



## Kocaeli’de Yayılış Gösteren Bazı Böcek Türlerinin Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Alt Ünite 1 Geni ile Filogenetik Analizi

### *Phylogenetic Analysis of Some Insect Species with Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 Gene in Kocaeli*

Fikriye POLAT<sup>1,\*</sup>, Serkan DEDE<sup>2</sup>, Günsel BİNGÖL<sup>3</sup>, Aysel KEKİLLİOĞLU<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kocaeli, 41380, Türkiye

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, 41380, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Nevşehir, Türkiye

#### Araştırma Makalesi

Gönderilme Tarihi : 27/09/2018

Kabul Tarihi : 22/10/2018

#### Anahtar Kelimeler

Böcek,  
COI Geni,  
Filogenetik Analiz,  
Kocaeli

#### Özet

Böcek türleri bakımından zengin bir coğrafyada yaşamaktayız. Ancak coğrafyamızda tespit edilen böcek türleri sayısı tahmin edilen sayıdan çok daha azdır. Buradan yola çıkarak yapılan bu çalışmada, Kocaeli ilinden rastgele toplanılan çeşitli böcek türlerinin moleküler düzeyde tespit edilmesi amaçlandı. Bunun için böceklerden önce DNA izolasyonu ardından mitokondrial COI bölgelerine ait evrensel primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve DNA sekans analizi yapıldı. Her bir DNA dizisi NCBI Nucleotide BLAST’a yüklenerek erişim numaraları elde edildi. Böcek türlerine ait COI gen dizileri MEGA 7.0 programına yüklenerek modelleme yöntemleri ve mesafeleri belirlendi. DNA barkod geni olarak yaygın bir şekilde kullanılan COI geni ile yapılan bu çalışmada, böcek türlerinin *Exechia seriata*, *Phlebotomus neglectus*, *Chironomus riparius*, *Drosophila tsukubaensis*, ve *Rhamphomyia sp.* oldukları tespit edildi.

#### Research Paper

Received Date : 27/09/2018

Accepted Date : 22/10/2018

#### Keywords

COI Gene,  
Insect,  
Phylogenetic Analysis,  
Kocaeli

#### Abstract

We live in a region having rich fauna of insect species. However, the number of insect species detected in our geography is less than the estimated number. Hence, in this study, it was aimed to determine the various insect species collected randomly from Kocaeli province, with molecular level analysis. Thus, after DNA isolations, Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequence analysis using universal primers belonging mitochondrial COI regions were applied. Each DNA sequence was loaded into the NCBI Nucleotide BLAST to obtain their accession numbers. COI gene sequences of insect species were loaded into the MEGA 7.0 program to determine modeling methods and distances. In this study with COI gene which is widely used as a DNA barcode gene, insect species detected were *Exechia seriata*, *Phlebotomus neglectus*, *Chironomus riparius*, *Drosophila tsukubaensis* and *Rhamphomyia sp.*

### 1. Giriş

Yeryüzünde 700 bin değişik böcek türü belirlenmiş olup, 10 milyonu aşan sayıda daha değişik böcek türü

olduğu tahmin edilmektedir [1]. Yeryüzünde tespit edilememiş canlıların ve biyolojik çeşitliliğin büyük bir kısmını da böcekler oluşturmaktadır [2, 3]. Böcekler yağmur ormanları, çöllere, sıcak su kaynakları, buzullar,

\* Sorumlu Yazar (Corresponding Author): fikriyepolat@kocaeli.edu.tr

çeşitli bitki kozalakları ve tohumları gibi hemen her ortamda bulunabilirler. Yaşam ortamlarının bu denli çeşitlilik göstermesindeki en büyük etken uçabilme yeteneklerine sahip olmalarıdır. Böcekler çevreye çok kolay adapte olabilirler. Çoğalma güçleri sayesinde en kötü koşullarda bile üremeye devam ederler. Böcekler çoğunlukla karasal hayvanlardır fakat az bir kısmı da suda yaşayabilmektedir [4]. Bu canlılar, insanlar ve diğer canlıların yaşamında büyük bir ekolojik öneme sahiptirler. Böcekler, besin zinciri ve besin ağlarının hacim ve sayısal olarak en baskın grubunu oluştururlar. Böcekler aynı zamanda evrim, anatomi, fizyoloji, biyokimya, genetik, tıp, adli entomoloji, entomotoksikoloji gibi bilim dalını birleştirici bir rol üstlenmektedirler [3, 5]. Çok farklı disiplinleri birleştiren bu canlı grubu bilim insanlarında sürekli merak ve ilgi uyandırmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi böcek (Insecta) grubu Türkiye’de de çok zengindir. Ancak bazı gruplarda hiç çalışma olmaması, bazı gruplardaki çalışmaların yetersiz oluşu gibi nedenlerle Türkiye böcek faunası hakkında kesin rakamlar vermek mümkün olmamaktadır. Türkiye’de bugüne kadar tespit edilmiş böcek türü yaklaşık 30.000 civarındadır. Bununla birlikte tahmin edilen sayı 60.000-80.000 arasındadır [6].

Türkiye’nin, biyocoğrafik olarak yer aldığı batı Palaearktik bölgesindeki ülkelerle kıyaslandığında, zengin böcek faunasına sahip olduğu belirtilmektedir. Burada özellikle, Akdeniz ülkeleri, yüksek biyoçeşitlilikleriyle tanımlandığından, bu ülkeleri kapsayan çeşitli faunistik ve sistematik çalışmalar çoğunlukta olmaktadır [7, 8]. Bununla birlikte günümüzde mevcut bilimsel gelişmelere paralel olarak klasik sistematik çalışmaların moleküler verilerle desteklenmesine de gereksinim duyulmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, Kocaeli ilinden elde edilen çeşitli böcek türlerinin DNA barkod geni olan Sitokrom Oksidaz Altünite I (COI) geni ile moleküler düzeyde karakterize etmek amaçlanmıştır. Başlıca seçilen böcekler *Exechia seriata*, *Phlebotomus neglectus*, *Chironomus riparius*, *Drosophila tsukubaensis* ve tür bazında tespit edemediğimiz *Rhamphomyia sp.*’dir [9].

Mantar sivrisineklerinin (Mycetophilidae) ailesinden bir sivrisinek türü olan *Exechia seriata*’nın bilimsel adı ilk olarak 1830’da Meigen tarafından yayınlanmıştır. Taksonomisi şu şekildedir;

Domain: Eukaryota  
Kingdom: Metazoa  
Phylum: Arthropoda  
Class: Insecta  
Order: Diptera  
Family: Mycetophilidae  
Genus: *Exechia*  
Species: *Exechia seriata*

*Phlebotomus neglectus*, kuzey İtalya’dan Türkiye’nin güneydoğusuna ve Akdeniz’in doğu kıyılarına kadar Orta ve Doğu Akdeniz’de yayılış gösteren Palaearctic bir türdür [10]. Visceral leishmanya vektörü olarak da rapor edilen [11]. *Phlebotomus neglectus*’un taksonomisi aşağıdaki şekildedir;

Domain: Eukaryota  
Kingdom: Metazoa  
Phylum: Arthropoda  
Class: Insecta  
Order: Diptera  
Family: Psychodidae  
Genus: *Phlebotomus*  
Species: *Phlebotomus neglectus*

*Chironomus thummi* olarak da bilinen *Chironomus riparius*, palyaço sineği olarak adlandırılır. Larvaları kırmızı renkli olmasından dolayı kan kurdu olarak da bilinir. Kuzey Amerika ve Avrupa’da yaygındır. 1804’de Johann Wilhelm Meigen tarafından tanımlanmıştır. Böceklerde genom yapı analizi için genellikle model olarak kullanılır. Ayrıca fonksiyonel gelişimsel genetik çalışmalarda ve toksikoloji testlerinde de kullanılır. Hem yetişkinler hem de larva formları hastalık vektörleri olarak görülmüştür ancak aynı zamanda tatlı su besin zincirlerinin önemli bir parçasıdır [12]. *Chironomus riparius*’un taksonomisi aşağıdaki gibidir.

Domain: Eukaryota  
Kingdom: Metazoa  
Phylum: Arthropoda  
Class: Insecta  
Order: Diptera  
Family: Chironomidae  
Genus: *Chironomus*  
Species: *Chironomus riparius*

J. W. Zetterstedt tarafından 1838-1859 yılları arasında tanımlanan ve dans sinekleri olarak bilinen *Rhamphomyia sp.* nin taksonomisi [9, 13] şu şekildedir.

Domain: Eukaryota  
Kingdom: Metazoa  
Phylum: Arthropoda  
Class: Insecta  
Order: Diptera  
Family: Empididae  
Genus: *Rhamphomyia*

*Drosophila*, *Drosophilidae* familyasına ait sineklerin bir cinsidir. Bu familya üyeleri küçük meyve sineği olarak isimlendirilir. Sirke sineği de denilen *Drosophila* üyelerinden *D. melanogaster* gelişimsel biyolojide model organizma olarak kullanılır. Bu cinsin 1500’den fazla üyesi

bulunmaktadır [14]. Bu aileye ait olan türlerden biri olan *Drosophila tsukubaensis*'in taksonomisi şöyledir:

Domain: Eukaryota

Kingdom: Metazoa

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Diptera

Family: Drosophilidae

Genus: *Drosophila*

Species: *Drosophila tsukubaensis*

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. DNA İzolasyonu-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-Agaroz Jel Elektrofrezisi

Kocaeli ilinde Temmuz 2017 tarihinde, 40.640525-29.938661 koordinatlarında toplanan böcek örnekleri DNA izolasyonları yapılarına kadar %70'lik alkolde, -20 °C'de derin dondurucuda bekletildi. DNA izolasyonu için MACHEREY-NAGEL marka (Genomic DNA from insects, NucleoSpin DNA Insect) DNA izolasyon kitinde önerilen protokol modifiye edilerek uygulandı. İzole edilen DNA'lardan mitokondrial COI bölgelerine ait evrensel primerler LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' ve HCO 2198 5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' kullanıldı. PZR reaksiyon karışımı 5x FIREPol Master Mix (Solis BioDyne) kullanıldı. PZR reaksiyonu 30 µl olacak şekilde 6µl 5x Master Mix, 0.5 µl 10 µM primer (sense), 0.5 µl 10 µM primer (antisense), 50 ng DNA alınarak hazırlandı. PZR şartları; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 5 dk. olacak şekilde 35 döngü 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk. annealing, 72°C'de 1 dk. extension ve ardından 72°C'de 7 dk son uzama basamağı gerçekleştirildi. %1'lik agaroz jel PZR ürünleri UV ışığı altında görüntülendi.

### 2.2. DNA Sekansı

PCR ürünleri ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) kiti prosedürleri kullanılarak BM lab tarafından saflaştırılıp COI'e ait sense ve antisense primerler ile karıştırılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak yapıldı.

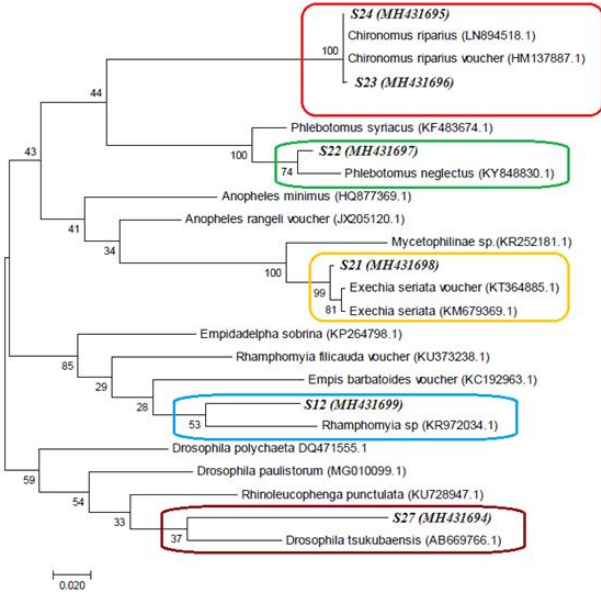
### 2.3. Filogenetik Analiz

DNA sekansları, Chromas (Version: 2.6.5) programı kullanılarak görüntülendi ve Chromas üzerinden ayrı ayrı FASTA formatında kaydedildi. Dizilerin ileri ve reverse komplement okumaları ClustalW programı ile hizalanarak karşılaştırıldı. Her bir böcek türü için COI gen bölgesine ait diziler FASTA formatında NCBI Nucleotide BLAST'a yüklendi. NCBI veri bankasında kayıtlı dizilerle benzerlikleri karşılaştırıldı. En çok benzerlik gösteren diziler, benzerlik sıralarına göre GeneBank erişim numaraları ile birlikte filogenetik ağaçta kullanılmak üzere not edildiler. Çalışmamıza ait diziler ile NCBI Nucleotide'den elde edilen böcek türlerine ait COI gen dizileri MEGA 7.0 programına yüklenerek modelleme yöntemleri ve mesafeleri belirlendi. Maksimum Likelihood metodu, Tamura-Nei Modeli (1993), Bootstrap 1000'de filogenetik ağaçları oluşturuldu.

### 3. Bulgular

NCBI genom veri bankasından, S12 kodlu örneğimiz *Rhamphomyia* sp. için MH431699, S21 kodlu örneğimiz *Exechia seriata* voucher için MH431698, S22 kodlu örneğimiz *Phlebotomus neglectus* için MH431697, S23 kodlu örneğimiz *Chironomus riparius* voucher için MH431696, S24 kodlu örneğimiz *Chironomus riparius* için MH431695, S27 kodlu örneğimiz *Drosophila tsukubaensis* için MH431694 erişim numaraları alındı. Çalışmamızda her bir örneğe ait COI DNA dizileri ayrı ayrı NCBI Blast'a girilerek veri tabanında kayıtlı böcek türleriyle benzerlik oranları karşılaştırıldı. S12 örneğimize ait COI dizisinin %90 oranında *Rhamphomyia* cinsine ait olduğu, S21 örneğimizin %99 oranında *Exechia seriata* voucher, S22 örneğimizin %97 oranında *Phlebotomus neglectus*, S23 örneğimizin %99 oranında *Chironomus riparius* voucher, S24 örneğimizin %100 *Chironomus riparius*, S27 örneğimizin ise %87 oranında *Drosophila tsukubaensis* oldukları tespit edilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmak için NCBI veri tabanında bulunan %100 ile % 87 arasında benzerlik oranları gösteren böcek türleri belirlendi. Bu türlerin isimleri; *Rhamphomyia* sp (KR972034.1), *Rhamphomyia filicauda* voucher (KU373238.1), *Empis barbatoides* voucher (KC192963.1), *Empidadelphia sobrina* (KP264798.1), *Exechia seriata* voucher (KT364885.1), *Exechia seriata* (KM679369.1), *Mycetophilinae* sp.(KR252181.1), *Anopheles rangeli* voucher (JX205120.1), *Phlebotomus neglectus* (KY848830.1), *Phlebotomus syriacus* (KF483674.1), *Anopheles minimus* (HQ877369.1), *Chironomus riparius* voucher

(HM137887.1), *Chironomus riparius* (LN894518.1), *Chironomus riparius* (LN894518.1), *Drosophila tsukubaensis* (AB669766.1), *Rhinoleucophenga punctulata* (KU728947.1), *Drosophila paulistorum* (MG010099.1), *Drosophila polychaeta* (DQ471555.1) şeklindedir. Daha sonra COI dizileri MEGA 7.0 programına yüklendi. Model olarak GTG+G+I kullanıldı. Baz frekansları  $f(A)=0.277$ ,  $f(T)=0.386$ ,  $f(C)=0.175$ ,  $f(G)=0.161$  ve +G (Gamma distribution)=2.57, +I=0.57 bulundu. Maksimum Likelihood (ML) Metodu, Tamara-Nei Modeli (1993), Bootstrap 1000 kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil1).



Şekil 1. S12, S21, S22, S23, S24 ve S27 örneklerine ait COI gen bölgeleri için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağacı

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Hayvanların teşhisinde COI geni yüksek taksonomik kategorilerden az sayıda örnek ile test edilmiş, elde kapsamlı COI verisi bulunursa türlerin de teşhis edilebileceği anlaşılmıştır [15]. Bu çalışmaların ardından iki önemli sonuca varılmıştır. İlki, tür içi mesafenin nadiren %2'nin üzerine çıkması ve çoğunlukla da %1 ve altında görülmesi olmuştur [16]. İkincisi, tür içi mesafenin %2'nin üzerinde bulunduğu grupların genellikle coğrafi olarak izole olmuş populasyonlar olduğu, geçmişte gen havuzunda ayrılmalar görülmüş olabileceğinin işareti olduğunu göstermiştir. Birçok türün ise, taksonomik statüsü belirgin olmayan soylar içerdiği de saptanmıştır. Sonuçta bu filoçografik araştırmalar COI'in türleri birbirinden ayırmak için uygun bir gen bölgesi olabileceğini göstermiştir [17].

Geçmişte yapılan birçok sistematik analiz çalışmasında

kullanılan 12S rRNA ve 16S rRNA genleri, göstermiş oldukları yüksek insersiyon ve delesyon frekansı nedeniyle elde edilen dizilerin hizalanmasında ve karşılaştırılmasında büyük zorluklara neden olmuştur. Çok hücreli türlerin mitokondriyal genomlarında bulunan 13 protein kodlayan gen genellikle bu insersiyon ve delesyonları içermektedir. COI geninin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü, metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi ve birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilir bir filogenetik sinyale sahip olmasıdır. COI geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyonundaki nükleotidleri yüksek oranda substitüsyon göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek moleküler evrim hızına sahip olarak değerlendirilmektedirler. Bir başka önemli nokta da COI geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkan tanıyan ve coğrafi yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda gerçekleşmesidir [15, 18- 20].

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada, Kocaeli Yöresinde doğal ortamlarından toplanılan çeşitli Diptera (Insecta) türleri, DNA barkod geni olan Sitokrom Oksidaz Altünite I (COI) geni ile moleküler düzeyde karakterize edilmeye çalışılmıştır. Örneğimiz S12'nin (MH431698), NCBI BLAST'ta incelendiğinde, %90 oranında *Rhamphomyia* cinsine ait olduğu görülmüştür. Tür bazında tanımlama yapılamamıştır. Örneğimiz S21'nin (MH431698) %99 benzerlikle *Exechia seriata*, S22'nin (MH431697) ise %97 benzerlikle *Phlebotomus neglectus* olduğu tespit edilmiştir. Örneklerimiz S23 (MH431696) ile S24'ün (MH431695) %99 benzerlikle *Chironomus riparius* oldukları görülmüştür. Örneğimiz S27 ise %87 oranında *Drosophila tsukubaensis*'a benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte, S27'nin *Symplecta hybrida*, *Rhinoleucophenga punctulata*, *Phortica longipennis*, *Palloptera ustulata*, *Drosophila latifshahi*, *Drosophila paulistorum* ve *Drosophila polychaeta* türleri ile olan benzerlik oranı %86'dır. S27'nin daha spesifik tespiti için farklı bir DNA barkod geni kullanılması önerilmektedir.

#### Kaynaklar

- [1] Hancı H., 2003. Adli Entomoloji, TBB Dergisi, **2003**(49).
- [2] Aydın G., 2016. Böceklerin Sınıflandırılması (Takım) Düzeyinde, <http://atabeymyo.isparta.edu.tr/assets/uploads/sites/76/files/boceklerin-siniflandirilmesi-18102016.pdf>.
- [3] Gullan P. J., Cranston P. S., 2005. The Insects: An Outline of Entomology, 4. ed., Blackwell Publishing, California, USA.

- [4] Hancı İ., Tüzün A., Açıkgöz N., Balseven A., Candar, S., 2002. Adli Entomoloji, Asayiş Daire Başkanlığı, Yayın no: 9, Ankara.
- [5] Eric J., Biyoloji Öz., 2015. 1. Baskı, Pearson, Nobel, Ankara.
- [6] Yılmaz C., 2017. Terme'nin Biyoçeşitlilik ve Doğal Ortam Özellikleri, O.M.Ü. Eğitim Fak. Serander Yayınları, Samsun.
- [7] Yıldırım E., 2012. The distribution and biogeography of Vespidae (Hymenoptera: Aculeata) in Turkey, Türk Entomol. Dergisi., **36**(1), 23-42.
- [8] Yıldırım E., Gusenleitner J., 2012. Contribution to the knowledge of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of Turkey, with a checklist of the Turkish species, Türk J. Zool., **36**(3), 361-374.
- [9] <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhamphomyia> (Erişim tarihi: 29.08.2018).
- [10] Ivočić V., Chaniotis V., Vujanić M., B. Bobić B., Nikolić A., Klun A., Živković T, Djurković-Djaković O., 2010., Life Tables And Reproductive Parameters Of Phlebotomus Neglectus Tonnoir, 1921 (Diptera, Psychodidae) Under Laboratory Conditions. Arch. Biol. Sci., Belgrade, **62**(1), 153-157.
- [11] Chaniotis B., Spyridaki I., Scoulika E., Antoniou M., 2000. Colonization of Phlebotomus neglectus (Diptera: Psychodidae), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. J Med Entomol., **37**(3): 346-348.
- [12] [https://en.wikipedia.org/wiki/Chironomus\\_riparius](https://en.wikipedia.org/wiki/Chironomus_riparius), Erişim tarihi 29.08.2018.
- [13] Barták M., Danielson R., 2007. Revision of Rhamphomyia species (Diptera, Empididae) described by J. W. Zetterstedt. Acta Zoologica Universitatis Comenianae **47**(2): 105–114.
- [14] <https://en.wikipedia.org/wiki/Drosophila>, (Erişim Tarihi 29.08.2018).
- [15] Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences. **270**, 313-321.
- [16] Avise J. C., 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university pres, Harvard.
- [17] Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings in Biological Sciences, **270**(1): 96–99.
- [18] Arnot D. E., Roper C., Bayoumi R. A., 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the Plasmodium falciparum circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. Molecular and Biochemical Parasitology, **61**, 15-24.
- [19] Ball S. L., Armstrong K. F., 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). Canadian Journal of Forest Research, **36**(2), 337-350.
- [20] Martijn J. T. N., Timmermans C. V., Geoff M., Kevin H. A., Vogler P., 2016. Rapid assembly of taxonomically validated mitochondrial genomes from historical insect collections. Biological Journal of the Linnean Society, **117**, 83-95.