

Türkiye’deki Bazı *Paratanytarsus dissimilis* (Diptera: Chironomidae) Popülasyonlarının Genetik Çeşitliliğinin ve Popülasyon Yapısının Değerlendirilmesi

Adile SARI^{1*}

¹Pamukkale Üniversitesi, Denizli Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Denizli, Türkiye
(ORCID: [0000-0002-8247-6103](https://orcid.org/0000-0002-8247-6103))



Anahtar Kelimeler: COI, Gen akışı, Genetik çeşitlilik, Haplotip, Popülasyon yapısı.

Öz

Bu çalışma, mitokondriyal sitokrom *c* oksidaz alt birim I (COI) geni kullanılarak Türkiye’nin bazı bölgelerinden toplanan *Paratanytarsus dissimilis*’in (Diptera: Chironomidae) genetik çeşitliliğini, popülasyon yapısını ve demografik geçmişi incelemek için tasarlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye’deki 7 popülasyonu temsil eden toplam 32 *P. dissimilis* larvası toplanmış, sekanslanmış ve analiz edilmiştir. Çalışma alanında toplam 15 haplotip tespit edilmiş ve bu haplotiplerin biri (H9) hariç hepsinin tek popülasyona özgü olduğu gözlenmiştir. Toplam popülasyon için nispeten yüksek haplotip çeşitliliği ($h=0,95161$) ve düşük nükleotid çeşitliliği ($\pi=0,04624$) bulunmuştur. Maksimum likelihood (ML) ve haplotip ağı incelemeleri bu 7 popülasyonun Doğu, Hatay ve Batı olmak üzere 3 gruba ayrılacağını göstermiştir. Moleküler varyans analizi (AMOVA) ve ikili F_{ST} karşılaştırmalarında, Türkiye’deki *P. dissimilis*’in farklı düzeylerde yüksek bir genetik yapılanma gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,01$). Ayrıca, gerçekleştirilen nötralite testleri ve uyumsuzluk dağılımı analizleri sonucunda hem üç grubun hem de tüm popülasyonun demografik kararlılıkta olduğu tespit edilmiş ve bunlarda genişlemeye veya bir darboğaza yönelik nötraliteden herhangi bir sapma görülmemiştir. Bu çalışmada, Türkiye’deki bazı *P. dissimilis* popülasyonlarının genetik çeşitliliği, popülasyon yapısı ve demografik geçmişi değerlendirilerek, türün yaşam tarihi ve sürdürülebilirliği ile ilgili güncel bilgilere katkı sunulmuştur. Ancak *P. dissimilis*’in popülasyon çeşitliliğinin ve demografik geçmişinin daha detaylı bir şekilde anlaşılabilmesi için daha fazla örnek, örnekleme alanı ve moleküler belirteç kullanarak gerçekleştirilecek yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Evaluation of Genetic Diversity and Population Structure of Some *Paratanytarsus dissimilis* (Diptera: Chironomidae) Populations in Turkey

Keywords: COI, Gene Flow, Genetic diversity, Haplotype, Population structure.

Abstract

This study was designed to evaluate the genetic diversity, population structure, and demographic history of *Paratanytarsus dissimilis* (Diptera: Chironomidae) sampled from some regions of Turkey using the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene. For this purpose, a total of 32 *P. dissimilis* larvae representing 7 populations in Turkey were collected, sequenced, and analysed. Fifteen haplotypes were identified in the study area, and it was observed that all of these haplotypes except one haplotype (H9) were unique to a population. Relatively high haplotype diversity ($h=0.95161$) and low nucleotide diversity ($\pi=0.04624$) were detected for the overall population. Maximum likelihood (ML) and haplotype network analyses suggested that these 7 populations could be divided into three groups as East, Hatay,

*Sorumlu yazar: aozdemir@pau.edu.tr

Geliş Tarihi: 28.10.2021, Kabul Tarihi: 17.01.2022

and West. It was determined in analyses of molecular variance (AMOVA) and pairwise F_{ST} comparisons that *P. dissimilis* in Turkey exhibited high genetic structuring at several levels ($p < 0.01$). Further, as a result of the performed neutrality tests and mismatch distribution analyses, it was detected that both the three groups and the overall population were demographically stable, and no deviations from neutrality were observed for expansion or a bottleneck. In this study, the genetic diversity, population structure, and demographic history of some *P. dissimilis* populations in Turkey were evaluated, and a contribution was made to the current knowledge on the life history and sustainability of the species. Nevertheless, further studies using more samples, sampling sites, and molecular markers are needed to better understand the population diversity and demographic history of *P. dissimilis*.

1. Giriş

Moleküler biyoloji ve biyoinformatikte özellikle son zamanlarda gerçekleşen gelişmeler taksonomi, filogeni, evrim ve popülasyon genetiği gibi farklı alanlara önemli bilgiler sağlamaktadır. Popülasyon genetiği çalışmaları ile tespit edilmeye çalışılan bir popülasyonun genetik yapısı esas olarak yaşam öyküsü, coğrafi engeller, gen akışı, seçilim ve darboğazlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından şekillendirilen popülasyondaki toplam genetik çeşitliliği ifade etmektedir [1]. Genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısı çalışmaları, bir türün yaşam öyküleri, demografisi, üremesi ve ekolojisi hakkında bilgi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda uygun koruma ve yönetim stratejilerinin uygulanması ve bir popülasyonun sürdürülebilirliğinin sağlanması için oldukça kullanışlıdır [2].

Böcekler dünyadaki en çeşitli hayvan grubu olarak bilinir [3]. Suda yaşayan böcekler arasında, Chironomidae familyası (Diptera), tatlı su ekosistemlerinde en bol bulunan ve en fazla tür çeşitliliğine sahip böcek grubudur [4]. Halk arasında ısırmayan tatarcıklar olarak adlandırılan chironomidler neredeyse her türlü tatlı su ortamında bulunur [4]. Birçok chironomid türü zorlu çevre koşullarına karşı geniş bir tolerans gösterirken, bu familyanın bazı türlerinin ise çevresel faktörlere karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir [5], [6]. Chironomid larvaları, balıklar ve diğer sucul organizmalar için başlıca besin kaynaklarından biri olması nedeniyle sucul besin zincirinde önemli bir konuma sahiptir [4]. Bu larvalar, sucul ortamlardaki varlıkları, bollukları, gelişim durumları ve bazı koşullarda ortamdaki yok olmaları ile sucul ortamın su kalitesi ve kirliliği hakkında bilgiler veren biyoindikatör organizmalar olarak oldukça önemlidir [5]. Birçok kirlenmeye karşı hassas olan chironomidlerin çok kısa bir yaşam döngüsü vardır ve laboratuvar ortamında yetiştirilmeleri oldukça kolaydır. Chironomidler bu ekolojik uygunlukları nedeniyle

kimyasalların toksisitelerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Ayrıca taksonomik olarak Orthocladiinae ve Chironominae gibi çeşitli alt familyalara ait farklı cinsler içerisinde sınıflandırılmaları [8] biyoçeşitliliğin büyük bir parçası olan chironomidleri filogenetik ve biyocoğrafik çalışmalar için değerli kaynaklar haline getirmektedir.

Chironominae alt familyasındaki üç tribüsten biri olan Tanytarsini, *Paratanytarsus* cinsi de dahil olmak üzere tanımlanmış yaklaşık 30 cins ve 400'den fazla tür içerir [9]. *Paratanytarsus* cinsi Afrotropikal ve Antarktik haricinde bütün biyocoğrafik bölgelerde tespit edilmiştir [10] ve bazı *Paratanytarsus* türleri kentsel lentik ortamlarda oldukça yaygın olarak bulunur [11]. Bu cinsin türlerinden biri de *Paratanytarsus dissimilis*'tir ve ülkemizde Akdeniz, Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nden kaydı bulunmaktadır [12]. Bu tür ile ilgili dünya genelinde yapılan çalışmalar genellikle türün biyolojik istekleri ve yaşam döngüsü ile taksonomik özelliklerinin belirlenmesi, DNA barkodlama ve filogeni temellidir [13]-[15]. Durum Türkiye için de aynıdır [12], [16].

Gerçekleştirilen detaylı literatür taraması, ekonomik ve çevresel açılarından önemli bir chironomid türü olan *P. dissimilis*'in popülasyon yapısının ne Türkiye ne de başka bir ülkede incelenmiş olduğunu göstermiştir. Nitekim Türkiye, üç kıta ve üç deniz arasındaki benzersiz konumu, sahip olduğu çeşitli jeolojik oluşumları ile farklı iklim, ekolojik koşul ve habitat tipleri içermesi sebebiyle biyolojik çeşitlilik açısından olağanüstü zengin bir ülkedir [17]. Bu çalışma, birçok omurgalı ve omurgasız türünün genetik çeşitliliği ve popülasyonların genetik yapısının belirlenmesinde etkili bir moleküler belirteç olması nedeniyle popülasyon genetiği çalışmalarında sıkça tercih edilen mitokondriyal sitokrom *c* oksidaz alt birim I (COI) [18]-[21]

kullanılarak Türkiye'deki bazı *P. dissimilis* popülasyonlarının genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçların bu alandaki bilimsel boşluğu dolduracağı ve gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklerin Toplanması ve Teşhisi

Türkiye'nin farklı şehirlerindeki lentik tatlı su ekosistemlerinden 500 µm delik çapına sahip süzgeçler kullanılarak chironomid larvaları toplanmıştır. Toplanan her bir larva %96'lık etil alkol içeren eppendorf tüplere tek başına konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarda tüm chironomid larvalarının morfolojik özellikleri Olympus SZ51 marka stereo mikroskopta incelenmiş, larvaların kafaları ayrılarak kalıcı preparat haline getirildikten sonra kafa kapsülleri Olympus CX31 marka mikroskop altında incelenerek toplanan larvaların tür seviyesine kadar teşhisleri yapılmıştır [16]. Larvaların vücutları ise kafa kapsülleri ile aynı kod verilerek etiketlenmiş ve %96'lık etil alkol içeren eppendorf tüplere alınarak total DNA izolasyonu için -20 °C'de saklanmıştır. Tür teşhisinden sonra Türkiye'nin 7 farklı şehirden (Şekil 1) 32 *P. dissimilis* larvası toplandığı görülmüş ve her bir şehir bir popülasyon olarak kabul edilmek suretiyle 7 popülasyonu temsil eden toplam 32 *P. dissimilis* örneği çalışmaya dahil edilmiştir.

2.2. DNA İzolasyonu, PCR ve Sekans Analizi

Toplanan örneklerden total DNA, Hillis ve Morritz'in [22] protokolünde küçük değişiklikler yapılarak izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lardan COI gen bölgesinin 658 baz çifti uzunluğundaki fragmanları 911 (5'-TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve 912 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır [23]. Bu primerler, chironomidlerle yapılan bazı çalışmalarda [11, 16, 24] kullanılarak COI gen bölgesinin başarılı bir şekilde çoğaltılmasını sağlaması sebebiyle seçilmiştir. Her bir PCR tüpü, son hacim 25 µl olacak şekilde, 1× PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 300 µM dNTP, 0,4 µM her bir primer, 5 U *Taq* polimeraz ve 6 µL kalıp DNA içermiştir. PCR reaksiyonları, 95 °C'de 5 dakikalık bir başlangıç denatürasyon basamağı, 40

amplifikasyon döngüsü (her bir döngü için 94 °C'de 45 saniye, 53 °C'de 90 saniye ve 72 °C'de 2 dakika) ve 72 °C'de 6 dakikalık bir son uzama basamağının programlandığı bir PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiş ve daha sonra PureLink Quick PCR Purification Kit kullanılarak temizlenmiştir. Temizlenen PCR ürünleri yine 911 ve 912 primer çifti kullanılarak Sanger sekanslama yöntemi ile ileri ve geri olmak üzere iki yönde sekanslanmıştır.

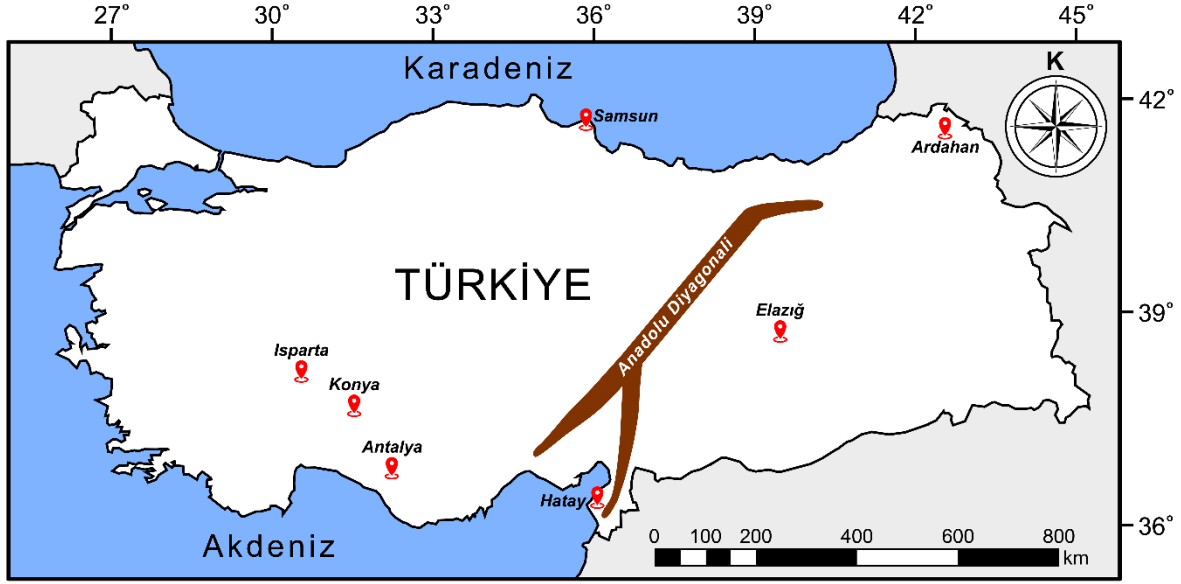
2.3. Verilerin Analizi

Sekanslama sonundaki ileri ve geri okumalardan ortak dizilerin elde edilmesi MEGA 6 [25], hizalaması ve düzenlemesi ise MEGA X [26] ile Clustal W kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonunda 7 popülasyonu temsil eden toplam 32 COI sekansı elde edilmiştir. Hizalanan sekansların nükleotid kompozisyonları ve transisyon/ transversiyon oranları ile popülasyon içi ve popülasyonlar arası ortalama genetik uzaklıklar Kimura 2-parameter (K2P) modeli kullanılarak yine MEGA X ile belirlenmiştir. Ayrıca nükleotid doygunluğu, DAMBE programı [27] ile genetik uzaklık değerlerine karşı mutlak transisyon ve transversiyon sayıları grafiği K80 modeli kullanılarak çizilmek suretiyle saptanmış ve bu sekanslardan elde edilen filogenetik bilginin kalitesi değerlendirilmiştir.

Elde edilen sekansların filogenetik analizi MEGA X ile neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve dal güvenilirlikleri 10000 bootstrap ile hesaplanmıştır. NJ analizi için dış grubun, *Tanytarsini* tribüsü içerisinde yer alan ve *Paratanytarsus* cinsiyle oldukça yakın ilişkili olan *Tanytarsus* ve *Cladotanytarsus* cinslerinden seçilmesine karar verildikten sonra GenBank'tan alınan *Tanytarsus arduennensis*, *Cladotanytarsus* sp. ve *Cladotanytarsus atridorsum* COI sekansları (erişim numaraları sırasıyla LC329303, GU668057 ve JF870834), oluşturulan NJ ağacını köklendirmek amacıyla kullanılmıştır. Veri setinin içerdiği haplotipler, genetik çeşitlilik indeksleri [polimorfik bölgelerin sayısı (*S*), haplotip çeşitliliği (*h*), ortalama nükleotid farklılıkları sayısı (*k*) ve nükleotid çeşitliliği (π)], genetik farklılaşma seviyeleri (γ_{ST}) ve ikili etkili göç oranları (N_m) DnaSP 5.10 kullanılarak belirlenmiştir [28]. Ek olarak, tüm popülasyon çiftleri arasındaki genetik farklılaşma katsayısını tahmin etmek için, ikili F_{ST} değerleri Arlequin 3.5

[29] ile K2P ikili uzaklıklar kullanılarak hesaplanmış ve F_{ST} 'nin önem derecesi, her ikili

karşılaştırma için 1000 permütasyonla test edilmiştir.



Şekil 1. *P. dissimilis* örneklerinin toplandığı lokasyonlar ve ilgili popülasyonlar ile Anadolu Diyagonalı'nın şematik olarak konumu (kahverengi)

Tespit edilen haplotipler arasındaki genetik ilişkileri test etmek için raxmlGUI 1.0 ile [30] maksimum likelihood (ML) analizi GTR+GAMMA+I modeli kullanılarak yapılmış ve dal güvenilirlikleri ise 10000 bootstrap ile hesaplanmıştır. Bu analiz için GenBank'tan *Tanytarsus arduennensis*, *Cladotanytarsus* sp. ve *Cladotanytarsus atridorsum* COI sekansları alınmış (erişim numaraları sırasıyla LC329303, GU668057 ve JF870834) ve oluşturulan ML ağacını köklendirmek için dış grup haplotip olarak kullanılmıştır. Diğer yandan haplotiplerin her popülasyondaki dağılımını ve bunların birbiri ile ilişkilerini göstermek için, POPART 1.7 ile aralarındaki ikili farklılıklara ($\epsilon=0$) dayalı haplotiplerin median-joining (MJ) ağı oluşturulmuştur [31]. ML ağacı ve haplotip ağının önerdiği gruplar bazında hiyerarşik popülasyon yapısını (gruplar arasında, gruplar içindeki popülasyonlar arasında ve popülasyonlar içinde) analiz etmek için, Arlequin 3.5 ile moleküler varyans analizi (AMOVA) gerçekleştirilmiş ve elde edilen parametrelerin önem derecesi 1000 permütasyonlu mesafe matrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

Türkiye'deki *P. dissimilis* popülasyonu demografik geçmişine ait çıkarımlar (örneğin popülasyon genişlemesi, darboğaz, popülasyon durağanlığı gibi durumlar) yapabilmek amacıyla her bir grup için ayrı ayrı ve tüm örneklerin birlikte oluşturduğu toplam popülasyon için nötralite

testleri (Tajima's D ve Fu's F_s istatistikleri) ve uyumsuzluk (mismatch) dağılımı analizleri [Harpending's raggedness istatistiği (r) ve varyasyon kareler toplamı (SSD)] Arlequin 3.5 ile gerçekleştirilmiştir. Demografik değişimler ayrıca DnaSP 5.10 kullanılarak sabit popülasyon büyüklüğü ve popülasyon artışı-azalışı modelleri altında gerçekleştirilen ikili uyumsuzluk dağılımı analizi sonucu çizilen uyumsuzluk dağılımı grafiklerinin incelenmesi ile değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Genetik Çeşitlilik

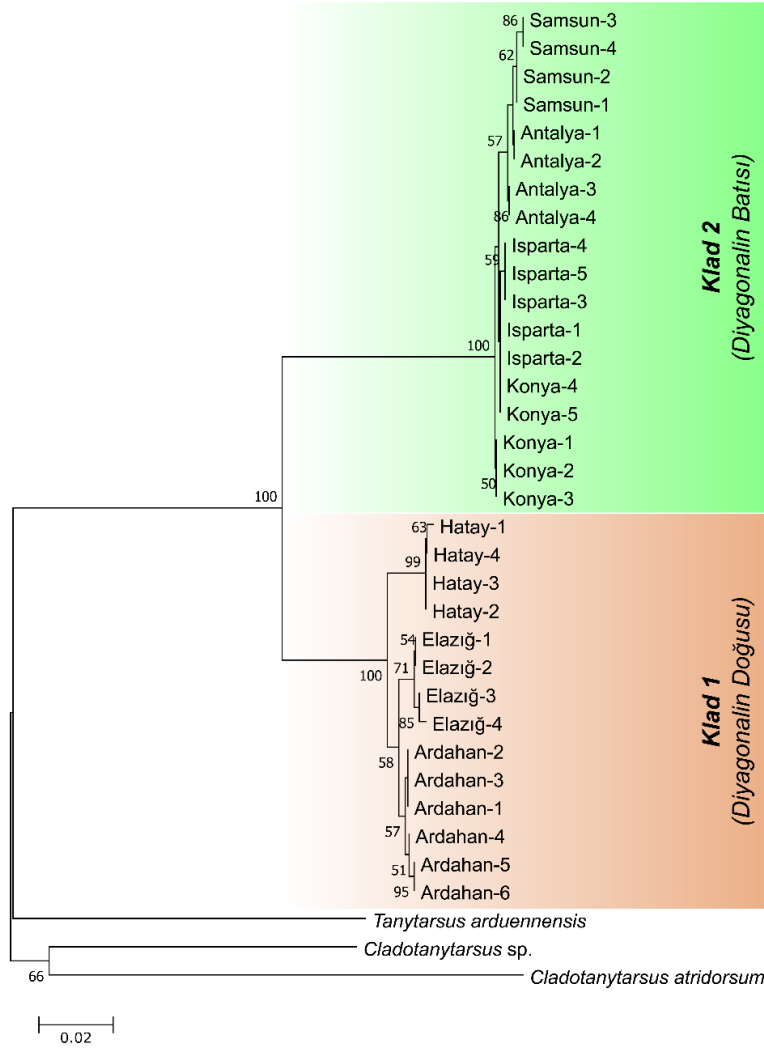
Toplam 32 bireye ait COI gen bölgesi sekansı elde edilmiştir. 658 baz çifti uzunluğundaki bu sekansların 64 tanesi parsimonik olarak bilgi verici olmak üzere 65 polimorfik bölge içerdiği tespit edilmiştir. Ortalama baz yüzdeleri şu şekilde bulunmuştur: %29,54 A, %40,09 T, %15,24 C ve %15,14 G. Bu durum güçlü bir AT sapmasını (%69,63) göstermektedir. Transisyon/transversiyon oranının pürinler için $k_1=14,115$, pirimidinler için ise $k_2=5,569$ olduğu belirlenirken, toplam transisyon/transversiyon oranı $R=4,918$ olarak hesaplanmıştır. DAMBE analiz sonuçları hem transisyonların hem de transversiyonların artan genetik uzaklıkla arttığını, analiz edilen COI sekanslarının önemli bir

satürasyona uğramadığını ve bu sebeple de sonraki analizlerde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Sekansların NJ analizinde (Şekil 2) bireylerin oldukça yüksek bootstrap değerine sahip bir nod ile 2 farklı klada ayrıldıkları, birinci kladın Ardahan, Elazığ ve Hatay popülasyonlarından toplanan örneklerden oluştuğu (%100 bootstrap değeri), ikinci kladın ise Konya, Isparta, Antalya ve Samsun popülasyonu örneklerinden oluştuğu (%100 bootstrap değeri) görülmüştür. Şekil 1’den de görülebileceği gibi, birinci klad Anadolu Diyağonalı’nın doğusuna, ikinci klad ise batısına tekabül etmektedir. Diğer yandan birinci klad içerisinde Hatay popülasyonu örnekleri %99 bootstrap değeri ile Elazığ ve Ardahan popülasyonu örneklerinden ayrılarak bir arada kümelenmiştir. Daha sonra DnaSP ile 32 bireyin COI sekanslarından toplam 15 haplotip tespit edilmiş ve bu haplotiplerin biri (H9) hariç

hepsinin tek popülasyona özgü olduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

Çalışılan 7 popülasyon için genetik çeşitlilik verileri Tablo 2’de sunulmaktadır. Tüm popülasyonlar birlikte değerlendirildiğinde haplotip çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğu görülürken ($h=0,95161$), ortalama nükleotid farklılığı sayısı (k) ve ortalama nükleotid çeşitliliğinin (π) sırasıyla 30,42339 ve 0,04624 olduğu gözlenmiştir. Popülasyon bazında en yüksek haplotip çeşitliliği Elazığ popülasyonunda ($h=0,83333$), en düşük haplotip çeşitliliği ise Hatay popülasyonunda ($h=0,50000$) izlenmiştir. Benzer şekilde, en yüksek nükleotid farklılığı sayısı ve nükleotid çeşitliliği Elazığ popülasyonunda ($k=1,16667$; $\pi=0,00177$) bulunurken, en düşük nükleotid farklılığı sayısı ve nükleotid çeşitliliği Hatay popülasyonunda ($k=0,50000$; $\pi=0,00076$) gözlenmiştir.



Şekil 2. Türkiye'nin farklı illerinden toplanan *P. dissimilis* bireylerinin NJ ağacı. Birey etiketleri toplandığı ili ve örneğin numarasını gösterecek şekilde oluşturulmuştur. Analizde ağaçları köklendirmek için *Tanytarsus arduennensis*, *Cladotanytarsus sp.* ve *Cladotanytarsus atridorsum* dış grup olarak kullanılmıştır. Nodlardaki rakamlar bootstrap değerlerini belirtmektedir. %50'den küçük değerler gösterilmemiştir.

Tablo 1. Türkiye’deki *P. dissimilis* popülasyonlarının haplotip dağılımı

Haplotip	Popülasyon							Toplam
	Ardahan	Hatay	Elazığ	Isparta	Konya	Samsun	Antalya	
H1	3							3
H2	1							1
H3	2							2
H4		1						1
H5		3						3
H6			2					2
H7			1					1
H8			1					1
H9				2	2			4
H10				3				3
H11					3			3
H12						2		2
H13						2		2
H14							2	2
H15							2	2
Örnek Sayısı	6	4	4	5	5	4	4	32

Tablo 2. Örneklenen *P. dissimilis* popülasyonlarının COI gen bölgesi için genetik çeşitlilik indeksleri

Popülasyon	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>h</i>	<i>k</i>	π
Ardahan	6	2	3	0,73333±0,155	0,93333	0,00142±0,00039
Hatay	4	1	2	0,50000±0,265	0,50000	0,00076±0,00040
Elazığ	4	2	3	0,83333±0,222	1,16667	0,00177±0,00055
Isparta	5	1	2	0,60000±0,175	0,60000	0,00091±0,00027
Konya	5	1	2	0,60000±0,175	0,60000	0,00091±0,00027
Samsun	4	1	2	0,66667±0,204	0,66667	0,00101±0,00031
Antalya	4	1	2	0,66667±0,204	0,66667	0,00101±0,00031
Toplam	32	65	15	0,95161±0,015	30,42339	0,04624±0,00288

N: örnek sayısı, *S*: polimorfik bölge sayısı, *H*: haplotip sayısı, *h*: haplotip çeşitliliği, *k*: ortalama nükleotid farklılığı sayısı, π : nükleotid çeşitliliği

Çalışılan 7 popülasyon için 0,50000±0,265 ile 0,83333±0,222 arasında değişen kısmen yüksek sayılabilecek haplotip çeşitlilikleri ve 0,00076±0,00040 ile 0,00177±0,00055 arasında değişen oldukça düşük nükleotid çeşitlilikleri tespit edilmiştir (Tablo 2). Toplam haplotip ve nükleotid çeşitlilik değerleri ise sırasıyla 0,95161±0,015 ve 0,04624±0,00288 olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu haplotip ve nükleotid çeşitliliği değerleri *P. dissimilis* popülasyonları için rapor edilmiş verilerin bulunmaması sebebiyle başka çalışmaların değerleri ile kıyaslanamamaktadır. Ancak bu değerlere göre Türkiye’deki *P. dissimilis* için kısmen yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliklerinin söz konusu olduğu ve bu durumun da genetik heterojenitenin yani yüksek bir tür içi genetik çeşitliliğin göstergesi olduğu söylenebilir. Nitekim çalışmada kullanılan örnek sayısının nispeten az olmasına rağmen 15 haplotip belirlenmiş olması da tür içi genetik çeşitliliğin yüksek olduğuna işaret etmektedir.

3.2. Popülasyon Yapısı

32 birey arasındaki genel ortalama genetik uzaklık 0,05240 olarak tespit edilmiştir. En yüksek popülasyon içi genetik uzaklık Elazığ popülasyonunda (0,00178), en düşük popülasyon içi genetik uzaklık Hatay popülasyonunda (0,00076) saptanmıştır (Tablo 3). Popülasyonlar arası genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde Samsun ve Hatay popülasyonlarının en fazla farklılaşan popülasyonlar (0,10265), Konya ve Isparta popülasyonlarının ise en az farklılaşan popülasyonlar (0,00183) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Toplamda 21 ikili popülasyon karşılaştırmasının 19’unda anlamlı F_{ST} değerleri bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 3). Genel F_{ST} değeri 0,98983 olarak hesaplanmıştır ($p<0,0001$). Samsun ve Hatay popülasyonları en yüksek ikili farklılaşmayı gösterirken ($F_{ST}=0,99840$; $p<0,05$), Konya ve Isparta popülasyonları en düşük farklılaşmayı sergilemiştir ($F_{ST}=0,50973$; $p>0,05$). Tüm bu değerlerde farklılıkların gözlenmesi, söz konusu popülasyonlar arasında farklı coğrafi

mesafeler ve fiziksel bariyerlerin bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.

Tespit edilen 15 *P. dissimilis* COI haplotipinin filogenetik ilişkileri ML analizi ile incelenmiştir. Elde edilen ML ağacında yüksek bootstrap değerleri ile birbirinden ayrılan iki temel klad belirlenmiştir (Şekil 3). Birinci kladda Anadolu Diyagonali'nin doğusundaki popülasyonların (Ardahan, Elazığ ve Hatay) haplotipleri (H1-H8) %100 bootstrap değeri ile birlikte kümelenirken, ikinci kladda Anadolu Diyagonali'nin batısındaki popülasyonların (Isparta, Konya, Antalya ve Samsun) haplotipleri (H9-H15) %100 bootstrap değeri ile birlikte yer almıştır. Birinci kladda yer alan haplotiplerden bir popülasyona özgü olanların monofiletik gruplar oluşturduğu görülmüştür. Ancak ikinci kladdaki haplotiplerden sadece Samsun popülasyonuna özgü olanlar (H12 ve H13) monofiletik grup oluşturmuştur. Diğer yandan ML ağacında Hatay popülasyonu haplotiplerinin %100 bootstrap değeri ile Ardahan ve Elazığ haplotiplerinden ayrılarak birlikte kümelenmeleri dolayısıyla birinci kladda iki temel soy hattı (Doğu ve Hatay soy hatları) bulunduğu, ikinci kladda ise sadece batı soy hattından müteşekkil olduğu görülmüştür.

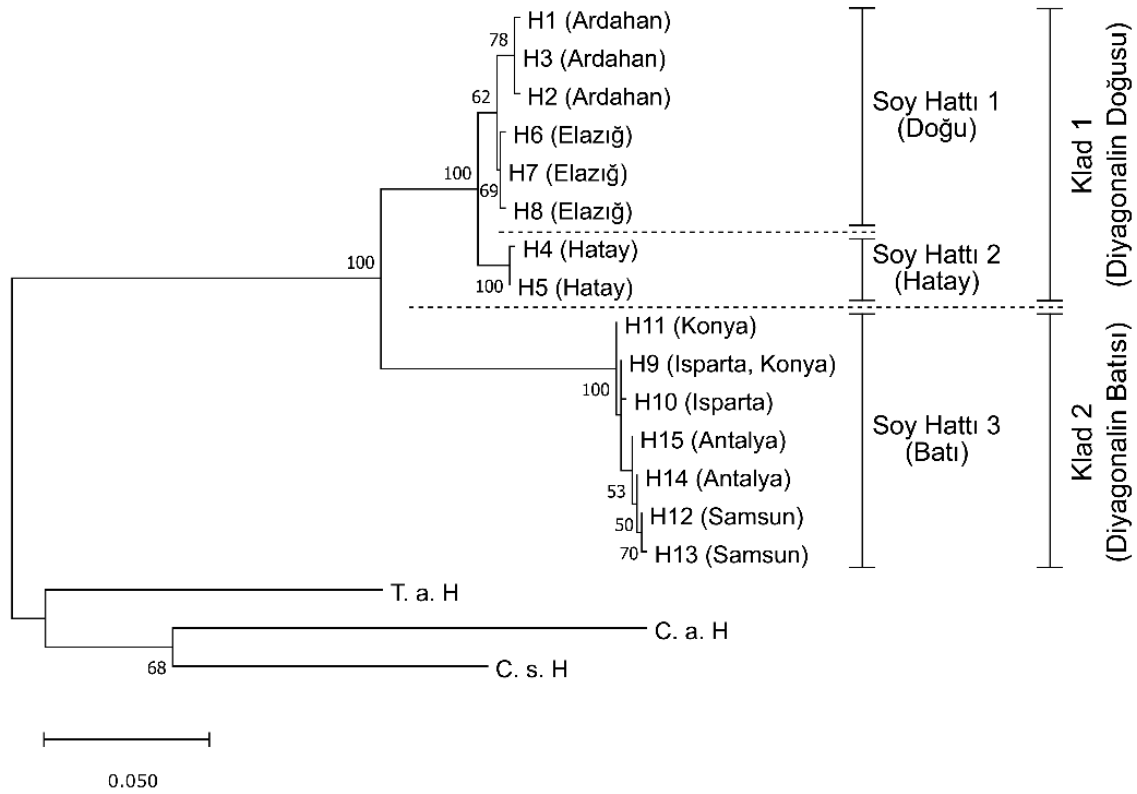
Haplotiplerin ML ağacına benzer şekilde, MJ yöntemi ile oluşturulan haplotip ağında da 3 ana haplotip grubu (soy hattı) oluşmuştur (Şekil 4). Bu gruplar Doğu haplotip grubu, Hatay haplotip grubu ve Batı haplotip grubudur. H4 ve H5 haplotiplerinden oluşan Hatay haplotip grubu ile H1, H2, H3, H6, H7 ve H8 haplotiplerinden oluşan Doğu haplotip grubu arasında en az 9 mutasyon basamağı, Doğu haplotip grubu ile H9-H15 haplotiplerinden oluşan Batı haplotip grubu arasında ise en az 52 mutasyon basamağı bulunduğu saptanmıştır. Hatay grubundaki iki haplotip aralarında bulunan en az bir mutasyon basamağıyla birbiri ile bağlantılıdır. Doğu grubu içinde Ardahan'dan örneklenen H3 haplotipinin H1 ve H2 ile en az birer mutasyon basamağıyla bağlantılı olduğu ve ayrıca H1 ve H2'nin örneklenmemiş ara bir haplotip ile de en az birer mutasyon basamağıyla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan H2 ve H3 haplotiplerinin Elazığ'dan örneklenen sırasıyla H6 ve H7 haplotipleriyle aralarındaki en az dörder mutasyon basamağıyla bağlantılı olduğu ve H7'nin de yine Elazığ'dan örneklenen H8 ile en az bir mutasyon basamağıyla bağlantılı olduğu görülmüştür. Batı grubu içinde ise H9'un Isparta'dan örneklenmiş

H10 ve Konya'dan örneklenmiş H11 haplotipleriyle en az birer mutasyon basamağıyla ama Antalya'dan örneklenmiş H15 ile en az iki mutasyon basamağıyla bağlantılı olduğu görülmüştür. Ayrıca H15'in Antalya'dan örneklenmiş H14 ile, H14'ün Samsun'dan örneklenmiş H12 ile, H12'nin de yine aynı yerden örneklenmiş H13 ile bağlantılı olduğu ve bu 4 haplotip arasında en az birer mutasyon basamağı bulunduğu tespit edilmiştir.

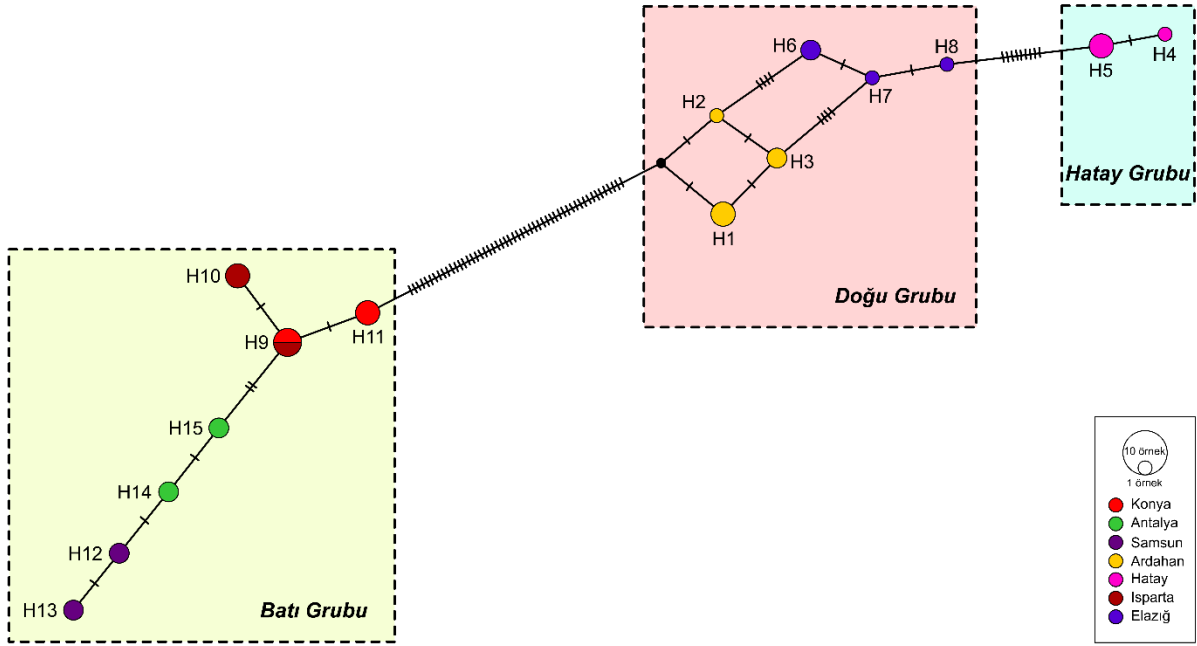
Hem MJ haplotip ağı hem de ML ağacından elde edilen verilere göre, çalışılan popülasyonlar Doğu, Hatay ve Batı olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Grup çiftleri arasında genetik farklılaşma derecesi ikili F_{ST} değerleri vasıtasıyla değerlendirilmiştir. İkili grup karşılaştırmalarının tamamında anlamlı F_{ST} değerleri bulunmuştur ($p < 0,0001$). Batı-Hatay grupları ($F_{ST}=0,99289$) ile Batı-Doğu grupları ($F_{ST}=0,99002$) en yüksek ikili farklılaşmayı gösterirken, Doğu-Hatay grupları ($F_{ST}=0,84027$) en düşük farklılaşmayı sergilemiştir. Ayrıca ikili grup incelemeleri ile γ_{ST} ve N_m değerleri elde edilerek grup çiftleri arasındaki genetik farklılaşma ve gen akışı değerlendirilmiştir. Ortalama γ_{ST} ve ilgili N_m değerleri sırasıyla 0,92176 ve 0,02 olarak bulunmuştur. Bu değerler oldukça yüksek bir farklılaşma ve oldukça düşük bir gen akışına işaret etmektedir. Batı ile Doğu grupları arasında ve Batı ile Hatay grupları arasında yüksek genetik farklılaşma ve düşük gen akışı (Batı-Doğu: $\gamma_{ST}=0,90357$ ve $N_m=0,03$; Batı-Hatay: $\gamma_{ST}=0,89157$ ve $N_m=0,03$) belirlenirken, Doğu ve Hatay grupları arasında ise nispeten daha düşük bir genetik farklılaşma ve daha yüksek bir gen akışı (Doğu-Hatay: $\gamma_{ST}=0,65557$ ve $N_m=0,13$) saptanmıştır. İncelenen *P. dissimilis* popülasyonlarının COI gen bölgesinde gözlenen varyasyonun dağılımını belirlemek için uygulanan AMOVA ile, her üç düzey için (gruplar arasında, gruplar içi popülasyonlar arasında ve popülasyonlar içinde) istatistiksel olarak önemli genetik varyasyon tespit edilmiştir (Tablo 4). Buna göre gruplar arasındaki varyasyon payı %98,54 ($p < 0,01$), gruplar içi popülasyonlar arasındaki varyasyon payı %1,18 ($p < 0,0001$) ve popülasyon içindeki varyasyon payı %0,27 ($p < 0,0001$) olarak belirlenmiştir. Analiz sonucu her üç düzeyde de yüksek bir genetik yapılanma olduğunu göstermiştir.

Tablo 3. Popülasyon içi ortalama genetik uzaklıklar (diyagonal, koyu yazılmış), popülasyonlar arası ortalama genetik uzaklıklar (diyagonalın altı) ve popülasyon çiftleri arasındaki F_{ST} değerleri (diyagonalın üstü)

	Ardahan	Hatay	Elazığ	Isparta	Konya	Samsun	Antalya
Ardahan	0,00142	0,95914***	0,82375***	0,99736***	0,99713***	0,99729*	0,99709***
Hatay	0,02037	0,00076	0,94176**	0,99831*	0,99816*	0,99840*	0,99828*
Elazığ	0,00808	0,01646	0,00178	0,99738***	0,99715**	0,99724*	0,99705*
Isparta	0,09515	0,09888	0,09794	0,00091	0,50973	0,85015**	0,80686***
Konya	0,09272	0,09643	0,09549	0,00183	0,00091	0,88971***	0,80686**
Samsun	0,09683	0,10265	0,09963	0,00599	0,00785	0,00102	0,68007
Antalya	0,09480	0,10058	0,09758	0,00475	0,00475	0,00306	0,00102

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,0001$ **Şekil 3.** *P. dissimilis* COI haplotiplerinin ML ağacı. T. a. H, C. a. H ve C. s. H dış grup olarak kullanılan sırasıyla *Tanyarsus arduennensis*, *Cladotanyarsus atridorsum* ve *Cladotanyarsus* sp.'nin haplotipleridir. Nodlardaki rakamlar bootstrap değerlerini belirtmektedir. %50'den küçük değerler gösterilmemiştir.**Tablo 4.** Çalışılan *P. dissimilis* popülasyonlarının moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyonun kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyans yüzdesi	Fiksasyon indeksi	p değeri
Gruplar arasında	2	2517,976	137,11287 Va	98,54	$F_{CT}=0,98544$	0,00978
Gruplar içi popülasyonlar arasında	4	31,511	1,64336 Vb	1,18	$F_{SC}=0,81134$	0,00000
Popülasyonlar içinde	25	9,553	0,38213 Vc	0,27	$F_{ST}=0,99725$	0,00000
Toplam	31	2559,040	139,13836			



Şekil 4. *P. dissimilis* popülasyonlarında tespit edilen 15 COI haplotipinin MJ ağı. Her bir daire bir haplotipi, her bir daire rengi bir popülasyonu gösterirken dairenin boyutu haplotipin görüldüğü örnek sayısı ile orantılıdır.

F_{ST} değeri, popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli bir göstergesi olarak bilinmektedir [32]. Bu çalışmada 21 ikili karşılaştırmanın 19'u için saptanan istatistiksel açıdan önemli F_{ST} değerleri ($F_{ST} > 0,25$; $p < 0,05$) (Tablo 3) bu popülasyonlar arasında çok büyük farklılaşmalar olduğunu göstermektedir. Özellikle lentik ekosistemlerde, *P. dissimilis*'in yumurta, larva, pupa ve ergin yaşam evrelerinde yayılma potansiyeli, kısa ömürleri ve üreme biyolojileri nedeniyle son derece düşüktür [6]. Bu gerçek göz önüne alındığında, bu popülasyonların gösterdiği önemli ölçüde büyük ikili farklılaşmalar, coğrafi izolasyon faktörleri olarak aralarındaki mesafe ve fiziksel bariyerlerden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, hesaplanan ortalama γ_{ST} değeri (0,92176) *P. dissimilis* popülasyonlarının birbirinden farklılaştığını ve genel N_m değeri (0,02) muhtemelen coğrafi izolasyon faktörleri nedeniyle popülasyonlar arasında sınırlı genetik bağlantı olduğunu göstermektedir. Ancak Isparta ile Konya ve Samsun ile Antalya popülasyonları arasındaki ikili karşılaştırmalardan elde edilen istatistiksel açıdan anlamsız F_{ST} değerleri, bir grup içerisinde yer alan popülasyonların birbirleriyle diğer gruplardaki popülasyonlarla olduğundan daha yakın ilişkili olduklarını göstermektedir. Bu popülasyon çiftlerinden aralarında nispeten büyük bir coğrafi mesafe bulunan Samsun ve Antalya popülasyonları arasındaki düşük genetik farklılaşma ($F_{ST} = 0,68007$; $p > 0,05$), coğrafi mesafenin Türkiye'deki *P. dissimilis*

popülasyonlarının genetik yapısı üzerinde etkili olan tek faktör olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu türün popülasyonları arasında genetik çeşitliliğe neden olan ve popülasyon yapısını belirleyen potansiyel faktörlerin detaylı bir şekilde araştırılması yerinde olacaktır.

Haplotiplerin ML ağacı (Şekil 3) ve MJ ağı (Şekil 4), çalışmada örneklenmiş popülasyonların 3 ayrı soy hattına ayrıldığını açık bir şekilde göstermektedir. AMOVA analizi farklı hiyerarşik düzeylerde istatistiksel açıdan anlamlı moleküler varyasyonlar belirlemiştir ($p < 0,01$) (Tablo 4). Ayrıca soy hatları karşılaştırmalarından elde edilen farklı γ_{ST} ve N_m değerleri, soy hatları arasında farklı genetik farklılaşma ve gen akışı seviyelerine işaret etmektedir. Bu sonuçlardan hareketle, Türkiye'deki *P. dissimilis*'in farklı düzeylerde yüksek genetik yapılanma sergilediği söylenebilir. Bu yüksek genetik yapılanmada fiziksel bariyerler ve mesafeler gibi coğrafi izolasyon faktörlerinin etkisi yadsınmaz. Bu bağlamda, Türkiye'nin güneydoğu kısmından (Hatay) başlayarak kuzeye doğru (Rize) ilerleyen dağ silsilelerinden oluşan ve genetik çeşitliliğin dağılımını belirleyen önemli faktörlerden biri olan Anadolu Diyagonali'nin [33], [34], Türkiye'deki *P. dissimilis*'in popülasyon yapısı ve soy hatlarının dağılışı üzerinde de etkili olduğu düşünülebilir.

3.3. Demografik Geçmiş

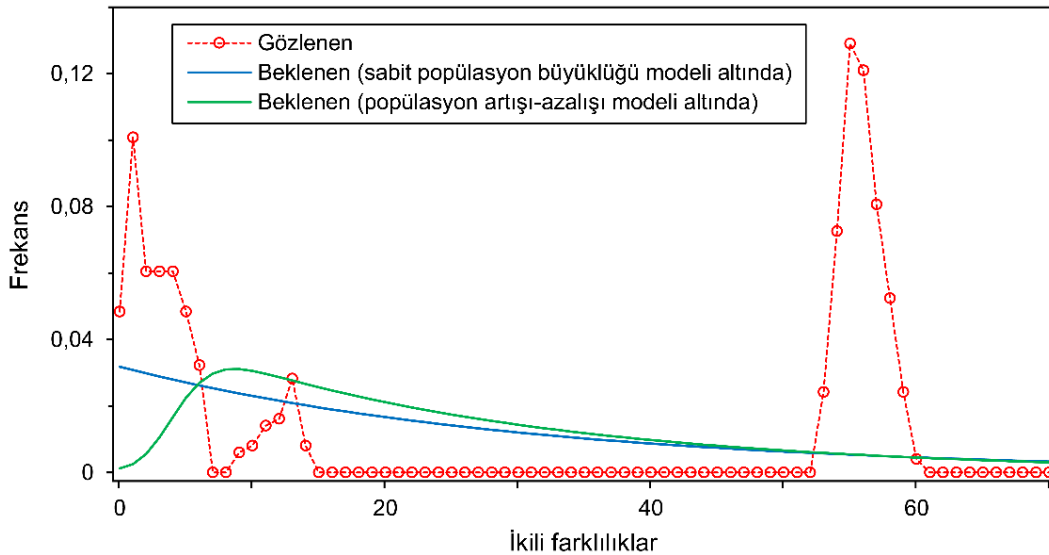
Gruplar (soy hatları) bazında bir değerlendirmede, Tajima's D istatistiği sadece Hatay grubu için negatif değer tespit ederken ($p>0,05$), Fu's F_s istatistiği ise Doğu ve Batı grupları için negatif değerler bulmuştur ($p>0,02$) (Tablo 5). Diğer yandan, her bir grup için hem r hem de SSD değerlerinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır ($p>0,05$). Ayrıca hem sabit popülasyon büyüklüğü modeli hem de popülasyon artışı-azalışı modeli altında yapılan uyumsuzluk dağılımı analizinde tüm grupların uyumsuzluk

dağılımı grafikleri çok doruklu (multimodal) bir şekil göstermiştir. Tüm örnekler birlikte değerlendirildiğinde ise hem nötralite testlerinde hem de uyumsuzluk dağılımı analizlerinde istatistiksel açıdan anlamsız değerler elde edilmiştir (Tablo 5). Tüm örnekler için uyumsuzluk dağılımı grafiği de tıpkı gruplar için olduğu gibi çok doruklu bir şekil sergilemiştir (Şekil 5). Bu sonuçlar hem örneklenmiş üç grubun hem de tüm popülasyonun demografik kararlılıkta olduğunu ve bunlarda genişlemeye veya güçlü bir darboğaza yönelik nötraliteden herhangi bir sapma görülmediğini göstermektedir.

Tablo 5. Belirlenen *P. dissimilis* gruplarının (soy hatlarının) nötralite testleri ve uyumsuzluk dağılımı analizi sonuçları

Grup	Nötralite testleri*		Uyumsuzluk dağılımı analizleri*	
	Tajima's D	Fu's F_s	r	SSD
Grup 1 (Doğu)	1,35618 ($p=0,93800$)	-0,61232 ($p=0,33900$)	0,12296 ($p=0,67400$)	0,06915 ($p=0,12700$)
Grup 2 (Hatay)	-0,61237 ($p=0,35700$)	0,17185 ($p=0,35300$)	0,25000 ($p=1,00000$)	0,02196 ($p=0,19200$)
Grup 3 (Batı)	1,46931 ($p=0,92100$)	-0,74053 ($p=0,33000$)	0,03443 ($p=0,54600$)	0,00737 ($p=0,42800$)
Toplam	3,30134 ($p=1,00000$)	6,57999 ($p=0,97900$)	0,01634 ($p=0,93600$)	0,03518 ($p=0,18100$)

* r : Harpending's raggedness istatistiği, SSD: varyasyon kareler toplamı, p : istatistiklerde elde edilen önem dereceleri. Her bir test için p değeri parantez içinde gösterilmektedir.



Şekil 5. Tüm veri setini içeren toplam *P. dissimilis* popülasyonunun (N=32) uyumsuzluk dağılımı grafiği

4. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma ile Türkiye'deki *P. dissimilis* genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı ilk defa incelenmiş ve mitokondriyal COI gen bölgesinin bu türün popülasyon genetiği çalışmaları için kullanışlı bir moleküler belirteç olarak görülebileceğine ilişkin güçlü kanıtlar ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak

Türkiye'deki bazı *P. dissimilis* popülasyonlarında genetik heterojeniteye işaret eden kısmen yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitlilikleri bulunduğu, bu popülasyonların farklı düzeylerde (gruplar arasında, gruplar içi popülasyonlar arasında ve popülasyonlar içinde) yüksek bir genetik yapılanma gösterdiği ve demografik kararlılıkta olduğu belirlenmiştir. Örneklenen *P.*

dissimilis popülasyonlarının farklı düzeylerde gösterdiği yüksek genetik yapılanma, popülasyonlar ve soy hatlarının birbirlerinden farklılaşması ve aralarındaki genetik bağlantı üzerinde coğrafi mesafenin ve fiziksel bariyerlerin etkili bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Batı ile Doğu soy hatları arasında ve Batı ile Hatay soy hatları arasında tespit edilen yüksek genetik farklılaşma ve düşük gen akışı özellikle Anadolu Diyagonalı'nın bu soy hatları arasındaki gen akışını sınırlandırarak birbirlerinden farklılaşmalarına yol açmış olabileceğine işaret etmektedir. Chironomidlerin ekonomik ve çevresel açılarından önemi ve *P. dissimilis*'in genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı ile ilgili literatürdeki boşluk göz önüne alındığında, bu çalışmanın Türkiye'deki *P. dissimilis* genetik

çeşitliliği, popülasyon yapısı ve demografik geçmişine ilişkin çok değerli bilgiler sağladığı açıktır. Ancak yine de daha fazla örnekleme alanından (hem Türkiye'den hem de türün yayılışının olduğu başka yerlerden) toplanan daha fazla örnek ile daha fazla moleküler belirteç (mitokondriyal ve/veya nükleer) kullanarak gerçekleştirilecek yeni çalışmaların yapılması yararlı olacaktır. Böylece *P. dissimilis*'in genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı daha iyi anlaşılabilir ve türün bu bölgedeki tarihsel demografisi detaylı olarak incelenmiş olur.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- [1] J. S. Gilleard, and E. Redman, "Genetic diversity and population structure of *Haemonchus contortus*," *Adv. Parasitol.*, vol. 93, pp. 31-68, May 2016.
- [2] K. A. Crandall, D. Posada, and D. Vasco, "Effective population size: missing measures and missing concepts," *Anim. Conserv.*, vol. 2, no. 4, pp. 317-319, 1999.
- [3] H. B. Bode, "Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 224-230, 2009.
- [4] P. S. Cranston, "Introduction," in *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges*, P. D. Armitage, P. S. Cranston, L. C. V. Pinder, Eds. Dordrecht: Springer, 1995, ch. 1, pp. 1-7.
- [5] L. C. V. Pinder, "Biology of freshwater Chironomidae," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 31, pp. 1-23, 1986.
- [6] P. D. Armitage, P. S. Cranston, and L. C. V. Pinder, Eds. *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges*. Dordrecht: Springer, 1995, pp. 1-572.
- [7] A. Sari, and F. Sari, "A comparative examination of acute toxicities of three disazo dyes to freshwater macroinvertebrates *Gammarus roeseli* (Crustacea: Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera)," *Chem. Ecol.*, vol. 37, no. 8, pp. 683-703, 2021.
- [8] P. S. Cranston, N. B. Hardy, G. E. Morse, L. Puslednik, and S. R. McCluen, "When molecules and morphology concur: the "Gondwanan" midges (Diptera: Chironomidae)," *Syst. Entomol.*, vol. 35, no. 4, pp. 636-648, 2010.
- [9] O. A. Sæther, and F. O. Roque, "New Neotropical species of *Nandeva* (Diptera: Chironomidae), with a phylogeny of the Tanytarsini," *Tijdschr. Entomol.*, vol. 147, pp. 63-80, 2004.
- [10] T. Ekrem, E. Willassen, and E. Stur, "Phylogenetic utility of five genes for dipteran phylogeny: a test case in the Chironomidae leads to generic synonymies," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 57, no. 2, pp. 561-571, 2010.
- [11] M. E. Carew, V. Pettigrove, R. L. Cox, and A. A. Hoffmann, "DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera: Chironomidae)," *J. North Am. Benthol. Soc.*, vol. 26, no. 4, pp. 587-600, 2007.
- [12] R. Bakır, "Türkiye'nin bazı önemli göllerinde Chironomidae (Insecta: Diptera) faunasının araştırılması," Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2012.
- [13] A. V. Nebeker, "Temperature requirements and life cycle of the midge *Tanytarsus dissimilis* (Diptera: Chironomidae)," *J. Kans. Entomol. Soc.*, vol. 46, no. 2, pp. 160-165, 1973.
- [14] Y. Brodin, G. Ejdung, J. Strandberg, and T. Lyrholm, "Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic Sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera)," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 13, no. 6, pp. 996-1004, 2013.
- [15] P. Bitušík, and K. Trnková, "A preliminary checklist of Chironomidae (Diptera) from Albania with first records for the Balkan Peninsula," *Zootaxa*, vol. 4563, no. 2, pp. 361-371, 2019.

- [16] A. Sari, M. Duran, A. Sen, and F. Bardakci, "Investigation of Chironomidae (Diptera) relationships using mitochondrial *COI* gene," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 59, pp. 229-238, 2015.
- [17] M. Gross, "Turkey's biodiversity at the crossroads," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 13, pp. R503-R505, 2012.
- [18] H. Xu, Y. Zhang, D. Xu, B. Lou, Y. Guo, X. Sun, and B. Guo, "Genetic population structure of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) in the Yellow and East China Seas base on mitochondrial COI sequences," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 54, pp. 240-246, 2014.
- [19] C. Lord, K. Maeda, P. Keith, and S. Watanabe, "Population structure of the Asian amphidromous Sicydiinae goby, *Stiphodon percnopterygionus*, inferred from mitochondrial COI sequences, with comments on larval dispersal in the northwest Pacific Ocean," *Vie Milieu*, vol. 65, no. 2, pp. 63-71, 2015.
- [20] A. Ayyasamy, and P. D. Kamala Jayanthi, "Population structure inferred from COI data analyses for *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in the Karnataka region of India," *Orient. Insects*, vol. 54, no. 1, pp. 41-57, 2020.
- [21] A. Kuyulu, and H. Genç, "Genetic diversity of codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) populations in Turkey," *Turk. J. Zool.*, vol. 44, no. 5, pp. 462-471., 2020.
- [22] D. M. Hillis, and C. Moritz, Eds., *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1990, pp. 1-588.
- [23] V. Guryev, I. Makarevitch, A. Blinov, and J. Martin, "Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial *cytochrome b* and *cytochrome oxidase I*," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 19, no. 1, pp. 9-21, 2001.
- [24] C. S. Sinclair, and S. E. Gresens "Discrimination of *Cricotopus* species (Diptera: Chironomidae) by DNA barcoding," *Bull. Entomol. Res.*, vol. 98, no. 6, pp. 555-563, 2008.
- [25] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729, 2013.
- [26] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549, 2018.
- [27] X. Xia, and Z. Xie, "DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution," *J. Hered.*, vol. 92, no. 4, pp. 371-373, 2001.
- [28] P. Librado, and J. Rozas, "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 11, pp. 1451-1452, 2009.
- [29] L. Excoffier, G. Laval, and S. Schneider, "Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis," *Evol. Bioinform. Online*, vol. 1, pp. 47-50, 2005.
- [30] D. Silvestro, and I. Michalak, "RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML," *Org. Divers. Evol.*, vol. 12, pp. 335-337, 2012.
- [31] J. W. Leigh, and D. Bryant, "POPART: Full-feature software for haplotype network construction," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 6, no. 9, pp. 1110-1116, 2015.
- [32] S. Wright, "The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating," *Evolution*, vol. 19, no. 3, pp. 395-420, 1965.
- [33] B. Çiplak, "Distribution of Tettigoniinae (Orthoptera, Tettigoniidae) bush-crickets in Turkey: the importance of the Anatolian Taurus Mountains in biodiversity and implications for conservation," *Biodivers. Conserv.*, vol. 12, no. 1, pp. 47-64, 2003.
- [34] S. Mutun, "Intraspecific genetic variation and phylogeography of the oak gallwasp *Andricus caputmedusae* (Hymenoptera: Cynipidae): Effects of the Anatolian diagonal," *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.*, vol. 56, no. 2, pp. 153-172, 2010.