

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**



**KESTANE AĞACI MEYVELERİNDE ZARAR YAPAN BÖCEK
TÜRLERİNİN GENETİK BELİRTEÇ İLE BELİRLENMESİ VE
BUNLARIN FİLOGENİ VE POPULASYON GENETİKLERİ: BİR
PİLOT BARKOD ÇALIŞMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Elif ASLAN

Danışman

Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.21.020 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Elif ASLAN tarafından, Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ danışmanlığında hazırlanan “KESTANE AĞACI MEYVELERİNDE ZARAR YAPAN BÖCEK TÜRLERİNİN GENETİK BELİRTEÇ İLE BELİRLENMESİ VE BUNLARIN FİLOGENİ VE POPULASYON GENETİKLERİ: BİR PİLOT BARKOD ÇALIŞMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 12.9.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan (Danışman)	Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Dr. Öğr. Üyesi Meltem KÖKDENER Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sosyal Hizmet Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Nurver ALTUN Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Zooloji Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY
... / ... / ...
Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet

Hayır

İmza
... / ... / ...
Elif ASLAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: KESTANE AĞACI MEYVELERİNDE ZARAR YAPAN BÖCEK TÜRLERİNİN GENETİK BELİRTEÇ İLE BELİRLENMESİ VE BUNLARIN FİLOGENİ VE POPULASYON GENETİKLERİ: BİR PİLOT BARKOD ÇALIŞMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 24.06.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

İmza
24 / 06 / 2022
Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ

ÖZET

KESTANE AĞACI MEYVELERİNDE ZARAR YAPAN BÖCEK TÜRLERİNİN GENETİK BELİRTEÇ İLE BELİRLENMESİ VE BUNLARIN FİLOGENİ VE POPULASYON GENETİKLERİ: BİR PİLOT BARKOD ÇALIŞMASI

Elif ASLAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Yüksek Lisans, Haziran/2022

Danışman: Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ

Kestane (*Castanea sativa* Mill.) ekolojik ve ekonomik öneme sahip bir tür olup, ülkemiz kestane üretimi açısından dünyada önemli bir sıralamada yer almaktadır. Kestane üretimi yapılan diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de değişik hastalıklara neden olan patojenik mantarlar ve kestane ile beslenen zararlı böcekler nedeniyle kestane üretiminde zaman zaman önemli kayıplar yaşanmaktadır. Ülkemizde kestane zararlısı patojenler üzerine yoğunlaşmış bazı çalışmalar olmasına rağmen, kestane ile beslenen böcekler üzerine yapılan çalışmalar nispeten azdır ve bu türler ile ilgili moleküler bir çalışma bulunmamaktadır. Daha önce bir takım morfolojik verilere dayalı olarak yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda, Türkiye’de en önemli kestane zararlısı olarak iki böcek türü verilmiştir: kestane hortumlu böceği *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) ve kestane iç kurdu *Cydia splendana* (Hübner, 1799) (Lepidoptera: Tortricidae). Bu zararlı böcek türleri %50 civarında yıllık ürün kaybına neden olmaktadır.

Bu çalışmada, böcekler de dâhil olmak üzere çeşitli hayvan gruplarında filogenetik ilişkileri ve genetik yapıyı araştırmak için başarıyla kullanılan mitokondrial sitokrom oksidaz alt birim I (COI) geni kullanılarak kestane ile beslenen larvalar üzerinde bir DNA barkod çalışması yapılmıştır. Türkiye'nin önde gelen iki kestane üreticisi olan Aydın ve Sinop illerinden toplanan kestane ile beslenen larvalar için COI geninin 414 ile 826 bç'lik bir kısmı dizilenmiştir. DNA barkodunun bilinmeyen örneklerin bilinen türlerle eşleştirilmesine yardımcı olacağı ve böylece hızlı bir şekilde tür seviyesinde örneklerin tanımlanacağından yola çıkarak, elde ettiğimiz COI gen dizilerini GenBank veya DNA barkod veri tabanından COI gen dizileriyle birleştirerek üç filogenetik çıkarım yöntemi kullanılmıştır. COI barkodlama çalışmamız, Aydın ve Sinop illerinde en önemli kestane zararlısı böceklerin, *Curculio elephas* ve *Cydia splendana* olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmamız *Curculio glandium*, *Curculio venosus*, *Ephestia elutella* ve *Cadra figulilella*'nın çalışma alanlarında çok yaygın olmasa da kestane zararlı böcekler olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, filogenetik ve populasyon parametrelerini içeren moleküler çalışmaların, bir zararlının mevcut durumunu ve gelecekteki potansiyelini tahmin etmek için kullanılabileceğini göstermektedir. Bu bilgi, daha etkili bir zararlı spesifik mücadele stratejisi için kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Castanea sativa*, Kestane zararlısı böcekler, Sitokrom oksidaz I barkodlama, Türkiye

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF INSECT SPECIES DAMAGING CHESTNUT FRUIT BY GENETIC MARKERS AND THEIR PHYLOGENY AND POPULATION GENETICS: A PILOT BARCODING STUDY

Elif ASLAN

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies

Department of Biology

Biology Thesis Master's Program

Master, June/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ

Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is a species of ecological and economic importance, and our country is in an important ranking in the world in terms of chestnut production. As in other chestnut producing countries, there are significant losses in chestnut production from time to time due to pathogenic fungi that cause various diseases and harmful insects that feed on chestnuts in Turkey. Although there are some studies focused on chestnut pest pathogens in our country, studies on chestnut-feeding insects are relatively few, and there is no molecular study on these species. In a limited number of studies based on some morphological data, two insect species have been reported as the most severe chestnut pest in Turkey: the chestnut weevil *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) and the chestnut tortrix *Cydia splendana* (Hübner, 1799) (Lepidoptera: Tortricidae). These pests causes about 50% annual crop loss in Turkey.

In this study, a DNA barcoding study was carried out on chestnut-feeding larvae using the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, which has been successfully used to investigate phylogenetic relationships and the genetic structure in various animal groups, including insects. A 414-826 bp portion of the COI gene was sequenced for chestnut-feeding larvae collected from Aydın and Sinop provinces, two leading chestnut producing cities in Turkey. Combining our COI gene sequences with COI gene sequences from GenBank or DNA barcode libraries, we used, given that the application of DNA barcoding to the matching of unknown specimens to known species is generally straightforward, three phylogenetic inferences for the pace of specimen identification to the species level. Our COI barcoding study shown that *Curculio elephas* and *Cydia splendana*, were the most abundant and widespread chestnut feeding pests Aydın and Sinop provinces. Moreover, our study shown that *Curculio glandium*, *Curculio venosus*, *Ephestia elutella* and *Cadra figulilella* are, although not very common, chestnut pest insects in the study sites. These findings suggest that molecular studies, including phylogenetic and population parameters, can be used to estimate the current status and future potential of a pest. This information can be integrated into a more effective pest-specific management strategy.

Keywords: *Castanea sativa*, Chestnut pests, Cytochrome oxidase I barcoding, Turkey

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kestane ağacı meyvelerinde zarar yapan böcek türlerinin genetik belirteç ile belirlenmesi ve bunların filogeni ve populasyon genetiklerinin bir pilot barkod çalışması yapılarak incelenmesi istenmiştir. Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Nevran Eylem AKMAN GÜNDÜZ'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarımla, başta Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ, Prof. Dr. Ünal Zeybekoğlu, bölüm başkanımız Prof. Dr. Erkan YALÇIN, Arş. Gör. Sadık DEMİRTAŞ ve değerli arkadaşım Medine ÖZMEN olmak üzere bana iki buçuk yıllık lisansüstü hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum. Ve son olarak çalışmamda desteğini ve bana olan güvenini benden esirgemeyen, beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bu hayattaki en büyük şansım olan aileme ve benim için dost kelimesinin anlamına derinlik katarak hayatımı güzelleştiren canım arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Elif ASLAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Örneklem ve Toplam DNA İzolasyonu	12
3.2. Yeterli Konsantrasyonda Toplam DNA Yapıldığıнын Kontrol Edilmesi	15
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR Reaksiyonları)	16
3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	18
3.5. DNA Dizileme İşlemi ve Ham Verilerin Edit Edilerek Konsensus Dizilerinin Oluşturulması.....	19
3.6. Moleküler Analizler	19
3.6.1. DNA Veri Matrisi Hazırlanması	19
3.6.2. COI Verisine Uyan İyi Baz Değişikliği Modelinin Belirlenmesi	20
3.7. Filogenetik Analizler	20
3.7.1. Uzaklık Metodu Analizi (Neighbour Joining-NJ).....	20
3.7.2. Maksimum Tutumluluk Analizi (Maximum Parsimony-MP)	21
3.7.3. Maksimum Olasılık Analizi (Maximum Likelihood-ML).....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. COI Dizilerinin Böcek Takımlarına Dağılımı.....	22
4.2. Moleküler Filogeni.....	27
4.2.1. Coleoptera Takımı İçinde Belirlenen Taksonların Filogenisi	28
4.2.2. Lepidoptera Takımı İçinde Belirlenen Taksonların Filogenisi	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ l	: Mikrolitre
bç	: Baz Çifti
COI	: Sitokrom Oksidaz-I
ddH ₂ O	: Deiyonize Distile Su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifostat
EtOH	: Etil Alkol
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
mA	: Miliamper
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ML	: Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
MP	: Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony)
mtDNA	: Mitokondrial DNA
NJ	: Uzaklık Metodu (Neighbour Joining)
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pmol	: Pikomol
rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı (Revolutions Per Minute)
TBE	: Tris-Borat-EDTA
UV	: Ultraviyole (Mor Ötesi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyada kestane yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgeler (Pereira-Lorenzo vd., 2012).....	2
Şekil 1.2. <i>Castanea sativa</i> Miller türünün dünya haritası üzerindeki yayılışı (Conedera vd., 2016).....	4
Şekil 1.3. Kestane ağaçlarının gövde yapısı, yaprakları, çiçeklenme durumu ve meyvesi (Anonim, 2021)	5
Şekil 1.4. FAO verilerine göre dünyada kestane üretim oranları (Anonim, 2022; Freitas vd., 2021).....	6
Şekil 3.1. Kestane zararlısı böcek larvalarının örneklendiği lokaliteler	12
Şekil 3.2. Kestane zararlısı böcekler tarafından parazitlenmiş kestane örnekleri	13
Şekil 3.3. COI geninin ilgili kısmını çoğaltmak için kullanılan PCR stratejisi	17
Şekil 4.1. Beş larva için C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerleri ile yapılan ve COI gen bölgesinin 826 bp'lik kısmının çoğaltıldığını gösteren PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. NK: Negatif kontrol, B: Belirteç	24
Şekil 4.2. NAZT1_AYD numaralı örnek için C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerleri ile elde edilmiş PCR ürünlerinin aynı primerler ile dizilenmesi sonucu elde edilen kromotogramlarının hizalamasını gösteren konsensus dizi kesit	25
Şekil 4.3. Çalışma kapsamında Coleoptera takımına dâhil olduğu belirlenen taksonlar arasında, COI verilerine (826 bp) dayalı evrimsel ilişkiyi gösteren ve MP ile MP ağaç topolojilerini de özetleyen ML ağacı. Ağaç GTR+I baz değişim modeline göre üretilmiştir. Ağaç dalları üzerinde verilen rakamlar 10000 (NJ) ve 1000 (MP ve ML) replikasyon ile oluşturan bootstrap değerlerini göstermektedir. <i>Eucryptorrhynchus scrobiculatus</i> türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MG728094 ve MZ417388) dış grup olarak kullanılmıştır. Analizlere dâhil edilen HQ165403, AY327714, KC663599, KC663612, KC663614, KC663605 ve KX087269 dizileri BOLD ve Gen Bankası karşılaştırması yapıldığında ilgili taksonlar en fazla benzerlik gösteren dizi temsilcilerini ifade etmektedir	29
Şekil 4.4. Çalışma kapsamında Lepidoptera takımına dâhil olduğu belirlenen taksonlar arasında, COI verilerine (414 bp) dayalı evrimsel ilişkiyi gösteren ve MP ile MP ağaç topolojilerini de özetleyen ML ağacı. Ağaç GTR+G baz değişim modeline göre üretilmiştir. Ağaç dalları üzerinde verilen rakamlar 10000 (NJ) ve 1000 (MP ve ML) replikasyon ile oluşturan bootstrap değerlerini göstermektedir. <i>Grapholita delineaana</i> türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MT1656914 ve MW924663) dış grup olarak kullanılmıştır. Analizlere dâhil edilen NC_039716, OU342899, KJ398305 ve KJ398277 dizileri BOLD ve Gen Bankası karşılaştırması yapıldığında ilgili taksonlar en fazla benzerlik gösteren dizi temsilcilerini ifade etmektedir	31

TABLolar DİZİNİ

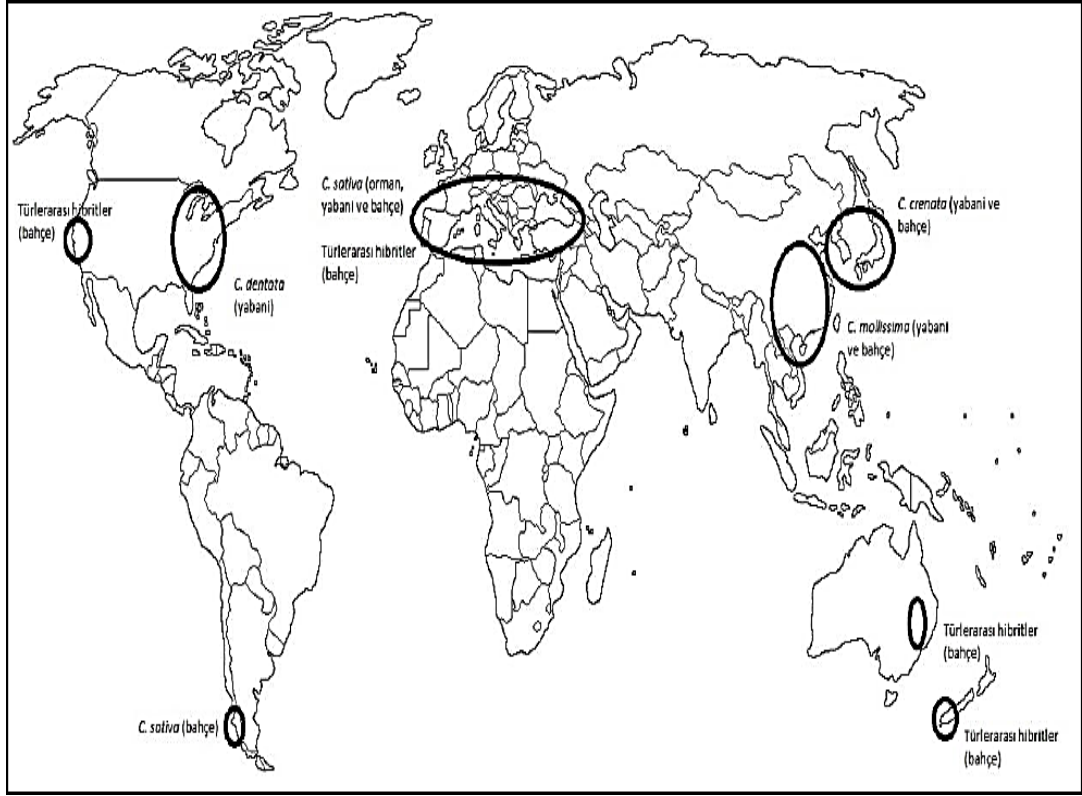
Tablo 1.1. Farklı kestane türlerinin seksiyonlarına göre ayrımı, latince ve genel isimleri ile doğal yetişme bölgeleri (Soylu, 2004).....	3
Tablo 1.2. Ülkemizde bazı illerde yıllara göre kestane üretim miktarları (Ton) (Aydın, 2021).....	7
Tablo 3.1. Larva örneklerinin toplandığı lokalite ve örnek numaraları	13
Tablo 3.2. PCR reaksiyonları için hazırlanan Master karışımının içeriği.....	17
Tablo 3.3. Kullanılan PCR döngü detayları.....	18
Tablo 4.1. Böcek larvalarından elde edilen toplam DNA'nın Colibri Microvolume Spectrometer ile belirlenmiş konsantrasyonları.....	22
Tablo 4.2. Belirlenen COI haplotiplerinin böcek takımlarına dağılımı	25

1. GİRİŞ

Türkiye, birçok meyve türünün anavatanı olması ve meyvelerin kültüre alınması açısından meyvecilik için önemli bir gen kaynağıdır. Jeopolitik konumu nedeniyle de iklim ve toprak çeşitliği oldukça fazladır ve bu sayede pek çok yabancı ve kültüre alınmış meyve türü için yaşam alanı oluşturmaktadır (Aydın, 2021). Ülkemizde yetişen en önemli meyvelerden biri olan kestane (*Castanea*), meşe (*Quercus*) ve kışın yaprağını döken kayın (*Fagus*) ağaçları ile birlikte *Fagaceae* (Kayıngiller) familyası içerisinde bulunmaktadır (Özer, 2020; Soylu, 2004).

Kestanenin ilk yayılış merkezinin neresi olduğu tam olarak bilinmemesine rağmen, farklı kaynaklara göre dünyada kültüre alınma yolu ile gerçekleştirilen kestane yetiştiriciliğinin Neolitik çağdan beri yaklaşık 6.000 yıl öncesinde Lidya Uygarlığı'nda ortaya çıktığı ve uzun süre boyunca da kestanenin "Lidya Elması" adıyla anıldığı bilinmektedir (Kumru, 2019). Geçmişte kestane tohumunun çok değerli olmasının sebebi, nişasta oranının çok yüksek olması ve doyurucu bir etkiye sahip olmasıdır. Eski Yunanlı ve Romalı yazarlar kestanenin MÖ. 5. yüzyılda Anadolu'dan Yunanistan'a, oradan da İspanya ve Güney İtalya'ya götürüldüğünü ileri sürmüşlerdir (Karadeniz, 2013; Soylu, 2004; Subaşı, 2004). Bir kısmı ise, Anadolu'da Kastamonu (Kastanis) ilinin kestanenin ilk yayılış merkezi olduğunu ve kestanenin adının da buradan geldiğini ifade etmişlerdir (Özçağırın vd., 2007; Soylu 2004). Son yıllarda yapılan genetik araştırmalarda Batı Anadolu'daki kestane çeşitlerinin İtalyan kestane çeşitleri ile akraba oldukları tespit edilmiştir (Kumru, 2019).

Dünyada kestane yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgeler Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Pereira-Lorenzo vd., 2012).



Şekil 1.1. Dünyada kestane yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgeler (Pereira-Lorenzo vd., 2012)

Kestanenin bilinen 13 türü bulunmaktadır ve bunların doğal yayılış alanları Çin, Kore, Japonya, Türkiye, Güney Avrupa, Kuzey Amerika ve Bolivya'dır (Sabbatini Pereira vd., 2017; Soylu, 2004) (Şekil 1.1).

Kestane türlerinin seksiyonlarına göre ayrımı, latince ve genel isimleri ile doğal olarak yetiştikleri yerler Tablo 1.1'de gösterilmiştir (Soylu, 2004).

Tablo 1.1. Farklı kestane türlerinin seksiyonlarına göre ayrımı, latince ve genel isimleri ile doğal yetişme bölgeleri (Soylu, 2004)

SEKSİYON VE LATİNCE ADI	GENEL ADI	DOĞAL YETİŞME ALANI
Gerçek Kestane (<i>Castanea</i>) Seksiyonu		
<i>Castanea mollissima</i> Bl.	Çin Kestanesi	Çin
<i>Castanea crenata</i> Sieb&Zucc	Japon Kestaneleri	Kore, Japonya
<i>Castanea sativa</i> Mill.	Avrupa Kestaneleri	Anadolu, Güney Avrupa
<i>Castanea dentata</i> Borkh.	Amerikan Kestaneleri	ABD'nin Doğusu
<i>Castanea seguinii</i> Dode	Amerikan Kestaneleri	Çin
<i>Castanea davidii</i> Dode	Seguin Kestanesi	Çin
Balanocastanon Seksiyonu (<i>Chinkapin</i>)		
<i>Castanea pumila</i> Mill.		ABD'nin Güneydoğusu, Virginia
<i>Castanea ozarkensis</i> Ashe		Arkansas, Missouri
<i>Castanea ashei</i> Sudw.		Kuzey Karolina, Florida
<i>Castanea alnifolia</i> Nutt.		Georgia, Florida
<i>Castanea floridana</i> Ashe		Florida, Texas, Georgia
<i>Castanea paucispina</i> Ashe		ABD'nin Güneydoğusu
Hypocastanon Seksiyonu		
<i>Castanea henryi</i> Rehd Wils.		Güneybatı Çin

Kestane türleri arasında yer alan 4 tür ekonomik açıdan oldukça değerlidir. Bu türlerden ilki olan *Castanea sativa* Mill. Avrupa Kestanesi olarak bilinir ve Anadolu ile Güney Avrupa'da, ikinci tür *Castanea mollissima* Bl. (Çin Kestanesi) Çin'de, üçüncü tür *Castanea crenata* Sieb&Zucc (Japon Kestanesi) Japonya ve Kore'de ve *Castanea dentata* Borkh. (Amerikan Kestanesi) ise ABD'nin doğusunda yetişmektedir (Kendir vd., 2016). Kestane türleri meyve, ağaç ve yaprak özellikleri bakımından değişiklik göstermektedir. Ülkemizde yetişen kestaneler "Avrupa Kestaneleri" grubunda yer alır ve ilk kez 1768 yılında Miller tarafından, *Castanea sativa* olarak adlandırılmıştır (Davis, 1988). Avrupa Kestanesi yayılma alanı en geniş olan kestane türü olup dünya üzerinde Hazar Denizi'nden Atlas Okyanusu'na kadar uzanan geniş bir yayılış alanına sahiptir (Conedera vd., 2016) (Şekil 1.2). Bu kestane türünün özellikle Fransa, İsviçre, İtalya ve Türkiye başta olmak üzere Bulgaristan, Arnavutluk, Yunanistan, Gürcistan, Azerbaycan, İspanya, Portekiz ve Romanya gibi ülkelerde de yayılış gösterdiği görülmektedir (Yaltırık, 1993; Yılmaz, 2014).



Şekil 1.2. *Castanea sativa* Miller türünün dünya üzerindeki yayılışı (Conedera vd., 2016)

Kestane ağaçları 25-30 m uzunlukta olabilen ve 1000 yaşına kadar yaşayabilen çok uzun ömürlü ağaçlardır (Yaltırık, 1993). Oldukça uzun ömürlü olmaları nedeniyle yurdumuzda anıt ağaç niteliği kazanmış birçok kestane ağacı vardır. Ağaçların dalları kuvvetli olup, tomurcukları diğer türlerinkinden daha iri, koyu kırmızı, yuvarlak ve oval şekildedir. Yaprakların kenarları testere dişli ve sert yapılı olup, üst yüzeyleri koyu, alt yüzeyleri ise açık yeşil renktedir. Çiçeklenme yaprakların oluşumunu takiben ilkbahara doğru başlar. Meyve kabuğu kahverengi tonlarındadır, meyveleri iridir ve bir yumak (kirpi) içerisinde genellikle 2-3 adet kestane meyvesi bulunmaktadır. Bazı çeşitlerde tohum zarı tohuma yapışık bir şekilde yer alır (Anonim, 2021) (Şekil 1.3).

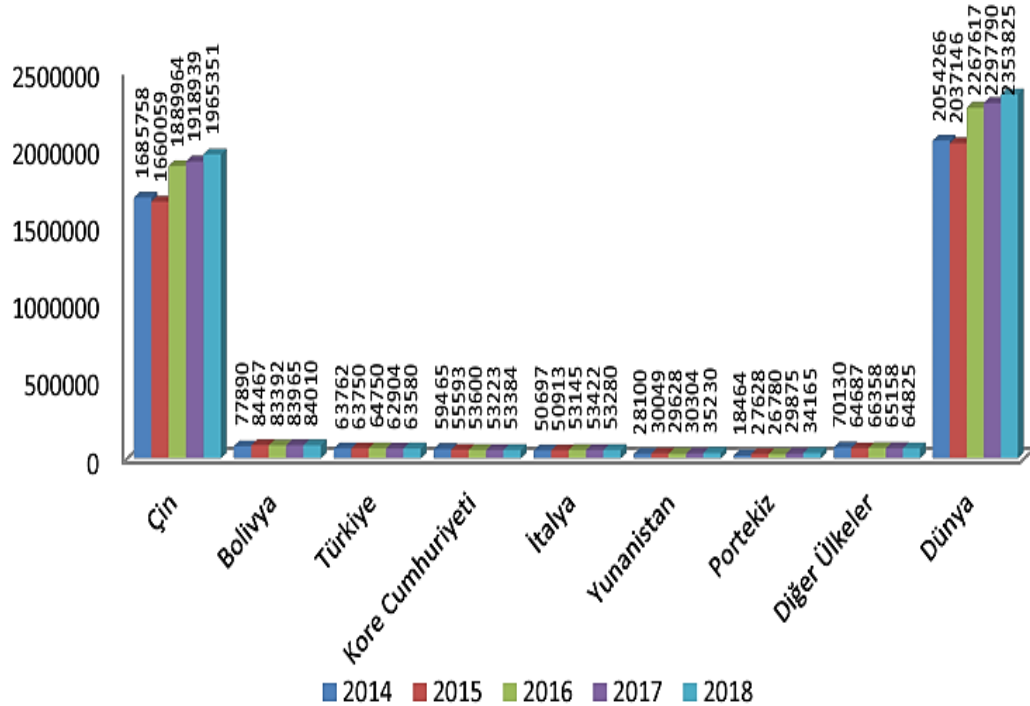


Şekil 1.3. Kestane ağaçlarının gövde yapısı, yaprakları, çiçeklenme durumu ve meyvesi (Anonim, 2021)

Kestane ağaçları eski çağlardan beri insanlar tarafından barınma, yakacak hammadde, beslenme gibi temel ihtiyaçların giderilmesinde kullanılmıştır (Soylu, 2004). Kestane ağaçlarının ekonomik anlamda en önemli ürünü şüphesiz ki meyvesidir (Akyüz, 2019). Zengin karbonhidrat, mineral ve vitamin içeriğine sahip olan bu meyvelerin enerji değeri oldukça yüksektir ve uzun süre tok tutma özelliğine sahiptir. Eski dönemlerde ormanlık alanlarda yaşayan ve yeterince buğday ununa sahip olmayan insan toplulukları için kestane ağaçları temel besin kaynağını oluşturduğundan “ekmek ağacı” olarak adlandırılmıştır. Yetiştigi mevsim nedeniyle kestane “hüznün meyvesi” ve bazı yörelerde “dağların ekmeği” olarak da nitelendirilmiştir. Meyveler çiğ olarak, suda haşlanarak ya da ateşte pişirilerek tüketilebilir. Ayrıca konserve, marmelat, püre, ezme, şekerleme, pasta, bisküvi, un ve ekmek yapımı gibi farklı tüketim yolları da bulunmaktadır (Ferreira-Cardoso vd., 1999). Kestane balı, astım hastalığının tedavisinde, öksürüğün giderilmesinde, yanık yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. Kestane ağacı, ahşap sanayisinde suya ve darbelere karşı dayanıklılık ve dekoratif özellikleri bakımından çok kullanışlı olması sebebiyle kereste ürünü olarak üretilip kullanılmaktadır (Conedera vd., 2004; Gümüştöre, 1994). Ayrıca kestane ağaçları, ekolojik ve peyzaj amaçlı olarak

kullanılmakta, ağacının sürgünlerinden el aletleri yapılarak ülkemize ekonomik açıdan katkı sağlanmaktadır (Anonim, 2021). Bu kullanım alanları dışında, odun ve odun kömürü yapımında hammadde olarak kullanılmaktadır. Boya sanayisinde de önemli bir yere sahip olan kestane ağacından; dalında, yaprağında, meyvesinde ve kabuğunda bulunan tanen maddesi sayesinde kahverengi renk elde edilmektedir. İlaç ve kozmetik yapımında ise büyük oranda ağaçların yaprak ve çiçeklerinden yararlanılmaktadır. Kestane ağaçlarının yüksek verime sahip olması, meyvelerinin tüketime hazırlanmasının kolay olması, doğal ortamda iyi yetişmesi, meyvelerin yağ içeriğinin düşük, buna karşın vitamin bakımından zengin olması ve gluten içermemesi (özellikle çölyak hastaları için besin kaynağı) nedeniyle insanların zamanla bu ağaçlara olan ilgisi artmıştır (Aydın, 2021; Seferoğlu, 2012).

FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre dünyadaki kestane üretim oranı 2018 yılında bir önceki yıla göre %2.5 oranında artarak yaklaşık 2.4 milyon tona ulaşmıştır. Bu verilere göre, 2018 yılında Çin Halk Cumhuriyeti yaklaşık 1.97 milyon tona ulaşarak, %83.50 oran ile dünya kestane üretiminde 1. sırada yer aldığı görülmektedir. Dünya kestane üretiminde Bolivya 2. sırada, Türkiye ise yaklaşık 64 bin tona ulaşarak %2.70 oranı ile 3. sırada yer almaktadır (Anonim, 2022; Freitas vd., 2021) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. FAO verilerine göre dünyada kestane üretim oranları (Anonim, 2022; Freitas vd., 2021)

Türkiye’de Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri kestane yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı yerlerdir (Soylu, 2004; Yüksel vd., 2020). Ülkemizde kestane üretimi genellikle ormanlarda kendiliğinden yetişen ağaçlardan ya da aşılama yolu ile yetiştirilen kestane ağaçlarından yapılmaktadır (Serdar vd., 2014). Aydın ve İzmir illeri kestane üretiminde ilk sıralarda yer alan illerdir. Bu illeri Kastamonu, Sinop, Kütahya, Denizli, Bursa ve Zonguldak illerinin izlediği görülmektedir (Aydın, 2021) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Ülkemizde bazı illerde yıllara göre kestane üretim miktarları (Ton) (Aydın, 2021)

İLLER	2004	2010	2017	2018	2019
Aydın	15.424	18.605	24.304	26.248	32.232
İzmir	8.077	8.659	11.542	11.610	12.168
Kastamonu	3.278	9.225	3.124	3.126	3.125
Sinop	4.497	4.504	3.755	3.655	3.676
Kütahya	3.068	2.374	2.075	1.988	1.999
Denizli	1.025	1.487	1.898	1.761	1.777
Bursa	1.159	1.455	1.990	1.822	1.820
Zonguldak	1.406	1.407	1.246	1.295	1.307
İstanbul	-	50	40	45	30
TÜRKİYE	49.000	59.171	62.904	63.580	72.655

Türkiye’de yetişen kestane türünün meyve kalitesi çok iyi olmakla birlikte, zararlı türlere ve hastalıklara karşı dayanıklılığı *Castanea mollissima* (Çin Kestanesi) ve *Castanea crenata* (Japon Kestanesi) türlerine oranla daha düşüktür (Pereira-Lorenzo vd., 2012). Bu nedenle bazı yıllarda ciddi ürün kayıpları ortaya çıkmakta ve bu durum Türkiye’nin kestane üreten ülkeler sıralamasındaki yerinin değişmesine neden olmaktadır.

Ülkemizde kestane zararlısı türler ve bu türlere karşı değişik mücadele yöntemleri ile ilgili olarak bazı yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Akça vd., 2016; Coşkuncu ve Mert, 2011; Demir, 2012; Karagöz vd., 2009; Toksöz vd., 2017; Yıldız, 2020). Daha ziyade morfolojik verilere dayalı olarak yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada, Türkiye’de en önemli kestane meyve zararlısı olarak özellikle iki böcek türü belirtilmiştir: Kestane hortumlu böceği *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) ve kestane iç kurdu *Cydia splendana* (Hübner, 1799) (Lepidoptera: Tortricidae) (Coşkuncu ve Mert, 2011; Karagöz vd., 2009; Tuncer ve

Serdar, 1996). Larvaları kestane ile beslenen bu böcek türlerinin %50'ye varan oranda ürün kaybına neden olduğu rapor edilmektedir. Kestane meyve zararlıları ile ilgili olarak yapılan çalışmalar arasında zararlı türlerin belirlenmesine yönelik moleküler çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkılarak tez çalışmasında Türkiye'de kestane üretimi yapılan iki farklı ilden (Aydın ve Sinop) toplanan kestanelerden elde edilen larvalarda mitokondrial DNA sitokrom oksidaz alt ünite I (COI) gen bölgesi dizileri kullanılarak DNA barkodlama çalışması yapılması ve böylece zararlı böcek türlerinin moleküler belirteç yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Akça vd. (2016), Samsun ili kestane ağaçlarında ilk kez görülen Yaprak biti *Lachnus roboris* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) örneklerinin laboratuvar koşullarında morfolojik özelliklerini incelemiştir.

Avtzis vd. (2013), son yıllarda Yunanistan'da *Cryphonectria parasitica* mantar türünün neden olduğu kestane kanseri ve kestane ile beslenen zararlılar nedeniyle üretimde önemli bir azalma görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu problemlerden kestane kanseri kısmen kontrol altına alınmış olmasına rağmen, kestane ile beslenen zararlı türler konusuna Yunanistan'da daha az önem verildiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada genetik belirteçler kullanılarak kestane ağaçlarında beslenen türlerin teşhisi ve dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonunda *Cydia splendana* ve *Curculio elephas* türlerinin yanı sıra *Cydia fagiglandana*, *Curculio glandium* ve *Curculio sp.*'nin var olduğu belirlenmiştir.

Avtzis ve Cognata (2013), çalışmalarında Yunanistan'da *Curculio elephas* türünün genetik yapısını araştırmışlardır. Yapılan çalışmada bu türün populasyon yapısının bilinmesinin zararlının gelecekte kontrolünde yardımcı olabileceği ifade edilmiştir.

Coşkuncu ve Mert (2011), Bursa, Balıkesir ve Kocaeli illerinden örneklenen 24 farklı kestane çeşidinde zarar oluşturan böcek türlerini ve meyvedeki kurtlanma oranlarını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *Cydia splendana* ve *Curculio elephas* türlerinin meyvelerde zarara neden olduğu, ayrıca erken dönemde kestane kirpi güvesi *Pammene fasciana* larvalarına da rastlandığını belirlenmiştir.

Demir (2012), yüksek lisans tez çalışmasında kestane meyve kurdu *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) ve haziran böceği *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvalarına karşı farklı konsantrasyonlarda farklı entomopatojen nematod türlerini kullanarak 50 ve 100 infektif juvenil etkinliklerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, *Heterorhabditis bacteriophora* ve *Steinernema weiseri* nematod türlerinin kombinasyonu kullanıldığında *Curculio elephas* larvalarına karşı başarı oranının arttığı, buna karşın *Polyphylla fullo* larvalarına karşı entomopatojen nematodların etkinliklerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir.

Karagöz vd. (2009) çalışmalarında Türkiye'de kestane meyvelerinin iki önemli zararlısı olan *Cydia splendana* ve *Curculio elephas* türleri ile mücadele için üç farklı

entamopatojenik nematod türünü (*Steinernema feltiae*, *S. weiseri* ve *Heterorhabditis bacteriophora*) kullanmışlardır. Her iki zararlı türü için farklı sıcaklıklarda infeksiyon için optimum sıcaklık, konağın ölüm süresi ve nematodların üreme potansiyelleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Cydia splendana* türünün *Curculio elephas* türüne göre nematod enfeksiyonuna karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiş, sıcaklığın entomopatojenik nematodun infektivitesi ve gelişimi için önemli bir etken olduğu da ifade edilmiştir.

Marvaldi (2003), Güney Amerika'da Coleoptera takımının Curculionoidea üst familyasına ait larvaların teşhisi için dış morfolojik özellikleri ve beslenme alışkanlıklarını esas alan teşhis anahtarı hazırlamıştır.

Ovcharov vd. (2007), Bulgaristan'da *Castanea sativa* Mill. türü ile ilişkili toplam 82 zararlı tür belirlemişlerdir. Bu türler Homoptera, Coleoptera ve Lepidoptera olmak üzere üç takıma aittir. Cerambycidae ve Curculionidae familyalarına ait türlerin çoğunlukta olduğunu da belirtmişlerdir. Ayrıca, en önemli zararlı türünün *Curculio elephas* olduğu ve bu türün meyve üretimine büyük ölçüde zarar verdiği ifade edilmiştir.

Paparati ve Speranza (2004), çalışmalarında İtalya'da *Curculio elephas* (Gyll.) ve *Curculio propinquus* (Desbr.) türlerinin kestane yetiştiriciliğinde önemli böcekler olduğunu ve yıldan yıla değişmekle birlikte ürün %60-70 oranında etkileyebildiklerini belirtmişlerdir. Çalışmada *C. propinquus* türünün biyolojisinin yanı sıra ergin böcekleri toplama teknikleri, zararlı kontrol yöntemleri ve soğuk su tekniğinin ürün istilasası üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Sabbatini vd. (2017), derleme çalışmalarında *Castanea* cinsinin dünyada bilinen 12 türü olduğunu, bunlar arasında *Castanea sativa* Mill., *Castanea mollissima* Bl. ve *Castanea crenata* Sieb&Zucc türlerinin kereste ve meyve sağlama açısından en önemli türler olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle *Castanea sativa* türünün meyvelerinin oldukça yüksek ekonomik değere sahip olması nedeniyle saf tür ya da hibrit olarak kültürel yetiştiriciliğinin yapıldığını ifade etmişlerdir. Ayrıca bu derleme çalışmasında Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da *Castanea* türlerine saldırdığı belirlenmiş 150'den fazla fitofaj böcek türü listelenmiştir. Bu türlerin Avrupa Kestane'lerine ulaşma ve mümkün olan zarar verme riskleri bu çalışmalara dayandırılarak açıklanmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda listede yer alan zararlı türler

düşük risk, orta risk ve yüksek risk olmak üzere üç risk kategorisinden birine yerleştirilmiştir.

Speranza (1998), çalışmasında Orta İtalya'da *Castanea sativa* Mill. türünün kültüre alımının arttığını ve kestane bahçelerinde bitki sağlığı ile ilgili konuların ele alınmasının gerekli olduğunu belirtmiştir. Bu konuda en acil sorun olarak üretimi doğrudan etkileyen fitofajların varlığına dikkat çekmeye çalışmıştır. Bu ürünü etkileyen en önemli fitofajlar; *Curculio elephas* Gyll., *Pammene fasciana* L., *Cydia fagiglandana* (Zell.), *Cydia splendana* L. türleridir. Bu türler arasında yer alan *Curculio elephas*'ın ürünün %90 kadarına saldırabildiği ve tüm verimi etkilediği, *Cydia splendana* istilasının da üretimi etkilediğini ancak bunların etkilerinin *Curculio elephas* ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu belirtilmiştir. Çalışmada zararlı popülasyonunu kontrol altına almak için yeni entegre kontrol metodlarının oluşturulması gerektiği belirtilmiştir.

Toksöz vd. (2017), Türkiye'nin dünyadaki kestane üretiminde önemli bir paya sahip olduğunu ve zararlı türlerin üretimi etkileyen önemli bir faktör olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmada 2 yaşındaki kestane ağaçlarında 4 farklı hibrit kestane genotipinde *Ambrosia* türlerinin yaptığı zarar oranları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda A14 genotipinin *Ambrosia* türlerine karşı diğer tüm gruplardan daha hassas olduğu belirlenmiştir.

Tuncer ve Serdar (1996), Sinop ilinde *Cydia splendana* ve *Curculio elephas* türlerinin kestane meyvelerinde kurtlanmaya neden olduğunu ve Sinop genelinde *Cydia splendana* için kurtlanma oranının *Curculio elephas* türüne oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Yıldız vd. (2020), oldukça önemli bir kestane zararlısı olan gal arısının son olarak Zonguldak ve Bartın illerinde yapılan arazi surveylerinde sınırlı bir yayılışa sahip olduğunu ve bir an önce mücadele çalışmalarına başlanmasının gerekli olduğunu ifade etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Örnekleme ve Toplam DNA İzolasyonu

Türkiye'nin önemli kestane üretim illerinden ikisi olduğu bilinen Aydın ve Sinop (Şekil 3.1) illerinden toplanan kestaneler kavanozlar içerisinde laboratuvar ortamına getirilerek, bunlardan kestane zararlısı böcekler tarafından parazitlenenler seçilmiş (Şekil 3.2) ve steril bistüri yardımı ile açılan kestanelerden böcek larvaları çıkarılarak, toplam DNA izolasyonu yapılana kadar larvalar -40°C'de steril poşetler içinde saklanmıştır. Çalışma kapsamında Aydın'dan 21 ve Sinop'tan 22 adet larva kullanılmıştır (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. Kestane zararlısı böcek larvalarının örneklendiği lokaliteler



Şekil 3.2. Kestane zararlısı böcekler tarafından parazitlenmiş kestane örnekleri

Tablo 3.1. Larva örneklerinin toplandığı lokalite ve örnek numaraları

Lokalite	Birey No
AYDIN	NAZT1_AYD
	NAZT3_AYD
	NAZT5_AYD
	NAZT6_AYD
	NAZT7_AYD
	NAZT8_AYD
	NAZT9_AYD
	NAZT10_AYD
	NAZT11_AYD
	NAZT12_AYD
	NAZT13_AYD
	NAZZ1_AYD
	NAZZ2_AYD
	NAZZ3_AYD
	NAZZ4_AYD
	NAZZ5_AYD
	NAZZ6_AYD
	NAZZ7_AYD
	NAZZ8_AYD
	NAZZ9_AYD
	NAZZ10_AYD

SİNOP

OZT1_SİN
OZT2_SİN
OZT3_SİN
OZT4_SİN
OZT5_SİN
OZT6_SİN
SINT1_SİN
ERT1_SİN
ERT2_SİN
ERT3_SİN
ERT4_SİN
ERT5_SİN
OZZ6_SİN
SINZ1_SİN
SINZ3_SİN
SINZ4_SİN
SINZ5_SİN
SINZ7_SİN
SINZ9_SİN
SINZ10_SİN
SINZ11_SİN
SINZ14_SİN

DNA izolasyonu yapılacak böcek larvaları 3x3 cm ebatlarında numaralandırılmış, steril plastik tartma kaplarına alınmıştır. Bu örneklerden PureLink Genomic DNA Kit (Thermo Scientific)'i kullanılarak ve kitle gönderilen protokol takip edilerek, Spin-Column yöntemiyle aşağıda özetlenen aşamalar ile toplam DNA izole edilmiştir:

Larvanın abdomen kısmının yaklaşık 3-4 mm'lik bölümü steril bir bistüri yardımıyla kesilerek plastik bir tartı kabına alınmış ve aynı bistüri yardımıyla alınan doku parçası küçük parçalara ayrılmıştır. Tamamen parçalanmış doku, numaralandırılmış 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine aktararak üzerine 180 µl Digestion Solüsyon ve 20 µl Proteinaz K eklenerek bir vorteks yardımıyla yaklaşık 5-6 saniye süre ile karıştırılmıştır.

Mikrosantrifüj tüplerinin ağızları streç film ile iyice sarılarak önceden 55 °C'ye ayarlanan su banyosuna transfer edilmiş ve burada yaklaşık 6 saat süre ile inkübasyona bırakılmış, bu süre zarfında tüpler su banyosundan her 3 saatte bir çıkarılarak vorteks ile karıştırılmıştır.

Bu inkübasyon süresinin ardından tüpler su banyosundan çıkarılarak 5 dakika süre ile vortekslenmiş ve her bir tüpe 20 µl RNase A solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir.

Bunun ardından tüplere 200 µl Lysis Tamponu eklenerek 4-5 saniye karıştırılmış ve ardından her bir tüpe 200 µl %96'lık EtOH eklenerek tüplerin her biri 5 saniye boyunca vortekslenmiştir.

Daha sonra tüp içerikleri önceden hazırlanmış ve steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş olan PureLink Genomic DNA Purification Column'lara yavaş bir şekilde pipetlenerek ağızları iyi bir şekilde kapatılmasının ardından, tüpler 10000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Spin Column'lar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, bir önceki tüplerdeki süpernatant atılmıştır. Her bir Spin Column üzerine 500 µl Wash Buffer I solüsyonu eklenmiş ve ardından tüpler 10000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Spin Column'lar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, bir önceki tüplerdeki süpernatant atılmıştır. Spin Column'lar üzerine 500 µl Wash Buffer II solüsyonu eklenerek ardından 14000xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Spin Column'lar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bir önceki tüplerdeki süpernatant atılmıştır. Column'lar üzerine 100 µl PureLink Genomic DNA Elution tamponu yavaşça eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmesinin ardından 13000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Column'lar atılarak içerisinde toplam DNA bulunan tüpler moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -40 °C'de saklanmıştır.

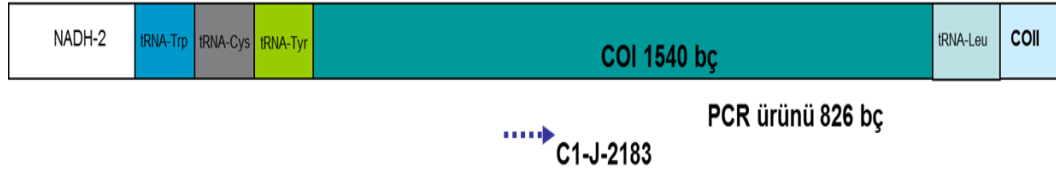
3.2. Yeterli Konsantrasyonda Toplam DNA Yapıldığının Kontrol Edilmesi

Moleküler çalışmalarda kullanılacak olan toplam DNA'nın yeterli konsantrasyonda izole edilip edilmediğini ve aynı zamanda kalite ve konsantrasyonun belirlemek için Colibri Microvolume Spectrometer (Thermo

Scientific) cihazı kullanılmıştır. Bunun için spektrometrenin örnek koyma kuyucuğu yumuşak bir peçeteye emdirilmiş saf su ile iyice temizlenmiş ve ardından kuyucuğa 1 µl PureLink Genomic DNA Elution tamponu (kör) pipetlenerek kalibre edilmiştir. Ardından kuyucuk yumuşak bir peçete yardımıyla kurulandıktan sonra her bir örneğe ait toplam DNA'lardan 1 µl pipetlenerek örneklerin DNA konsantrasyonları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Buna ilave olarak, yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın izole edildiğinden emin olmak için saflaştırılan DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülenmiştir. Bunun için %1.5 yoğunluğunda 100 ml 1 x TBE tampon içinde eritilerek hazırlanan agaroz jel soğutulmasının peşinden, örnek sayısı ile orantılı büyüklükte ve plastik tarak içeren plastik kalıplara dökülerek yaklaşık 40 dakika yoğunlaşması için bekletilmiştir. Ardından, her örnek için numaralandırılmış 100 µl'lik eppendorf tüpleri içerisine 3 µl yükleme tamponu Orange G, 1 µl %3'ük GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) ve 5 µl DNA konduktan sonra karıştırılmış ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiş örnek serisi hazırlanmıştır. Daha sonra, önceden hazırlanmış olan agaroz jelden tarak çıkarılarak jel içerisinde uygun 100 ml 1 x TBE tampon bulunan tank içerisine konulmuş ve agaroz jel üzerinde bulunan kuyucuklara her bir örnek için hazırlanan karışım yavaş bir şekilde pipetlenmiş, en son kuyucuğa ise 100 baz çifti (bç) belirteç (DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1 kb, Roch) pipetlenmiştir. Tankın elektrik bağlantıları yapılarak örnekler, 90-100 Volt ve 50 mA güç kullanılarak 45 dk elektroforez tankında yürütülmüştür. Ardından tanktan çıkarılan jel ultraviyole (UV) özellikli görüntüleme sistemi (Syngene, Gene Genius, Bio Imaging System) kullanılarak fotoğraflandırılmıştır.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR Reaksiyonları)

Hem Microvolume Spectrometer hem de agaroz jel elektroforez yöntemiyle PCR yapılacak derecede kaliteye sahip olduğu belirlenen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, mitokondrial DNA'nın sitokrom oksidaz 1 (CO I) geninin 826 baz çiftlik (bç) kısmı Jerry (C1-J-2183 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') ve Pat (L2-N-3014 5'- TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') (Simon vd., 1994) primerleri ve Şekil 3.3, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de verilen PCR stratejisi kullanarak Applied Biosystems™, SimpliAmp™ Thermal Cycler marka PCR cihazında çoğaltılmıştır.



Şekil 3.3. COI geninin ilgili kısmını çoğaltmak için kullanılan PCR stratejisi

Tablo 3.2. PCR reaksiyonları için hazırlanan master karışımının içeriği

PCR PROGRAMINDA KULLANILAN MASTER KARIŞIMININ YAPISI			
Elementler	Kullanılan Miktar (50 µL İçin)	Karışımın Son Konsantrasyonu	Kullanılan Elementlerin Markası
ddH ₂ O (Distile Su)	29.75 µl	Gerektiği kadar	
10X Taq Tamponu	5 µl		Thermophilic DNA Polymerase
C1-J-2183	5 µl	10 pmol/µl	
L2-N-3014	5 µl	10 pmol/µl	
dNTP	1 µl		Sigma
MgCl ₂	3 µl	25 pmol/µl	
Taq DNA Polimeraz	0.25 µl		Thermo Scientific Dream Taq
DNA	1 µl		

Tablo 3.3. Kullanılan PCR döngü detayları

REAKSİYON AŞAMASI	ZAMAN (SANİYE)	SICAKLIK (°C)
	30 Kez	
DNA Zincirlerinin Ayrılması (Denaturing)	150	94
Primerlerin Bağlanması (Annealing)	50	52
Zincirlerin Uzaması (Extension)	65	72
DNA Zincirlerinin Ayrılması	40	94
Primerlerin Bağlanması	50	52
DNA Zincirinin Uzaması	480	72
Soğuma Aşaması	Süresiz	4

3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerleri ile PCR reaksiyonları başarı ile gerçekleştirilmiş örnekler QIAGENE firmasına ait QIAquick adlı kit ve firmanın önerdiği ve aşağıda kısaca özetlenen protokol kullanılarak saflaştırılmıştır:

5:1 oranında PBI ve PCR ürünü 1500 µl'lik steril tüplerde karıştırılarak bu içerik daha sonra 2000 µl'lik tüplere yerleştirilmiş olan QIAquick Spin Column'larına pipetlenmiştir. Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Tüpler atılarak Column'lar 2000 µl'lik yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş ve Column'lara 0.75 ml PE tamponu eklenerek tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Tüpler yeniden atılarak Column'lar 2000 µl'lik yeni tüplere aktarılmış ve 12000 rpm'de 1 dakika süre ile tekrar santrifüj edilmiştir.

Column'lardan DNA'nın salınımını sağlamak için, Column'lar 1500 µl'lik yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 50 µl EB tamponu eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Column'lar atılarak PCR ürünleri içeren tüpler kısa süreli kullanım için +4 °C'de saklanmıştır.

Safılaştırma sürecinin ardından, bu PCR ürünlerinin kalitesini ve PCR ürün büyüklüğünü belirlemek için iki yöntem kullanılmıştır. İlk olarak %1.5 yoğunluğunda 100 ml 1 x TBE tampon içinde eritilerek hazırlanan agaroz jel hazırlanmış ve 100 µl'lik eppendorf tüpleri içerisine 3 µl yükleme tamponu Orange G, 1 µl %3'ük GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) ve 5 µl PCR ürünü konduktan sonra karıştırılmış ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiş örnek serisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu örnekler agaroz jel üzerinde 100 bç'lik (baz çifti) belirteç (DNA Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1 kb, Roch) ile yan yana, 90-100 Volt ve 50 mA güç kullanılarak 45 dk elektroforez tankında yürütülmüştür. Ardından tanktan çıkarılan jel ultraviyole (UV) özellikli görüntüleme sistemi ile fotoğraflandırılmıştır. İkinci olarak, her bir bireye ait PCR ürününden 1 µl alınarak ve EB tamponu kör olarak kullanılarak mikrovolumetre spektrometre ile kontrol edilmiştir. Kalitesi iyi (60-100 ng/µl) olan PCR ürünleri DNA dizilemesinde kullanılmak üzere stok olarak -40 °C'de saklanmıştır.

3.5. DNA Dizileme İşlemi ve Ham Verilerin Edit Edilerek Konsensus Dizilerin Oluşturulması

Mitokondrial DNA'nın sitokrom oksidaz I geninin dizileme işlemleri ABI 3730XL kapillar otomatik sistem kullanılarak Macrogen Firmasına (Hollanda) hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Dizileme işlemleri için yukarıda detayları verilen PCR primerleri (C1-J-2183 ve L2-N-3014) kullanılmış ve ilgili fragment iki yönlü ve üst üste çakışan diziler verecek şekilde dizilenmiştir.

Her bir birey için elde edilen ham DNA dizileri (elektroferogram) Sequencher® (Gene Codes, Ann Arbor, MI) programına aktararak hizalanmış, her bir baz tek tek gözden geçirilerek edit işlemleri yapılmıştır. Gerekli düzeltmeler ve primer bağlanma bölgelerinin kesilip çıkarılmasının ardından, her bir bireye ait 826 bç (Coleoptera) veya 414 bç (Lepidoptera) temiz bir biçimde okunmuş konsensus dizi elde edilmiştir. Bu konsensus diziler daha sonra yapılacak moleküler analizlerinde kullanılmak üzere FASTA formatında kaydedilmiştir.

3.6. Moleküler Analizler

3.6.1. DNA Veri Matrisi Hazırlanması

Aydın'dan 21 ve Sinop'tan 22 larvanın FASTA formatındaki COI dizileri öncelikle BOLD (The Barcode of Life Data System: <https://boldsystems.org/>) ve

GenBank-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veri tabanlarına aktarılarak dizi benzerlik analizine tabi tutulmuştur. Bu benzerlik analizleri sonucu elde edilen COI dizilerinin iki böcek takımına (Coleoptera ve Lepidoptera) dâhil olduklarının belirlenmesinin ardından, her bir dizinin bu böcek takımları içinde hangi taksona ait olabilecekleri değerlendirilerek, MacClade ver. 4.08 (Maddison and Maddison, 2000) programı yardımıyla Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına ait iki DNA matrisi hazırlanarak bu matrisler daha sonraki moleküler analizlerde kullanılmıştır.

3.6.2. COI Verisine Uyan İyi Baz Değişikliği Modelinin Belirlenmesi

Hazırlanan bu Coleoptera ve Lepidoptera DNA matrisleri jModeltest 2 (Darriba vd., 2012) programına aktarılarak burada seçenek olarak sunulan Akaike Information Criterion (AICc) (Akaike, 1973; Akaike, 1974) algoritması kullanılarak, her bir veri için en iyi baz değişim modeli bulunmuştur. Belirlenen bu modeller model kullanımı gerektiren filogenetik analizlerde kullanılarak evrimsel ağaçlar oluşturulmuştur.

3.7. Filogenetik Analizler

Taksonlar arası evrimsel ilişkiyi ortaya koymak için üç farklı evrimsel ağaç üretme yaklaşımı kullanılmıştır: Uzaklık metodu (Neighbour Joining-NJ) (Saitou and Nei, 1987), Maksimum Likelihood metodu (ML) (Felsenstein, 1981) ve Maksimum Parsimoni metodu (MP) (Fitch, 1971). Her biri ile elde edilen ağaçların topolojileri incelenerek, değerlendirilip birbiri ile karşılaştırılmıştır. Ağaçlardaki ana soy hatlarına köken veren düğümlerin istatistiksel olarak ne derece desteklendiğini görmek amacıyla 1000 (MP ve ML) ve 10000 (NJ) replikasyondan oluşan bootstrap analizi (Felsenstein, 1985) yapılmıştır. Filogenetik analizlerde Coleoptera veri seti için Curculionidae familyasından *Eucryptorrhynchus scrobiculatus* türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MG728094 ve MZ417388); Lepidoptera veri seti için ise Tortricidae familyasından *Grapholita delineana* türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MT165691 ve MW924663) dış grup olarak ağaçları köklendirmek için kullanılmıştır.

3.7.1. Uzaklık Metodu Analizi (Neighbour Joining-NJ)

Hazırlanan DNA veri matrisi NEXUS formatında kaydedilerek PAUP ver. 4.0 b10 (Swofford, 2002) filogenetik analiz programına aktarılmıştır. Belirlenen en iyi

baz değişikliği modeli opsiyonu kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz tamamlandıktan sonra üretilen ağaç dosyası NEXUS formatında kaydedilmiştir. Bu ağaç dosyaları TreeView ver. 1.6.6 (Page, 1996) programına aktarılmış ve orada filograma dönüştürülerek görsel hale getirilmiştir. Ana düğümlerin istatistiksel olarak ne derece desteklendiğini görmek amacıyla yine PAUP* program ve parametreler kullanılarak bootstrap analizi (10000 replikasyon) yapılmıştır. Analiz bitikten sonra yine üretilen konsensus ağaç dosyası NEXUS formatında kaydedilmiştir. Bu NEXUS dosyası yine TreeView programına aktarılmış ve orada kladograma dönüştürülerek görsel hale getirilmiştir. Bootstrap değerleri incelenerek kaydedilmiş, %70 ve üzeri olan bootstrap değerleri bir önceki aşamada oluşturulan NJ ağaç üzerinde gösterilmiştir.

3.7.2. Maksimum Tutumluluk Analizi (Maximum Parsimony-MP)

MP analizi PAUP* programında Heuristic ağaç algoritması ve 10 rastgele tekrar seğeneği kullanılarak yürütölmüştür. Elde edilen ağaçlar için řu üç ağaç istatistiki değeri hesaplanmıştır: TL (Tree Length): Ağaç Uzunluğu; CI (Consistency Index): Tutarlılık İndeksi ve RI (Retention Index): Tutma İndeksi. MP ağaçlardaki ana düğümlerin istatistiksel olarak ne derece desteklendiğini göstermek için yine Heuristic ağaç algoritması ve 10 rastgele tekrar seğeneği kullanılarak bootstrap analizi (1000 replikasyonlu) yapılmış; elde edilen bootstrap değerlerinden \geq %70 olanlar ağaç üzerindeki ilgili düğüm için gösterilmiştir. Birden fazla eşit olasılıklı en kısa ağaç üretildiği durumlarda bu ağaçların bir özetini oluşturacak şekilde Strict Konsensus ağacı üretilerek bu ağacın topolojisi diğer yöntemlerle (NJ, ML) üretilen ağaçların topolojileri ile karşılaştırılmıştır.

3.7.3. Maksimum Olasılık Analizi (Maximum Likelihood-ML)

ML analizi veri seti için önerilen en uygun baz değişikliği modeli kullanılarak MEGA X (Kumar vd., 2018) programında yapılmıştır. ML analizi için başlangıç ağacı olarak parsimoni yaklaşımı ile oluşturulan ağaç kullanılmıştır. Ana soy hatlarına köken oluşturan düğümlerin istatistiksel olarak ne derece desteklendiğini göstermek için yine aynı en iyi uyum gösteren baz değişikliği ve aynı program kullanılarak bootstrap analizi (1000 replikasyonlu) yapılmış, elde edilen bootstrap değerlerinden \geq %70 olanlar ağaç üzerindeki ilgili düğüm için gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. COI Dizilerinin Böcek Takımlarına Dağılımı

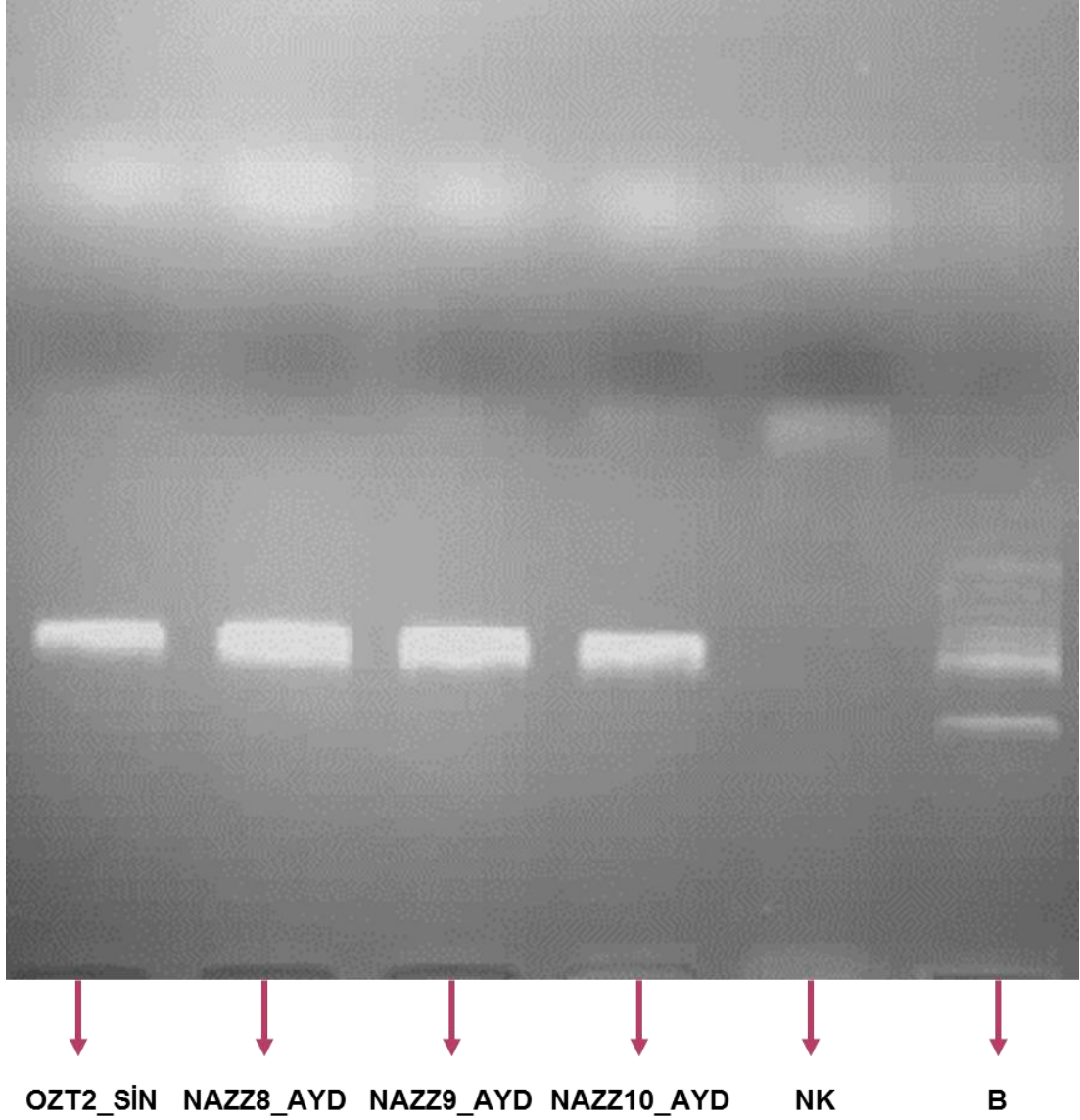
Çalışma kapsamında Aydın'dan 21 ve Sinop'tan toplam 22 larvanın toplam DNA'sı başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Tablo 4.1). 11 larva örneğinden elde edilen DNA konsantrasyonları düşük (20-30 ng/μl) olsa da genel olarak PCR reaksiyonlarının yapılması için gereken düzeyde DNA çoğu birey için elde edilebilmiştir. Düşük DNA konsantrasyonuna sahip bireyler için ise farklı DNA (2-5 μl) miktarları kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları ile hedeflenen COI bölgesinin 3' kısmının 826 bç'lik kısmı tüm örneklerde başarı ile çoğaltılabildiği (Şekil 4.1).

Çalışma kapsamında kullanılan böcek larvalarından elde edilen toplam DNA'nın Colibri Microvolume Spectrometer ile belirlenmiş konsantrasyonları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Böcek larvalarından elde edilen toplam DNA'nın Colibri Microvolume Spectrometer ile belirlenmiş konsantrasyonları

LOKALİTE	BİREY NO	DNA KONSANTRASYONU (ng/μl)
AYDIN	NAZT1_AYD	100.4
	NAZT3_AYD	60.99
	NAZT5_AYD	108.97
	NAZT6_AYD	210.92
	NAZT7_AYD	38.94
	NAZT8_AYD	33.17
	NAZT9_AYD	30.58
	NAZT10_AYD	24.54
	NAZT11_AYD	50.74
	NAZT12_AYD	23.55
	NAZT13_AYD	20.63
	NAZZ1_AYD	112.6
	NAZZ2_AYD	98.7
	NAZZ3_AYD	79.41
	NAZZ4_AYD	132.57
	NAZZ5_AYD	40.4
	NAZZ6_AYD	44.87
	NAZZ7_AYD	23.67
	NAZZ8_AYD	31.25

	NAZZ9_AYD	30.23
	NAZZ10_AYD	29.35
SINOP	OZT1_SIN	143.24
	OZT2_SIN	111.97
	OZT3_SIN	119.24
	OZT4_SIN	317.27
	OZT5_SIN	47.33
	OZT6_SIN	85.18
	SINT1_SIN	75.8
	ERT1_SIN	20.41
	ERT2_SIN	20.79
	ERT3_SIN	31.25
	ERT4_SIN	79.48
	ERT5_SIN	34.74
	OZZ6_SIN	65.85
	SINZ1_SIN	79.75
	SINZ3_SIN	259.75
	SINZ4_SIN	47.6
	SINZ5_SIN	90.06
	SINZ7_SIN	69.83
	SINZ9_SIN	65.58
	SINZ10_SIN	147.49
	SINZ11_SIN	29.12
	SINZ14_SIN	20.47



Şekil 4.1. Beş larva için C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerleri ile yapılan ve COI gen bölgesinin 826 bç'lik kısmının çoğaltıldığını gösteren PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. NK: Negatif kontrol, B: Belirteç.

Elde edilen PCR ürünlerinin C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerler ile dizilemesi yapıldığında larvaların bir kısmı (Coleoptera) için iki primer ile de net okunabilir diziler elde edilmiştir. İki primer ile elde edilen dizilerin hizalanması ile toplamda 826 bç'lik COI bölgesi okunmuştur (Şekil 4.2). Ancak larvaların bir kısmı (Lepidoptera) için iki kez dizileme tekrarlanmasına rağmen PCR primerlerinden biri (L2-N-3014) ile iyi kalitede diziler elde edilememiştir. Bu nedenle bu grup larvalar için (toplamda 20 birey) DNA dizilemesi tek primer (C1-J-2183) ile tek yönlü okunmuştur. Dolayısı ile bu grup larvalar için COI bölgesinin sadece 414 bç'lik kısmı okunabilmiştir.



Şekil 4.2. NAZT1_AYD numaralı örnek için C1-J-2183 ve L2-N-3014 primerleri ile elde edilmiş PCR ürünlerinin aynı primerler ile dizilmesi sonucu elde edilen kromotogramlarının hizalamasını gösteren konsensus dizi kesiti

Aydın ve Sinop illerinden çalışılan larvaların COI dizilerinin BOLD ve GenBank-BLAST veri bankalarında depolu verileri ile benzerlik karşılaştırılmasına tabi tutulması sonucunda bunların Coleoptera ve Lepidoptera takımlarındaki Tablo 4.2.'de verilen taksonlara ait oldukları belirlenmiştir. Tablo 4.2. incelendiğinde moleküler olarak belirlenen taksonlar arasında her iki ilde de en yaygın olarak belirlenen türlerin Coleoptera takımından *Curculio elephas* (Aydın: %47.62 ve Sinop: %45.45) Lepidoptera takımından ise *Cydia splendana* (Aydın: %42.85 ve Sinop: %40.91) olduğu görülmektedir. Coleoptera takımına ait diğer üç takson ise nadir olarak belirlenmiş olup bunlardan *Curculio* sp. Aydın'dan, *Curculio glandium* Sinop'tan ve *Curculio venosus* yine Sinop'tan sadece bir birey olarak belirlenmiştir. Lepidoptera takımına ait diğer iki takson ise yine nadir olup, bunlardan *Cadra figulilella* Aydın'dan bir birey ve *Ephestia elutella* Sinop'tan bir birey olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Belirlenen COI haplotiplerinin böcek takımlarına dağılımı

LOKALİTE	BİREY NO	TAKIM (FAMİLYA)	CİNS/TÜR	HAPLOTİP
AYDIN				
	NAZT1_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.7
	NAZT3_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.8
	NAZT5_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.2
	NAZT6_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.2
	NAZT7_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.9

	NAZT8_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	NAZT9_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.10
	NAZT10_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio</i> sp.	Haplotip.Col.12
	NAZT11_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	NAZT12_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.11
	NAZT13_AYD	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	NAZZ1_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.2
	NAZZ2_AYD	Lepidoptera (Pyralidae)	<i>Cadra figulilella</i>	Haplotip.Lep.3
	NAZZ3_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
	NAZZ4_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
	NAZZ5_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.2
	NAZZ6_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.2
	NAZZ7_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
	NAZZ8_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
	NAZZ9_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
	NAZZ10_AYD	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINOP				
	OZT1_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	OZT2_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.3
	OZT3_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	OZT4_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	OZT5_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio glandium</i>	Haplotip.Col.4
	OZT6_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	SINT1_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.5
	ERT1_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	ERT2_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	ERT3_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	ERT4_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio elephas</i>	Haplotip.Col.1
	ERT5_SiN	Coleoptera (Curculionidae)	<i>Curculio venosus</i>	Haplotip.Col.6
	OZZ6_SiN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.4
	SINZ1_SiN	Lepidoptera	<i>Ephestia elutella</i>	Haplotip.Lep.6

SINZ3_SİN	(Pyralidae) Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ4_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ5_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ7_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ9_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.5
SINZ10_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ11_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1
SINZ14_SİN	Lepidoptera (Tortricidae)	<i>Cydia splendana</i>	Haplotip.Lep.1

4.2. Moleküler Filogeni

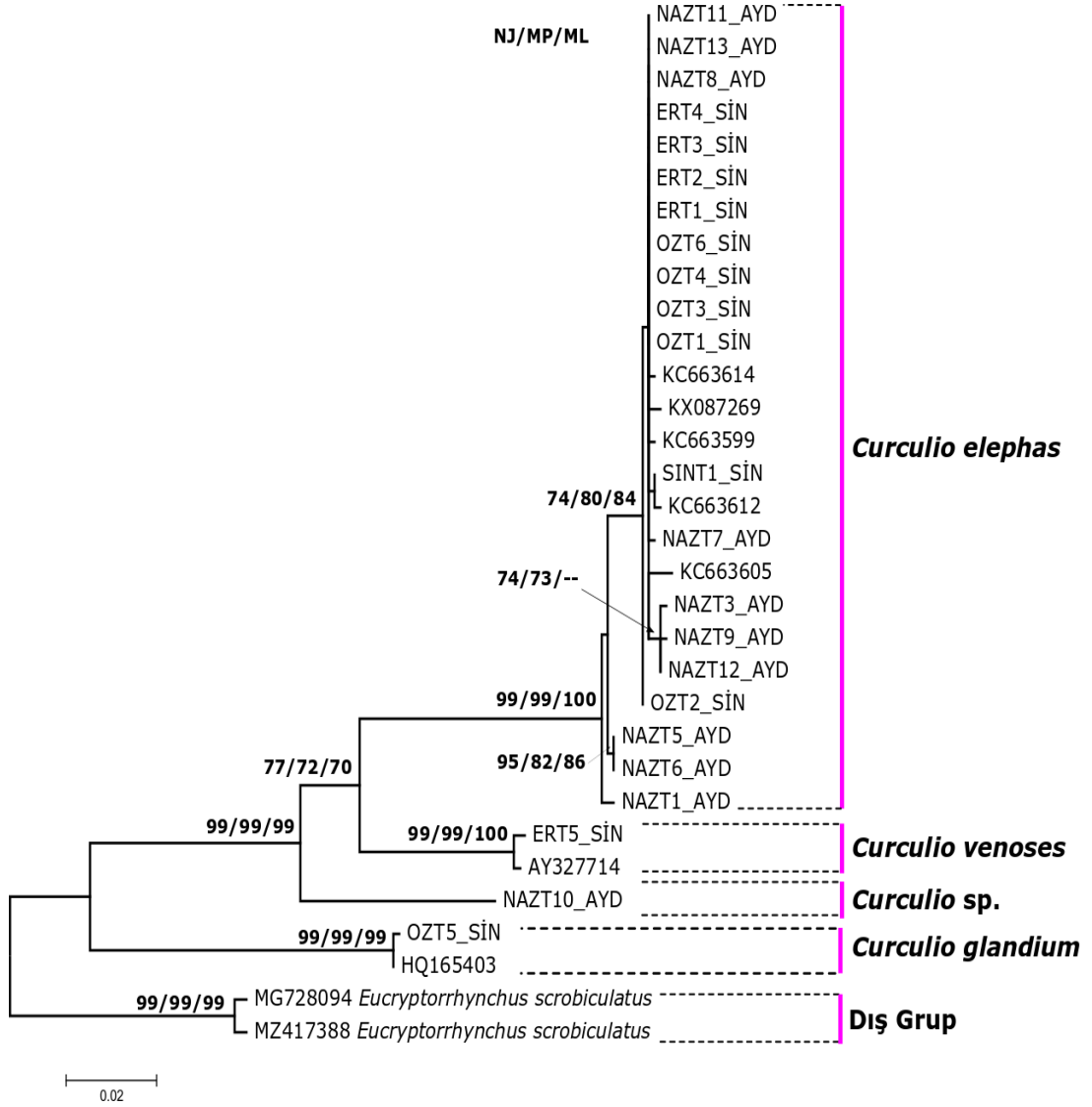
İki ilde Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına ait COI haplotiplerinin iller ve taksonlar arasında dağılımına bakıldığında (Tablo 4.2) Coleoptera içinde en yaygın haplotipin *Curculio elephas* türünde belirlenen Haplotip.Col.1 olduğu (11 birey) ve bu haplotipin Sinop ilinde yüksek, Aydın ilinde ise orta derecede frekansta bir dağılış gösterdiği görülmektedir. İkinci en yaygın Coleoptera haplotipi Haplotip.Col.2 olup, bu haplotip yine *Curculio elephas* türünde ve Aydın ilinde iki bireyde belirlenmiştir.

Diğer Coleoptera haplotiplerinin her biri nadir haplotipler olup her biri sadece tek bir bireyde belirlenmişlerdir: Haplotip.Col.3 Sinop'tan *Curculio elephas* türünde, Haplotip.Col.4 Sinop'tan *Curculio glandium* türünde, Haplotip.Col.5 Sinop'tan *Curculio elephas* türünde, Haplotip.Col.6 Sinop'tan *Curculio venosus* türünde, Haplotip.Col.7-11 Aydın'dan *Curculio elephas* türünde ve Haplotip.Col.12 Aydın'dan *Curculio* sp. türündedir. Diğer taraftan, Lepidoptera içinde en yaygın haplotipin *Cydia splendana* türünde belirlenen Haplotip.Lep.1 olduğu (13 birey) ve bu haplotipin hem Aydın hem de Sinop illerinde yüksek frekansta bir dağılış gösterdiği görülmektedir. İkinci en yaygın Lepidoptera haplotipi ise yine *Cydia splendana* türünde ve sadece Sinop ilinden üç bireyde belirlenen Haplotip.Lep.2'dir. Geri kalan Lepidoptera haplotipleri ise nadir frekansta olup bunlardan Haplotip.Lep.3 *Cadra figulilella* türünde Aydın'dan bir bireyde, Haplotip.Lep.4 *Cadra figulilella* türünde Sinop'tan bir bireyde, Haplotip.Lep.5 yine *Cadra figulilella* türünde Sinop'tan bir bireyde ve Haplotip.Lep.6 *Ephestia elutella* türünde Sinop'tan bir bireyde belirlenmiştir.

4.2.1. Coleoptera Takımı İçinde Belirlenen Taksonların Filogenisi

Coleoptera takımı için belirlenen COI haplotipleri (Haplotip.Col.1-12) arasında 826 bazlık fragment içinde varyasyon gösteren pozisyon sayısı 176 olup, bunlardan 67 tanesi Maksimum Parsimoni yaklaşımına göre filogenetik bilgi içermektedir. Coleoptera takımı için belirlenen COI dizilerinin Maksimum Parsimoni yöntemi ile yapılan filogenetik analizi ile TL: 292, CI: 0,811644 ve RI: 0,893617 olan 10 eşit uzunlukta ağaç oluşmuştur. Bu ağaçların özetini oluşturan Strict Konsensus ağacı üretildiğinde belirlenen tüm taksonların ağaç üzerindeki konumlanmalarının jModeltest tarafından veri setine en iyi uyan baz değişim modeli seçilen GTR+I modeli ile oluşturulan NJ ve ML ağaçlarındaki konumlanmalara benzer oldukları görülmüştür. Bu nedenle üç farklı metod ile oluşturulan filogenetik ağaçlar topolojilerinin benzer olması nedeniyle tek bir ML ağaç üzerinde özetlenmiştir (Şekil 4.3).

Bu ağaç incelendiğinde, iki ilde de en yaygın Coleoptera türünün *Curculio elephas* olduğu ve bu türe ait COI dizilerinin %99-100'lük bootstrap değeri ile desteklenen monofiletik bir grup oluşturduğu görülmektedir. Bu grup içinde üç alt grubun yer aldığı açıktır: 1. alt grup %82-95'lik bootstrap değerleri ile desteklenmekte olup NAZT5_AYD ve NAZT6_AYD dizilerinden oluşmaktadır; 2. alt grup NAZT1_AYD ile temsil edilen tek bir diziden oluşmaktadır; 3. alt grup ise en fazla dizi içeren ve hem Aydın hem de Sinop illerinden bulunan dizilerin yanında Gen Bankası dizilerini de içeren ve %74-84'lük bir bootstrap değerleri ile desteklenen geri kalan tüm dizileri içermektedir. ML ağaçta, çalışma kapsamında belirlenen diğer Coleoptera (*Curculio venosus*, *Curculio glandium* ve *Curculio* sp.) türlerine ait dizilerde yüksek bootstrap değerler ile desteklenen (%99-100) ayrı soy hatları şeklinde gruplanmaktadır.



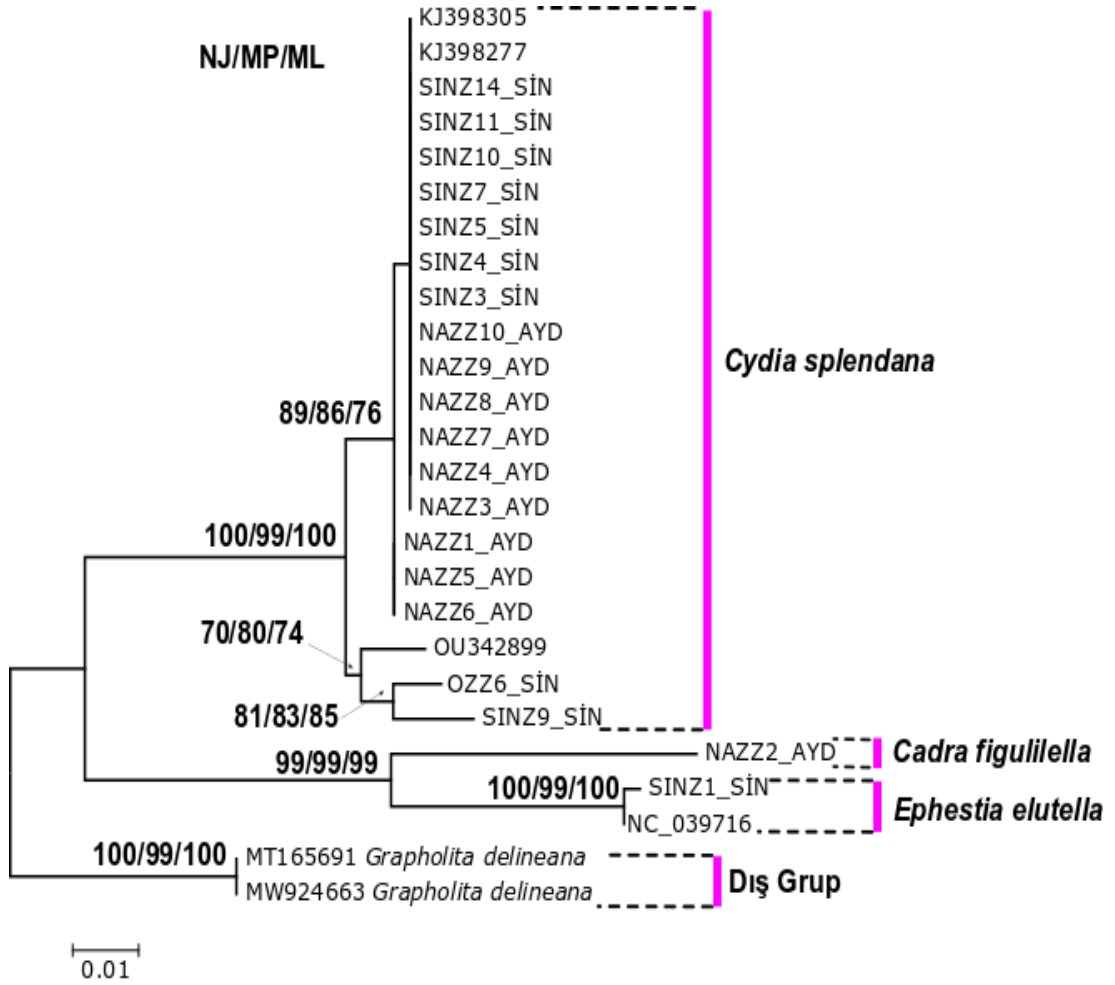
Şekil 4.3. Çalışma kapsamında Coleoptera takımına dâhil olduğu belirlenen taksonlar arasında, COI verilerine (826 bç) dayalı evrimsel ilişkiyi gösteren ve MP ile MP ağaç topolojilerini de özetleyen ML ağacı. Ağaç GTR+I baz değişim modeline göre üretilmiştir. Ağaç dalları üzerinde verilen rakamlar 10000 (NJ) ve 1000 (MP ve ML) replikasyon ile oluşturan bootstrap değerlerini göstermektedir. *Eucryptorrhynchus scrobiculatus* türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MG728094 ve MZ417388) dış grup olarak kullanılmıştır. Analizlere dâhil edilen HQ165403, AY327714, KC663599, KC663612, KC663614, KC663605 ve KX087269 dizileri BOLD ve Gen Bankası karşılaştırması yapıldığında ilgili taksonlar en fazla benzerlik gösteren dizi temsilcilerini ifade etmektedir.

4.2.2. Lepidoptera Takımı İçinde Belirlenen Taksonların Filogenisi

Lepidoptera takımı için belirlenen COI haplotipleri (Haplotip.Lep.1-6) arasında 414 bazlık fragment içinde varyasyon gösteren pozisyon sayısı 70 olup, bunlardan 33 tanesi Maksimum Parsimoni yaklaşımına göre filogenetik bilgi içermektedir. Lepidoptera takımı için belirlenen COI dizilerinin Maksimum Parsimoni yöntemi ile yapılan filogenetik analizi ile TL: 104, CI: 0,865385 ve RI: 0,905405 olan 10 eşit uzunlukta ağaç oluşmuştur. Bu ağaçların özetini oluşturan Strict Konsensus ağacı

üretildiğinde belirlenen tüm taksonların ağaç üzerindeki konumlanmalarının jModeltest tarafından veri setine en iyi uyan baz değişim modeli seçilen GTR+G modeli ile oluşturulan NJ ve ML ağaçlarındaki konumlanmalara benzer oldukları görülmüştür. Bu nedenle üç farklı metod ile oluşturulan filogenetik ağaçlar topolojilerinin benzer olması nedeniyle tek bir ML ağaç üzerinde özetlenmiştir (Şekil 4.4).

Bu ağaç incelendiğinde, iki ilde de en yaygın Lepidoptera türünün *Cydia splendana* olduğu ve bu türe ait COI dizilerinin %99-100'lük bootstrap değerleri ile desteklenen monofiletik bir grup oluşturduğu görülmektedir. Bu grup içinde iki alt grubun yer aldığı açıktır: 1. alt grup %70-80'lik bootstrap değerleri ile desteklenmekte olup Gen Bankası dizisi OU342899 ile Sinop'tan OZZ6_SİN ve SINZ9_SİN dizilerini içermektedir; 2. alt grup ise hem Aydın hem de Sinop illerinden bulunan dizilerin yanında Gen Bankası dizilerini de içeren ve %76-89'lük bootstrap değerleri ile desteklenen geri kalan tüm dizileri içermektedir. ML ağaçta, çalışma kapsamında belirlenen diğer Lepidoptera (*Ephestia elutella* ve *Cadra figulilella*) türlerine ait diziler beraberce %99-100'lük bootstrap değerleri ile gruplanmakta olup, bu grup içindeki iki *Ephestia elutella* dizisi (SINZ1_SİN ve NC_039716) %99-100'lük yüksek bootstrap değerleri ile beraber gruplanmaktadır.



Şekil 4.4. Çalışma kapsamında Lepidoptera takımına dâhil olduğu belirlenen taksonlar arasında, COI verilerine (414 bç) dayalı evrimsel ilişkiyi gösteren ve MP ile MP ağaç topolojilerini de özetleyen ML ağacı. Ağaç GTR+I baz değişim modeline göre üretilmiştir. Ağaç dalları üzerinde verilen rakamlar 10000 (NJ) ve 1000 (MP ve ML) replikasyon ile oluşturan bootstrap değerlerini göstermektedir. *Grapholita delineaana* türüne ait iki Gen Bankası COI dizisi (MT1656914 ve MW924663) dış grup olarak kullanılmıştır. Analizlere dâhil edilen NC_039716, OU342899, KJ398305 ve KJ398277 dizileri BOLD ve Gen Bankası karşılaştırması yapıldığında ilgili taksonlar en fazla benzerlik gösteren dizi temsilcilerini ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye'nin önde gelen kestane yetiştiriciliği yapan illerinden olan Aydın'dan 1 lokalite ve Sinop'tan 3 ayrı lokaliteden alınan toplam 43 kestane zararlısı örneğin mtDNA sitokrom oksidaz I gen bölgesinin 414 ile 826 bç'lik kısmı analiz edilmiştir. Önceki çalışmalarda Türkiye'de yaşadığı belirtilen Coleoptera takımından *Curculio elephas* (Fabricius, 1781) ve Lepidoptera takımından *Cydia splendana* (Hübner, 1799) türlerinin yanı sıra, bu çalışmada Coleoptera takımına ait *Curculio* sp., *Curculio glandium* (Marsham, 1802) ve *Curculio venosus* (Gravenhorst, 1807); Lepidoptera takımına ait *Cadra figulilella* (Gregson, 1871) ve *Ephestia elutella* (Hübner, 1796) türlerinin varlığı da ortaya çıkarılmıştır. Belirlenen bu türlerden Coleoptera takımı için Aydın ve Sinop'ta, *Curculio elephas* ve Lepidoptera takımı için yine Aydın ve Sinop'ta *Cydia splendana* türleri en yaygın olarak bulunmuştur. Bu bulgular Yunanistan, Bulgaristan ve İtalya gibi diğer ülkelerde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle örtüşmektedir (Avtzis ve Cognato, 2013; Avtzis vd., 2013; Marvaldi, 2003; Ovcharov vd., 2007; Papatari ve Sperenza; 2004; Sperenza, 1998). Yapılan dizileme teknikleri ile yukarıda belirtilen türlerin Aydın ve Sinop illeri örneklerinde toplamda 12 ayrı COI haplotipi tespit edilmiştir. Bu haplotiplerin coğrafik dağılımları şöyledir: Coleoptera takımındaki Haplotip.Col.1 *Curculio elephas* türüne ait Aydın'dan 3 ve Sinop'tan 8 bireyde, Haplotip.Col.2 Aydın'dan alınan *Curculio elephas* türüne ait 2 bireyde, Haplotip.Col.3 Sinop'tan alınan *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.4 Sinop'tan örneklenen *Curculio glandium* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.5 Sinop'tan alınan *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.6 Sinop'tan alınan *Curculio venosus* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.7 Aydın'dan örneklenen *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.8 Aydın'dan alınan *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.9 Aydın'dan alınan *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.10 Aydın'dan örneklenen *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde, Haplotip.Col.11 Aydın'dan örneklenen *Curculio elephas* türüne ait 1 bireyde ve Haplotip.Col.12 ise *Curculio* sp. türündeki Aydın örneğinde gözlenmiştir. Lepidoptera takımında belirlenen haplotip dağılımları ise 6 adet Aydın ve 7 adet Sinop örneğinde her biri *Cydia splendana* türüne ait olan Haplotip.Lep.1, Aydın'dan alınan 3 adet *Cydia splendana* örneğinde Haplotip.Lep.2, Aydın'dan alınan 1 adet

Cadra figulilella örneğinde Haplotip.Lep.3, Sinop'tan örneklenen 1 adet *Cydia splendana* örneğinde Haplotip.Lep.4, Sinop'tan örneklenen 1 adet *Cydia splendana* örneğinde Haplotip.Lep.5 ve Sinop'tan örneklenen *Ephestia elutella* türüne ait örnekte Haplotip.Lep.6 şeklinde olduğu gözlenmiştir.

Moleküler tabanlı çalışmalar, Gen Bankası ve BLAST'tan elde edilmiş olan referans dizilerle Aydın ve Sinop illerinden elde ettiğimiz diziler kullanılarak yapılmıştır. Diziler NJ, MP ve ML değerleri açısından benzer özellikleri gösterdiğinden tek bir Maksimum Likelihood ağaç topolojisi üzerinde sembolize edilmiştir. Bu ağaçlar incelendiğinde, her iki ilde de en yaygın olan Coleoptera türünün *Curculio elephas* olduğu ve %99-100'lük bir bootstrap değeri ile monofiletik bir grup meydana getirdiği görülmektedir. NAZ5, NAZ6 dizileri bu grubun 1. alt grubunu meydana getirmekteydi ve %70-80'lik bootstrap değeri ile desteklenmekteydi. Gen Bankası dizisi OU342899 ile Sinop'tan OZZ6_SİN ve SINZ9_SİN dizilerini içermektedir. NAZ1 dizisi ise 2. alt grubu oluşturmaktaydı. Ağacın 3. alt grubu ise Aydın ve Sinop illerinden en çok diziyi içeren %74-84'lük bootstrap değerine sahip kısımdı. Bu çalışma kapsamında ortaya konulan diğer Coleoptera türleri (*Curculio* sp., *Curculio venosus*, *Curculio glandium*) ise %99-100'lük bootstrap değeri ile ayrı soy hattı gruplarını meydana getirmiştir. *Eucryptorrhynchus scrobiculatus* türüne ait diziler, ağaçlandırmada dış grup olarak kullanılmıştır. İki ilde de en yaygın olan Lepidoptera takımına ait tür *Cydia splendana* olarak ağaçta kendini göstermektedir. Türe ait COI dizileri %99-100'lük bir bootstrap değeri ile monofiletik bir grup meydana getirmektedir. Bu monofiletik grubun içerisinde 2 alt grup göz önüne çıkmaktadır: 1. alt grup %70-80'lik bir bootstrap değeri ile Gen Bankası dizisi OU342899 ile Sinop'tan OZZ6_SİN ve SINZ9_SİN dizilerini içermekteydi, 2. alt grup hem Gen Bankası dizileri hem de Aydın ve Sinop dizilerini bir arada bulunduran %76-89'lük bootstrap değerleri ile desteklenen kısmı içermekteydi. ML ağacın diğer soy hattı grupları ise %99-100'lük bootstrap değerleri ile temsil edilen ve bu çalışmada ortaya konan Lepidoptera takımına ait *Cadra figulilella* ve *Ephestia elutella* türlerine ait dizilerden oluşmaktaydı. *Grapholita delineanae* türü ise birleştirilmiş verilerden oluşan ML ağacının dış grubunu meydana getirmekteydi.

Bugüne kadar Türkiye'deki kestane zararlısı türlerin üzerine yapılmış bir moleküler filogeni çalışması bulunmamakla birlikte, yaşayan türlerin tamamının

taksonomik olarak belirlenmesi amacıyla yapılmış çalışmaya da rastlanılmamıştır. Elde ettiğimiz ağaç topolojilerinin bu taksonomik belirsizliklere ışık tutması hedeflenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada Türkiye’de kestane zararlısı türlerin Coleoptera takımına ait olan *Curculio elephas* ve Lepidoptera takımına ait *Cydia splendana* türleriyle sınırlı kalmayıp, bu türlerin haricinde Coleoptera takımından *Curculio* sp., *Curculio glandium* (Marsham, 1802) ve *Curculio venosus* (Gravenhorst, 1807); Lepidoptera takımından *Cadra figulilella* (Gregson, 1871) ve *Ephestia elutella* (Hübner, 1796) türlerinin de zarar veren taksonlardan olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan bu tez çalışmasının gelecek çalışmalar için bir ön kaynak olması beklenmektedir. Türkiye’de bulunan diğer kestane üretim merkezi illerde de yapılacak olan farklı çalışmalarla daha kapsamlı taksonomik verilerin elde edileceği, Türkiye filocoğrafyasının belirlenebileceği ve taksonomik belirsizlikler ortadan kaldırıldığında bu türlere karşı uygulanacak spesifik mücadele programları sayesinde kestane zararlılarının ekonomik olarak olumsuz etkilerinin azalacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akaike, H. (1973). *Information theory and an extension of the maximum likelihood principle*, Budapest: Akademiai Kiado.
- Akaike, H. (1974). *A new look at the statistical model identification*. IEEE Transactions on Automatic Control. 19(6). 716-723.
- Akça, İ., Tuncer, C., Aker, O. ve Saruhan, İ. (2016). Samsun ili kestane ağaçlarında görülen yaprakbiti, *Lachnus roboris* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) üzerine bir araştırma. *Türkiye Entomoloji Bülteni*. 6(2). 143-148.
- Akyüz, B. (2019). *Bazı hibrit kestane genotiplerinin anaçlık potansiyellerinin ve aşı uyuşma durumlarının belirlenmesi*. Basılmamış Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, 175, Samsun.
- Anonim, 2021. *Kestane Eylem Planı*.<http://www.cevresehirkutuphanesi.com/basili-yayinlar/detay/kestane-eylem-planı-2013-2017> (Erişim tarihi: 11.07.2021).
- Anonim, 2022. *Kestane Raporu*. <https://www.ordutb.org.tr/wp-content/uploads/2020/12/Kestane-Raporu.pdf> (Erişim tarihi: 13.06.2022)
- Avtzis, D. N., and Cognato, A. I. (2013). Genetic structure of *Curculio elephas* Gyll. (Coleoptera, Curculionidae) in Greece: an important pest of sweet chestnut. *Journal of Pest Science*. 86(3). 491-497.
- Avtzis, D. N., Perlerou, C. and Diamandis, S. (2013). Geographic distribution of chestnut feeding insects in Greece. *Journal of Pest Science*. 86(2). 185-191.
- Aydın, F. (2021). *Beykoz'da (İstanbul) yetişen kestane (Castanea sativa Mill.) genotiplerinin seleksiyon yoluyla ıslahı*. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 101, Bolu.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D. and Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa in Europe: distribution, habitat, usage and threats*. Luxembourg: European Atlas of Forest Tree Species.
- Conedera, M., Manetti, M.C., Giudici, F. and Amorini, E. (2004). Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia Mediterranea*. 30(2). 179-193.
- Coşkuncu, K.S. ve Mert, C. (2011). Bursa, Balıkesir ve Kocaeli İlleri Kestane Üretim Alanlarında Değişik Kestane Çeşitlerindeki Meyve Kurtlanma Oranları Üzerine Araştırmalar. *Karaelmas Science and Engineering Journal*. 1(2). 31-39.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9(8). 772.
- Davis, P.H. (1988). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Edinburgh: Volume University Press.
- Demir, S. (2012). Entomopatojen Nematod (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Tür Kombinasyonlarının *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) ve *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvalarına Etkisi. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, 81, Aydın.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17(6). 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4). 783-791.

- Ferreira-Cardoso, J.F., Sequeira, C.A., Torres-Pereira, J.M.G., Rodrigues, L. and Gomes, E.F. (1999). Lipid composition of *Castanea sativa* Mill. fruits of some native Portuguese cultivars. *Acta Horticulturae*. 494. 133-138.
- Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution: Minimum change for specified tree topology. *Systematic Zoology*. 20(4). 406-416.
- Freitas, T. R., Santos, J. A., Silva, A. P. and Fraga, H. (2021). Influence of climate change on chestnut trees: A Review. *Plants*. 10(7). 1463.
- Gümüşdere, İ. (1994). Ormanlarımızda önemli bir ağaç türü kestane. *Tabiat ve İnsan*. 27 (4). 21-26.
- Karadeniz, V. (2013). Türkiye’de kestane tarımı ve başlıca sorunları. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*. 6(27). 279-291.
- Karagöz, M., Gülcü, B., Hazır, S. ve Kaya, H. K. (2009). Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biocontrol Science and Technology*. 19(7). 755-768.
- Kendir, G., Öztürk, A. ve Köroğlu, A. (2016). *Castanae sativa* Mill. (Kestane), meyve ve yaprak anatomisi. *Ankara Eczacılık Fakülte Dergisi*. 40(2). 1-18.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6). 1547-1549.
- Kumru, A. (2019). *Bazı kestane (Castanea sativa Mill.) çeşit ve genotiplerin Bursa koşullarında bitki gelişim kuvveti ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi*. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, 65, Bursa.
- Maddison, D.R. and Maddison, W.P. (2000). *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution, Version 4.0*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Marvaldi, A. E. (2003). Key to larvae of the South American subfamilies of weevils (Coleoptera, Curculionoidea). *Revista Chilena de Historia Natural*. 76(4). 603-612.
- Ovcharov, D., Doychev, D. and Dimitrova, P. (2005, November). Insects feeding on the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Bulgaria. *In Sustainable Management of Sweet Chestnut Ecosystems–CAST Bul. Reports presented at the 1st Balkan Regional Workshop*. 173-182.
- Özçağıran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M. (2007). Ilıman iklim meyve türleri sert kabuklu meyveler. *Ege Üniversitesi Yayınları Ziraat Fakültesi Dergisi*. 3(566).
- Özer, G. (2020). *İstanbul ili anadolu keşanesi (Castanea sativa Mill.) meşcerelerinde meyve verimi ve yetişme ortamı özellikleri*. Basılmamış Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Orman Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 115, İstanbul.
- Page, R.D.M. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12(4). 357-358.
- Paparatti, B. and Speranza, S. (2004). Management of chestnut weevil (*Curculio* spp.) 1, insect key-pest in central Italy. *In III International Chestnut Congress*. 693. 551-556.
- Pereira-Lorenzo, S., Ballester, A., Corredoira, E., Viéitez, A.M., Agnanostakis, S., Costa, R., Bounous, G., Botta, R., Beccaro, L.G., Kubisiak, L.T., Conedera, M., Krebs, P., Yamamoto, T., Sawamura, Y., Takada, N., Gomes-Laranjo, J. and Ramos-Cabrer, M. (2012). Chestnut. *Fruit Breeding*. 729-769.

- Sabbatini Peverieri, G., Binazzi, F. and Roversi, P.F. (2017). Chestnut-associated insects alien to Europe. *Journal of Zoology*. 100. 103-113.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4). 406-425.
- Seferoğlu, B. (2012). *Çölyak hastalarına yönelik kestane unu ve glutensiz unlarla hazırlanan ekmek, kek ve bisküvi çeşitlerinin duyuusal analiz ile değerlendirilmesi*. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Toplu Beslenme Sistemleri Ana Bilim Dalı, 2012, Ankara.
- Speranza, S. (1998). Chestnut pests in central Italy. *ISHS Acta Horticulturae 494: II International Symposium on Chestnut*. 417-424.
- Serdar, Ü., Akyüz, B. and Fulbright, W.D. (2014, Nisan). Graft success of hybrids on European chestnut rootstock and development of chestnut blight disease. *2nd Symposium of Turkey Forest Entomology and Pathology*, 127-131, Antalya.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87. 651-701.
- Soylu, A. (2004). *Kestane yetiştiriciliği ve özellikleri (Genişletilmiş II. Baskı)*. Hasad Yayıncılık, 64, İstanbul.
- Swofford, D.L. (2002). *Paup*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)* 4.0. b10 137 Sunderland: Sinauer Associates.
- Subaşı, B. (2004). *Kestane sektör profili*. Yumpu Yayıncılık, 19, İstanbul.
- Toksöz, S. (2017). Determination of the damage ratios of *Ambrosia* beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on hybrid chestnuts. *Journal of Zoology Studies*. 4(5). 19-22.
- Tuncer, C. ve Serdar, Ü. (1996). Sinop ili kestane üretim alanlarındaki meyve kurtlanma oranları ve larvaların meyveyi terk etme zamanının saptanması üzerinde araştırmalar. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 11(3). 127-144.
- Yaltırık, F. (1993). Dendroloji Ders Kitabı-II Angiospermae (Kapalı Tohumlular). *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, 3767. *Orman Fakültesi Yayınları*, 420.
- Yıldız, Y., Yıldırım, İ., Albas, E., Bostancı, C., ve Aydoğan, O. (2020). İstilacı tür kestane gal arısı (*Dryocosmus kuriphilus*) Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae)'nin yeni yayılış alanları. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*. 22(3). 1014-1022.
- Yılmaz, H. (2014). *Türkiye'nin doğal egzotik ağaç ve çalılırları*. I. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, 668-669, Ankara.
- Yüksel, N., Balçık, E.Ü.Y., Yıldız, D.D.Ş., Binat, Z. ve Boyacıoğlu, O. (2020). Aydın'ın değerlerinden biri olan kestane meyvesinin önemi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*. 9(1). 162-166.

ÖZGEÇMİŞ

Elif Aslan, Ayancık Atatürk Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği bölümünden 31.05.2019 tarihinde mezun oldu. 2019 yılında OMÜ Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana biyoloji öğretmeni olarak görev yapan Elif Aslan, orta derecede İngilizce bilmektedir (TEOL-Language Schools Certificate of Attendance, B2 Intermediate, Mayıs 2018). Temel ilgi alanları, yemek yapmak, bahçe ile uğraşmak, gezmek, film-dizi izlemek, arkadaşlar ile sohbet etmek, aile ile vakit geçirmek, dergi okumak, araştırmak, voleybol oynamak, müzik dinlemek, yeni yerler keşfetmektir (24.06.2022).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-3154-5754

Yayınlar:

1. N.E. Akman Gündüz, E. Aslan ve Ö. Özcan (2020, Mart). "Influence of synthetic plant growth regulators on total protein level of parasitoid *Bracon Hebetor* say (Hymenoptera: Braconidae)". 3rd. *International Eurasian Biological and Chemical Sciences Conference*, Ankara.
2. E. Aslan ve N.E. Akman Gündüz (2022, Mayıs). "Kestane ağacı meyvelerinde zarar yapan böcek türlerinin genetik belirteç ile belirlenmesi ve bunların filogeni ve populasyon genetikleri: Bir pilot barkod çalışması". *ASES International Health, Engineering and Sciences Congress*, Ankara.