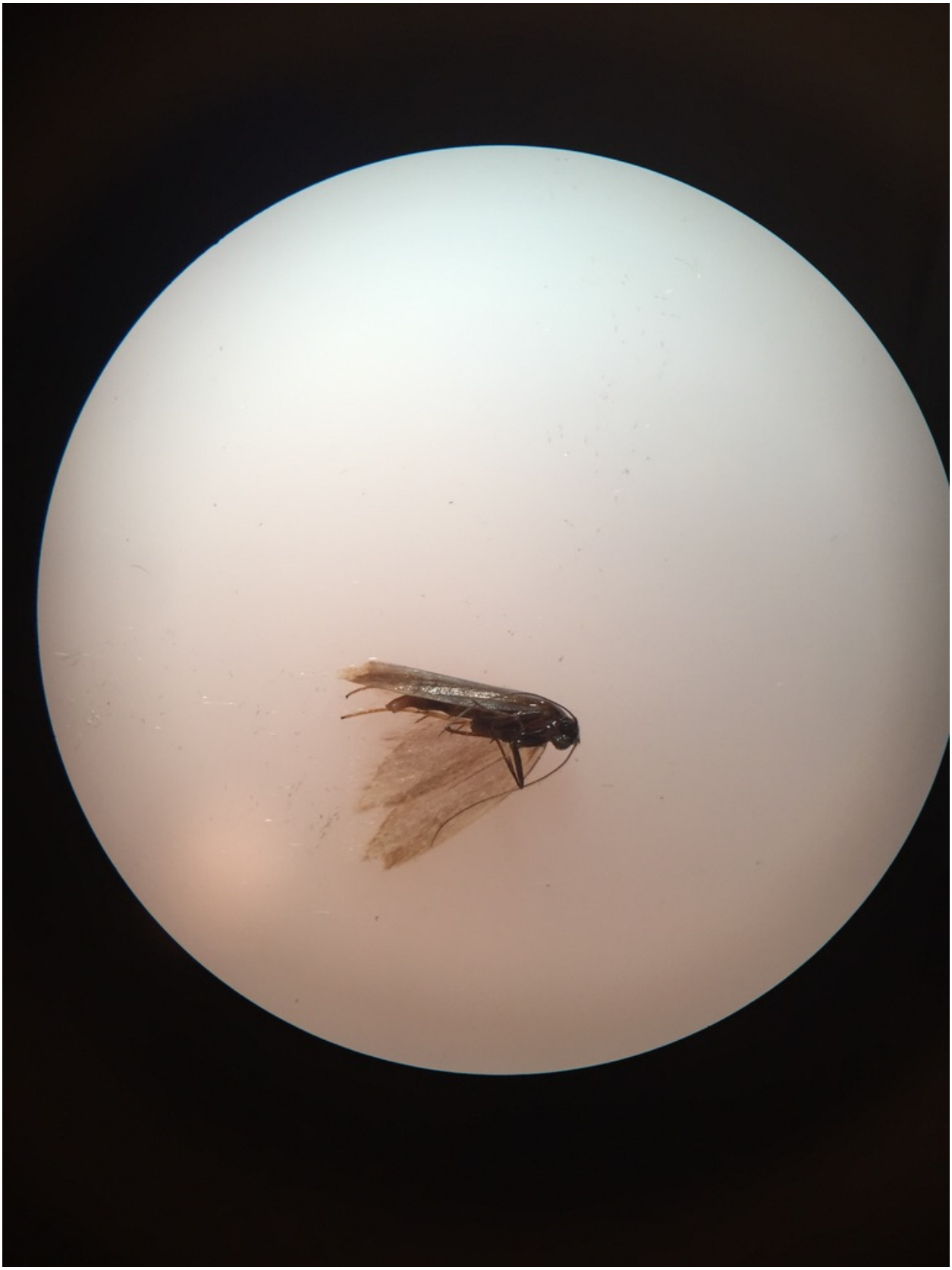
Örnek 18’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 19’un mikroskop altındaki görüntüsü.

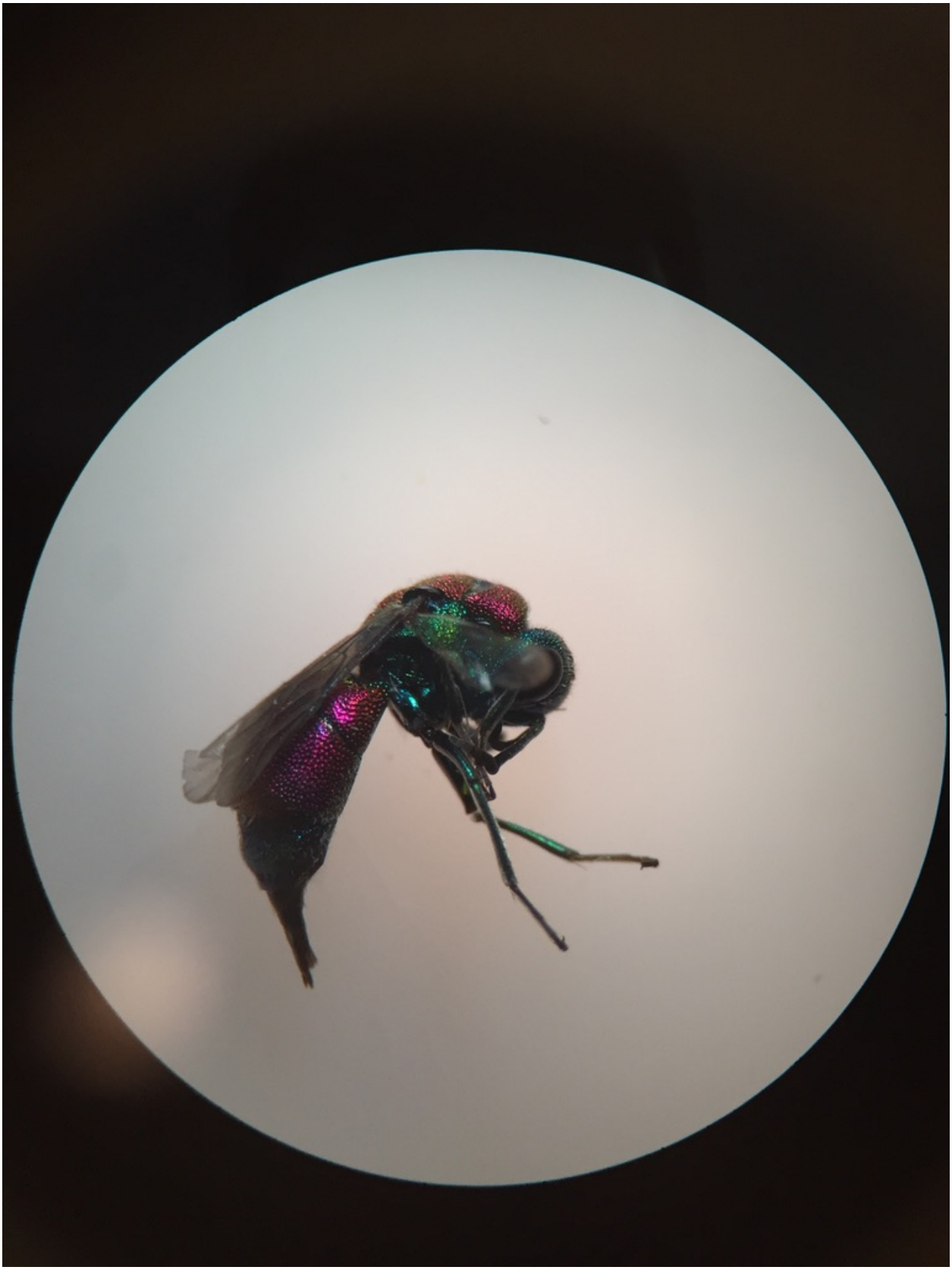
Örnek 20’nin mikroskop altındaki görüntüsü



Örnek 21’in mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 22’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

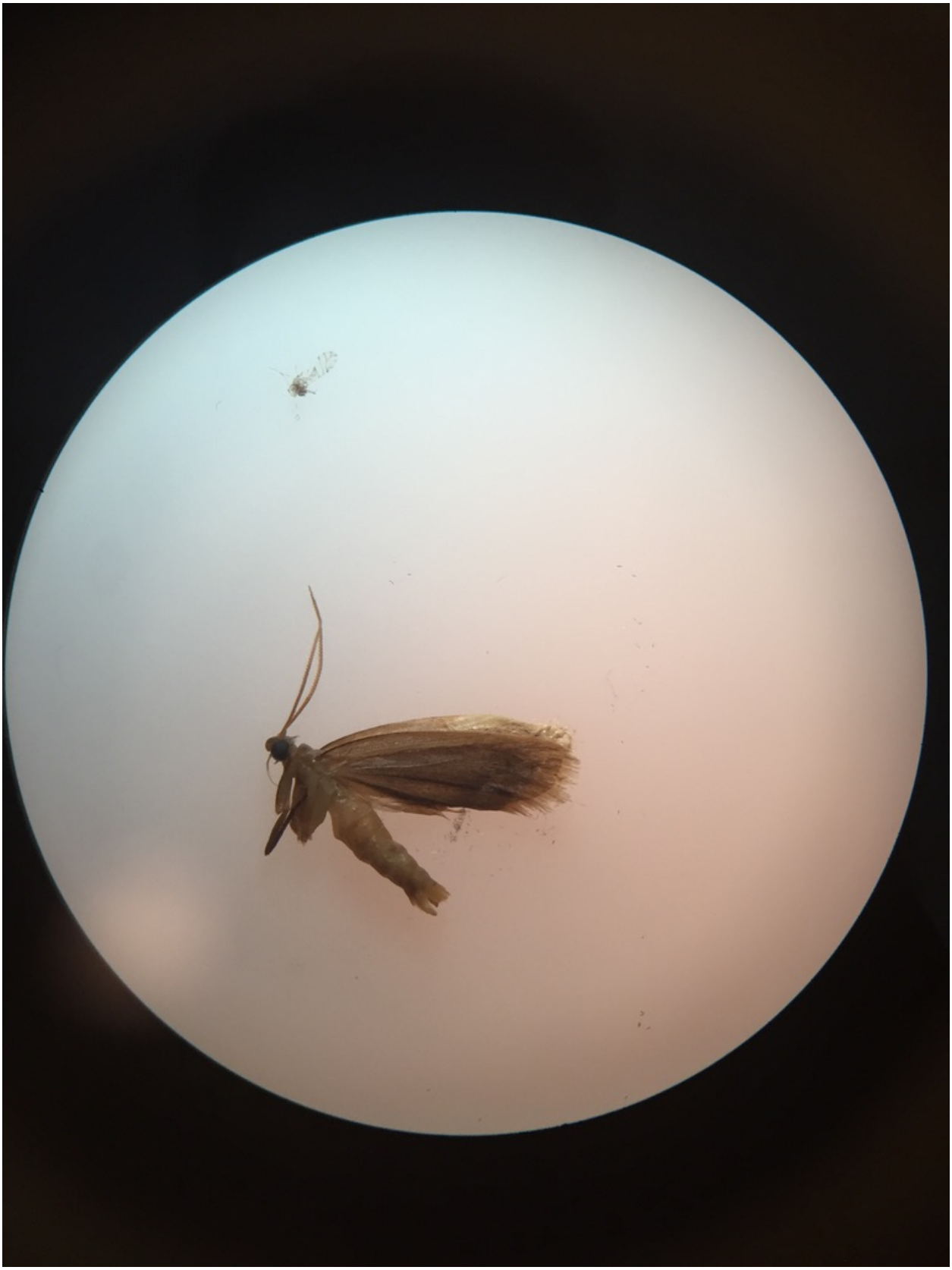


Örnek 23’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 24’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 25’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 26’nın mikroskop altındaki görüntüsü.



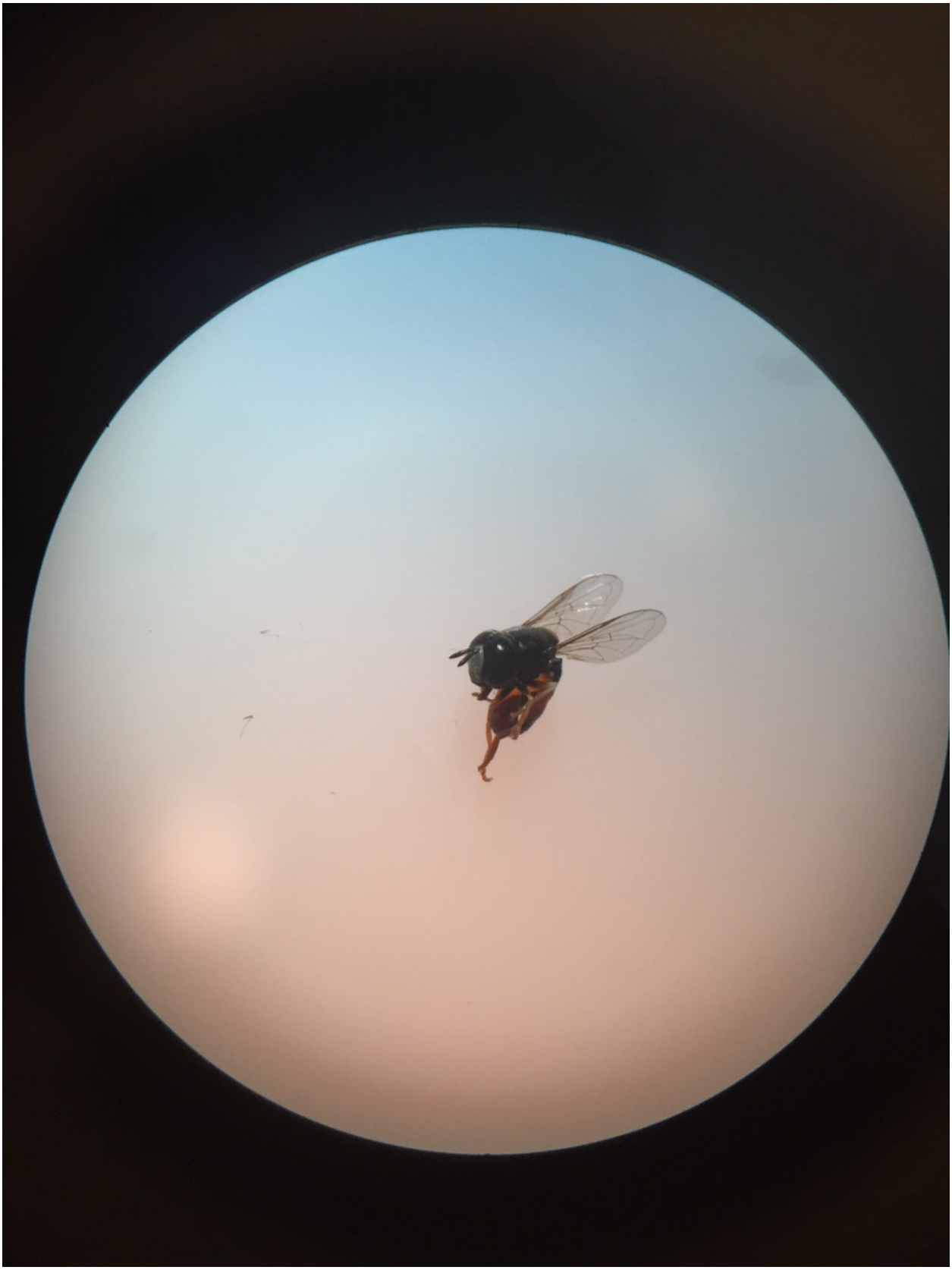
Örnek 27’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 28’in mikroskop altındaki görüntüsü.

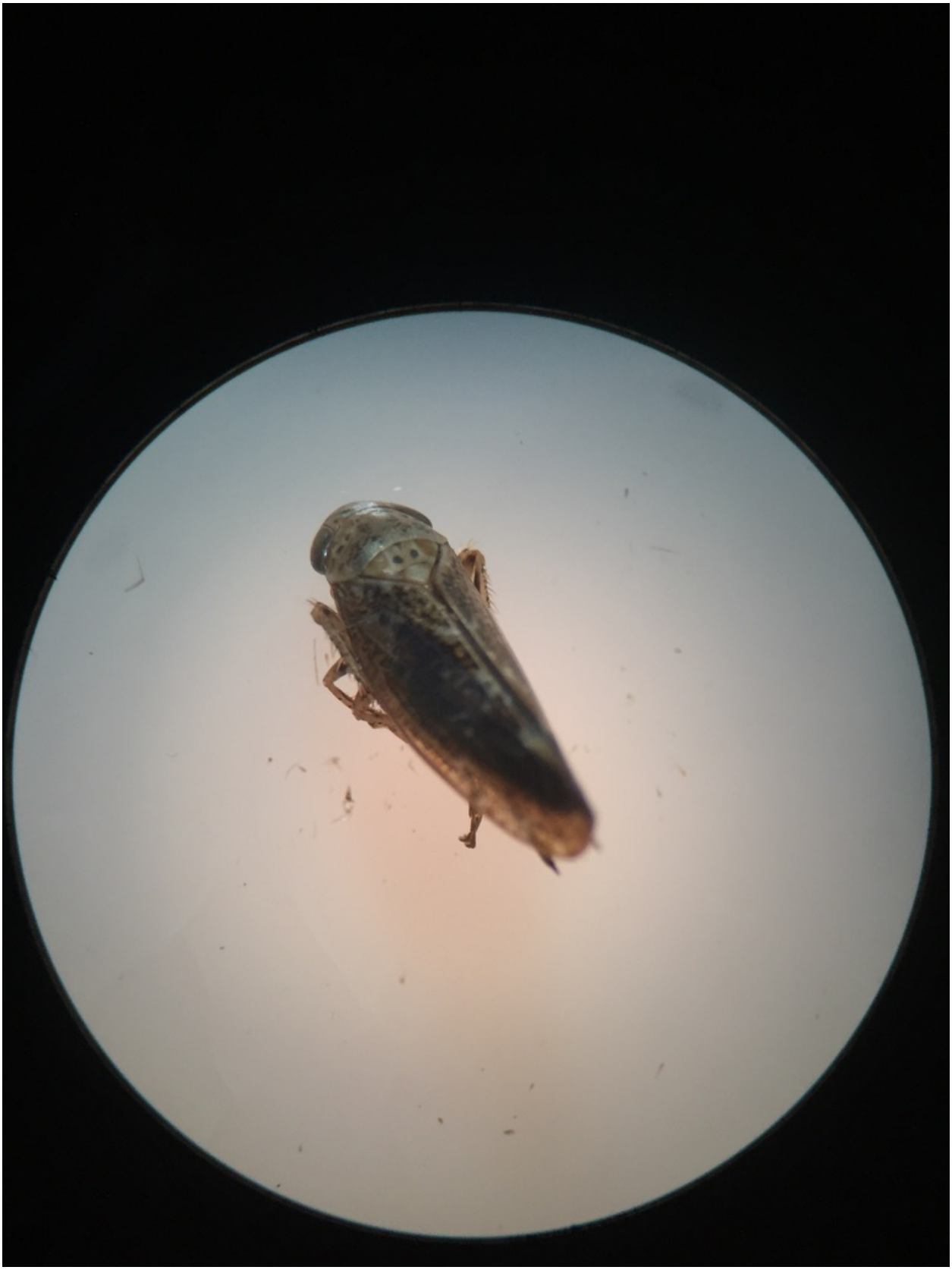
Örnek 29’un mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 30’un mikroskop altındaki görüntüsü.

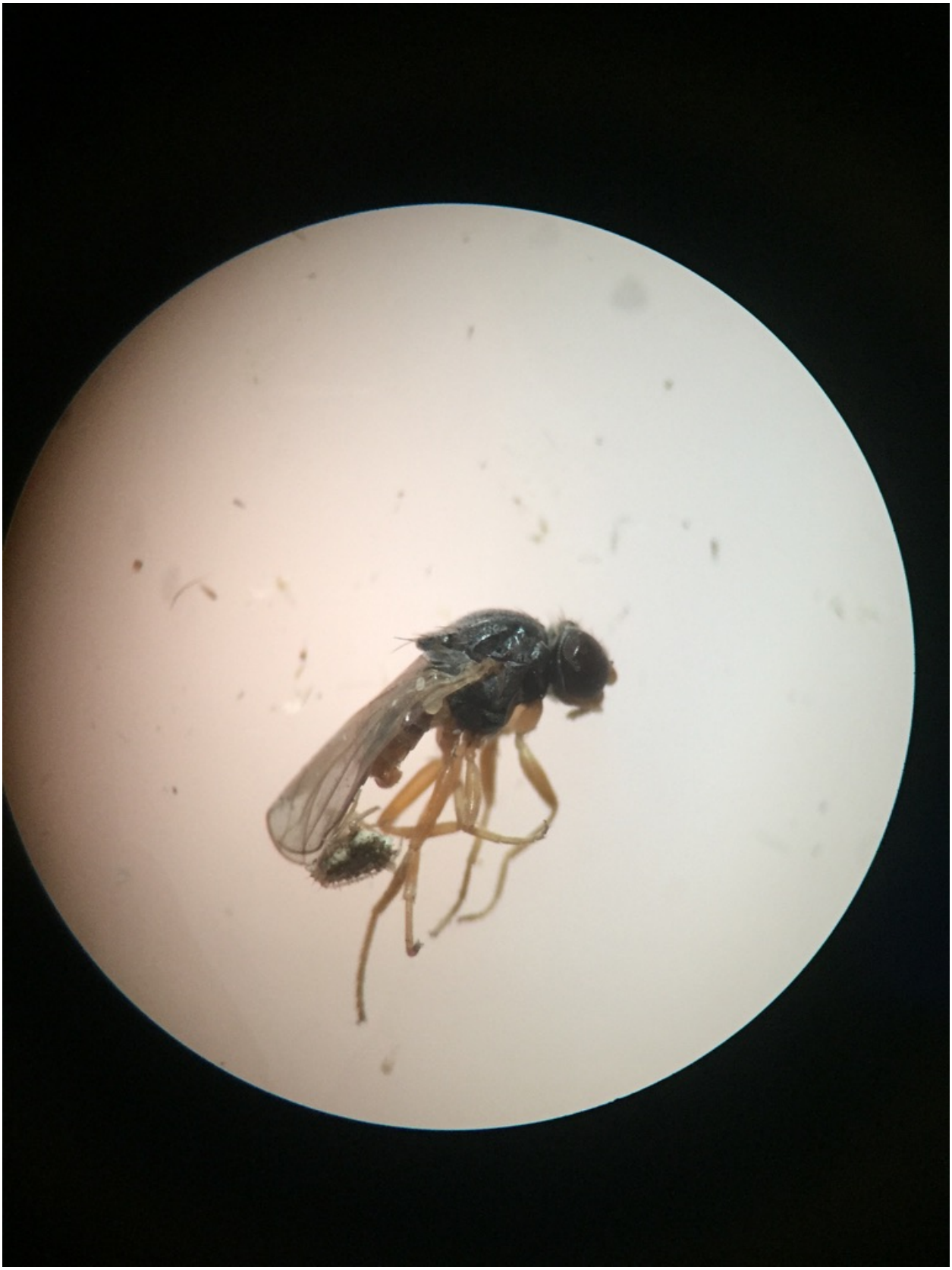
Örnek 31’in mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 32’nin mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 32’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

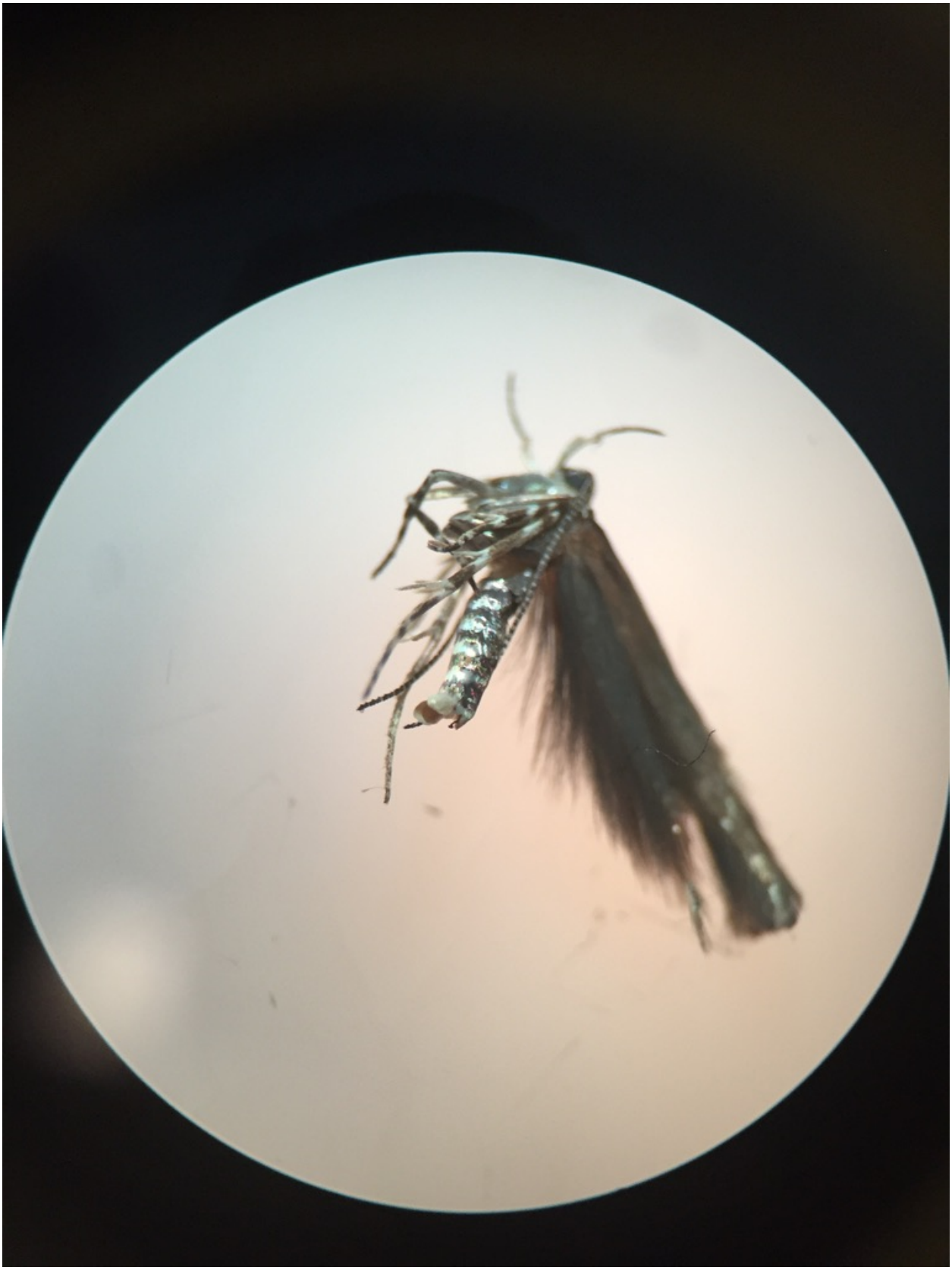


Örnek 33^ün mikroskop altındaki görüntüsü.

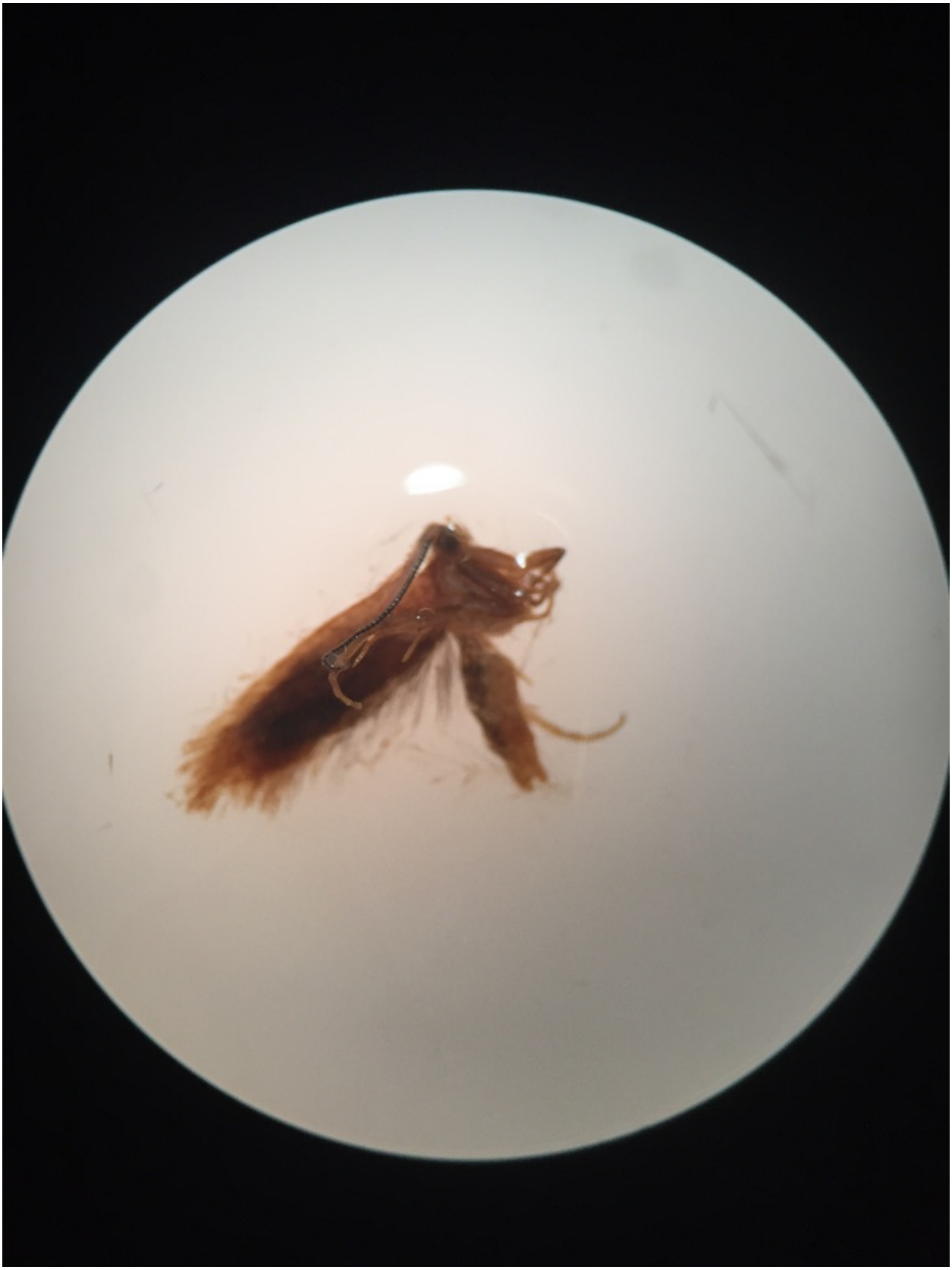
Örnek 34’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 35’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 36’nın mikroskop altındaki görüntüsü.

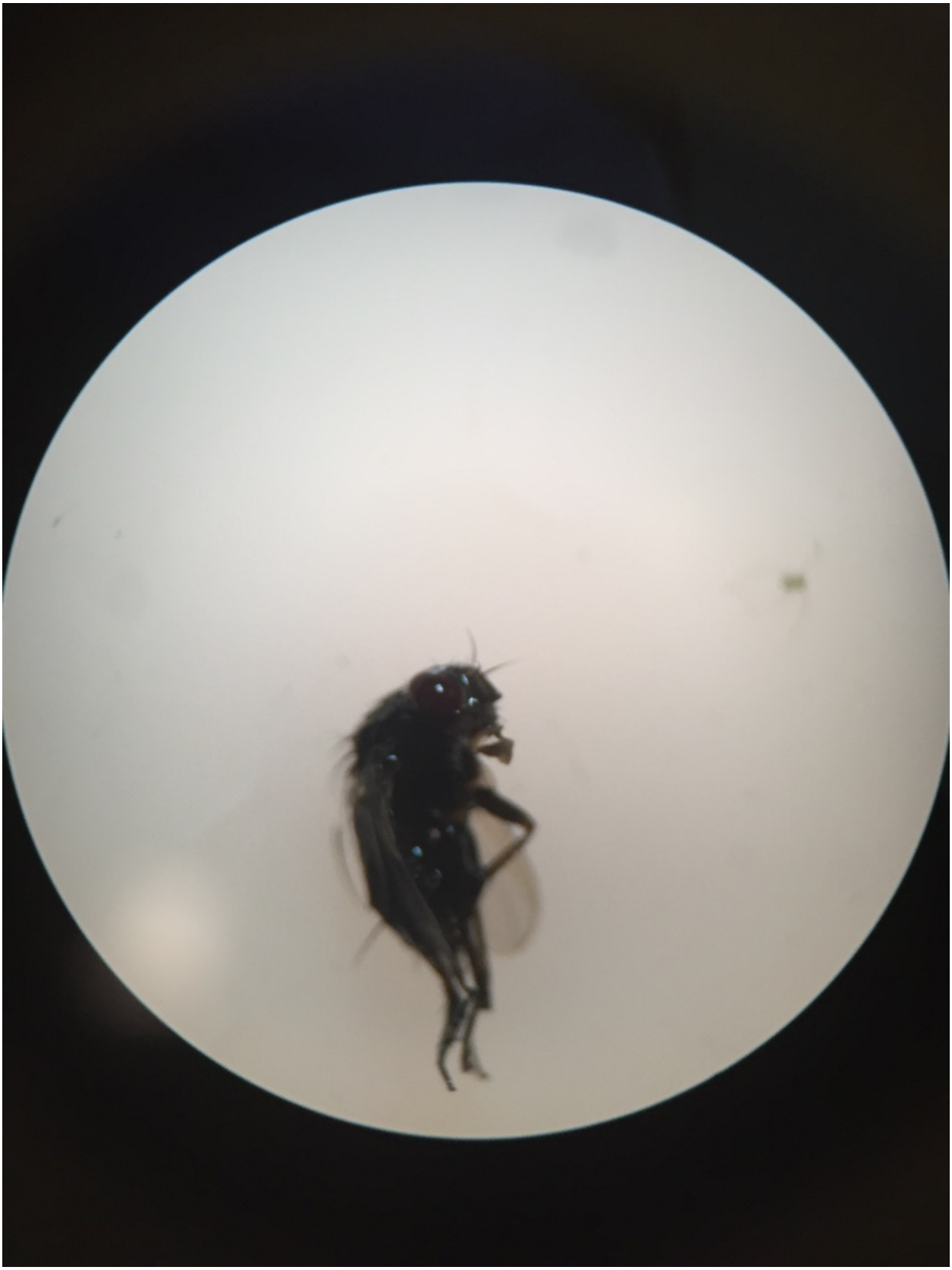


Örnek 37’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

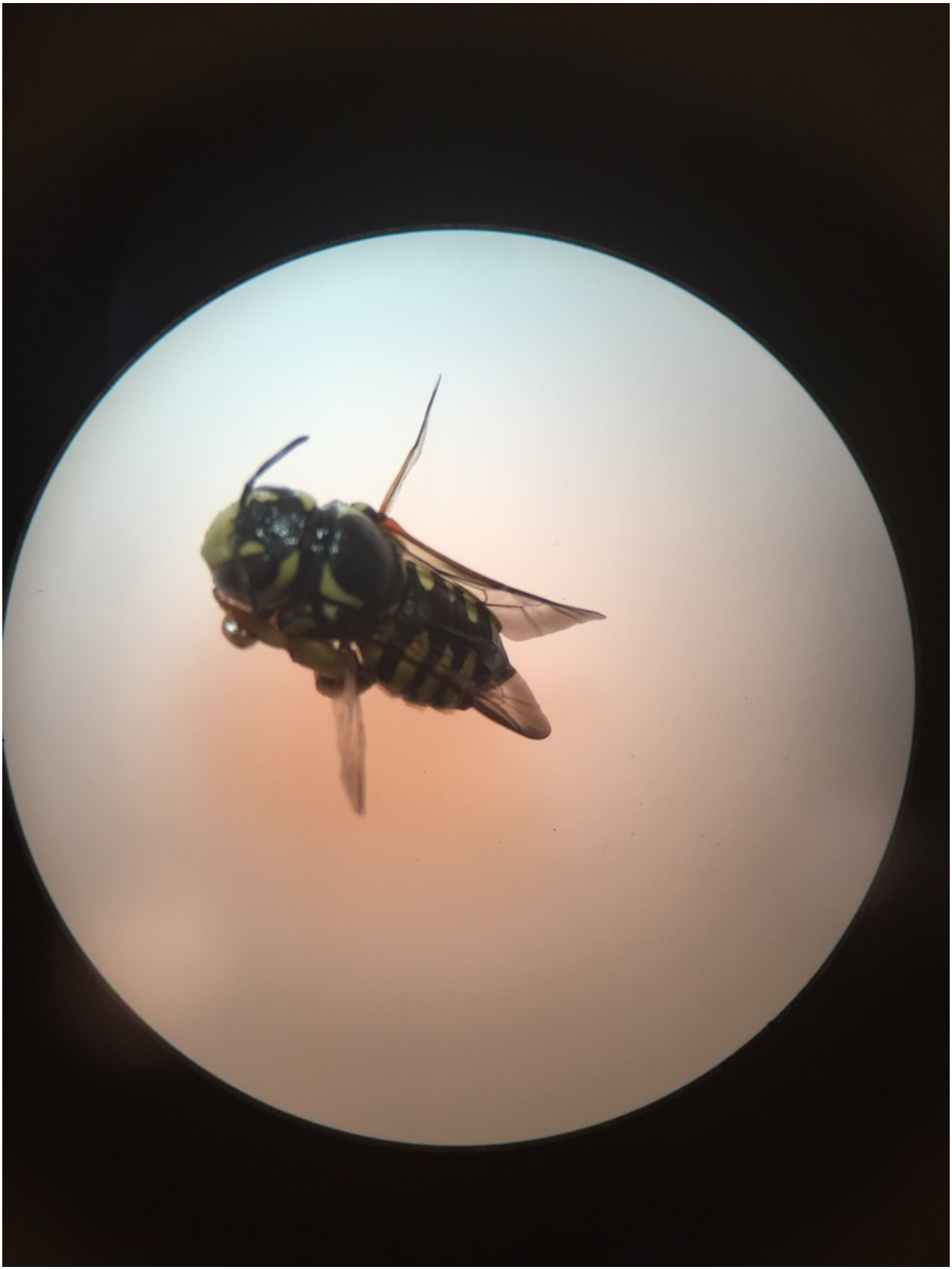


Örnek 38’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 39’un mikroskop altındaki görüntüsü.

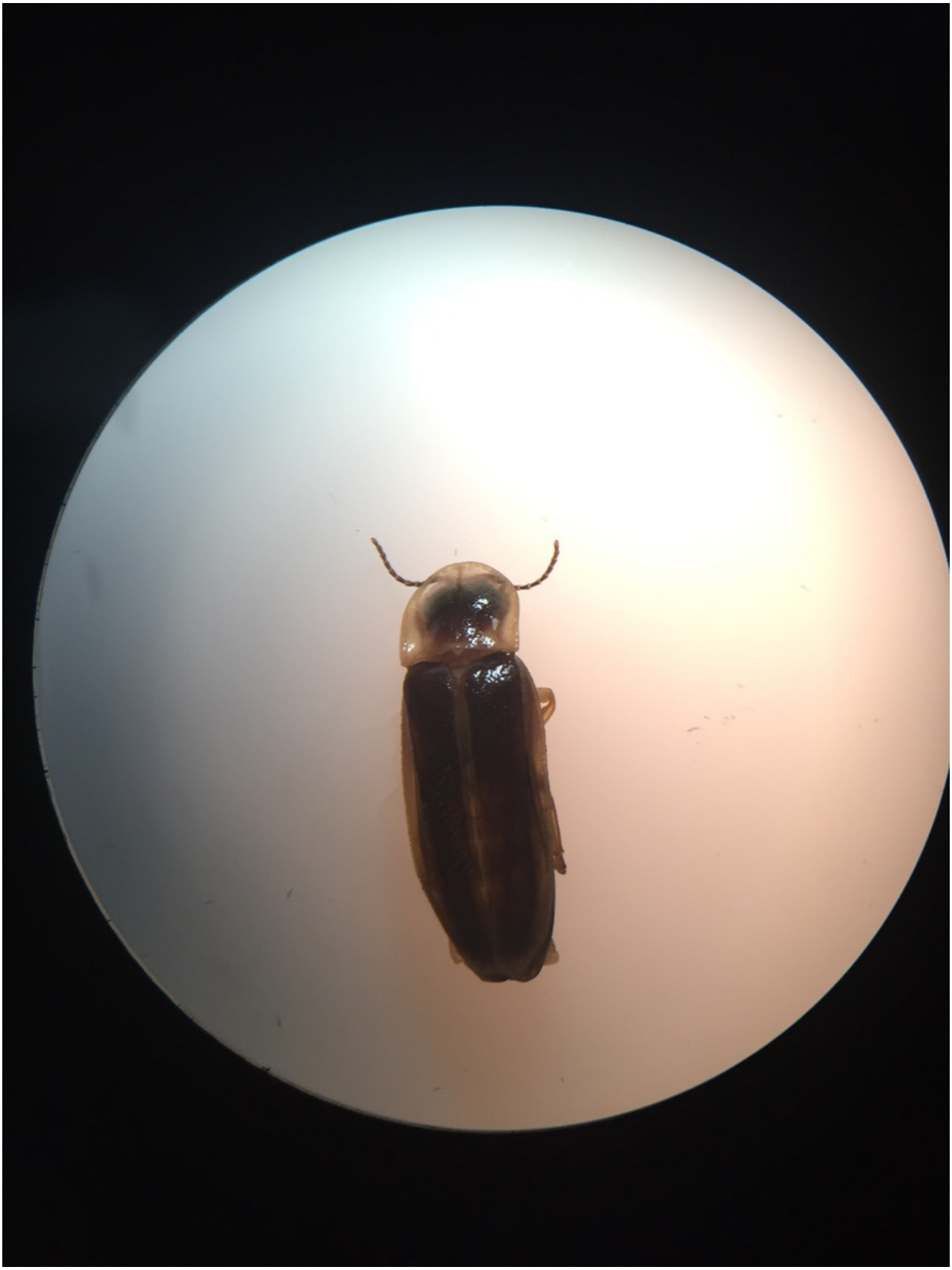


Örnek 40’ın mikroskop altındaki görüntüsü.



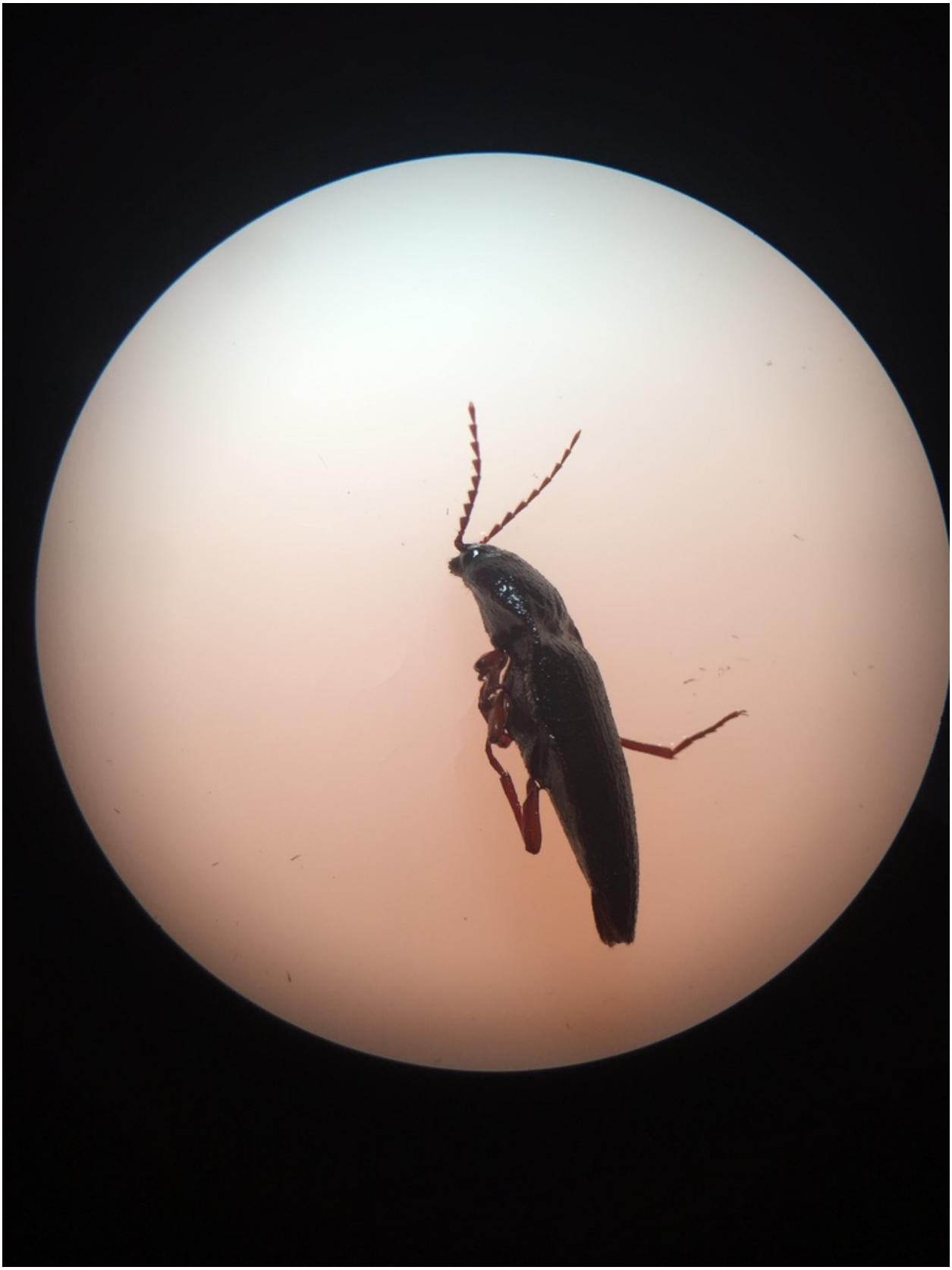
Örnek 41’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 42’nin mikroskop altındaki görüntüsü.



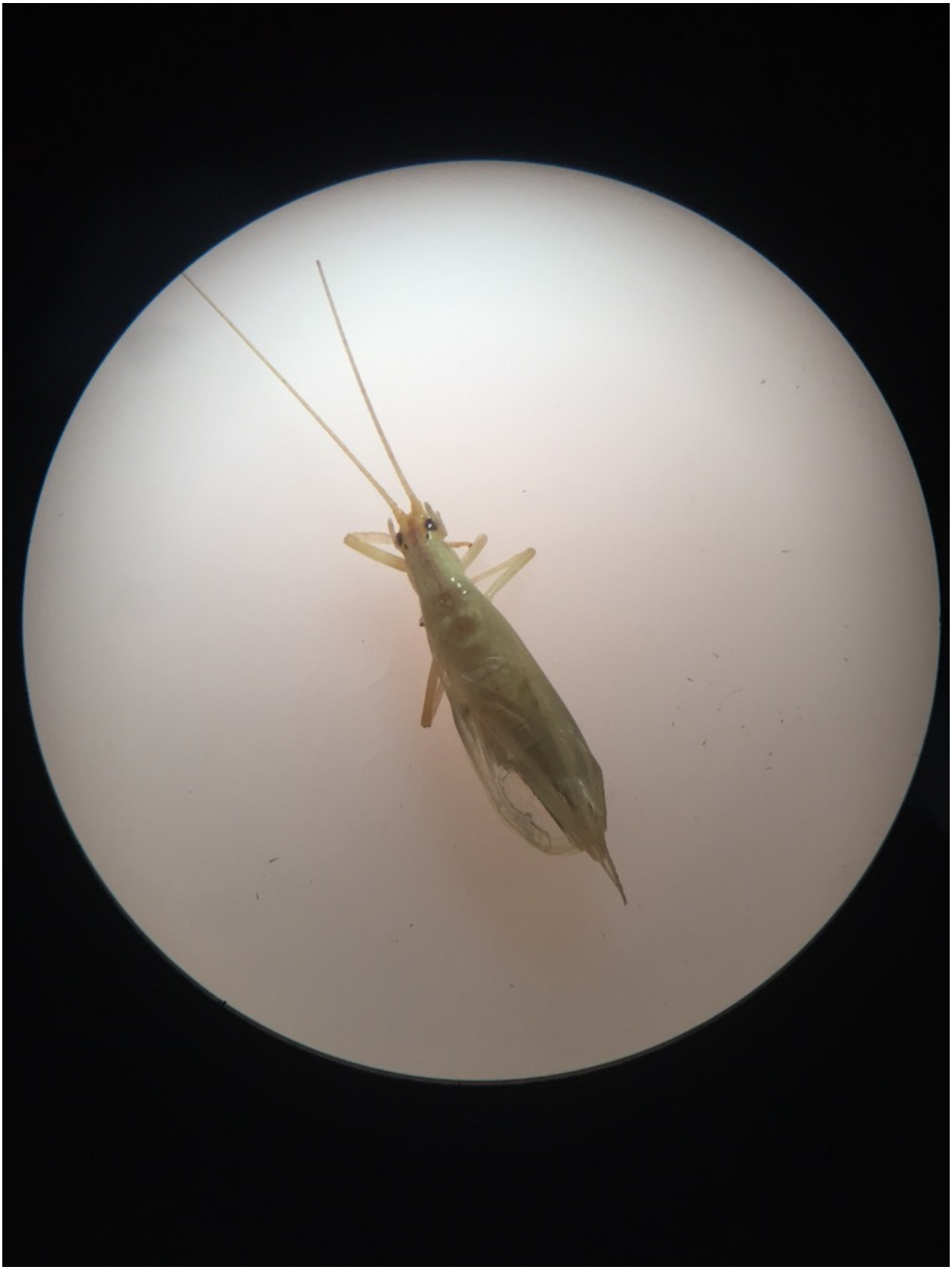
Örnek 43’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 44’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

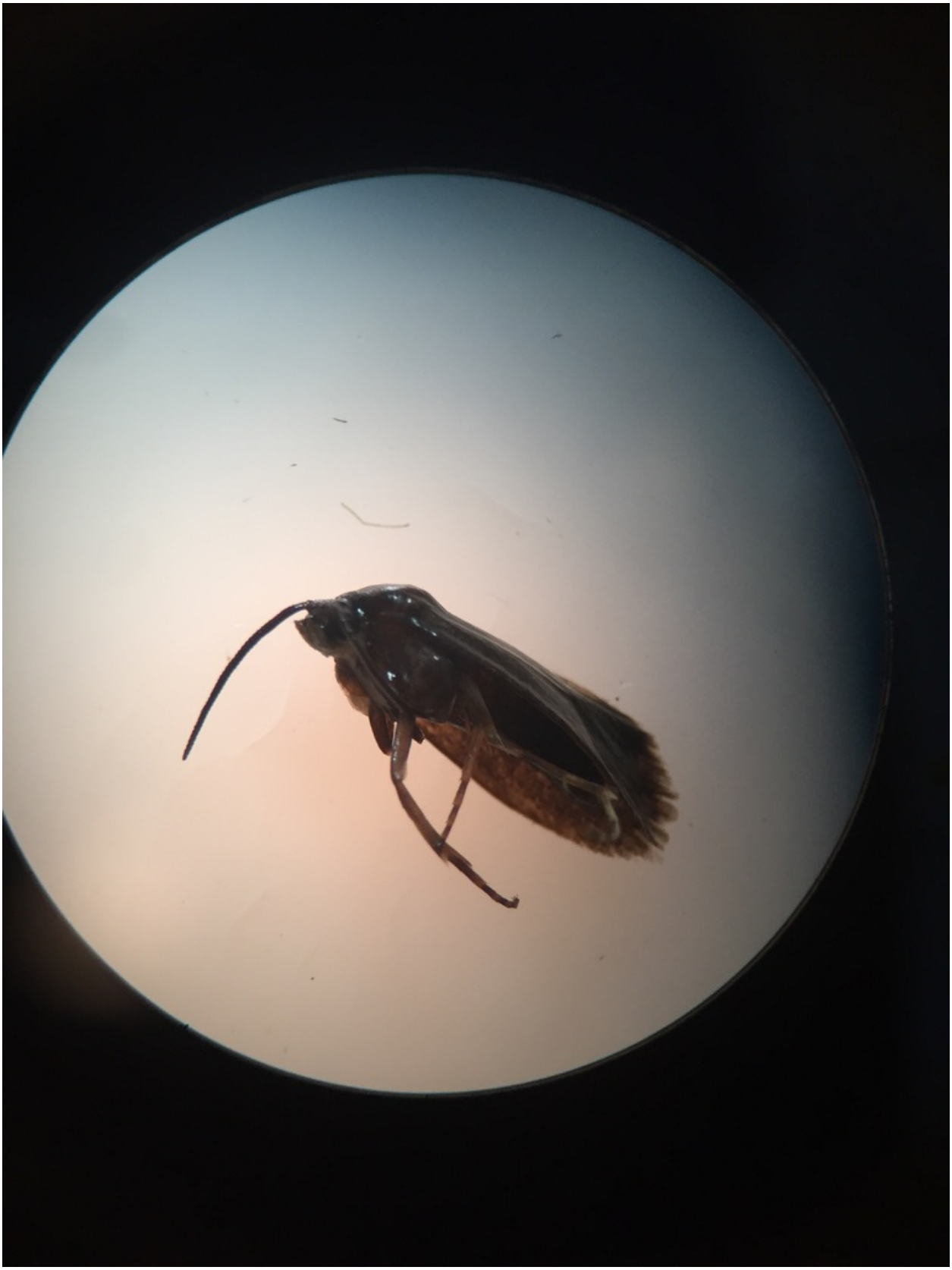


Örnek 45’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 46’nın mikroskop altındaki görüntüsü.

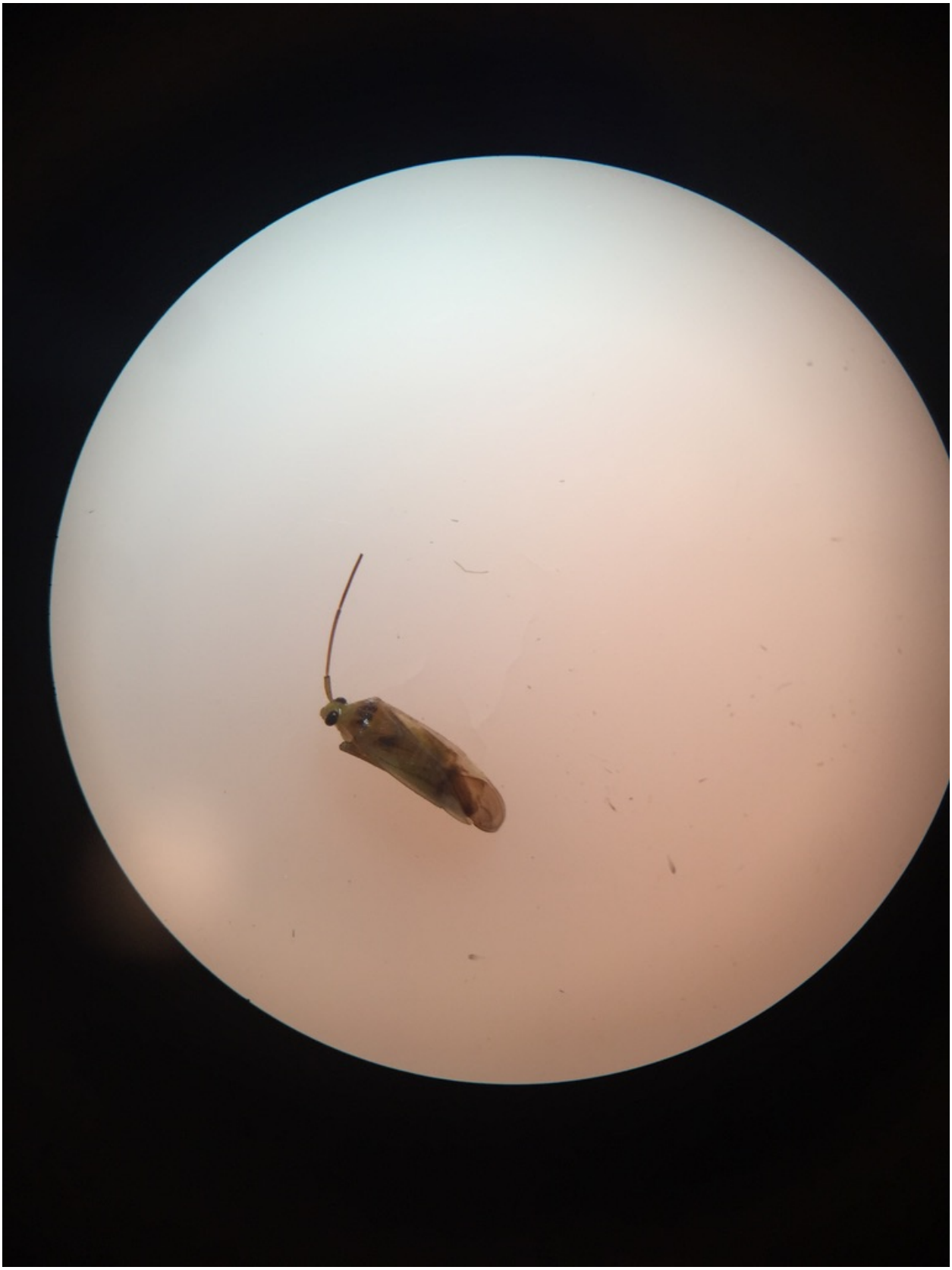


Örnek 47’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

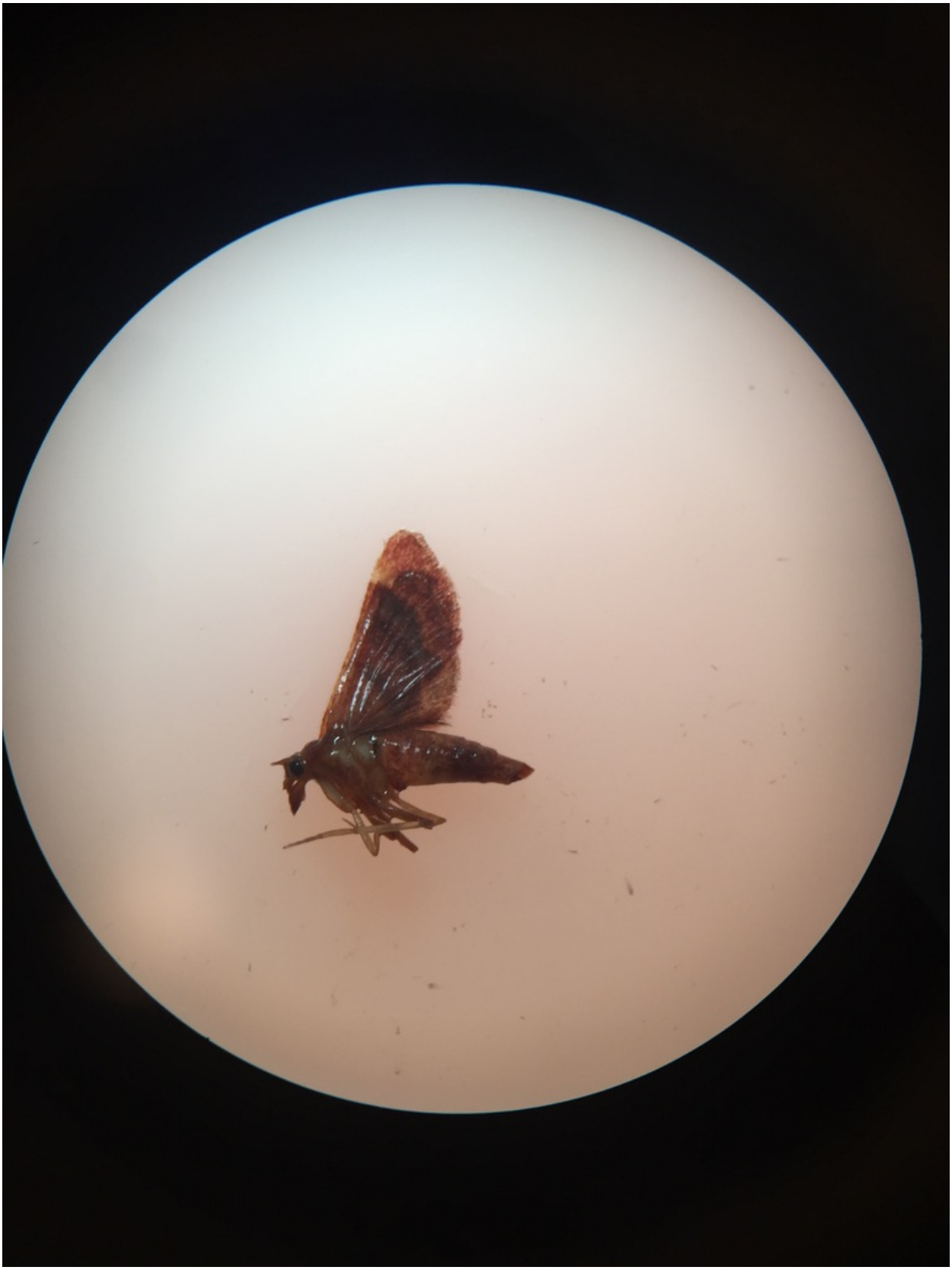


Örnek 48’in mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 49’un mikroskop altındaki görüntüsü.



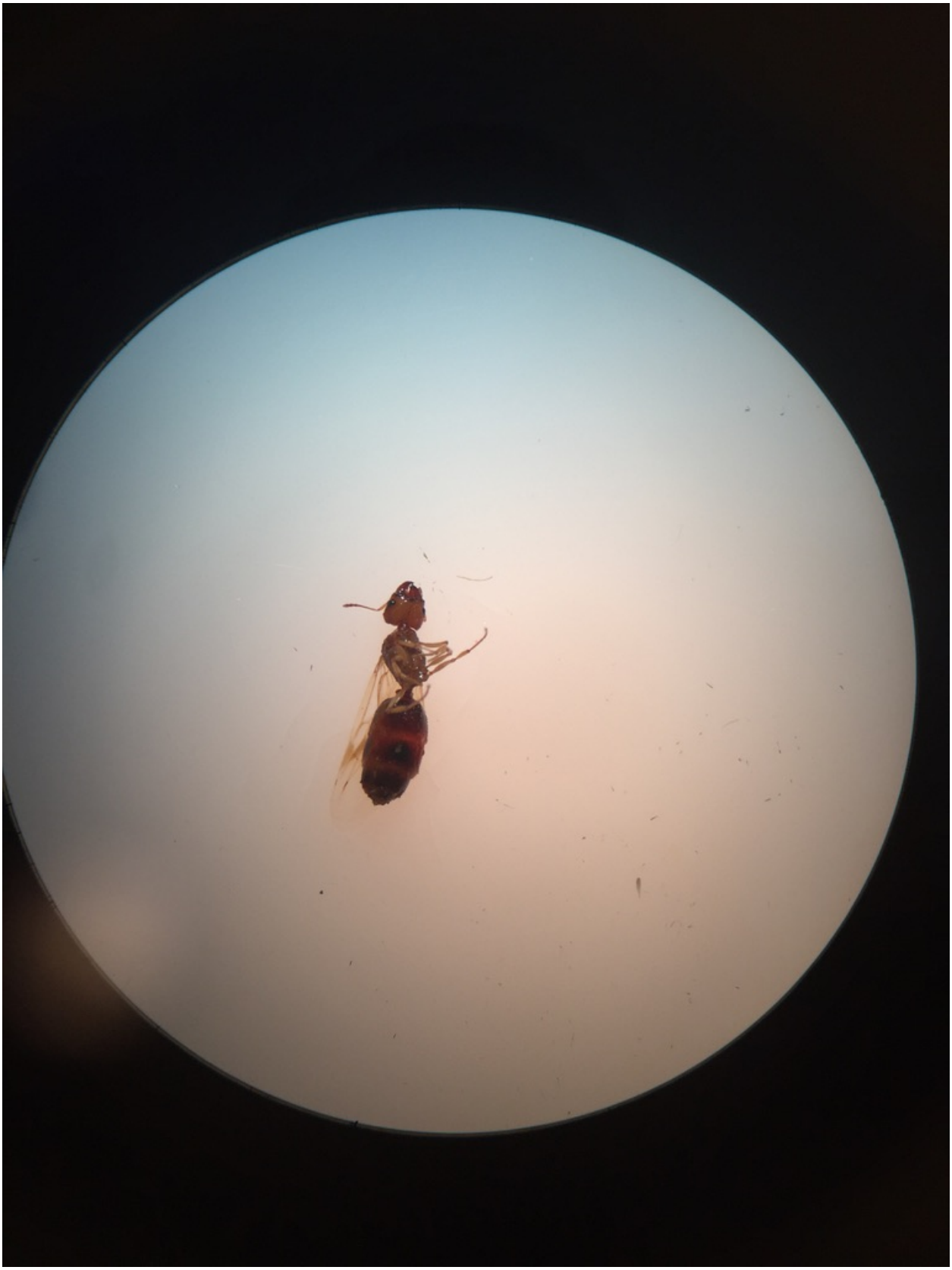
Örnek 50’nin mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 51’in mikroskop altındaki görüntüsü.

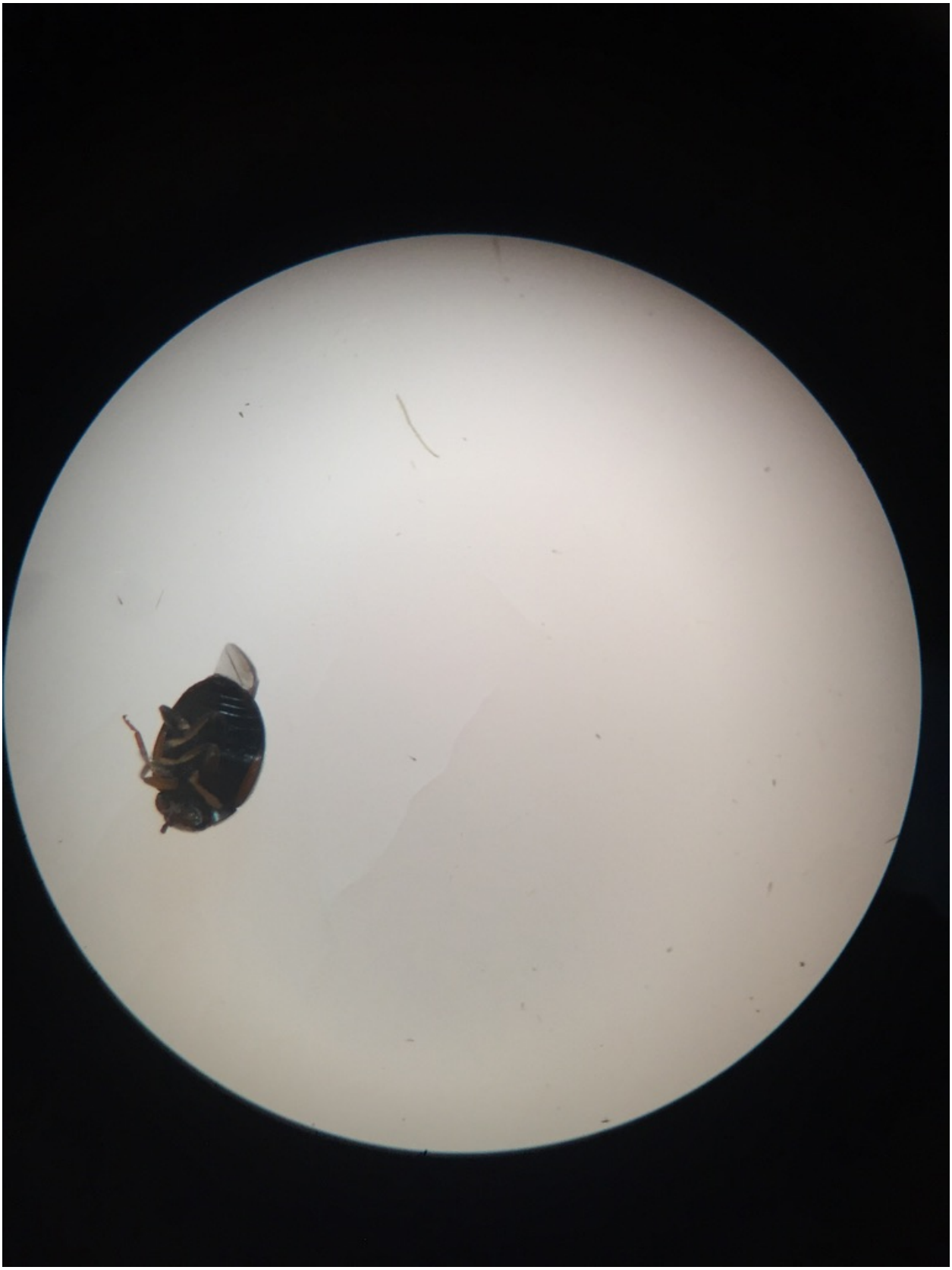
Örnek 52’nin mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 53’ün mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 54’ün mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 55’in mikroskop altındaki görüntüsü.



Örnek 56’nın mikroskop altındaki görüntüsü.

Örnek 57’nin görüntüsü.

Örnek 58’in mikroskop altındaki görüntüsü.

EK 2: BİYOİNFORMATİK İŞ AKIŞINDA OLUŞTURULAN BASH BETİĞİ

```
#!/bin/bash

IN_DIR=$1
OUT_DIR=$2

mkdir $OUT_DIR
mkdir $OUT_DIR/0_fastqc
mkdir $OUT_DIR/1_align
mkdir $OUT_DIR/2_merge
mkdir $OUT_DIR/3_trim
mkdir $OUT_DIR/4_uniq
mkdir $OUT_DIR/5_filter
mkdir $OUT_DIR/6_clean

for file in ./$IN_DIR/*R1_001.fastq ; do
   samplename=$(basename "$file" | cut -d "." -f1)
   searchname=$(basename "$file" | cut -d "." -f1,2,3)
   ~/Programs/FastQC/fastqc $IN_DIR/"$samplename"*.fastq -o $OUT_DIR/0_fastqc
   illuminapairedend --score-min=30 -r $IN_DIR/"$searchname"_R2_001.fastq
$IN_DIR/"$searchname"_R1_001.fastq >
$OUT_DIR/1_align/"$samplename".aligned.fastq
   obigrep -p 'mode!="joined"' $OUT_DIR/1_align/"$samplename".aligned.fastq >
$OUT_DIR/2_merge/"$samplename".merged.fastq
   perl ~/Programs/tagcleaner-standalone-0.16/tagcleaner.pl -fastq
$OUT_DIR/2_merge/"$samplename".merged.fastq -out
$OUT_DIR/3_trim/"$samplename".merged.trimmed -tag5 “PRIMER1” -tag3 “PRIMER2”
-mm5 3 -mm3 3
   perl ~/Programs/tagcleaner-standalone-0.16/tagcleaner.pl -fastq
$OUT_DIR/2_merge/"$samplename".merged.fastq -out
$OUT_DIR/3_trim/"$samplename".merged.trimmed.info -tag5 “PRIMER1”-tag3
“PRIMER2” -mm5 3 -mm3 3 -info
   awk 'NR%4==1' $OUT_DIR/3_trim/"$samplename".merged.trimmed.info.fastq | cut -d "
" -f3 | sort -n | uniq -c > $OUT_DIR/3_trim/"$samplename".trimmed.stats
   awk 'NR%4==1' $OUT_DIR/3_trim/"$samplename".merged.trimmed.info.fastq | cut -d "
" -f2 | sort -n | uniq -c > $OUT_DIR/3_trim/"$samplename".untrimmed.stats
   awk 'NR%4==1' 3_trim/"$samplename".merged.trimmed.info.fastq | cut -d " " -f6 | sort -
n | uniq -c > 3_trim/"$samplename".5mismatch.stats
   awk 'NR%4==1' 3_trim/"$samplename".merged.trimmed.info.fastq | cut -d " " -f7 | sort -
n | uniq -c > 3_trim/"$samplename".3mismatch.stats
   obiuniq $OUT_DIR/3_trim/"$samplename".merged.trimmed.fastq >
$OUT_DIR/4_uniq/"$samplename".merged.trimmed.uniq.fasta
   obiannotate -k count $OUT_DIR/4_uniq/"$samplename".merged.trimmed.uniq.fasta >
$$ ; mv $$  $OUT_DIR/4_uniq/"$samplename".merged.trimmed.uniq.fasta
   obigrep -l “min” -L “max” -p 'count>=5'
$OUT_DIR/4_uniq/"$samplename".merged.trimmed.uniq.fasta >
$OUT_DIR/5_filter/"$samplename".merged.trimmed.uniq.c5-10.l150.L250.fasta
```

obiclean -r 0.05 -H $OUT_DIR/5_filter/"$samplename".merged.trimmed.uniq.c10.l150.L250.fasta > $OUT_DIR/6_clean/"$samplename".merged.trimmed.uniq.c10.l150.L250.clean.fasta
$OUT_DIR/11_rblast.results/"$samplename".c5-10.rblast.results

blastn -query $OUT_DIR/6_clean/"$samplename".merged.trimmed.uniq.c10.l150.L250.clean.fasta -db ~/Database/blastdb/localdb.fasta -max_target_seqs 1 -outfmt “6 qseqid sseqid length pident” -out $OUT_DIR/12_lblast.results/2031.c10.lblast.results

blastn -query

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Environmental DNA: a tool for estimation of fish biomass/abundance?

Ayşegül Er1,2*, Metehan Arıkan2,3, Emre Keskin2 1Institue of Natural and Applied Science, Ankara University. Ankara, Turkey.
2Evolutionary Genetics Laboratory (eGL), Ankara University, Agricultural Faculty, Department of Fisheries and Aquaculture, Ankara, Turkey
3Biotechnology Institute of Ankara University, Ankara, Turkey

Abstract

Environmental DNA has become popular method to detect living organism in aquatic and terrestrial habitats. Besides, eDNA can be used for estimation of fish biomass/abundance in freshwater. In our study we tested the relationship between eDNA and traditional method by comparing the eDNA read numbers of *Cyprinus carpio*, *Carassius gibelio* and *Sander lucioperca* with the traditional abundance/biomass estimation data in the Karataş lake. We designed seasonal field and simulated laboratory experiments for February, April, June and September. eDNA sampling was done from three stations of the lake and fishing was done for laboratory experiments. Before aquarium experiments, parameters of biomass were measured for each captured individual. In laboratory experiment, the effect of three different factors (duration, water temperature and fish biomass/abundance) on eDNA concentration was investigated. We set up three aquarium experiments using 250L fiber tanks. Target species were kept in for 1,2,3,6 and 9 days in experiment tanks. For temperature experiment, selected species were kept six days at 7, 15 and 25°C in experiment tanks. To evaluate target species abundance on eDNA concentration 1, 5, 10, 25 individuals were kept 6 days in experiment tanks. After these experiments, 500ml of water was filtered by using 0.22µm pore size filters. We obtained total 192 filters. DNA extractions were done by using optimized eDNA protocol and two-step PCR were done using universal fish primers MiFish-U-F/ MiFish-U-R with related high throughput sequencing platform adaptors with 500K read per sample.
According to bioinformatics analysis we found statistically correlated results between eDNA copy number and fish biomass/abundance estimated using traditional methods.
Comparison of results from traditional and eDNA method for estimation of biomass/abundance of target species resulted with an average of %4 deviation. As a result, using eDNA metabarcoding can provide cost-effective, time-saving and rapid results similar to traditional methods to estimate species biomass/abundance in natural environments.

Keywords: Environmental DNA, Biomass, Abundance, Freshwater Fish, High Throughput Sequencing

18


EEBST 2019
Ecology and Evolutionary Biology Symposium
10-12 July 2019
ABSTRACT BOOK
eGL
info@eebst.org
www.eebst.org
https://twitter.com/eebstsymposium
https://www.facebook.com/eebst
ekoevo