

T.C.  
ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ALANLARDA YAŞAYAN *EUSTIGMAEUS*  
*ERCIYESIENSIS* (ACARI: STIGMAEIDAE)  
POPÜLASYONLARINDAKİ GENETİK POLİMORFİZMLERİN  
RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Nilgün KARASU

Danışman  
Prof. Dr. Salih DOĞAN

BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2015

Her Hakkı Saklıdır

Prof. Dr. Salih DOĞAN danışmanlığında, Nilgün KARASU tarafından hazırlanan bu çalışma 13.07.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Salih DOĞAN

İmza:



Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:



Üye : Doç. Dr. Sevgi SEVSAY

İmza:



Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

13.07/2015



Prof. Dr. Ali SÜLÜN

Enstitü Müdürü

**ÖZET**

Yüksek Lisans

**FARKLI ALANLARDA YAŞAYAN *EUSTIGMAEUS ERCIYESIENSIS*  
(ACARI: STIGMAEIDAE) POPÜLASYONLARINDAKİ GENETİK  
POLİMORFİZMLERİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Nilgün KARASU

Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih DOĞAN

Ortak Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

Bu çalışmada, Erzincan'ın Ahmediye ve Ekşisu sınırları içinde yer alan 17 farklı alandan alınan *Eustigmaeus erciyesiensis* (Acari: Stigmaeidae) örneklerinde genetik farklılıklar RAPD-PCR yöntemi ile analiz edildi. RAPD-PCR çalışmalarında toplam 12 primer denendi ve hepsi genoma bağlandığı için tümü değerlendirmeye alındı. Amplifikasyon sonucu büyüklüğü 100 bç ile 4000 bç arasında değişen toplam 134 bant elde edildi. Çoğalan DNA bantlarından 74 tanesinin polimorfik olduğu gözlemlendi. Toplam polimorfizm oranı %55,2 olarak hesaplandı. Bu oran iki alandaki *E. erciyesiensis* popülasyonlarında tür içi varyasyonun yüksek olduğunu gösterdi. RAPD sonuçlarıyla oluşturulan dendrogram analizlerine göre *E. erciyesiensis* iki grupta kümelendi.

Toprak ve suyun pH'sı ile sıcaklığına bakıldığında Ahmediye alanının Ekşisu alanına göre daha asidik olduğu belirlendi. Aynı mevsimlerde Ahmediye ve Ekşisu alanlarının hava ve toprak sıcaklıklarının değerlendirilmesi yapıldığında yıl içinde Ahmediye'de sıcaklığın daha düşük olduğu görüldü. Canlıların farklı ortam koşullarına adaptasyonunun genetik açıdan da farklılaşmalarına ve tür içi varyasyonlara sebep olduğu söylenebilir. Elde edilen veriler bu durumu destekler niteliktedir.

**2015, 83 sayfa****Anahtar Kelimeler:** *Eustigmaeus erciyesiensis*, RAPD-PCR, Erzincan, genetik polimorfizm

**ABSTRACT**

Master Thesis

**DETERMINATION OF GENETIC POLYMORPHISMS IN *EUSTIGMAEUS ERCIYESIENSIS* (ACARI: STIGMAEIDAE) POPULATIONS INHABITING DIFFERENT FIELDS BY RAPD-PCR METHOD**

Nilgün KARASU

Erzincan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Salih DOĞAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

In this study, the genetic differences in *Eustigmaeus erciyesiensis* specimen analyzed by RAPD-PCR method taken from 17 different areas located within Ahmediye and Ekşisu in Erzincan. In RAPD-PCR studies a total of 12 primers were tested and all of them were linked to the genome so all primers were included in the evaluation. As a result of amplification it was obtained a total of 134 bands varying the size from 100 bp to 4000 bp. Growing bands of DNA were observed that 74 of them were polymorphic. Total polymorphism rate was calculated as 55,2%. This ratio showed that the intra-specific variation was high in *E. erciyesiensis* populations in two areas. According to the dendrogram analysis which generated by RAPD-PCR results *E. erciyesiensis* were clustered in two groups.

When the pH and temperature of the water and the soil was examined, it was determined that Ahmediye was more acidic than Ekşisu. The air and the soil temperature of Ahmediye and Ekşisu was evaluated in the same seasons it was observed that the temperature was lower in Ahmediye in the year. It can be said that the adaptation of organisms to different environmental conditions causes the genetic differentiation and intraspecific variation. The data obtained support this situation.

**2015, 83 pages****Keywords:** *Eustigmaeus erciyesiensis*, RAPD-PCR, Erzincan, genetic polymorphism

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Salih DOĞAN'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca eşsiz katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya tüm içtenliklerimle teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans dönemim boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, deneysel ve teorik çalışmalarında hep yardımcı olan Arş. Gör. Mehmet KUZUCU'ya ve deneylerimde yardımını esirgemeyen moleküler biyoloji laboratuvar ekibinden; H. Özkan CANÇELİK, Hülya KARADEMİR, Hasan Can TÜRK, Uğur DURMUŞ ve Oğuzhan BAYRAK'a teşekkür ederim. Arazi ve örnek ayıklama çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Akaroloji laboratuvar ekibinden; Sibel DİLKARAOĞLU, Hakan AKSOY, Evren BUĞA ve Meryem BİNGÜL'e çok teşekkür ederim.

Çalışmanın alt yapısı ve sarf malzeme giderleri Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) tarafından desteklenen FEN-A-240215-0129 numaralı proje ile karşılanmıştır. Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonuna desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler ederim.

**Nilgün KARASU**

**Temmuz 2015**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Akarların Genel Özellikleri.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Stigmaeidae'nin Özellikleri.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. <i>Eustigmaeus</i>'un Özellikleri.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i>'in Sistematikteki Yeri.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i>'in Özellikleri.....</b>	<b>5</b>
<b>1.6. Böcek Taksonomisinde Kullanılan Moleküler Belirteçler (Markırlar).....</b>	<b>7</b>
<b>1.6.1. Protein markırları.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6.2. DNA markırları.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6.2.1. Hibridizasyona dayalı moleküler markırlar.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6.2.2. PCR temelli moleküler markırlar.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.2.2.1. RAPD yöntemi.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.2.2.2. AFLP yöntemi.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.2.2.3. SSR yöntemi.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.2.2.4. ISSR yöntemi.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2.2.5. SCAR yöntemi.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6.2.2.6. SRAP yöntemi.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6.2.2.7. CAPS yöntemi.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.2.2.8. TRAP yöntemi.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7. PCR Yöntemi.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1. PCR yönteminin aşamaları.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1.1. DNA zincirinin açılması (Denaturasyon).....</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1.2. Primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması (Annealing).....</b>	<b>21</b>

1.7.1.3. Primer uzaması (Ekstensiyon).....	21
1.7.2. PCR optimizasyonu.....	21
1.7.3. PCR çalışma şartlarını etkileyen faktörler.....	22
1.7.4. PCR bileşenleri.....	23
1.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
1.9. Genetik Polimorfizm.....	24
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>31</b>
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	31
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	32
3.1.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler.....	32
3.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda kullanılan kimyasal maddeler.....	32
3.1.2.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler.....	32
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	32
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Yaşama alanlarının tanımı.....	33
3.2.1.1. Ekşisu.....	33
3.2.1.2. Ahmediye.....	33
3.2.2. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> örneklerinin toplanması.....	35
3.2.3. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> 'den DNA saflaştırılması.....	38
3.2.3.1. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> örneklerinin temizlenmesi.....	38
3.2.3.2. Ön homojenizasyon.....	38
3.2.3.3. DNA saflaştırılması.....	38
3.2.3.4. DNA konsantrasyon tayini.....	40
3.2.4. İzole edilmiş DNA'ların PCR ile çoğaltılması.....	40
3.2.4.1. RAPD-PCR yöntemi.....	40
3.2.4.2. RAPD primerleri.....	40
3.2.4.3. Hazırlanan RAPD-PCR karışımı.....	41
3.2.4.4. Uygulanan PCR koşulları.....	43
3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezine Yüklenmesi.....	43

3.2.5.1. Agaroz jelin hazırlanması.....	43
3.2.5.2. Örneklerin jele yüklenmesi.....	44
3.2.6. Elektroforez sonucu jelin görüntülenmesi.....	45
3.2.7. Verilerin derlenmesi ve istatistiksel analizi.....	46
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>47</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>58</b>
5.1. Sonuç.....	58
5.2. Öneriler.....	62
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>74</b>



## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

<b>A</b>	Adenin
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>C</b>	Sitozin
<b>CAPS</b>	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi)
<b>CTAB</b>	Sentril trimetil amonyum bromür
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tags (İfade Edilen Dizi Etiketleri)
<b>G</b>	Guanin
<b>G</b>	Gram
<b>ISSR</b>	Inter-Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrar Arası)
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligram
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Döngü sayısı
<b>NTsys</b>	Versiyon 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY
<b>ORF</b>	Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>C°</b>	Santigrat derece
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>R</b>	Tahmin edilen sessiz allel (null) frekansı
<b>RAPD</b>	Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parça uzunluğu farklılığı)
<b>rpm</b>	Revolutions Per Minutes (Dakikada dönüş sayısı)
<b>Sn</b>	Saniye
<b>SCAR</b>	Sequence-Characterized Amplified Region (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölge)
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotit polimorfizmi)
<b>SRAP</b>	Sequence Related Amplified Polymorphism (Çoğaltılan Sekans Polimorfizmi)
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeats (Basit dizi tekrarları)
<b>T</b>	Timin
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA tamponu
<b>TE</b>	Tris-EDTA tamponu
<b>TRAP</b>	Target Region Amplification Polymorphism (Hedef Bölge Çoğaltım Polimorfizmi)

<b>Tris</b>	Tris (hidroksil metil) aminometan
<b>Tris-HCl</b>	Tris-hidroklorür
<b>U</b>	Unit
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu)
<b>VgR</b>	Vitellin reseptörü kodlayan bir gen
<b>VgR- dsRNA</b>	VgR ifadesi silinmiş prob
<b>v/v</b>	Hacim / Hacim oranı
<b>w/v</b>	Ağırlık / Hacim oranı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> .....	4
Şekil 1.2. <i>E.erciyesiensis</i> 'in ışık mikroskobuyla elde edilmiş görüntüsü.....	6
Şekil 1.3. RAPD Reaksiyonu şematik gösterimi .....	12
Şekil 3.1. Akar ayıklama düzeneği .....	36
Şekil 3.2. Ayıklamanın yapıldığı stereo mikroskop.....	37
Şekil 3.3. Görüntüleme de kullanılan ışık mikroskobu .....	37
Şekil 3.5. PCR karışımı hazırlama işlemi .....	42
Şekil 3.6. PCR cihazı .....	42
Şekil 3.7. Yatay elektroforez ve güç kaynağı .....	44
Şekil 3.8. Agaroz jele numune yüklenmesi .....	45
Şekil 3.9. Jel Görüntüleme Cihazı .....	45
Şekil 4.1. OPAA08 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	49
Şekil 4.2. OPAA19 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	50
Şekil 4.3. OPAB01 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	50
Şekil 4.4. OPAB05 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	51
Şekil 4.5. OPAB18 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	51
Şekil 4.6. OPAC09 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	52
Şekil 4.7. OPAC17 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	52
Şekil 4.8. OPAC19 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	53
Şekil 4.9. OPAD10 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri .....	53
Şekil 4.10. OPAE09 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	54
Şekil 4.11. OPAE12 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	54
Şekil 4.12. OPAE17 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri.....	55
Şekil 4.13. <i>E. erciyesiensis</i> 'in popülasyonları arasındaki genotipik bağlantı.....	55

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b>Çizelge 3.1.</b> Primerler ve baz dizileri.....	41
<b>Çizelge 3.2.</b> PCR karışım içeriği ve miktarları.....	42
<b>Çizelge 3.3.</b> PCR sıcaklıkları ve döngü sayıları.....	43
<b>Çizelge 4.1.</b> RAPD primerlerinin oluşturduğu amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.....	48
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> popülasyonlarının 12 RAPD primerine karşı verdiği bant sayısı.....	49
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> 'in Ekşisu ve Ahmediye popülasyonları arasındaki genetik benzerlik indeksi.....	56
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>Eustigmaeus erciyesiensis</i> 'in örnekleme alanlarına ait pH ve sıcaklık değerleri.....	57

## 1. GİRİŞ

Kâinatın varoluşundan bu yana çeşitli fiziksel ve kimyasal koşullar altında adaptasyon yeteneği sınanan canlılar varolma mücadelesini halen sürdürmektedir. Dünyanın ilk anlarında canlılık için çok da müsait olmayan bir ortam evrilerek yaşam için en uygun koşullara sahip olmuştur.

Canlılık, kâinatın yaratılma sürecinde çok da uzun olmayan bir hikâyeye sahip olsa da bu kısa zaman aralığında birçok değişime uğramıştır. Bu değişimler sayesinde dünyanın farklı bölgelerinde bulunan organizmalar birbirlerinden farklı koşullar içerisinde adaptasyona zorlandıklarından DNA'larında bir takım farklılıklar meydana gelmiştir. Bu farklılıklar kimi zaman morfolojik olarak görülebilir bir değişime, kimi zamanda sessiz bir mutasyon halinde polimorfizme yansımaktadır.

Morfolojik ve anatomik farklılıklara dayanarak canlıların sınıflandırılması artık teknolojinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizleri ile sağlanmaktadır. Aynı türün farklı bölgelerde yaşayan bireyleri arasında çoğu kez morfolojik bir farka rastlanmazken DNA ve protein belirteçleri sayesinde akrabalık ilişkisi daha net ortaya konulabilmektedir.

Canlıların çeşitliliği ile meşgul olan Sistemik, Moleküler Biyoloji ile bütünleştirilip moleküler verilerle desteklendiğinde sonuçların yorumlanmasında oldukça fayda sağlamaktadır. Sistemik alanda çalışanlar verilerini Moleküler Biyoloji, Biyokimya gibi bilim dallarıyla destekleyerek multidisipliner yorumlarla daha anlamlı hale getirebilirler.

Bu çalışmada farklı alanlarda yaşayan *Eustigmaeus erciyesiensis* akarlarının DNA'larındaki polimorfizmler RAPD-PCR yöntemi ile incelenerek, bu iki alandaki popülasyonların genetik açıdan karşılaştırılması yapılmıştır. Burada amaç tür içi olası farklılığı moleküler düzeyde ortaya koymaktır. Bu, *E. erciyesiensis* üzerindeki ilk moleküler temelli çalışmadır.

### 1.1. Akarların Genel Özellikleri

Akarlar (Acari), karasal ve sucul formlardan oluşan eklembacaklılar (Arthropoda) şubesinin bir üyesidir. Diğer eklembecaklılardan farklı olarak antenleri ve mandibulları bulunmayan Chelicerata alt şubesinde yer alan akarlar, karasal ve sucul ortamlar da dahil neredeyse her yerde yaşarlar. Bunların çoğu serbest yaşayan formlardır (Krantz ve Walter, 2009).

Akarlar, yaklaşık 400 milyon yıl öncesinde, erken Devoniyenden bilinen fosiller ile tüm karasal hayvanların en eskileri arasında yer alır (Walter vd., 1996). Serbest yaşayan diğer araknidlerin (Arachnida) aksine çok sayıda akar diğer hayvanlarla yakın ilişkiler kurmuştur. Bu ilişkiler kommensalizmden parazitizme değişiklik göstermektedir (Evans, 1992).

Akarlar çok küçüktürler; çoğunluğu uzunluk olarak 1 milimetreden daha kısadır ve hiçbiri birkaç santimetreden daha fazla büyüyemez. Böceklerinkine eşit olmamasına rağmen, akarlar tür zenginliğinde yüksek bir orana sahiptir (Walter ve Proctor, 2001; Zhang, 2011). Akarlar ekosistemin pasif bir bileşeni değildir; aksine sucul ve karasal sistemlerin önemli indikatörüdür. Akarlar biyolojik çeşitliliğin başlıca bileşenleridir. Şimdiye kadar tanımlanmış tür sayısı 55 bin civarındadır; fakat Krantz ve Walter (2009)'a göre bu sayının yarım ila bir milyon arasında olduğu düşünülmektedir.

Buzullardan çöllerde tüm karasal ortamlarda, tatlı-tuzlu-termal sularda, ev tozunda ve depo ürünlerinde bulunan akarlar, geniş bir yaşam alanına sahiptirler. En yoğun buldukları yerler ise orman topraklarıdır. Doku artıklarını ayrıştırma, zirai mücadele, toprak ıslahı akarların ekolojik faydaları olarak sayılabilir. İnsanlarda ve omurgalı-omurgasız hayvanlarda iç-dış parazit olarak yaşayan türleri de mevcuttur. Başkalaşım geçiren akarlar uzun bir ömre sahiptirler ve diğer eklembacaklıların aksine yavaş ürerler (Wooley, 1988; Evans, 1992; Walter ve Proctor, 1999; Krantz ve Walter, 2009; Doğan, 2012).

Çalışma konusunu oluşturan *Eustigmaeus erciyesiensis* Stigmaeidae familyasının mensubu olup, aşağıda bununla alakalı bilgi sunulmuştur.

## 1.2. Stigmaeidae'nin Özellikleri

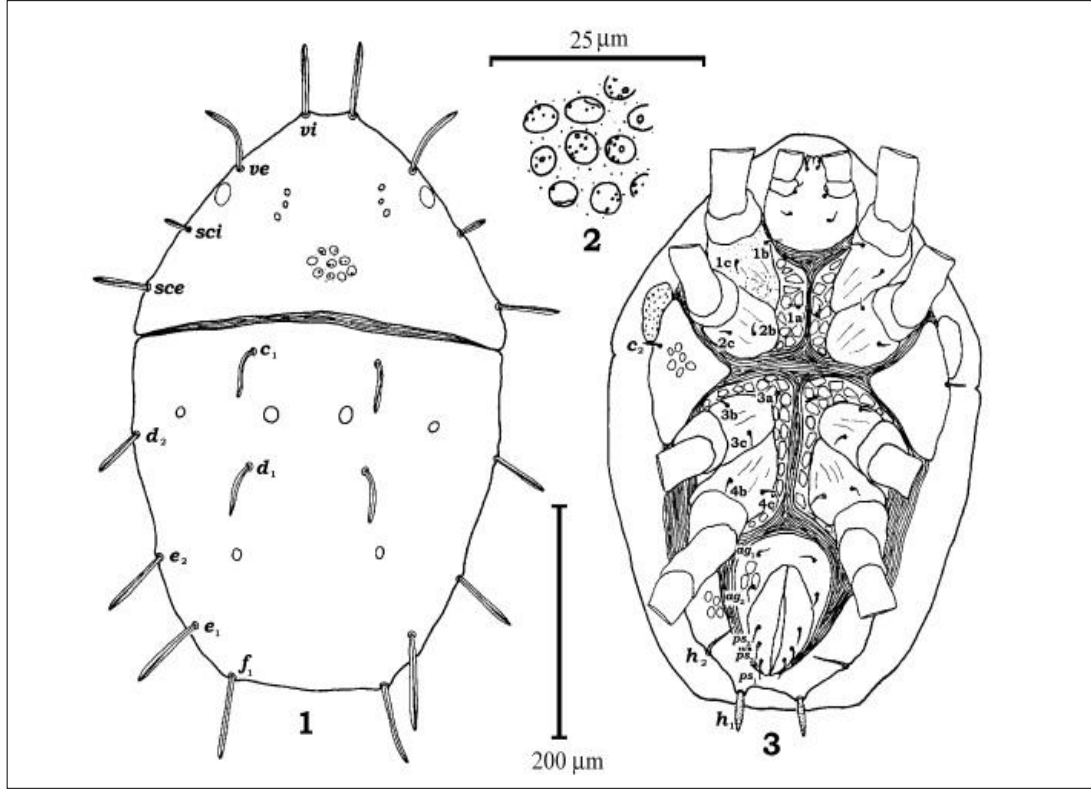
Stigmaeidler dünyada geniş bir dağılıma sahiptir. Türlerinin çoğu Palearktık, Oryantal, Nearktik, Afrotropikal ve Avustralya bölgelerinden bulunmuş olmasına rağmen bu familyaya ait türler tüm biyocoğrafik bölgelerde mevcuttur. Türlerinin % 35'inden daha fazlası bitki yaprakları ve dalları üzerinde serbest yaşayan predatördür. Stigmaeid akarlarının yumurta, larva, protonimf, dötonimf ve ergin olmak üzere beş yaşam evresi vardır (Fan ve Flechtmann, 2015).

Stigmaeid akarlar sulu ve yarı sulu habitatlar ile toprak, yaprak ve çimen döküntüsü, yosun, liken, ağaç kabuğu ve bazı böceklerin üzerinde yaşarlar. Stigmaeidler genellikle yumuşak vücut yapısına sahip olup, serbest yaşadıkları kabul edilmektedir. Bazı türlerinin avcılıkla geçindikleri ve bazı zararlı akarların yumurta, larva, nimf veya erginleri ile beslendikleri bilinmektedir. Stigmaeidae familyası 500'ün üzerinde tür ve 32 cinsle temsil edilmektedir; bu cinslerden birisi de *Eustigmaeus*'dur (Gerson vd., 2003; Doğan ve Özçelik, 2011; Dönel ve Doğan, 2011, Pérez, 2015; Doğan vd., 2015a).

## 1.3. *Eustigmaeus*'un Özellikleri

Az sayıda türünün yaşam evrelerinin özellikleri bilinen *Eustigmaeus* cinsi (Şekil 1.1) dünyada yüzden fazla türle temsil edilmektedir (Doğan vd., 2004). Döküntü, yosun, liken ve çimenli toprak *Eustigmaeus* cinsi üyelerinin yaşam alanını oluşturur. Bu cinsin taksonomi ve ekolojisi Summers & Price (1961), Chaudhri (1972 a,b), Wood (1971, 1972, 1973) ve Tseng (1982)'in yaptığı çalışmalarla daha iyi anlaşılmıştır. *Eustigmaeus* cinsi akarlar Antarktika hariç bütün zoocoğrafik bölgelerde bulunmaktadırlar. Türkiye'de Koç & Ayyıldız (2000) ve Doğan & Ayyıldız (2003) tarafından cinsin 22 türü bildirilmiştir (Doğan vd., 2003). *Eustigmaeus* türleri yaşam

döngülerini dört evrede tamamlar. Bunlar larva, protonimf, deutonimf ve ergin olarak adlandırılır (Doğan vd., 2004).



Şekil 1.1. *Eustigmaeus erciyesiensis* A. dorsal, B. sırt deseni, C. Ventral (Doğan vd., 2003).

#### 1.4. *Eustigmaeus erciyesiensis*'in Sistematikteki Yeri

Alem: Animalia  
 Şube: Arthropoda  
 Alt Şube: Chelicerata  
 Sınıf: Arachnida  
 Alt Sınıf: Acari  
 Üst Takım: Acariformes  
 Takım: Trombidiformes  
 Alt Takım: Prostigmata  
 Üst Familya: Raphignathoidea  
 Familya: Stigmaeidae  
 Cins: *Eustigmaeus*  
 Tür: *Eustigmaeus erciyesiensis*

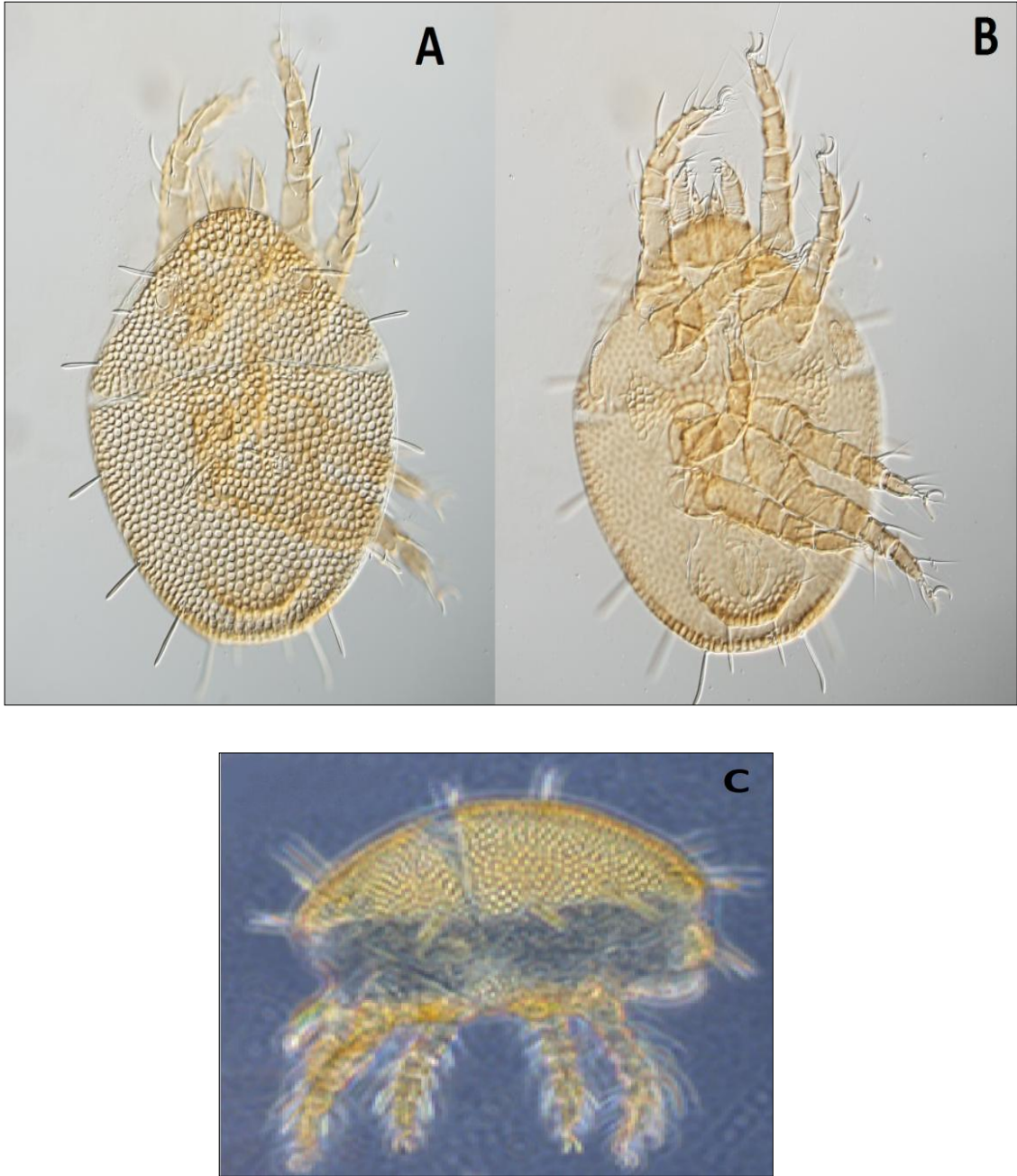


### 1.5. *Eustigmaeus erciyesiensis*'in Özellikleri

Bu canlının yumurtalarından üç çift bacaklı larvalar çıkmaktadır. Bu evrede aggenital plağın bulunmamasının yanında larvalar nimf ve erginlere göre daha yumuşak yapılı, sırt daha fazla sayıda plaklı ve bazı ağızla bacak parçaları üzerindeki kılların sayısı daha azdır. Protonimf evresinde; dört çift bacaklı olup sertleşme artmış, sırttaki plakların sayısı büyüyüp kaynaşarak dörde inmiştir. Bu evrede bir çift kılı aggenital plaklar oluşur. Bunun yanında ağız ve bacak parçaları üzerindeki kılların sayısı giderek artmaya ve sırt plakları üzerindeki çukurluklar belirginleşmeye başlar. Deutonimf ergine çok benzer. Bu evrede paragenital kıl sayısı iki katına çıkar. Sırt deseni daha iyi ayırt edilebilir konumdadır. Ancak, histerozoma plağı protonimfteki gibi ikiye bölünmüş durumdadır. Akar erginleştğinde; vücut daha iyi sertleşmiş, sırt ve karındaki çukurluklar iyice belirginleşmiş ve histerozoma bir plakla örtülmüştür. Erkek bireylerin genel olarak özellikleri dişi bireylere benzerdir. Farklı olarak; vücudun daha küçük olması, histerozoma plağının nimf evrelerindeki gibi ikiye bölünmüş olması, bütün bacakların tarsusu üzerinde ilave uzun bir solenidiyumun bulunması ve anogenital açıklığın vücudun arka ucunda yer almasıyla dişiden ayrılır.

Erişkin dişilerde (Şekil 1.1 ve 1.2) vücut uzunluğu 460 (417-500)  $\mu\text{m}$  ve eni ise 356 (320-419)  $\mu\text{m}$ 'dir. Propodozoma plağı üzerinde bir çift göz vardır. Propodozoma ve histerozoma plakları dairesel çukurluklardan oluşan desenlere sahiptir. Propodozoma üzerinde dört çift, histerozoma üzerinde altı çift kılıç şeklinde merkezi ışıklı kıl vardır. Suranal plak üzerinde bulunan iki çiftten ikincisi ( $h_2$ ) ince ve diken şeklinde, ilk çifti ise sırt kıllarına benzer yapıdadır.

Humeral plak, sırt plaklarıyla aynı desene sahiptir ve taşıdığı  $c_2$  kılları çok kısadır. Humeral bölgede üzeri noktalı bir çift kallosit bulunmaktadır. Koksisternal plaklar ayrı ve çokgenimsi desene sahiptir.  $1a$ ,  $3a$  kılları bu plaklar üzerinde yer almaktadır.  $4a$  kılı yoktur. İki çift aggenital kılın bulunduğu aggenital bölge koksisternal plaklarda olduğu gibi desenlidir. Anogenital plak üzerinde uzunlukları birbirlerine yakın üç çift pseudanal kıl bulunmaktadır.



**Şekil 1.2.** *Eustigmaeus erciyesiensis*'in ışık mikroskopuyla elde edilmiş görüntüsü  
A. dorsal görünüşü, B. ventral görünüş, C. yandan görünüşü.

Bacak parçaları üzerindeki kılların dağılımı ise şöyledir; koksa: 2–2–2–2, trokanter: 1–1–2–1, femur: 6–5–3–2, genu: 3(+1κ)–3(+1κ)–1–1, tibiya: 5(+1φρ+1φ)–5(+1φρ)–5(+1φρ)–5(+1φρ), tarsus: 13(+1ω)–9(+1ω)–7(+1ω)–7(+1ω).

### ***Eustigmaeus erciyesiensis*'in yayılışı**

Şimdiye kadar sadece ülkemizden bilinen bu tür Erzincan, Kayseri, Trabzon ve Kelkit Vadisi'nden verilmiştir (Doğan vd., 2003, 2004, 2015b; Doğan, 2005, 2007; Erman vd., 2007; Dönel ve Doğan, 2011).

### **1.6. Böcek Taksonomisinde Kullanılan Moleküler Belirteçler (Markırlar)**

Biyolojide moleküler yöntemler yirminci yüzyılın sonlarına doğru ortaya çıkmıştır. PCR temelli DNA çoğaltılması ve DNA sekans yöntemlerindeki yenilik moleküler belirteçlerin (markır) kullanılmasında etkili olmuştur (Mullis vd., 1986; Dabert, 2006). Moleküler markırlar, taksonomik gruplar arasındaki varyasyonları belirlemek üzere geliştirilmiş ve popülasyon genetiği, filogenetik gibi alanlarda etkili olarak kullanılmıştır (Dabert, 2006).

Moleküler filogenetik çalışmalarında türler arasındaki nükleotid dizilim farklılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Günümüzde DNA bölgelerinin filogenetik çalışmalara yüksek katkı sağladığı tartışmasız bir gerçektir. Fakat DNA bölgelerinin karşılaştırılmasında birtakım problemler bulunmaktadır. Organizmaları karşılaştırırken sistematik problemlerin çözümü için uygun markır ya da gen bölgesi seçimi oldukça zahmetli bir iştir. Filogenetik çalışmalarda üzerinde taksonomik araştırma yapılacak canlının genomu belirlenmiş ise ilk ve en önemli adımı uygun gen bölgesinin seçimidir. Uygun olmayan gen bölgesi ya da markır seçimi sonuçların yanlış değerlendirilmesine sebep olabilmektedir (Dabert, 2006; Hwang ve Kim, 1999).

Yüksek şekilde korunmuş gen bölgeleri, düşük popülasyon dağılımı gösteren canlılar için yapılacak araştırmalarda uygundur. Yüksek dağılım gösteren canlılar için yapılan filogenetik araştırmalar için ise oldukça fazla değişken gen bölgeleri kullanılmaktadır (Hwang ve Kim, 1999). Böceklerdeki sistematik çalışmalar sıklıkla morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya göre yapılmaktadır (Frank, 1979;

Herman, 2001). Organizmaların sadece morfolojik özelliklerine dayalı çalışmalar kimi zaman yeterli olmamaktadır. Çünkü organizmalar yaşa, cinsiyete ve farklı yaşam koşullarına bağlı olarak varyasyon gösterebilmelerinin yanında, ikiz türlerde olduğu gibi morfolojik olarak da birbirlerine son derece benzeyebilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda sınıflandırma çalışmalarında moleküler tekniklere de ağırlık verilmektedir (Frank, 1979).

Böcek taksonomisinde kullanılan moleküler markırlar, protein markırları ve DNA markırları olarak ikiye ayrılır. Protein markırları için allozim elektroforezi kullanılırken DNA çalışmaları için RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, SRAP, SCAR, CAPS ve DNA dizi analizi gibi teknikler kullanılmaktadır (Frank, 1979; Herman, 2001).

### **1.6.1. Protein markırları**

Protein markırları, DNA'nın kullanımından önce elektroforetik enzim analizleri, farklı alellerin ortaya çıkartılması, tür içi ve türler arasındaki genetik varyasyonun saptanması gibi çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Türler arasında ya da bir türün farklı popülasyonları arasındaki genetik mesafe, elde edilen alel frekanslarının analiziyle hesaplanabilir (Loxdale ve Lushai, 1998).

Allozim ve izozimler 1960 ortalarından itibaren sistematik çalışmalarda ve popülasyon genetiğinde kullanılmaya başlanan protein markırlarıdır. Allozimler, aynı gen bölgesi üzerinde farklı aleller tarafından kodlanan farklı şekilde enzimlerdir; izozimler ise farklı gen bölgeleri üzerinde yer alan genler tarafından kodlanan fakat aynı işlevi gören enzimlerdir (Hubby ve Lewontin, 1966).

Bu proteinlerin; şekil, büyüklük, elektrik yükleri birbirinden farklı olduğu için jelde farklı şekilde taşınırlar ve farklı şekilde görünürler. Bir genin farklı allellerini ayırt etmek için allozimlerin poliakrilamid jelde yürütülmesiyle elde edilen bantlar kullanılır. Yine aynı şekilde izozimlerin jelde yürütülmesi sonucu elde edilen

bantların incelenmesiyle de farklı popülasyonlar arasındaki genetik çeşitlilik saptanabilir (Gómez, 1998).

### **1.6.2. DNA markırları**

Genom üzerinde belli bir bölgeyi tarif etmek için kullanılan genetik belirteçlere moleküler markırlar denir. DNA zincirinin büyük bir kısmını ya da tek bir nükleotidini işaret edebilirler (Gülşen ve Mutlu, 2005). Bu markırlar sayesinde morfolojik olarak benzer türler hakkında kesin yargılara varılabilmektedir (Karaca vd., 2002).

DNA'ya dayalı markır sistemlerinin gelişmesiyle DNA markırlarının, protein markırlarına göre polimorfizmleri daha iyi ortaya çıkardığı görülmüştür. DNA bölgesinin intronlarında yer alan mutasyonların DNA düzeyinde protein düzeyinden daha fazla değişiklik göstermesinden dolayı DNA markırlarıyla, protein markırlarından daha fazla polimorfizm elde edildiği belirlenmiştir. Bundan dolayı DNA markırlarının kullanımı yaygınlaşmıştır. Ayrıca DNA numuneleri, proteinlere göre daha durağandır ve proteinlerden farklı olarak organizmaların bütün dokularında aynıdır. Bu yüzden DNA markırları tür içindeki ya da türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Güz ve Kılınçer, 2012).

Ayrıca seleksiyon, genom haritalama, tür tanımlanması, bireyler arası genetik uzaklığın belirlenmesi gibi durumlarda DNA markırlarından yararlanılır (Bilgin ve Korkut, 2005).

Yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar birtakım avantajlara sahiptir:

- a. Çevre şartlarından etkilenmezler.
- b. Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir.

- c. Genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotroftir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi).
- d. Her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir.
- e. Sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir.

Çağdaş moleküler biyoloji ve özellikle de DNA markır sistemlerinde ilerleme kaydedilmesi böceklerde, moleküler ekoloji çalışmalarına ait zengin teknik bilgi oluşturmuştur (Hoy, 2003). Son 15 yıldır DNA markırları böceklerde filogeni, popülasyon genetiği, gen ve genom haritalama çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır (Loxdale ve Lushai, 1998; Arbogast, 2001; Avise, 2004).

DNA markır sistemlerinin Entomolojide uygulanmaya başlanmasından sonra daha ucuz ve güçlü genotipleme için yeni teknikler geliştirilmiş, bu da entomologlara geliştirilen yeni teknikleri kullanarak daha verimli böcek genleri ile çalışmaları için imkan sağlamıştır (Behura, 2006). DNA markırları, böceklerde genetik akrabalıkların belirlenmesi, popülasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında, çalışmalara hız vermektedir. Eğer elimizdeki böcek materyali az ise ya da numuneler eski ve kuru ise bu gibi durumlarda DNA markırlarının kullanılması daha uygun olmaktadır (Loxdale ve Lushai, 1998; Hoy, 2003; Behura, 2006).

Sınıflandırma yapılırken her seviye için ayrı DNA markırının belirlenmesi mümkün değildir. Filogenetik çalışmalara ışık tutmak için birçok markır ve genlerle çalışılır fakat türler arası genetik çeşitlilik çalışmaları için yaygın olarak mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nükleer ribozomal DNA (rDNA) gen bölgeleri kullanılmaktadır (Hwang, 1999). Bu markırlar, yakın zamanda birbirinden ayrılan türlerin fenotipik değişimi ve gelişiminin genetik temelleri ve tarihi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Tümay, 2011).

#### **1.6.2.1. Hibridizasyona dayalı moleküler markır**

## **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/ Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi**

Sistematik çalışmalarda kullanılan yöntemlerden birisi olan RFLP, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi olarak adlandırılır. RFLP yönteminde DNA, ekstraksiyondan sonra uygun restriksiyon enzimleri ile kesilir ve jel elektroforezi ile kesilen DNA bantları birbirinden ayrılır. Daha sonra jeldeki DNA bir membrana aktarılarak, radyoaktif ya da radyoaktif olmayan bir prob ile işaretlenir. Bağlanmayan proplar yıkanarak elde edilen bantlar röntgen filminde ya da özel cihazlarda görüntülenir. Bu yöntem daha iyi bir çözünürlük ve daha fazla değişkenlik elde etmek için kullanılır. Ancak benzer işlemler prob kullanılmadan da yapılabilir. RFLP analizi fazla miktarda ve saflık derecesi yüksek olan DNA gerektirdiği için, küçük böcek örneklerinden her bir bireye özgü DNA'nın izole edilmesinde sorunlar yaşanabilmektedir (Güz vd., 2012).

### **1.6.2.2. PCR temelli moleküler markırlar**

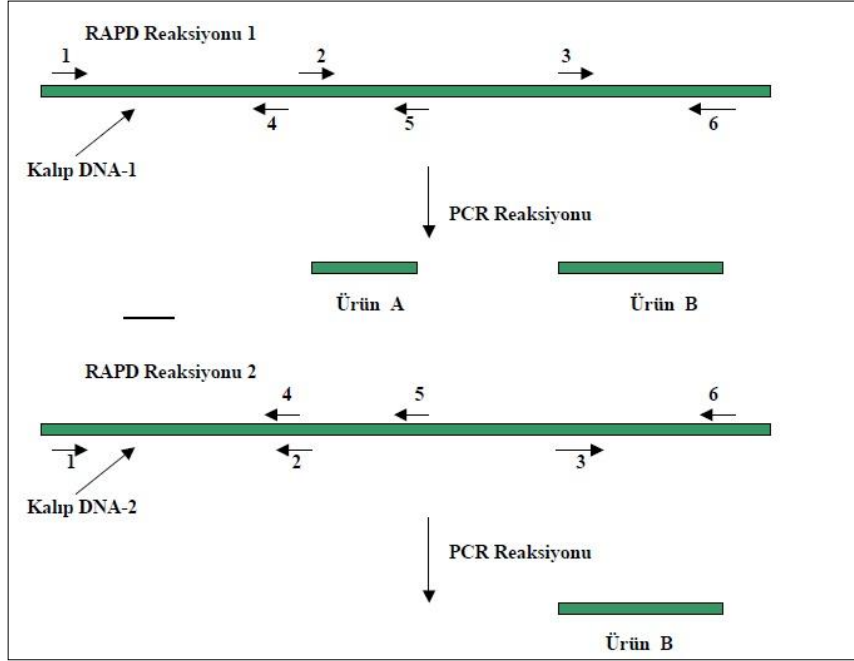
#### **1.6.2.2.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) yöntemi**

RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) genetik polimorfizmi belirleyen PCR'ı temel alan bir yöntemdir. RAPD yöntemi ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır.

RAPD fragmenleri ayırt edilerek, genetik markırlar olarak kullanılmıştır ve sonradan buna moleküler markırlar adı verilmiştir. Bu yöntemi ilk kez Williams vd. genetik polimorfizmi belirleyen, yeni bir yöntem olarak ortaya koymuşlar ve rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak ifade etmişlerdir.

RAPD yönteminin temel prensibi (Şekil 1.3) çalışılan genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, 9-10 bç oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi bir

şekilde bağlanması ve PCR ile çoğaltılmasıdır. Daha sonra elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve ürünler bantlar halinde gözlemlenir. Bantların varlığı ya da yokluğuna göre sonuçlar değerlendirilir (Aydın, 2004).



**Şekil 1.3.** RAPD Reaksiyonu şematik gösterimi (Aydın, 2004).

DNA temelli polimorfizm araştırmaları, hayvan türlerinin genetik analizlerinde ilerleme kaydedilmesini sağlamaktadır. Hayvan popülasyonlarında birbirini tamamlayıcı nitelikte olan mikrosatelit, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi farklı moleküler markırlar kullanılmakla birlikte günümüzde RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) yöntemi de kullanılmaktadır.

Rastgele seçilen primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme kapasitesi ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü doğası, RAPD yöntemini genetik uzaklık ve filogenik araştırmalar için tercih edilir kılmıştır. RAPD yöntemi kullanılarak belirlenen DNA polimorfizmi; agaroz jelde RAPD bandının varlığı veya yokluğu ile belirlenmekte ve genomda şekillenen delesyon, insersiyon veya



primerlenme bölgelerindeki ya da bölgeler arasındaki nükleotid dizilim farkını yansıtmaktadır (Aydın, 2004).

### **RAPD yönteminin aşamaları**

1. PCR işleminde kullanılacak olan primerler rastgele seçilir ve dizaynı yapılır.
2. Rasgele seçilen bu primerler kullanılarak PCR işlemi yapılır. PCR işlemi esnasında primerler DNA'nın eşlenik zincirine tutunur ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır.
3. Çoğalan bu DNA parçacıkları, agaroz jel elektroforez işlemiyle yürütülür.
4. Etidyum bromür ile boyanarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bantlar halinde görülen DNA parçacıkları değerlendirilerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir.

### **RAPD yönteminin mekanizması**

Standart bir PCR'da, her biri yaklaşık 18-25 baz uzunluğunda, DNA iplikçğine özgü primerler kullanılmaktadır. Primerlerdeki baz diziliş sıraları, hedef dizinin yan bölgelerindeki DNA dizi bilgisine dayalıdır. Ayrışarak tek iplikçğe dönüşmüş DNA kalıbındaki bu spesifik bölgelere PCR'in yapışma fazında primerler bağlanırlar ve çoğalacak bölgeleri tanımlarlar (Aydın, 2004).

RAPD yönteminin PCR aşamasında ise, rasgele dizilimdeki primerler kullanılmaktadır. Rasgele seçilmiş olan primer, RAPD'in bağlanma fazı boyunca tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanmaktadır. Farklı bir parçacığın çoğalabilmesi için her iki primerin karşılıklı iplikçiklerdeki uygun bölgede ve çoğalabilecek mesafede (yaklaşık 2500 veya daha az baz uzunluğu) bulunması gerekmektedir (Aydın, 2004).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metoduna dayalı olan bu yöntemde; rasgele dizayn edilmiş kısa oligonükleotid primerler kullanılır ve genomik DNA üzerinde belli bazı parçacıklar çoğaltılır. Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılarda (1-10 veya daha fazla) DNA parçacıklarını çoğaltma kabiliyetine sahiptir. Yani farklı primerler farklı RAPD polimorfizmleri meydana getirmektedir. Bireyler arasındaki nükleotid dizilimi farkından oluşan polimorfizm RAPD bantlarının varlığı ya da yokluğuna göre belirlenir (Aydın, 2004).

Bütün bireylerde bulunan RAPD bantları monomorfik, bazı bireylerde bulunmayanlar ise polimorfik olarak kabul edilir. 1-0 şeklinde puanlama düşünüldüğünde hepsi 1 olarak puanlanmış bireyler monomorfik özellik göstermiştir. 1-0 şeklinde puanlama ise PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ile oluşmuş bantlaşmalara göre yapılmaktadır.

Elde edilen RAPD bantlarında gözlemlenen polimorfizmlerin, genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir. Gen haritalarının çıkarılmasında RAPD bantlarının çok sayıda olması istenen bir durumdur.

RAPD polimorfizmlere, primerlenme bölgelerindeki dizi farklılığı sebep olmaktadır. Ayrıca, varyasyon oluşumunda ve nokta mutasyonlarında olduğu gibi, primer bağlayan bölgeler arasındaki alanların farklılıklarından da kaynaklanmaktadır. RAPD yöntemi, primer ve kalıp arasındaki tek baz yanlış eşleşmelerini belirlemede oldukça duyarlıdır. Bu yöntemdeki ana güçlük, sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline çok duyarlı olmasıdır. RAPD bantlarının Mendel kalıtım yolunu izlediği ve çeşitli türlerin gen haritalarının yapılmasında kullanıldığı bildirilmiştir. Buna ek olarak, RAPD tekniği ile homozigotluk ve heterozigotluk tespit edilememektedir (Devrim ve Kaya, 2006).

### **RAPD yönteminin avantajları**

- Çabuk sonuç verir.
- Ucuzdur.
- Az iş gücü gerektirir.
- Polimorfizm oranı yüksektir.
- Az ve düşük kalitede DNA örneklerinde bile sonuç verir.
- PCR reaksiyonunu gerçekleştirmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur.
- Yüksek saflıktaki DNA'dan çok miktarlara ihtiyaç yoktur.

### **RAPD yönteminin dezavantajları**

- Güvenirliliği sınırlıdır.
- PCR koşulları değiştiğinde farklı sonuçlar verebilir, hatta örneklerin saklanma koşulları bile sonuçları etkileyebilir.
- Bu yöntem genomlardaki rastgele bölgeleri çoğalttığı için iki tür arasındaki benzer büyüklükteki fragmanlar homolog olmayabilir.
- Özellikle popülasyon çalışmalarında güvenilirliği az olduğu için tercih edilmez.
- Nadir de olsa örneklerde bakteriyel kontaminasyon sonucu farklı bantlar çıkabilir.

### **RAPD yönteminden yararlanılan durumlar**

- RAPD belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi,
- Genom yapısının araştırılması,
- Çeşitli taksonomik çalışmalar,
- Evrimsel sorunlar,
- Popülasyon biyolojisi,
- Hibrit çalışmalarında,

- Genetik akrabalıkların belirlenmesinde,
- Bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi,
- Bağlantı haritalarının oluşturulması,
- Özgün bir gen lokusunun belirlenmesi,
- Adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın, 2004).

#### **1.6.2.2.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi**

AFLP yöntemi DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile elde edilen DNA parçalarının PCR aşamaları ile çoğaltılmasını temel alır. Bu yöntemde önce DNA iki restriksiyon enzimi ile kesilir, daha sonra kesilen DNA fragmanlarına adaptör olarak isimlendirilen oligonükleotidler bağlanır. Elde edilen DNA fragmanları farklı primerlerle PCR yoluyla çoğaltılır. Yapılan iki aşamalı PCR'in ilk aşamasında her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı pre-amplifikasyon yapılır. Asıl amplifikasyonda, preamplifikasyondan elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün primerler sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur. Çoğaltılan fragmanlar gümüş boyama ile jelde ya da floresan boyalar yardımıyla otomatik sekans cihazında gözlemlenir (Güz vd., 2012).

#### **1.6.2.2.3. SSR (Single Sequence Repeat/Basit Dizi Tekrarları) yöntemi**

Mikrosatellitler olarak da bilinen SSR markırları genomda tekrar edilen en küçük birimlerdir. Tekrar dizileri 1-6 bp arasında değişmektedir. Bu tekrar dizilerini çevreleyen bölgelerin dizileri biliniyorsa oraya uygun primerler tasarlanır ve PCR ile çoğaltılır. DNA replikasyonu sırasında meydana gelen dizi atlama, yanlış baz

eşleşmeleri ve eşit olmayan crossing over olayları mikrosatellit sayılarının farklılığına neden olan temel olaylardır (Matsuoka vd., 2002).

Ligasyon ve enzim kesimi gibi işlemlere gerek yoktur. PCR ürünleri jelde yürütülerek analizi yapılır (Nagaraju vd., 2002). SSR markırlar kullanılarak türler arası farklılıklar ortaya çıkarılabilir. 2-6 nükleotid sayıda gruplardan oluşan tekrarlar  $(AT)_n$ ,  $(GT)_n$ ,  $(ATT)_n$  şeklinde gösterilir ve 'n' ardışık tekrar sayısını belirtmektedir (Van Oppen vd., 2000).

SSR yöntemi, az miktarda DNA gerektirmesi, kodominant markır oluşturabilmesi, tekrarlanabilir olması ve yüksek polimorfizm göstermesi gibi avantajlara sahip olması sebebiyle popülasyon genetiği gen haritalama çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Powel vd., 1996). Bu yöntemin önemli bir dezavantajı ise mikrosatellit bölgelerinin yüksek oranda mutasyona uğramasıyla primer bağlanma bölgelerini değiştirmesi ve bunun sonucunda anlamsız allellerin oluşmasına sebep olmasıdır (Freudenreich vd., 1997).

Ayrıca SSR yöntemiyle yeni markır geliştirmek de oldukça zor olmaktadır. Çünkü yeni markır geliştirilmesi için genomik DNA kopyalarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problemlerle hibridizasyonunun yapılması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel primerlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça fazla iş gücü gerektiren bir işlemdir. Böcek popülasyonlarının genetik yapısının belirlenmesi amacıyla bazı çalışmalarda SSR ya da ISSR yöntemlerinden yararlanılmıştır (Güz vd., 2012).

#### **1.6.2.2.4. ISSR (Inter-Simple Sequences Repeats/Basit Dizi Tekrar Arası) yöntemi**

Bu yöntemde kullanılan basit DNA zincirleri, primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilir. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak şartıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı birleşimleri primer olarak aynı

reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA zincirlerinin sayısı arttırılır. Dolayısıyla da bir tek jel üzerinde üretilebilecek bant ya da markır sayısı arttırılır. Bu, diğer DNA markırlarının üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Fang vd., 1997).

ISSR yönteminde, ikili, üçlü, dördü ve beşli tekrarlanan nükleotitlere sahip primerler kullanılmakta, bu primerlerle iki mikrosatellit arası bölge çoğaltılabilmekte ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir (Zietkiewicz vd., 1994).

#### **1.6.2.2.5. SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions/Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) yöntemi**

SCAR markırları kullanılarak üretilen bantlar jel üzerinden elde edilir ve bunların 3' uçlarındaki DNA zincirleri belirlenir. Bunlar daha uzun ve daha spesifik primerler olarak PCR reaksiyonunda kullanılırlar. Böylece RAPD ve ISSR gibi markır spesifitesi düşük markırların gücü arttırılmış olur.

RAPD ve ISSR markırlarına kıyasla SCAR markırlarının tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. SCAR markırları restriksiyon enzimleriyle kesilerek kodominant markırlara dönüştürülebildiği gibi çoğunlukla dominant markırlar oluşturur (Chawla, 2002).

#### **1.6.2.2.6. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism/Çoğaltılan Sekans Polimorfizmi) yöntemi**

SRAP açık okuma alanlarını (ORF) hedef alan PCR temelli bir yöntemdir. Kullanılan forward primerler 17 nükleotitten, reverse primerler ise 14 nükleotitten oluşan çekirdek dizini ve bunu takiben 5' ucuna eklenmiş forward primerler için CCGG dizini, reverse primerler için AATT dizini içermektedir. 3' ucunda ise hem forward hem reverse primerler 3 seçici nükleotidden oluşan bir dizi

bulundurmaktadır. Forward primerler ekzonları, reverse primerler ise genellikle intronları hedef almaktadır. SRAP markırları, RAPD markırlarına göre daha yüksek oranda tutarlı sonuçlar ortaya koymaktadır ve AFLP markırlarına göre ise daha ucuz ve daha az işgücü gerektirmektedir. Ayrıca SRAP markırlarının polimorfizm oranının yüksek olması gibi bir avantajı da vardır (Li ve Quiros, 2001).

#### **1.6.2.2.7. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi) yöntemi**

Bu yöntem PCR-RFLP olarak da bilinir. Uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesini temel alır. Bunun sonucunda DNA parça uzunluk polimorfizmleri elde edilir. DNA üzerinde meydana gelen tek baz değişimleri ve insersiyon, delesyon gibi eklenme ve çıkarmalar endonükleazların tanıma bölgelerini değiştirir ve böylece farklı büyüklükte DNA parçaları oluşur. Yöntemin devamında bir veya birden fazla endonükleazla kesilen gen bölgelerine özgü PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmektedir. CAPS markırları eş baskın ve gen bölgelerine özgüdür dolayısıyla homozigot-heterozigot allel ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir (Konieczny ve Ausubel, 1993).

Kolay ve ucuz olması, düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, eş baskın allel ayrımı yapabilmesi CAPS markırlarının avantajları arasındadır. Mutasyonlar DNA'da dizi değişimlerine sebep olarak endonükleazların tanıma bölgelerini etkilemektedir ve bu da polimorfizm oranının düşük olmasına sebep olmaktadır. Birtakım dezavantajlarına rağmen CAPS markırları moleküler genetik alanında birçok çalışmada kullanılmaktadır (Weiland ve Yu, 2003).

PCR-RFLP analizi PCR yoluyla belli bölgesi çoğaltılmış DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından agaroz jelde veya poliakrilamid jelde yürütülerek polimorfik bölgelerinin saptanmasına dayanmaktadır. PCR-RFLP analizi için literatürde primer bilgisinin mevcut olmadığı durumlarda gen bankasından hedef genin dizisine ulaşılabilir.

#### **1.6.2.2.8. TRAP (Target Region Amplification Polymorphism/Hedef Bölge Çoğaltım Polimorfizmi) yöntemi**

TARP yöntemi, hedefteki aday gen bölgeleri için biyoinformatik araçlar ve EST veri bankaları kullanarak polimorfik markır üretmek için gerçekleştirilen hızlı, etkili ve PCR temelli bir yöntemdir (Hu ve Vick, 2003). Bu markırlar iki tip 18 nükleotit uzunlukta primerler kullanılarak üretilir. Primerlerden biri veri bankasındaki EST dizilerine göre tasarlanmış sabit primerdir. Diğeri ise AT ve GC oranı bakımından zengin, ekzon ve intronları hedef alan primerdir. Bu yöntem, ıslah çalışmalarında kullanılan ve belli gen bölgelerine özgü genetik markırların üretilmesinde kullanılmaktadır (Hu vd., 2005).

### **1.7. PCR Yöntemi**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), in vitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir.

#### **1.7.1. PCR yönteminin aşamaları**

PCR işlemi üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama ayrılma (denatürasyon) DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılmasıdır, ikinci aşama olan bağlanmada (annealing) primer kopyalanmak istenilen bölgenin karşılığı olan yere yapışır. En son aşama uzamada (ekstensiyon) ise Taq polimeraz enzimi ortamda bulunan nükleotidleri karşılıklarına uygun olarak birbirine ekler. Böylece iki diziden dört dizi oluşmuş olur. Bu döngü 30-45 arasında tekrarlanır ve  $2^n$  sayıda DNA dizisi geometrik olarak çoğaltılmış olur (Sambrook ve Russel, 2006).

##### **1.7.1.1. DNA zincirinin açılması (Denaturasyon)**



Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir.

#### **1.7.1.2. Primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması (Annealing)**

Reaksiyon sıcaklığı, 37-65 °C'ye düşürülür ve oligonükleotid primerler açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlanır. Bu işlemin süresi, üretilen baz uzunluğuna bağlı olarak değişir.

#### **1.7.1.3. Primer uzaması (Ekstensiyon)**

Taq DNA polimeraz kalıp DNA'ya uygun bazları eşleştirir ve aralarında fosfodiester bağı oluşturur. Böylece zincir uzaması gerçekleşir.

Taq DNA polimeraz 72 °C'de en iyi çalıştığı için amplifikasyon bu sıcaklıkta gerçekleştirilir. PCR sonucu elde edilen çoğaltma ürünü hedeflenen DNA parçası ve iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi vd., 1995).

Sonuçta elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile yürütülür ve sonrasında fleurosyan bir boya olan etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak görüntüleme cihazında değerlendirilir.

### **1.7.2. PCR optimizasyonu**

PCR teknolojisinin gelişmesiyle çok çeşitli PCR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PCR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuvarında yeniden ayarlanması gerekmektedir. Eğer PCR şartları yeni PCR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemler meydana gelmektedir.

Bu problemler;

1. PCR'dan beklenen ürün ya az alınabilir ya da hiç alınmayabilir.
2. Primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
3. Primerler yanlış şekilde uzayabilir.
4. Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatabilir.
5. Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon görülebilir veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.

### 1.7.3. PCR çalışma şartlarını etkileyen faktörler

1. Enzim Konsantrasyonu
2. Magnezyum Konsantrasyonu
3. Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotide Triphosphates=dNTPs)
4. Diğer Reaksiyon Unsurları
5. DNA Zincirinin Açılması İçin Gerekli Zaman ve Sıcaklık
6. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması
7. Primer Uzunluğu, Konsantrasyonu ve Yapısı
8. Primer uzaması
9. Devir sayısı (Yılmaz ve Devran, 2003).

### 1.7.4. PCR bileşenleri

**1. Primer:** Çoğaltılmak istenen bölgenin ucundaki DNA dizisini spesifik olarak tanıyıp bağlanan ve çoğaltılacak olan bölgeyi sınırlayan 10-30 nükleotid uzunluğunda sentetik DNA parçasıdır. Primerler organizma genomunun belli bölgelerine bağlanmaya uygun olarak hazırlanır. Seçilen primerlerin uygun olup olmaması ürün spesifikliğinde oldukça etkilidir. Primerler liyofilize halde gelir ve DNaz ve RNaz içermeyen ultra saf su ile 10 veya 50 pmol/μl olacak şekilde sulandırılır. Kullanılana kadar aliquetlere ayrılarak -20 °C'de saklanır.

**2. dNTP karışımı:** Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlarından oluşmaktadır. dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, TTP içermektedir.

**3. DNA polimeraz:** PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80 °C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'=>3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Taq polimeraz genellikle 5 U/μl konsantrasyonda gelir ve -20 °C'de saklanır.

**4. MgCl<sub>2</sub>:** Taq DNA polimeraz MgCl<sub>2</sub> varlığında etkindir. MgCl<sub>2</sub>'ün PCR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg<sup>+2</sup> iyon konsantrasyonu ortamda aktif dNTP miktarı az olduğu için zayıf ürün oluşumuna sebep olmaktadır. Yüksek Mg<sup>+2</sup> iyon konsantrasyonu ise bütün dNTP'lerin reaksiyona girme yatkınlığını artırdığından dolayı spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır (Sambrook ve Russel, 2006).

### 1.8. Agaroz Jel Elektrofrez

Jel elektrofrez, elektrik varlığında hareketlenen moleküllerin jel boyunca karşıya hareket ettiği ve makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler bakımından ayıran bir yöntemdir. Elektrofrez terimi yüklü parçacıkların elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır. Elektrofrez için gerekli güç, jelin iki ucunda bulunan elektrotlara uygulanan voltajdır. Bir elektrik alanının bir molekülü hangi hızla jel ortamında hareket ettirdiği, molekülün özelliklerine bağlıdır.

Birçok önemli biyolojik makromolekül (örn. amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak çözeltide katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak, yüklü parçacıklar katoda veya anoda

doğru hareket edecektir. Örneğin, elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da ise, DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anota doğru hareket eder (Somma ve Querci, 2006).

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Teknik basit, hızlı ve diğer prosedürlerle ayrıştırılmayan DNA fragmanlarını çözebilme yeteneğindedir. Ayrıca DNA'nın jeldeki konumunu, düşük konsantrasyonlarda floresan ışımaya yapan etidyum bromür ile boyayarak belirlemek mümkündür (Sambrook vd., 1989).

### 1.9. Genetik Polimorfizm

Herhangi bir ürünün sentezi için gerekli bilgiyi içeren ve DNA molekülü üzerinde bulunan belli nükleotid bölgesine gen adı verilir. Heliks şeklinde bir yapı olan insan DNA'sı yaklaşık  $3 \times 10^9$  baz çiftinden oluşur ve 23 çift kromozom içerisinde 30,000'den fazla gen bulundurur. İki insan arasındaki DNA'nın yaklaşık %99,9'u benzerdir ve insanlar arasındaki farklılıklara DNA baz dizilişindeki küçük değişiklikler sebep olmaktadır (Gonzalez, 1999).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile bir akar türü olan *Ixodes scapularis* türünün 15 kromozomunun bulunduğu tespit edilmiştir. Bu canlının genom büyüklüğü 502,56 Mbç, GC oranı %45,5, genomdaki protein çeşidi 5832 gen sayısı 7,137 olarak bilinmektedir (Ayllón, 2015).

Farklı yerlerdeki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerdir. Bir popülasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti farklılık içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan farklı kopyalarından her birine allel denir. İtronlarda ve genler arasında sınırlandırılmış DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller bulunur. Kodlanan dizi farklılıkları, protein çeşitliliğini ve farklı fenotiplerin ortaya çıkmasını sağlar (Strachan, 1999). Normal bir popülasyonda bir karakter için

iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve fenotiplerden her biri popülasyonda %1'den daha fazla sıklıkta ise bu duruma genetik polimorfizm, bulunma sıklığı %1'den daha azsa genetik mutasyon adı verilir. Polimorfizmler, zararsız ya da ılımlı mutasyonlar olarak tanımlanabilirler (Gonzalez, 1999).

Mutasyon, DNA diziliminde meydana gelebilen küçük değişikliklerdir. Bunlar tek bir baz değişikliği şeklinde ortaya çıkar ve bu durumda bir kodonu tanımlayan üç bazdan biri değişir yani bir proteine farklı bir amino asit eklenir. Bazı durumlarda, DNA diziliminde mutasyon, söz konusu proteinin aktivitesini ciddi bir şekilde değiştirmek için yeterlidir. Diğer DNA mutasyonları ise, çok sayıda baz üzerinde etkili olabilir ve bu durumda genomdan birkaç gen içeren bir DNA parçası kopar; ya da bu DNA parçası genomda başka bir yere yerleşir ve bitişik olmayan DNA parçalarının birleşmesiyle oluşan yeni genler oluşarak yeni farklı proteinlerin sentezlenmesine sebep olur. Büyüklükleri ne olursa olsun, bu şekilde meydana gelen değişiklikler “genetik değişimler” ya da “mutasyonlar” olarak adlandırılır. Mutasyonlar; kromozom yapısının değişmesi, kromozom sayısının değişmesi ve tek baz değişimi yani nokta mutasyonları olmak üzere üç farklı şekilde meydana gelebilir (Gonzalez, 1999).

Göç (migrasyon), allellerin popülasyonlar arasında hareketini yani gen akışını ifade eder. Bu anlamda bir popülasyonun gen havuzundan diğer bir popülasyonun gen havuzuna allel transferi söz konusudur. Gen akışı mekanizmaları, genç hayvanların ara sıra yaptıkları uzun mesafeli göçlerden, rüzgâr, su veya hayvanlar aracılığı ile polen, tohum ve sporların taşınmasına kadar çok çeşitli şekillerde meydana gelebilir. Popülasyonlar arasındaki gerçek göç miktarı (allel olarak) bireylerin yayılış kabiliyetinin ne kadar yüksek olduğuna ve ne kadar hareketli olduklarına bağlı olarak değişir (Gonzalez, 1999).

Tamamen rastgele olan ve seçilimsel olmayan evrimsel mekanizmalardan birisi olan genetik sürüklenme (genetik drift) allel frekanslarında değişmeye sebep olmasına rağmen adaptasyona yol açmaz. Hardy-Weinberg prensibine göre genetik

sürüklenme, popülasyonun sonsuz büyüme koşulunun bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Genetik sürüklenme özellikle küçük popülasyonlar için önemlidir (Gonzalez, 1999).

Seleksiyon (doğal seçim), tüm bireylerin hayatta kalabilirliklerinin aynı olduğu ve gen havuzuna eşit sayıda katkıda buldukları koşulunun bozulması sonucu ortaya çıkar. Burada önemli olan ve doğal seçilime asıl sebep olan bireylerin farklı üreme başarısıdır. Yani bazı bireyler diğer bireylere göre daha fazla dölle sahiptir ya da daha yüksek oranda üreme yaşına kadar hayatta kalabilirler. Bir diğer ifadeyle, bireyler arasında hayatta kalma ve üreme oranı farklılığı olarak tanımlanır. Doğal seçim, geniş popülasyonlarda allel frekanslarını değiştiren en önemli etkidir ve evrimsel değişikliklerin en önemli faktörlerinden birisidir (Strachan, 1999).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda, sistematik çalışmalarda morfolojik karakterlerin kullanımının yanında türlerin tanılarında kullanılmak üzere moleküler belirteç sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar protein ve DNA belirteçleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. DNA belirteçleriyle protein belirteçlerine göre daha fazla polimorfizm elde edildiği saptanmıştır. Bunun temel nedeni DNA bölgesinin intronlarında yer alan mutasyonların, DNA seviyesinde protein seviyesinden daha fazla değişiklik göstermesidir. Ayrıca DNA örnekleri proteinlere göre daha stabildir. Bu sebeple DNA belirteçleri türler arasındaki genetik farklılığın ölçümünde yaygın hale gelmiştir. Moleküler yöntemlerden biri olan RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) DNA belirteçlerinin kullanıldığı güvenilir ve güncel bir yöntemdir (Güz vd., 2012).

Güz vd. (2012) göre DNA'nın polimorfik dizilerinin karşılaştırılmasının önemli bir akrabalık tespit yöntemi olduğu belirtilmiştir.

Malezya'dan toplanan *Apis cerana* koloni örnekleri ile Kaliforniya, Teksas ve Almanya'dan toplanan *A. mellifera* kolonisinin *Varroa jacobsoni* örnekleri RAPD tekniği ile karşılaştırılmıştır. Monomorfik bantların büyük yüzdesi parazit popülasyonlar arasında ve popülasyon içinde düşük genetik çeşitlilik göstermiştir. Kaliforniya ve Teksas'tan toplanan akarları ayırmak mümkün olmamasına rağmen Amerika'dan toplanan akarlar Almanya'dan toplanan akarlardan belirli 3 markır ile ayırt edilebilmiştir. Çalışmada ergin dişiler kullanılmıştır (Kraus ve Hunt, 1995).

Brennan vd. (2008), siyah üzümdeki gal akarlarına özgül olarak bağlanabilen primerler kullanılan PCR temelli bir belirtecin geliştirilmesi üzerinde araştırmalar yapmıştır. DNA belirteci olarak AFLP (Amplified fragment length polymorphism) primerleri ile çalışılmıştır (Brennan vd., 2008).

Matioli vd. (2009), Brezilya'nın Minas Gerais eyaletinde ve Vicosa'daki narenciye bahçelerinde bulunan *Agistemus pallini* türleri arasındaki genetik benzerliği araştırmıştır. Stigmeidlerden *Agistemus* cinsi üyeleri için sadece morfolojiye dayalı kimlik saptama oldukça zordur. Bundan dolayı, bu çalışmada bahsi geçen popülasyonun genetik benzerliğini karşılaştırmak için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır (Matioli vd., 2009).

Radwell vd. (2010) tarafından DNA sekans verileriyle desteklenmiş morfolojik analizlere bağlı yeni bir su akarı türü olan *Kongsbergia robisoni* Kuzey Amerika'nın iç dağlık bölgelerinden tanımlanmıştır. İç dağlık bölgeler de dahil üç ekolojik bölgeden elde edilen popülasyonlar, bilinen diğer *Kongsbergia* türlerinden farklı ve biri diğeriyle morfolojik açıdan benzer bulunmuştur (Radwell vd., 2010).

*Oryctes agamemnon* Burmeister ile ilişkili foretik akarların tespiti ve RAPD-PCR ile genetik profillerini çıkarmak üzere yapılan çalışmada 9 tane rastgele primer kullanılmıştır. Araştırmacılar primerlerin aynı seti tarafından üretilen aynı profile sahip akarların aynı foretik akar türüne ait olması gerektiğini savunmuşlardır (Al-Deep ve Enan, 2010).

Kwon vd. (2011) morfolojik ve moleküler karakterlere göre türlerini doğrulayıcı yöntem ve akarısitelerle karşı duyarlı bir *Tetranychus urticae* nesli oluşturulması üzerine çalışmışlardır. Bunun için öncelikle morfolojik karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Daha sonra ise moleküler karakterizasyon için hem ergin dişilerden genomik DNA izole edilmiş hem de mitekondriyal sitokrom oksidaz alt ünitesi 1 geninin PCR ile amplifikasyonu yapılarak bu bireylerin farklılıkları ortaya konulmuştur (Kwon vd., 2011).

Bryon vd. (2013) fakültatif reproduktif diyapoz evresindeki iki noktalı kırmızı örümcek akarı *Tetranychus urticae*'nin real-time PCR ile gen ekspresyon analizini çalışmışlardır. Diyapoz veya gelişimin durması akarın elverişsiz şartlarda hayatlarını devam ettirmesini sağlayan bir adaptasyondur. Diyapoz bir dizi fizyolojik,



morfolojik ve moleküler modifikasyonlara yol açar. Moleküler seviyede diyapoz az çalışılmıştır fakat *Tetranychus urticae* reproduktif fakültatif diyapoz sergileyen ciddi bir bitki zararlısıdır. Diyapoz evresindeki hayvanlar turuncu renk alırlar, beslenmeyi durdururlar ve yumurta bırakmazlar.

Yabsley vd. (2013) beyaz kuyruklu geyikten elde edilmiş *Demodex* türlerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Dört *Demodex* türü için Ulusal Biyoteknolojik Bilgi Merkezinden (National Center for Biotechnology Information) genetik bilgi almışlardır. Moleküler kıyaslama için RAPD-PCR tekniğini kullanmışlar ve sekans analizi yapmışlardır. Bu araştırma sonucu bu *Demodex* türleri için polimorfik yakınlığı belirlemişlerdir (Yabsley vd., 2013).

Que vd. (2014) *Aleuroglyphus ovatus*'un mitekondriyal genomundaki bütün gen dizileri üzerinde dizi analizi yapmışlardır. *A.ovatus*'un mitokondriyal genom sekansını seçilen özgün primerler ile PCR yaparak gerçekleştirmişlerdir. Çalışılan canlının bütün mitokondriyal genomunun 14,305 bç uzunlukta olduğu belirlenmiştir. Bunlardan; 13 gen protein, 2 gen rRNA ve 22 gen ise tRNA ifadesi sağladığı bildirilmiştir (Que vd., 2014).

Lv vd. (2014) *Ixodida* türlerinin tanımlanması için dört DNA parçasını (CO1, 16S rDNA, ITS2 VE 12S rDNA) değerlendirmişlerdir. Sitokrom oksidaz 1'in 5' ucu DNA barkodlamada standart bir belirteçtir. Ancak bazı türlerin ve bazı taksonların tanımlanmasında sitokrom oksidaz 1'in kullanımının sınırlı olduğu kanıtlanmıştır ve kodlama dizisinin PCR ile etkin bir şekilde çoğaltılamadığı bildirilmiştir (Lv vd., 2014).

Literatür bilgileri ışığında; *E. erciyesiensis*'in farklı popülasyonları arasındaki DNA polimorfizmlerinin kıyaslanmasına dayalı bir moleküler çalışmanın önemli ve gerekli olduğu söylenebilir. Literatürde görüldüğü üzere, canlıların sadece morfolojik olarak sınıflandırılması yeterli olmamaktadır. Çalışmanın, ülkemizdeki moleküler sistematığın gelişmesine nispeten katkıda bulunacağı söylenebilir. Diğer taraftan,

daha önce *Eustigmaeus* türleri ile ilgili moleküler temelli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla literatürdeki eksikliğin görece giderilmesi ümit edilmektedir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmanın ana materyali *Eustigmaeus erciyesiensis*'dir. Erzincan ili Ahmediye ve Ekşisu alanlarından toplanmıştır.

##### 3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Işık Mikroskobu	:	Olympus BX63 (Şekil 3.3)
Stereo Mikroskobu	:	Leica EZ4
Soğutmalı santrifüj	:	Hanil
Spektrofotometre	:	Perkin Elmer
pH metre	:	Radiometer meterlab PHM 210
Elektroforez tankı	:	Thermo
Karıştırıcı (Vorteks)	:	Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	:	Shimadzu
Otomatik pipet	:	Eppendorf
Çalkalayıcı	:	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	:	Heidolph
Saf su cihazı	:	Nüve
Kar makinesi	:	Scotsman AF-20
Güç kaynağı	:	Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	:	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	:	Ariston
Mikrodalga fırın	:	Arzum
Otoklav	:	Sümer SM3
Jel görüntüleme cihazı	:	Vilber Lourmat
PCR Cihazı	:	Bio-Rad

### **3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler**

#### **3.1.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler**

Qiagen DNeasy Tissue Kit kullanılmıştır.

#### **3.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda kullanılan kimyasal maddeler**

25 mM dNTP (Fermantas), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermantas), 10 X Taq Polimeraz Tamponu (Fermantas), 5 u/μl Taq polimeraz (Fermantas), Oligonükleotid Primerler (Biolegio, Research Genetics) tampon ve çözeltileri kullanılmıştır.

#### **3.1.2.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler**

Agaroz (Prona), Tris base (Sigma), EDTA (Sigma), Bromfenol mavisi (Sigma), Ethidyum bromürdür (Sigma).

### **3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**

**Ethidium bromür çözeltisi:** 500 ml 0,5x TBE (Tris-borat-EDTA) tamponu içerisine 300 μl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

**Bromfenol blue çözeltisi:** 0,25 g bromfenol blue, 0,25 g ksilen siyanol FF ve 30 ml gliserolün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

**1x TBE tamponu:** Stok TBE tamponu 10x olarak hazırlanmıştır. 10x TBE için 108 gr Tris, 55 gr borik asit 750 ml destile suda çözülerek saf HCL ile pH= 8,0'a titre

edildikten sonra, 4,65 gr EDTA eklenmiştir ve toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Yaşama alanlarının tanımı**

#### **3.2.1.1. Ekşisu**

*E. erciyesiensis* için uygun bir yaşama alanı niteliğindeki Ekşisu Sazlığı Erzincan Ovası'nın kuzey doğusunda ve Erzincan il merkezinden 11 km uzaklıkta yer alır. Alan fay kırıklarından yüzeye ulaşan tatlı, sodalı ve kükürlü su kaynakları tarafından beslenmektedir. Alanın kuzeyinde Keşiş Dağları, güneyinde ise Erzincan-Erzurum karayolu bulunmaktadır (Özhatay, 2006).

Alanın Kuzey bölümü tuzlu, sodalı özellikte aşırı miktarda su bulundurduğu için tarıma uygun toprak özelliği taşımamaktadır. Bunun yanında doğu ve güney kesiminde mevsimsel sulak çayirlara rastlanmaktadır. Fakat bu alanda aşırı otlatmadan dolayı bitki örtüsü tahrip olmuştur. Alanın kısmen güneyinde olmak üzere batı ve kuzeybatı bölümlerinin açılan kurutma kanalları ile ekolojik ortamlarında bozulmalar olmuş ve bu kesimlerde tuzlaşma ve çoraklaşma görülmüştür. Alanın güney kısmında arkeolojik sit alanı olarak koruma altında olan Saztepe ve Altıntepe isminde iki höyük bulunur (Özhatay, 2006).

#### **3.2.1.2. Ahmediye**

Erzincan Ovası'nın kuzeyinde, şehir merkezinin kuzeybatısında, Erzincan'ı Kelkit'e bağlayan karayolunun 34. km'sinde Ahmetli köyü bulunmaktadır. Yerleşmenin eski adı Ahmediye'dir ve sınırları içerisinde, köy yerleşim alanının güneydoğusunda bir göl bulunmaktadır. Göl için, yerleşmenin eski isminden esinlenilerek Ahmediye

Gölü adı verilmiştir. Erzincan ovasını Kelkit'den ayıran dağlık kütleinin güney yamacında bulunan Ahmediye Gölü'nün kuzeyinde Sarıbaba Tepe (2213 m) bulunmaktadır. Kuzeybatısında Küçükkop Tepe (2016 m), güneyinde ise Alagöl Tepe (1853 m) bulunur. Gölün güneyinde Davarlı köyü, güneydoğusunda Dereyurt ve Yalnızbağ köyleri bulunmaktadır (Özdemir vd., 2006).

Araştırma sahası, bitki örtüsü bakımından çayır katı ile step türlerinin yayılış alanı içinde kalmaktadır. Buna ilaveten Ahmediye Gölü kıyılarında ve göl içerisinde yüzer halde bulunan adada çeşitli cinslerde sulak alan bitkileri yetişme ortamı bulmuştur (Özdemir vd., 2006).

Çimen, Karadağ, Akdağ, Kazdağı ve Esence gibi Erzincan ve Kelkit depresyonlarını ayıran dağlık silsile üzerinde gelişmiş aşınım sathına tekabül eden kesimde Ahmediye Gölü oluşmuştur (Özdemir vd., 2006).

Ahmediye Gölü 1900 m yükseltide, heyelanın enine yarıklarında suların birikmesi sonucu oluşmuştur. Göl seviyesinin yüksek olduğu dönemlerde yaklaşık 3000 m<sup>2</sup>. yüzölçüme ulaşan göl alanının yaz mevsiminde 2000 m<sup>2</sup>'ye kadar daraldığı, çevresindeki bataklık alandan anlaşılmaktadır. Gölün çevresi 245 m kadardır. Derinliği ise 3 m ile 8 m arasında değişmektedir. Su seviyesinin yüksek olduğu dönemlerde su seviyesini sabit tutmak amacıyla gölün güney kesimine açılan bir arka göle müdahale edilmiş, bu durum göl yüzeyindeki yüzenadanın hareketine olumsuz bir etki yapmıştır (Özdemir vd., 2006).

Erzincan havzasının kuzeyinde, ovaya dönük yamaçta 1800-2200 m yükselti kuşağında yer alan Ahmetli köyünün yıllık ortalama sıcaklığının, yapılan enterplasyonla 5,5 °C kadar olduğu söylenebilir. Her mevsim yağış almakla birlikte en fazla yağışın ilkbahar (%37) ve kış mevsiminde (%26) görüldüğü Erzincan'da yıllık ortalama yağış tutarı 366 mm'dir. Ancak Ahmetli köyü, yükseltisinin fazla olması ve bakı şartları dolayısıyla 700 mm tutarında yağış almaktadır. Yağış ve sıcaklık değerlerine göre, inceleme alanında karasal özellikte iklim şartlarının hüküm

sürdüğü görülmektedir. Toprak özellikleri bakımından Ahmetli köyü dolaylarında iklim ve anakayanın etkisiyle zonal ve intrazonal topraklar gelişmiştir (Özdemir vd., 2006).

Arazi çalışmaları için Ahmediye ve Ekşisu alanları seçilmiştir. Çünkü bu alanlar *E. erciyesiensis* için uygun yaşam alanlarıdır.

### **3.2.2. *Eustigmaeus erciyesiensis* örneklerinin toplanması**

Arazi çalışmaları, kışı temsilen; Ocak-Şubat-Aralık, ilkbaharı temsilen; nisan-mayıs, yazı temsilen Haziran-Temmuz ve sonbaharı temsilen Eylül-Ekim aylarında yapılmıştır. Aynı ortamda yılın belli bir döneminde bulunmayan akarlar başka bir dönemde bulunabilmektedir. Bu nedenle örnekleme süresi bir yıla yayılmıştır. Belirtilen aylarda her iki bölgede de farklı yaşam alanlarından örnekler toplanmıştır. Gerekli olduğu düşünüldüğü durumlarda aynı ay içinde birden fazla kez araziye gidilmiş ve tekrar örnekleme yapılmıştır. Erzincan'ın Ahmediye ve Ekşisu bölgelerinde, özellikle su kenarlarından ve çalışma alanını iyi temsil edecek şekilde farklı yerlerden örnekler alınmıştır. Örneklerin alındığı yerlerin yükseklik ve koordinatları GPS (küresel yer belirleme sistemi alıcısı) cihazı ile kayıt edilmiştir.

Üzerinde çalışılan popülasyonların toplandığı yerler aşağıda verilmiştir. Bundan sonra popülasyonlar aşağıda verilen rakamlarla anılacaktır.

1. Ahmediye, 39° 52' 54'' K, 39° 29' 19'' D, 2012 m, su kenarı yosun, 23.10.2013.
2. Ahmediye, 39° 52' 54''K, 39° 20' 19'' D, 2012 m, kaya üstü yosun, 23.10.2013.
3. Ağılözü Köyü, 39° 52' 47'' K, 39° 20' 16''D, 1975 m, nemli yosun ve çimen, 23.05.2014
4. Ahmediye, 39° 52' 54'' K, 39° 29' 19'' D, 2012 m, kaya üstü yosun, 16.07.2014
5. Ahmediye, 39° 52' 54'' K, 39° 29' 19'' D, 2012 m, su kenarı çimen ve yosun, 08.05.2014

6. Ahmediye, 39° 52' 54'' K, 39° 29' 19'' D, 2012 m, su kenarı yosun,04.11.2014
7. Ahmediye, 39° 52' 54'' K, 39° 29' 19'' D, 2012 m, bol sulu su kenarı çimen, 04.11.2014
8. Ekşisu, 39°43'48''K, 39°37'36''D, bataklık üzeri çimen ve yosun, 31.12.2013
9. Ekşisu, 39°43'48''K, 39°37'36''D, çimen ve yosun, 25.02.2014
10. Ekşisu, 39°43'37''K, 39°37'47''D, sulu yosunlu toprak, 14.06.2014
11. Ekşisu, 39°43'34''K, 39°37'24''D, tatlı su kenarı yosun, 07.05.2014
12. Ekşisu, 39°43'48''K, 39°37'36''D, bataklık üzeri yosun, 31.01.2014
13. Ekşisu, 39°44'14''K, 39°36'48''D, kükürtlü su üstü çimen ve yosun, 25.02.2014
14. Ekşisu, 39°43'41.2''K, 39°37'32.8''D, nemli yosunlu toprak, 04.07.2013
15. Ekşisu, 39°43'44''K, 39°37'33''D, bataklık üzeri çimen ve yosun, 19.11.2013
16. Ekşisu, 39°43'48''K, 39°37'36''D, bataklık üzeri çimen ve yosun, 31.01.2014
17. Ekşisu, 39°44'14''K, 39°36'48''D, kükürtlü su üstü yosun, 31.01.2014

Tez konusu olan *Eustigmaeus erciyesiensis* türü çıplak gözle ayırt edilemediği için Berlese düzeneği ile elde edildi. Araziden alınan toprak, çimen ve yosun örnekleri naylon torbalara konularak etiketlenip laboratuvara getirilerek birleştirilmiş Berlese hunilerinden oluşan ayıklama düzeneğine (Şekil 3.1) yerleştirildi. Bu düzenek; 40 cm derinliğinde, 30 cm çapında olan ve bir huni ile bunun üzerine konulan gözenek çapı 2 mm olan bir elek ve bunun da üzerine yerleştirilen 15 Watt'lık lambalardan oluşan bir ışık kaynağından ibarettir.



**Şekil 3.1.** Akar ayıklama düzeneği.



Işık kaynağı materyalin nemlilik durumuna göre 5-7 gün süreyle açık bırakıldı. Berlese hunilerinin alt tarafına yerleştirilen ve içinde %70'lik etil alkol içeren toplama şişelerine biriktirilen akarlar petri kaplarına boşaltıldıktan sonra stereo mikroskop (Şekil 3.2) altında pipet ve iğneler yardımıyla ayıklandı.



**Şekil 3.2.** Ayıklamanın yapıldığı stereo mikroskop.

Ayıklanan *E. erciyesiensis* örneklerinden Hoyer ile daimi preparatı oluşturulmuş daha sonra ışık mikroskobu altında morfolojik incelemeler yapılarak fotoğraflandı (Şekil 1.2).



**Şekil 3.3.** Morfolojik inceleme ve fotoğraflamada kullanılan ışık mikroskobu.

### 3.2.3. *Eustigmaeus erciyesiensis*'den DNA saflaştırılması

#### 3.2.3.1. *Eustigmaeus erciyesiensis* örneklerinin temizlenmesi

Alkolün varlığında DNA istemediğimiz anda çökebilir. Bunu engellemek için etanolün uzaklaştırılması gerekir. Bunun için örnekler 60 °C'de 2 saat boyunca etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından akar üzerindeki safsızlıkların uzaklaştırılması için örnekler steril saf su ile 3'er defa yıkandı. Ardından ön homojenizasyon işlemine geçildi.

#### 3.2.3.2. Ön homojenizasyon

Steril saf su ile 3 defa yıkanan örnekler Whattman kağıdı yardımı ile kurutuldu. Kurutulan örnekler sıvı azot yardımı ile -196 °C'de havan ile (Şekil 3.4) ezilerek homojenize edildi. Sıvı azotla homojenizasyonun ardından ultra toraks yardımıyla daha ince parçacıklara ayrılarak DNA saflaştırma aşamasına geçildi.



Şekil 3.4. Ön homojenizasyon işlemi.

#### 3.2.3.3. DNA saflaştırılması

DNA saflaştırılmasında Qiagen DNeasy Tissue Kit kullanıldı (Radwell vd., 2010). DNA saflaştırma kitinin protokolü aşağıda maddeler halinde verildiği şekildedir.

1. Havan kullanılarak sıvı azot ile hayvanlar parçalandı. Canlı iyice toz haline gelene kadar ezildi. Toz haline gelen canlı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 180 µl ATL tamponu eklendi.
3. Üzerine 20 µl proteinaz-K eklendi ve iyice vortekslendi. Daha sonra 56 °C'de 3 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyondan sonra 15 sn vortekslendi. Üzerine 200 µl AL tamponu konuldu. Homojen olana kadar 5 sn aralıklarla vortekslendi. Üzerine 200 µl etanol eklendi ve ardından 5 sn vortekslendi.
5. 4. adımda elde edilen karışım altında 2 ml toplama tüpü olacak şekilde mini spin kolona aktarıldı. Yaklaşık 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından toplama tüpü atıldı.
6. DNeasy mini spin kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirildi. Üzerine 500 µl AW1 tamponu eklendi. Yaklaşık 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından toplama tüpü atıldı.
7. DNeasy mini spin kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirildi. Üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Sonra toplama tüpün içindeki sıvı döküldü. Aynı tüp takılarak 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu işlem ile etanol uzaklaştırılmış oldu. Santrifüj sonrası tüp atıldı.
8. DNeasy mini spin kolon 1,5 ya da 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Tam ortasına gelecek şekilde 200 µl AE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından yaklaşık 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. DNeasy mini spin kolon atıldı. Böylece DNA izole edilmiş oldu.
9. Maksimum DNA verimi için mini spin kolon atılmadan önce 8. adım tekrarlanabilir.
10. Saflaştırılan genomik DNA kullanım miktarına uygun olarak alikütlere ayrılarak -25 °C'de muhafaza edildi.

#### **3.2.3.4. DNA konsantrasyon tayini**

DNA konsantrasyon tayini için Mikrohacim Spektrofotometre cihazı kullanıldı. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

1. Take 3'ün A1 ve B1 kolonlarına kör olarak 2'şer µl TE tamponu ( 10 mM Tris 1mM EDTA ) konuldu.
2. Take 3'ün A2 B2 A3 B3 A4 B4 kolonlarına sırasıyla 2'şer µl analizi yapılacak DNA numuneleri konuldu.
3. Take 3'e yerleştirildi.
4. Öncelikle A1 ve B1 kolonları seçilerek kör okutuldu. Daha sonra numunelerin olduğu kolonlar seçilerek numuneler okutuldu.
5. Sonuçta ng/µl cinsinden DNA konsantrasyon değerleri elde edildi.

#### **3.2.4. İzole edilmiş DNA'ların PCR ile çoğaltılması**

##### **3.2.4.1. RAPD-PCR yöntemi**

Arbitrary primed PCR (AP-PCR) olarak da adlandırılan Random Amplified Polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)-PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) (RAPD-PCR), genomik DNA'nın rastgele seçilmiş bir veya daha fazla primer ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C bakımından zengindir (En az %40 mol G+C içermelidir). Kısa primer, analizi yapılacak DNA kalıbının her iki zincirinin de farklı yerlerine yapışabilir. Reaksiyon sonucunda, bu farklı yapışmalardan dolayı farklı uzunluklarda ürünler ortaya çıkar. Analizi yapılan genomik kalıplar arasında farklılıklar varsa primerlerin yapışma yerleri değişeceğinden agaroz jel üzerinde farklı büyüklükte bantlar görülecektir (Terzi, 2008).

##### **3.2.4.2. RAPD primerleri**

Çalışmada kullanılan RAPD primerleri (Çizelge 3.1), rastgele seçilmiş 10 bazlık primerlerdir. Bu çalışmada toplam 12 primer kullanıldı.

**Çizelge 3.1.** Primerler ve baz dizileri.

<b>Primerler</b>	<b>Baz Dizileri</b>
OPAA08	5'-TCC GCA GTA G-3'
OPAA19	5'-TGA GGC GTC T-3'
OPAB01	5'-CCG TCG GTA G-3'
OPAB05	5'-CCC GAA GCG A-3'
OPAB18	5'-CTG GCG TGT C-3'
OPAC09	5'-AGA GCG TAC C-3'
OPAC17	5'-CCT GGA GCT T-3'
OPAC19	5'-AGT CCG CCT G-3'
OPAD10	5'-AAG AGG CCA G-3'
OPAE09	5'-TGC CAC GAG G-3'
OPAE12	5'-CCG AGC AAT C-3'
OPAE17	5'-GGC AGG TTC A-3'

### **3.2.4.3. Hazırlanan RAPD-PCR karışımı**

Bir ependorf tüpüne örnek sayısına göre master mix hazırlandı (Şekil 3.5) ve daha sonra PCR tüplerine 20'şer µl (Çizelge 3.2) olacak şekilde dağıtıldı.



**Şekil 3.5.** PCR karışımı hazırlama işlemi.

En son bütün tüplere ayrı ayrı Taq DNA polimeraz eklendi ve programı ayarlanan PCR cihazına (Şekil 3.6) yerleştirildi.



**Şekil 3.6.** PCR cihazı.

**Tek bir örnek için hazırlanmış olan PCR karışımı:**

**Çizelge 3.2.** PCR karışım içeriği ve miktarları.

Reaktant	Miktar (µl)
Distile su	14,75
10x PCR buffer	2
MgCl <sub>2</sub>	1,25
dNTPs	0,5
Kalıp DNA	0,5
Primer	0,5
Taq DNA polimeraz	0,5
TOPLAM	20

PCR cihazına hazırlanan karışım yerleştirildikten sonra, önceden sıcaklık ve döngü sayıları belirlenmiş protokol seçildi (Çizelge 3.3). PCR işlemi yaklaşık 4,5 saat sürmektedir.

#### 3.2.4.4. Uygulanan PCR koşulları

Çizelge 3.3. PCR sıcaklıkları ve döngü sayıları.

Basamak	Sıcaklık ve Süre	Siklus (kez)
Ön denatürasyon	94 °C, 2 dk	1
Denatürasyon	94 °C, 30 sn	45
Bağlanma	42 °C, 1 dk	
Uzama	72 °C, 2 dk	
Son uzama	72 °C, 10 dk	1

#### 3.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezine Yüklenmesi

##### 3.2.5.1. Agaroz jelin hazırlanması

1 gr agaroz tartılmış ve vida kapaklı erlene aktarıldı. Üzerine 100 ml TBE (tris, borat, edta) tampon çözeltisi konularak mikrodalga fırında 1,5 dk sürede kaynayarak çözüldü. Hazırlanan agarozun bir termometre ile sıcaklığı takip edildi ve sıcaklık 60 °C'nin altına düşünce içine 2 µl EtBr eklenerek elektroforez tankına döküldü (Şekil 3.7). Taraklar yerleştirilerek 30-45 dk donmaya bırakıldı ve jel kıvamı alması beklendi. Yeterli süre beklendikten sonra örneklerin yüklenmesi aşamasına geçildi.

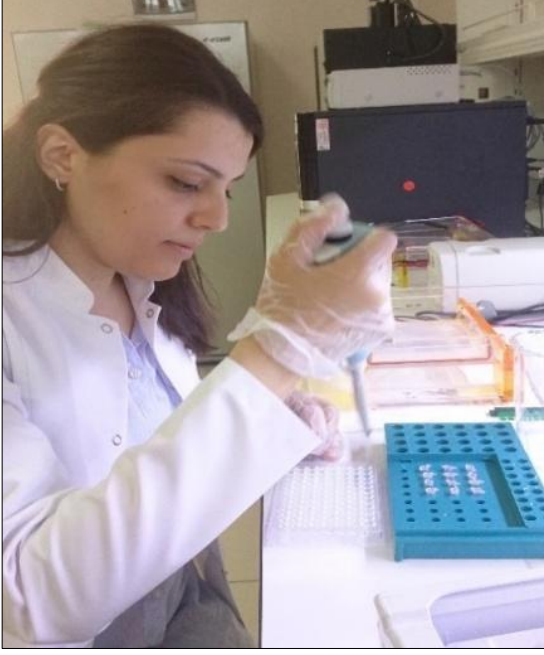


**Şekil 3.7.** Yatay elektroforez ve güç kaynağı.

### 3.2.5.2. Örneklerin jele yüklenmesi

Jel yükleme solüsyonu ve markır 1/5 oranında karıştırıldı. 10 µl örnek için 2 µl jel yükleme solüsyonu kullanıldı. Hazırlanan numuneler bir otomatik pipet yardımıyla ve sırası ile jele aktarıldı (Şekil 3.8). Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 1,5-2 saat süreyle yürümeye bırakıldı.





**Şekil 3.8.** Agaroz jele numune yüklenmesi.

### 3.2.6. Elektroforez sonucu jelin görüntülenmesi

Yeterli süre yürütülen jel görüntüleme cihazına alınarak U.V. ışık altında görüntülendi. EtBr ile U.V. ışık altında görünür hale gelen bantlar (Şekil 3.9) incelendi.



**Şekil 3.9.** Jel Görüntüleme Cihazı.

### **3.2.7. Verilerin derlenmesi ve istatistiksel analizi**

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde ifade edildi. Oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı.

Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin karşılık gelen komplementelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirildi. Bireyler arası değerlendirmeler SPSS V.13 ile hesaplandı ve genotiplere ait dendogram NTSys (Versiyon 2.02g, Exeter Software, Stauket, NY) yazılım programı ile oluşturuldu ve görüntülendi. Çalışılan canlı genotipinin 12 primerle analizi sonucunda, benzerlik oranı indeksi Microsat (Minch vd., 1995) programı ile tespit edildi. Kümeleme analizi için UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) yöntemi uygulandı.

#### 4. BULGULAR

Çalışma kapsamında toplam 12 primer kullanıldı ve bunların hepsi çok iyi amplifikasyon yaptığı için tamamı değerlendirmeye alındı. Büyüklüğü 100 bç ile 4000 bç arasında değişen toplam 134 bant elde edildi. OPAB05 en yüksek sayıda (15) bant oluştururken, OPAA19 ve OPAB01 en az (9) bant veren primerlerdir.

Primerlerden OPAA08, OPAA19, OPAB01, OPAB05, OPAB18, OPAC09, OPAC17, OPAD10, OPAE09, OPAE12, OPAE17 sırasıyla 1, 1, 6, 2, 2, 5, 1, 11, 10, 7, 8, 6 monomorfik bantlar üretirken, OPAA08, OPAA19, OPAB01, OPAB05, OPAB18, OPAC09, OPAC17, OPAC19, OPAD10, OPAE09, OPAE12, OPAE17 sırasıyla 9, 8, 3, 13, 10, 7, 9, 1, 5, 3, 6 polimorfik bantlar oluştu. Toplam polimorfizm oranı %55,2 olarak hesaplandı (Çizelge 4.1).

RAPD sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre türler 2 ana grupta kümelendi. 1. grupta; 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. popülasyonlar, 2. grupta; 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16. ve 17. popülasyonlar yer aldı. 6. ile 7.'nin birbirine en yakın (0,988), 1. ile 14.'ün ise en uzak popülasyonlar (0,688) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).

Ekim ayında Ahmediye alanından toplanan 6. ve 7. popülasyonlar hem sıcaklık şartları, yani çevresel koşulların benzerliği hem de toplandığı lokalitenin birbirine çok yakın olmasından dolayı genetik açıdan birbirine en yakın (0,988) çıktı. Aynı şekilde yine Ekim ayında toplanan 1. ve 2. popülasyonlar aynı sebeplerle birbirine yakın (0,895) çıktı ve aynı ay olmasından dolayı 6. ve 7. popülasyonlar ile de bağlantılı çıktı (Çizelge 4.3).

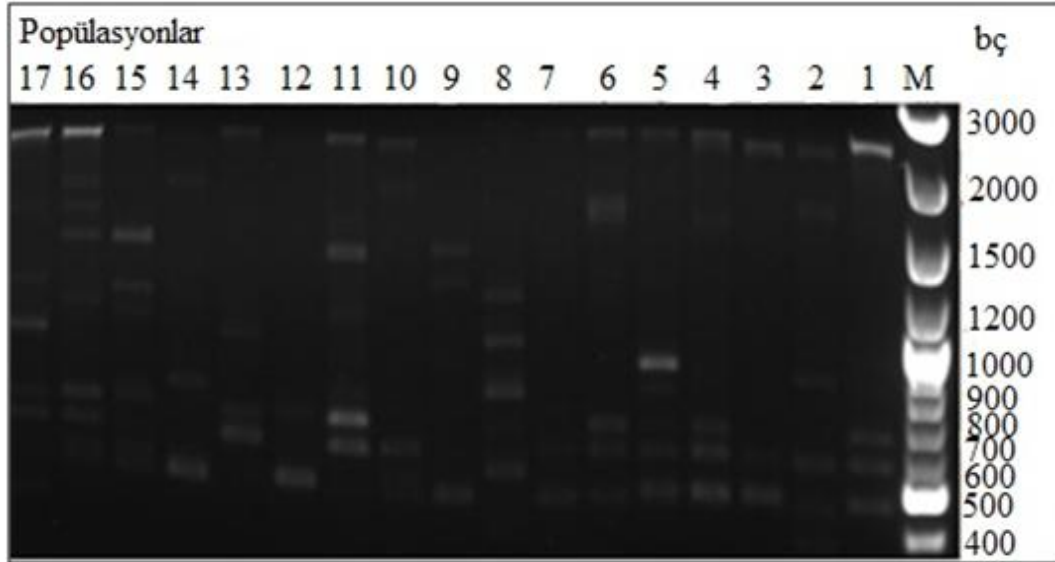
Haziran ayında Ekşisu alanından toplanan 9. ve 13. popülasyonlar da aynı şekilde aynı ay ve aynı lokalite olmasından dolayı birbirine yakın (0,976) çıktı. 10. ve 11. popülasyonlar da lokalite farklı olmasına rağmen aynı ayda toplanmış olması ve toprak özelliğinin aynı (sulu yosunlu toprak) olmasından dolayı birbirine yakın (0,974) çıktı (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.1.** RAPD primerlerinin oluşturduğu amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm yüzdeleri.

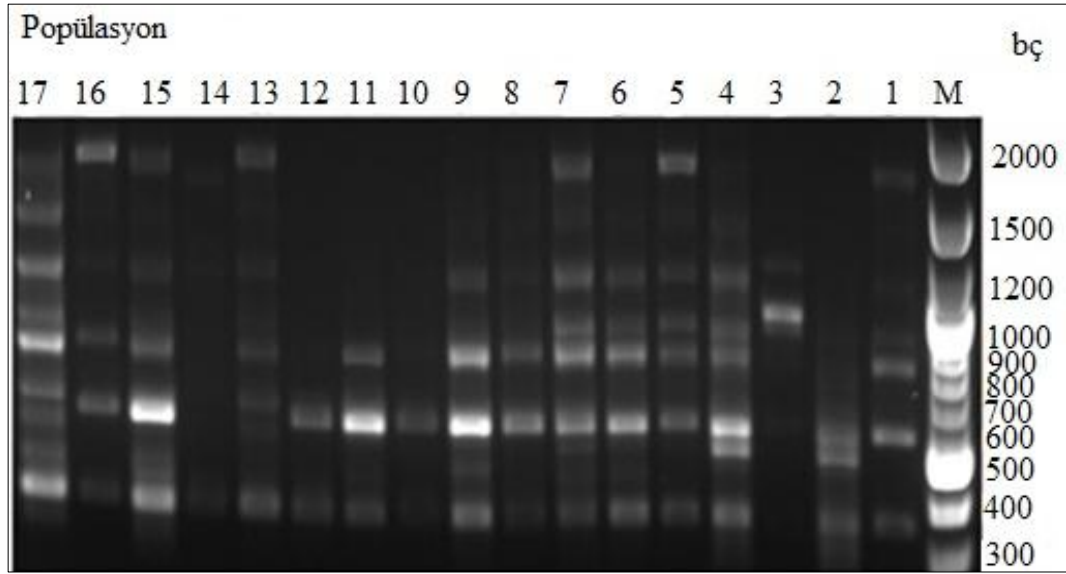
Primer Adı	Baz Dizilimi 5'- 3'	Molekül Büyüklüğü (bç) mak- min.	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Toplam bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
OPAA08	5'-TCC GCA GTA G-3'	2000-400	9	1	10	90
OPAA19	5'-TGA GGC GTC T-3'	2000-400	8	1	9	88,8
OPAB01	5'-CCG TCG GTA G-3'	2000-100	3	6	9	33,3
OPAB05	5'-CCC GAA GCG A-3'	4000-100	13	2	15	86,6
OPAB18	5'-CTG GCG TGT C-3'	2000-200	10	2	12	83,3
OPAC09	5'-AGA GCG TAC C-3'	3000-200	7	5	12	58,3
OPAC17	5'-CCT GGA GCT T-3'	2000-100	9	1	10	90
OPAC19	5'-AGT CCG CCT G-3'	2000-100	0	11	11	0
OPAD10	5'-AAG AGG CCA G-3'	2000-100	1	10	11	9,10
OPAE09	5'-TGC CAC GAG G-3'	2000-300	5	7	12	41,6
OPAE12	5'-CCG AGC AAT C-3'	3000-400	3	8	11	27,3
OPAE17	5'-GGC AGG TTC A-3'	2000-100	6	6	12	50
<b>TOPLAM</b>		4000-100	74	60	134	55,2

**Çizelge 4.2.** *Eustigmaeus erciyesiensis* popülasyonlarının 12 RAPD primerine karşı verdiği bant sayısı.

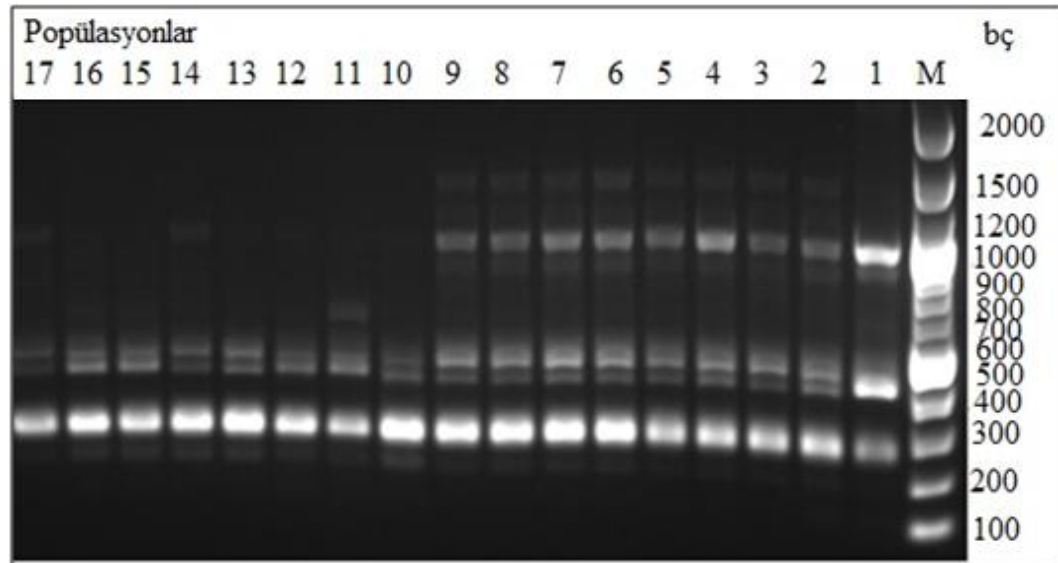
Primer Adı	Popülasyonlar																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
OPAA08	7	6	5	5	7	5	5	4	8	7	8	6	7	4	5	8	6
OPAA19	7	6	6	9	7	7	7	8	8	4	4	5	8	3	7	8	8
OPAB01	8	8	7	7	7	7	7	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7
OPAB05	12	12	9	11	9	13	13	11	11	12	12	10	11	7	12	12	12
OPAB18	6	6	5	7	4	7	7	11	5	4	4	6	3	10	8	6	6
OPAC09	6	11	9	9	9	12	12	11	10	10	10	10	10	10	11	11	11
OPAC17	7	8	7	7	6	6	6	7	8	7	7	3	8	5	8	6	6
OPAC19	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
OPAD10	11	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
OPAE09	11	9	11	12	12	11	11	8	9	8	10	8	8	8	9	9	9
OPAE12	9	9	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	9	10
OPAE17	7	7	7	7	7	7	7	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11



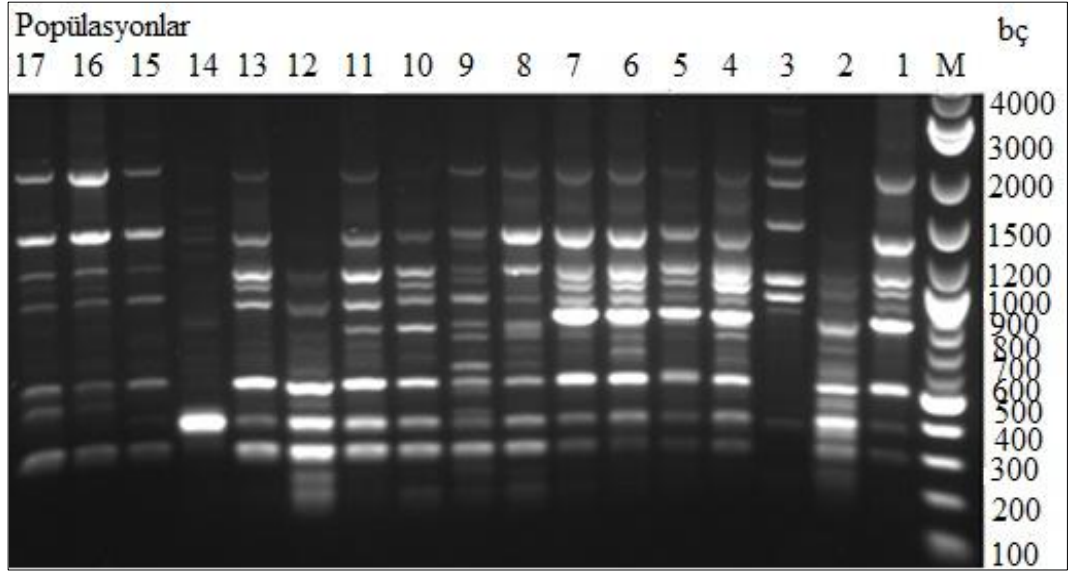
**Şekil 4.1.** OPAA08 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



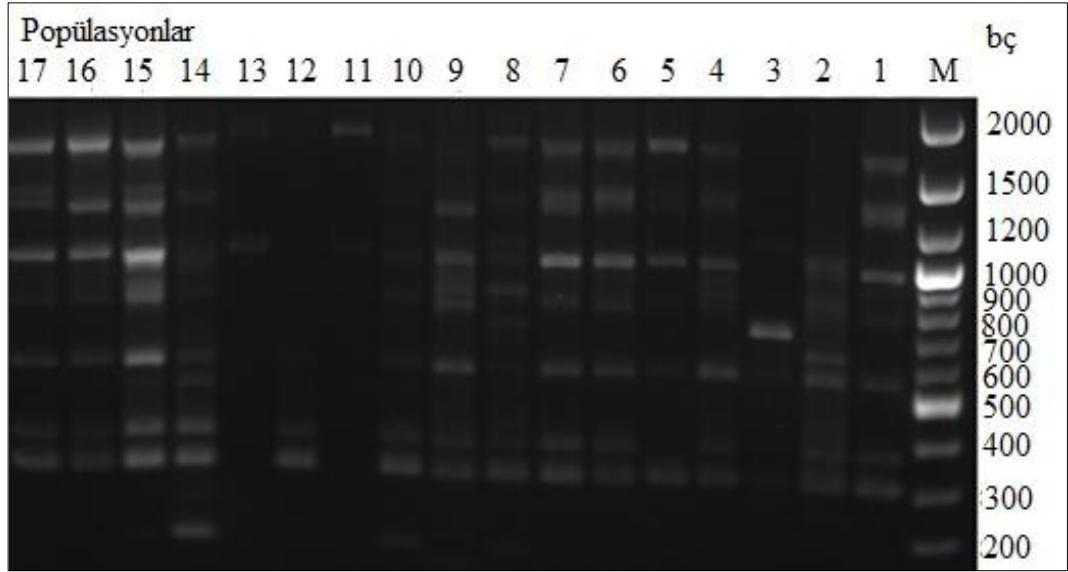
**Şekil 4.2.** OPAA19 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



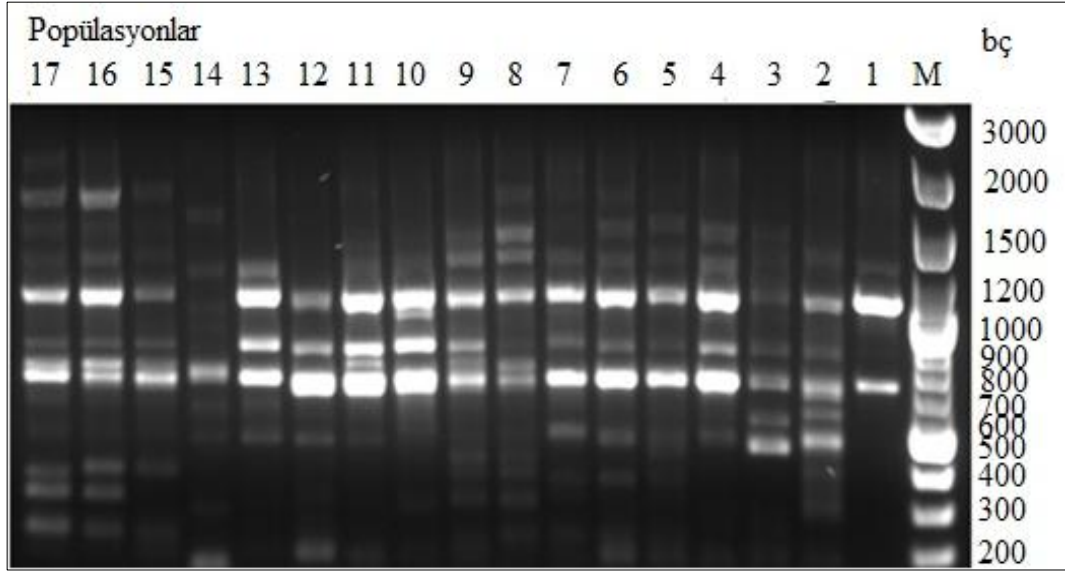
**Şekil 4.3.** OPAB01 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



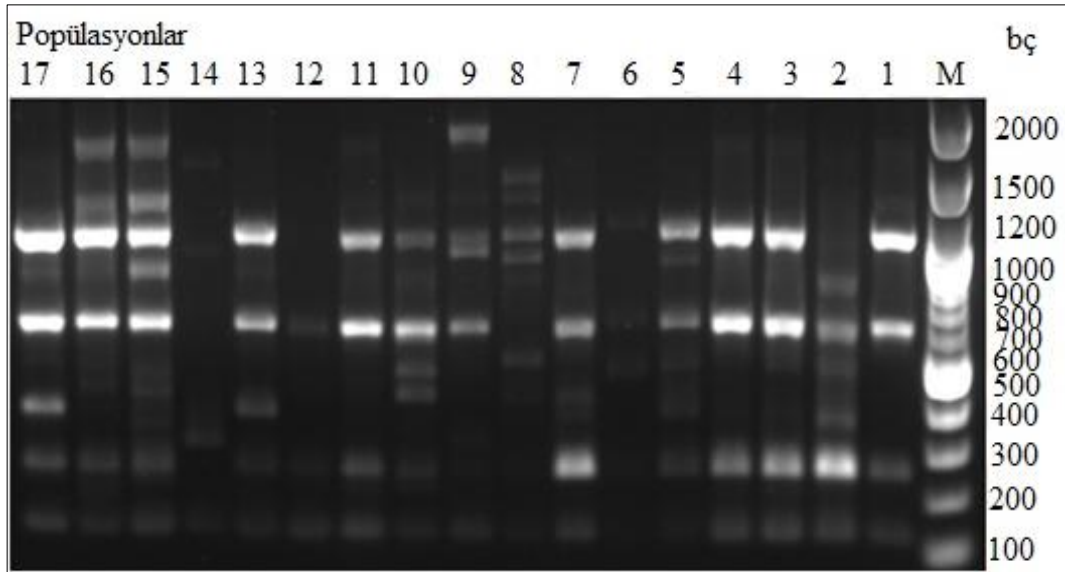
**Şekil 4.4.** OPAB05 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



**Şekil 4.5.** OPAB18 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).

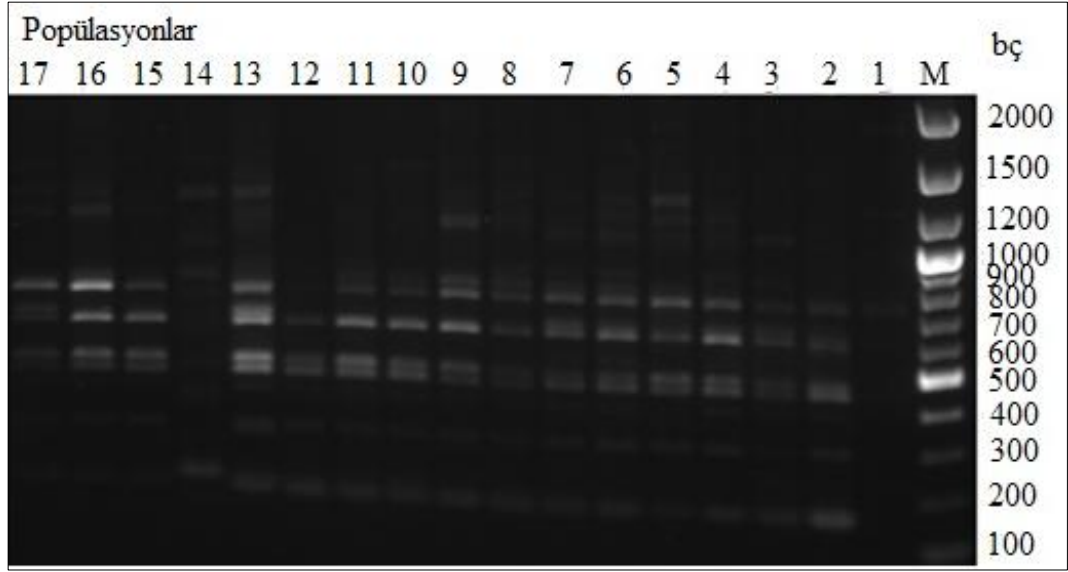


**Şekil 4.6.** OPAC09 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).

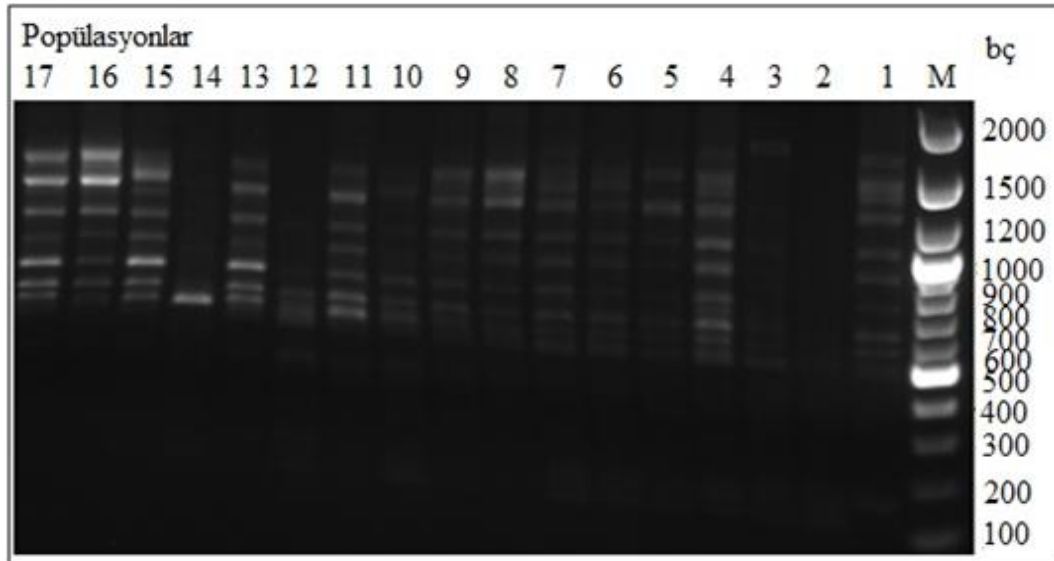


**Şekil 4.7.** OPAC17 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).

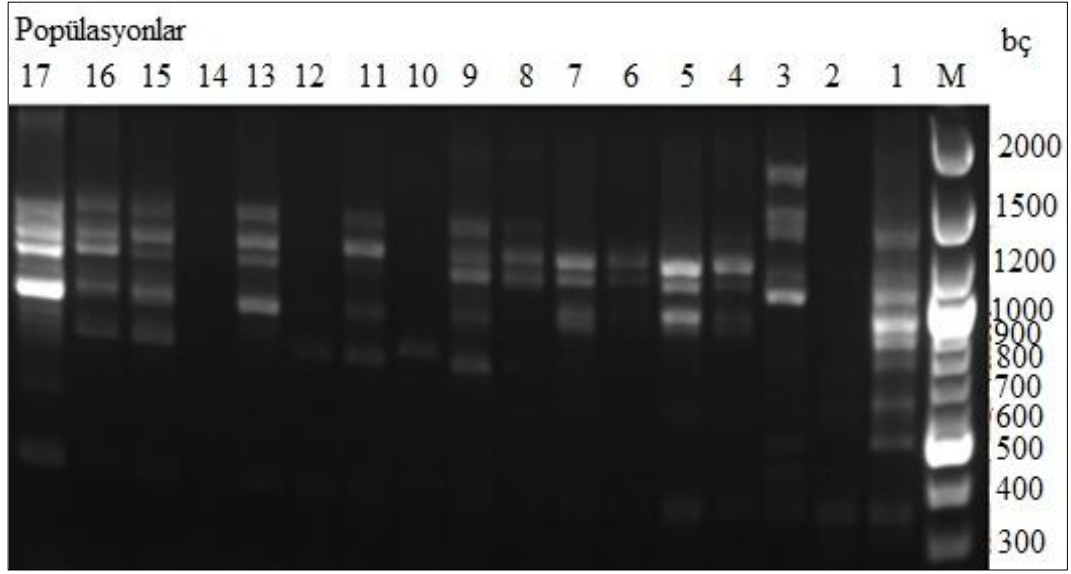




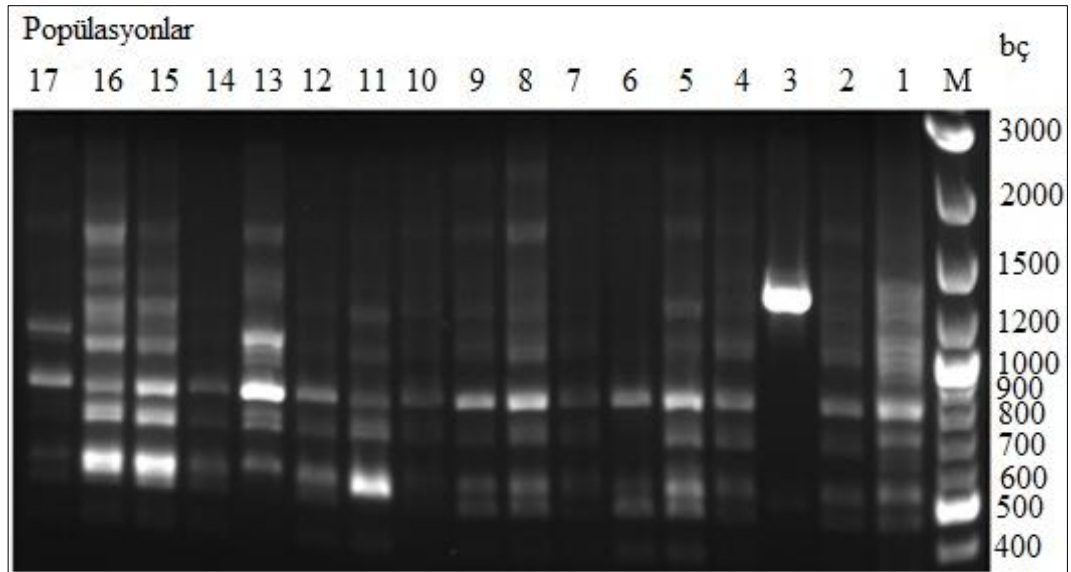
**Şekil 4.8.** OPAC19 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



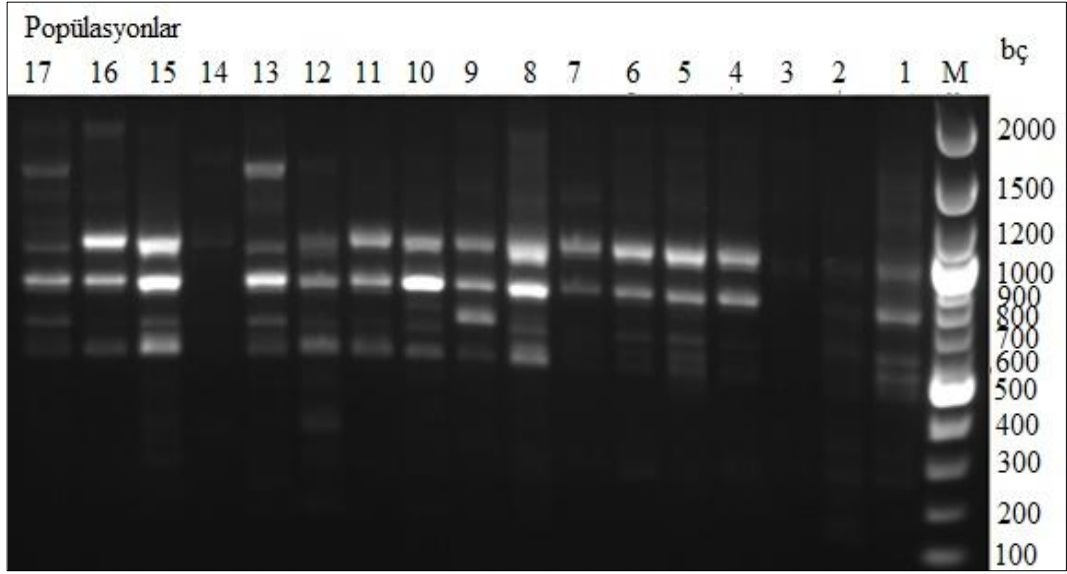
**Şekil 4.9.** OPAD10 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



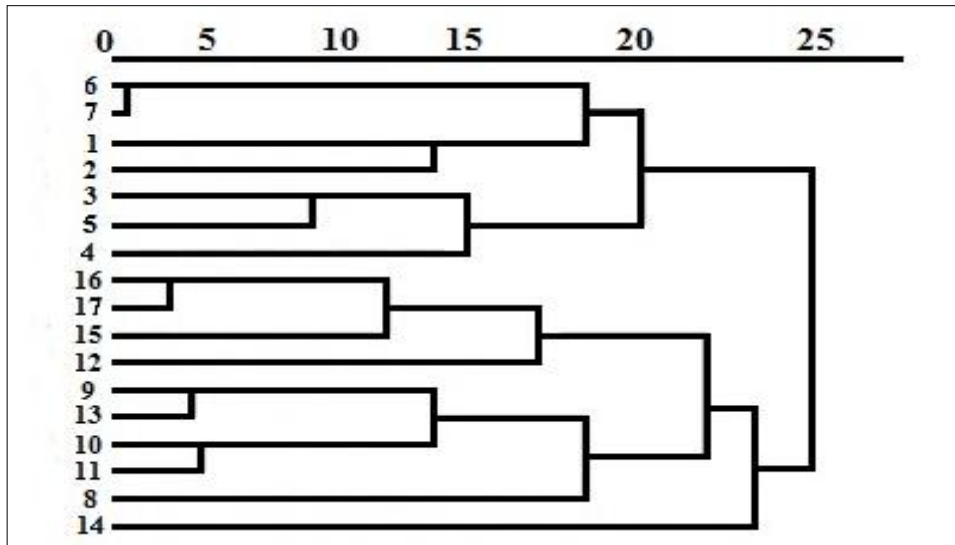
**Şekil 4.10.** OPAE09 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



**Şekil 4.11.** OPAE12 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



Şekil 4.12. OPAE17 primerine karşı oluşan amplifikasyon ürünleri (M: markır, bç: baz çifti).



Şekil 4.13. *Eustigmaeus erciyesiensis*'in Ekşisu ve Ahmediye popülasyonları arasındaki genotipik bağlantı.

**Çizelge 4.3.** *Eustigmaeus erciyesiensis*'in Ekşisu ve Ahmediye popülasyonları arasındaki genetik benzerlik indeksi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1,000																
2	,895	1,000															
3	,807	,820	1,000														
4	,864	,856	,874	1,000													
5	,859	,830	,938	,906	1,000												
6	,833	,867	,822	,878	,831	1,000											
7	,833	,867	,822	,878	,831	,988	1,000										
8	,742	,773	,732	,784	,722	,794	,794	1,000									
9	,793	,787	,745	,798	,791	,753	,753	,871	1,000								
10	,753	,766	,761	,796	,769	,750	,750	,849	,888	1,000							
11	,774	,750	,763	,817	,791	,771	,771	,851	,910	,974	1,000						
12	,736	,750	,688	,742	,733	,772	,772	,835	,831	,809	,811	1,000					
13	,791	,785	,742	,777	,789	,750	,750	,849	,976	,886	,909	,830	1,000				
14	,688	,719	,713	,785	,720	,722	,722	,839	,796	,833	,815	,778	,774	1,000			
15	,750	,763	,740	,792	,747	,840	,840	,844	,860	,839	,860	,844	,859	,828	1,000		
16	,755	,750	,726	,760	,753	,789	,789	,813	,868	,826	,848	,895	,867	,777	,922	1,000	
17	,747	,742	,719	,753	,745	,781	,781	,804	,859	,817	,839	,885	,857	,768	,912	,980	1,000

**Çizelge 4.4.** *Eustigmaeus erciyesiensis*'in örnekleme alanlarına ait pH ve sıcaklık değerleri.

ALAN	POPÜLASYONLAR	TOPRAK pH'sı	TOPRAK SICAKLIĞI	SU pH'sı	SU SICAKLIĞI
AHMEDİYE	1	7,73	18 °C		12 °C
	2	7,59	18 °C		9 °C
	3	7,21	29 °C		27 °C
	4	7,77	28 °C	8.60	19 °C
	5	7,60	28 °C	8.45	20 °C
	6	7,54	17 °C		11 °C
	7	7,84	18 °C	8.60	10 °C
EKŞİSU	8	8,18	29 °C	8.65	32 °C
	9	8,47	29 °C	8.85	30 °C
	10	8,76	29 °C		29 °C
	11	8,30	29 °C		25 °C
	12	9,00	29 °C		26 °C
	13	9,25	29 °C		28 °C
	14	8,00	29 °C		30 °C
	15	8,03	29 °C		32 °C
	16	9,00	29 °C		30 °C
	17	8,06	29 °C		30 °C

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu bölümde çalışmanın bulgularından çıkan sonuçlara ve bu sonuçlar doğrultusunda değinilecek önerilere yer verilmiştir. Literatürde çalışmayı destekleyici önemli bir araştırma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen arazi çalışmaları ve deneyler sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde Ekşisu ve Ahmediye *E. erciyesensis* popülasyonları hakkında şu kanılara ulaşıldı.

### 5.1. Sonuç

Günümüzde, moleküler düzeyde yapılan taksonomik çalışmalara, morfolojik olarak ayrılamayan türleri ayırt edebilmek için sıklıkla başvurulmaktadır. Fakat bazen morfolojik olarak diğerlerinden rahatlıkla ayırt edilebilen türlerin kendi içinde genetik düzeyde farklılıklar görülebilmektedir. Bu çalışmada aynı türün bireyleri arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmak için moleküler düzeyde analizler yapıldı.

Çalışmada 12 RAPD primeri kullanıldı. Kullanılan primerlerin tümü sonuç vermiş, bundan dolayı hepsi değerlendirmeye alındı. Büyüklüğü 100 bp ile 4000 bp arasında değişen toplam 134 RAPD bandı elde edildi ve bunlardan 74 tanesinin polimorfik olduğu gözlemlendi. Primerlerden OPAA08, OPAA19, OPAB01, OPAB05, OPAB18, OPAC09, OPAC17, OPAD10, OPAE09, OPAE12, OPAE17 sırasıyla 1, 1, 6, 2, 2, 5, 1, 11, 10, 7, 8, 6 monomorfik bantlar üretirken, primerlerden OPAA08, OPAA19, OPAB01, OPAB05, OPAB18, OPAC09, OPAC17, OPAC19, OPAD10, OPAE09, OPAE12, OPAE17 sırasıyla 9, 8, 3, 13, 10, 7, 9, 1, 5, 3, 6 polimorfik bantlar üretti. OPAB05 en yüksek sayıda (15) bant oluştururken, OPAA19 ve OPAB01 en az (9) bant veren primerlerdir.

RAPD sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre bireyler 2 ana grupta kümelendi. 1. grupta 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7.; 2. grupta 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16. ve 17. popülasyonlar yer aldı. Bu kümelene Ekşisu ve Ahmediye örnekleri arasında belirgin bir farklılığın olduğunu göstermektedir. 6. ve 7.

popülasyonun birbirine en yakın (0,988), 1. ile 14. popülasyonun ise en uzak polimorfizme sahip olduğu (0,688) gözlemlendi.

Birbirlerine en yakın olan 6. ve 7. popülasyonlar Kasım ayında Ahmediye alanından elde edildi. Bu veri ile aynı mevsim ve aynı alandan örneklenen canlılar arasında beklenildiği gibi polimorfik farklılığın az olduğu söylenebilmektedir. Canlıların farklı mevsimlerdeki genetik materyalindeki polimorfizm değişimleri, yıl içerisinde iklim koşullarına adaptasyon becerisinin bir göstergesidir. Birbirlerine en uzak popülasyonlardan olan 1. Ekim ayında Ahmediye'den, 14. ise Temmuz ayında Ekşisu'dan elde edildi. Sonuçlardan da görüldüğü gibi popülasyonlar arasında hem yaşama alanı hem de mevsimsel bir farklılıktan söz edilebilir. Aynı yerden aynı mevsimde alınan bireyler birbirine genetik açıdan en yakın çıkarken, farklı yerlerden ve farklı mevsimlerde alınan bireyler ise birbirlerine en uzak çıktı.

Bazı bilim insanları RAPD'in tür içerisinde taksonomik seviyede genetik farklılığı ortaya koymada kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Marilla ve Scoles 1996; Stammers vd., 1995). Matioli vd. (2009) Brezilya'nın Minas Gerais Eyaletinde ve Vicosa'daki narenciye bahçelerinde bulunan *Agistemus pallini* türleri arasındaki genetik benzerliği karşılaştırmak için RAPD-PCR yöntemini kullanılmıştır. Bu, stigmeid akarlar ile gerçekleştirilen ilk moleküler çalışmadır. Bu çalışmada akarların DNA ekstraksiyonu için kullanılan yöntem, DNA miktarının az olmasına ve akarların küçüklüğüne rağmen RAPD-PCR amplifikasyonları için uygunluğu belirtilmiştir. Çalışmada, bir numunede kararlı bir bantın yokluğu polimorfizm olarak nitelendirilmiştir (Matioli vd., 2009). Matioli vd. (2009)'nin yapmış olduğu çalışmanın sonucunda polimorfizm oranını %53,8 hesaplamıştır. Çalışmamızdaki bulgular (%55,2) bu durumu destekler niteliktedir.

Benzer şekilde Al-Deep ve Enan (2010) *Oryctes agamemnon* Burmeister ile ilişkili foretik akarların genetik profillerini ortaya çıkarmak için RAPD-PCR yöntemini kullanmıştır. Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. 9 primer tarafından üretilen bant sayısı 57 olmuştur. Yine Yabsley vd. (2013) moleküler

kıyaslama için RAPD-PCR yöntemini kullanmıştır. Elde ettikleri veriler ile yaptıkları kıyaslamalar sonucunda morfolojik olarak ayırt edilemeyen türler arasında genetik farklılıklar belirleyerek tür altı sınıflandırma yapmışlardır (Yabsley vd., 2013). Kraus ve Hunt (1995)'un yapmış oldukları çalışma RAPD tekniğinin *V. jacobsoni*'nin özellikle popülasyonlar arası çalışmaları için değerli bir araç olduğunu kanıtlamıştır. Tez çalışmasında bu çalışmalardan yola çıkarak RAPD-PCR yöntemi kullanıldı.

Yabsley vd. (2013) yılında yaptığı çalışma ve Que vd. (2014) yılında yaptığı çalışma bize morfolojik karakterizasyonun moleküler karakterizasyon ile ayrılmaz bir bütünlük sağladığını göstermektedir. Yalnızca morfolojik analiz ya da yalnızca moleküler analiz tek başına canlıların ekolojisini incelemede yetersiz bulunmaktadır.

Gal akarı siyah üzümde zarara neden olan büyük tomurcuk olarak bilinen ve aynı zamanda ekim alanları içinde ve ekim alanları arasında BRV virüsü (Blackcurrant Reversion Virus) bulaştıran en ciddi zararlıdır. Brennan vd., 2008, AFLP fragmanlarının, sekans temelli PCR belirteçlerine dönüşümü uygulanmasını kolaylaştırmış olduğunu bildirilmiş ve dolayısıyla kuş üzümü için yüksek verimli üretim programlarında akar-dirençli gen kaynaklarının seçimini daha verimli hale getirdiğini göstermiştir (Brennan vd., 2008).

Radwell vd. (2010) *Kongsbergia robisoni* popülasyonlarında mitokondriyal sitokrom oksidaz-1 dizilerini analiz ederek belirli ekolojik bölgelere özgü endemik türler tespit etmişlerdir. Popülasyonlar arasında tek bir türün içindeki değişkenliği gibi hemen göze çarpmayan morfolojik farklılıkların olup olmadığının belirlenmesine yardımcı olmak üzere iç dağlık bölgeler dâhil yorumlamışlardır. Morfolojik inceleme ve analizlere dayanarak iç dağlık alanlarda üç ekolojik bölgedeki *K. robisoni* popülasyonları arasında *Kongsbergia*'nın bilinen diğer tüm türlerinden farklı ve muhtemelen tek bir türe ait olduğu sonucuna varmışlardır (Radwell vd., 2010).

Bir Afrika kenesi olan *Amblyomma hebraeum*'dan vitellin reseptörü (VgR) kodlayan bir gen tespit edilmiştir. VgR'ler hemolenfden yumurta sarısı vitellin proteini alımını



teşvik eden reseptör ailesinin yoğun bulunmayan üyesidirler. *Amblyomma hebraeum*'a ait vitellin reseptörü (AhVgR) 5703 baz çiftidir ve 22 amino asitlik bir sinyalin oluşmasını sağlayan alt birimi (196,5 kDa) olan 1801 amino asitlik bir proteini kodlar. Filogenetik analizler AhVgR'nin diğer kenelerdeki VgR'ler ile son derece benzer olduğunu göstermiştir. AhVgR, çiftleştirilen dişilerin dokuların haricinde, aç veya tok erkeklerde ve diğer bütün dişi dokularında mevcut değildir. VgR ifadesi silinmiş VgR-dsRNA probu ile enjekte edilmiş aç ergin dişilerin yumurtalık gelişiminde önemli bir gecikme yaşanmıştır ve kontrollerden sonra önemli oranda ovipozisyon başlamıştır. Bu sonuçlar AhVgR ifadesinin Vg alımı ve daha sonra oositlerin olgunlaşması için önemli olduğunu göstermiştir. Bu çalışma moleküler temelli analizlerin canlılara özgün özelliklerin kullanılmasıyla ayırt etmede ne kadar pratik ve detaylı bilgiler edinildiğini göstermesi bakımından önemlidir (Smith ve Kaufman 2013).

Bryon vd. (2013) tarafından özel bir mikrodizi ile genom ifade değişiklikleri incelenerek diyapoz evresindeki akarların temel fizyolojik değişiklikleri araştırılmıştır. Çalışmada *T. urticae* genleri ile yapılan veri analizinde canlıya ait genlerin yaklaşık %11'inin farklı şekilde ifade olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma keliserlilerin (Chelicerata) bir üyesinin diyapoz ile ilgili ilk gen ifade analizidir ve ayrıca eklembacaklılarda (Arthropoda) diyapozun genel stratejileri hakkında önemli bilgiler kazandırmıştır (Bryon vd., 2013).

Lv vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada kene türlerini tanımlamak için CO1,16S rDNA, ITS2 VE 12S rDNA 'nın görece etkileri doğrudan karşılaştırmışlardır. Sonuçlar genetik sapma analizlerinin, her belirteç için tür içi sapmanın türler arası sapmaya göre daha düşük olduğunu göstermiştir (Lv vd., 2014).

Brennan vd., (2008), Radwell vd., (2010), Smith ve Kaufman (2013), Bryon vd., (2013) ve Lv vd., (2014) yapmış oldukları moleküler temelli çalışmalarla *E. erciyesiensis* popülasyonlarının moleküler açıdan değerlendirilmelerine katkı sağlamışlardır.

Sıcaklık, nem, besin miktarı, ortamın pH'sı, güneş ışığı ve radyasyon gibi ortam şartlarına canlılar bazı adaptasyonlar göstermek zorundadır. Bu da, tür içinde farklı polimorfizmlere sebep olmaktadır. Dolayısıyla canlının DNA sekansı ve bununla birlikte protein yapılarında değişiklikler meydana gelebilmektedir. Yani canlıların farklı ortam koşullarına adaptasyonları genetik açıdan da farklılaşmalarına sebep olmaktadır. Örneğin besin kaynağı yönünden farklı ortamlardan alınan aynı türün bireyleri arasında sindirim enzimleri açısından polimorfizmler bulunabilmektedir.

Ahmediye ve Ekşisu'dan aynı mevsimde alınan bireyler genetik açıdan birbirlerine yakın (0.840), hatta aynı yer ve aynı ayda alınan popülasyonların birbirlerine çok yakın olduğu (0.976, 0.980, 0.988) gözlemlendi. Dolayısıyla bu durumun çevresel etkenlere ve ortam adaptasyonuna dayanması muhtemeldir. Aynı bölgeden farklı mevsimlerde alınan bireylerde de muhtemelen farklı sıcaklıklardan ve farklı yaşam koşullarından dolayı polimorfizmler görüldü.

Çalışmada toprak ve suyun pH'sı ve sıcaklığı ölçüldü (Çizelge 4.4). Sonuçta Ahmediye alanının Ekşisu alanına göre daha asidik olduğu saptandı. Canlıların tür içindeki çeşitliliği bu etmenlere de bağlı olabileceği kanaatine varıldı. Akarlar zaman zaman uzun mesafeli göçler yapabilmektedirler. Göç ettikleri yerlerin şartlarına uyum sağlayabilmek adına bazı epigenetik modifikasyonlara uğradıkları gibi bazen de buldukları ortamın şartlarından kaynaklı mutasyona uğramaktadırlar.

*Eustigmaeus erciyesiensis* türlerinin moleküler tanıları hakkında daha önce yapılmış hiç bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan sistematik düzeydeki çalışmalarla bu türün yapısal özellikleri tam olarak ortaya çıkarılmıştır. Fakat bugüne kadar genetik seviyede bilgi sağlayacak herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma, *Eustigmaeus erciyesiensis* üzerine yapılan ilk moleküler çalışma olması nedeniyle, bu noktalardaki bilgi eksikliğini bir ölçüde kapatarak, daha sonraki çalışmalar için temel oluşturması beklenmektedir.

## 5.1. Öneriler

RAPD, tür seviyesinde filogenetik ilişkiyi açıklamada tek başına yeterli olmasa da, türün genetik profilini ortaya çıkarması bakımından önemlidir. Bundan sonraki çalışmalarda daha fazla örnekle daha çok gen bölgesinin sekans analizi yapılarak tür içi ve türler arası yapılanma detaylı olarak ortaya konulabilir. SSR, ISSR, RFLP gibi farklı yöntemlerle RAPD ile yapılan bu çalışmanın güvenilirliğinin artırılması sağlanabilir. Popülasyonların mtDNA markırları ile çalışılabilir. *Eustigmaeus erciyesiensis* popülasyonlarında görülen farklılaşma detaylandırılabilir. Türkiye'deki akarlara özgü bir genetik yapılanmanın söz konusu olup olmadığı açıklığa kavuşturulabilir. Ayrıca muhafaza edilmiş örnekler genetik çalışmalarda kullanılarak bu türlerin zaman içerisindeki değişimi ortaya konulabilir. Aynı zamanda sıcaklık ve pH yanında radyasyon ölçümü ve topraktan element analizi de yapılarak parametre sayısı artırılabilir, dolayısıyla sonuçlar ve nedenleri daha anlaşılır hale getirilebilir.

## KAYNAKLAR

Al-Deep, M.A., Enan, M.R., “First record of a phoretic astigmatid mite (*Sancassania* sp; Acaridae: Astigmata) on *Oryctes agamemnon* (Coleoptera: Scarabaeidae) in UAE”, *International Journal of Agriculture and Biology*, 12: 157-160 (2010).

Arbogast, B.S., “Phylogeography: The history and formation of species”, *American Zoologist*, 41(1): 134-135 (2001).

Avise, J.C.A., “Molecular markers, natural history and evolution 2<sup>nd</sup> ed.”, *Sinauer Associates*, Massachusetts, 372 p. (2004).

Aydın, S.Ö., “RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematığı”, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6: 113-118 (2004).

Ayllón, N., Villar M., Galindo, R. C., Kocan, K.M., Šíma, R., López J.A., Vázquez, J., Alberdi, P., Cabezas-Cruz, A., Kopáček, P., Fuente, J., “Systems biology of tissue-specific response to *Anaplasma phagocytophilum* reveals differentiated apoptosis in the tick vector *Ixodes scapularis*”, *Plos Genetics*, 11: 3-8 (2015).

Behura, S.K., “Molecular marker systems in insects: Current trends and future avenues”, *Molecular Ecology*, 15(11): 3087-3113 (2006).

Bilgin, O., Korkut, K.Z., “Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi”, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(3): 245-251 (2005).

Brennan, R., Jorgensen, L., Gordon, S., Loades, K., Hackett, C., Russell, J., “The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite”, *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 205-211 (2008).

Bryon, A., Wybouw, N., Dermauw, W., Tirry, L., Leeuwen, T.V., “Genome wide gene-expression analysis of facultative reproductive diapause in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*”, ***BMC Genomics***, 14: 815-817 (2013).

Chaudhri, W.M., “New mites of the genus *Ledermuelleria*”, ***Acarologia***, 7: 467-486 (1965).

Chawla, H.S., “Introduction to plant biotechnology 2<sup>nd</sup> ed.”, ***Science Publisher***, USA, 541 p. (2002).

Dabert, M.A., “DNA Markers in the phylogenetics of the Acari”, ***Biological Letters***, 43(2): 97-107 (2006).

Devrim, A.K., Kaya, N., “RAPD tekniği ve Biyokimya alanında kullanımı”, ***Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi***, 12(1): 98-99 (2006).

Doğan, S., “*Eustigmaeus* mites from Turkey (Acari: Stigmaeidae)”, ***Journal of Natural History***, 39: 835-861 (2005).

Doğan, S., “Checklist of raphignathoid mites (Acari: Raphignathoidea) of Turkey”, ***Zootaxa***, 1454: 1-26 (2007).

Doğan, S., “Akaroloji ders notları”, ***Erzincan Üniversitesi*** (2012).

Doğan, S., Ayyıldız, N., Fan, Q.-H., “Descriptions of two new species and a newly recorded species of *Eustigmaeus* from Turkey (Acari: Stigmaeidae)”, ***Systematic and Applied Acarology***, 8: 131-144 (2003).

Doğan, S., Per, S., Ayyıldız, N., Fan, Q.-H., “*Eustigmaeus erciyesiensis* Doğan, Ayyıldız ve Fan, 2003’ün (Acari: Stigmaeidae) gelişim evrelerinin morfolojisi”, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi***, 17: 21-27 (2004).

Doğan, S., Özçelik, S., “Uzunoluk ormanı (Erzurum, Türkiye) stigmaeid akarları (Acari: Stigmaeidae) üzerine sistematik araştırma”, ***Türkiye Entomoloji Dergisi***, 35 (4): 699-719 (2011).

Doğan, S., Bingöl, M., Dilkaraoğlu, S., Fan, Q.-H., “Description of a new species of the genus *Stigmaeus* Koch (Acari: Stigmaeidae) from Turkey, with a list of described species in the world”, ***International Journal of Acarology***, 41: 290-299 (2015a).

Doğan, S., Sevsay, S., Ayyıldız, N., Özbek, H.H., Dilkaraoğlu, S., Erman, O. Aksoy, H., “The mite fauna of Ekşisu Marshes in Erzincan (Turkey)”, ***Turkish Journal of Zoology***, 39: 571-579 (2015b).

Dönel, G., Doğan, S., “The stigmaeid mites (Acari: Stigmaeidae) of Kelkit Valley (Turkey)”, ***Zootaxa***, 2942: 1-56 (2011).

Erman, O., Özkan, M., Ayyıldız, N., Doğan, S., “Checklist of the mites (Arachnida: Acari) of Turkey. Second supplement”, ***Zootaxa***, 1532: 1-21 (2007).

Evans, G.O., “Principles of Acarology”, ***The Centre for Biosciences and Agriculture International***, Wallingford, 563 p. (1992).

Fan, Q.-H., Flechtmann, C.H.W., “Chapter 7 Stigmaeidae”, Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms , Carrillo, D. et al. eds., ***Progress in Biological Control***, Switzerland, 185-206 (2015).

Fang, D.Q., Roose M.L., Kruger, R.R., Federici, C.T., “Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes”, *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 211-219 (1997).

Frank, J.H., “A New Species of *Proteinus Latreille* (Coleoptera: Staphylinidae) from Florida”, *The Florida Entomologist*, 62(4): 329-340 (1979).

Gerson, U., Smiley, R.L., Ochoa, R., “Mites (Acari) for pest control”, *Blackwell Science*, Oxford, 373 p. (2003).

Gómez, A., “Allozyme electrophoresis: its application to rotifers”, *Hydrobiologia*, 385-393 (1998).

Gonzalez, F.J., “Polymorphisms in xenobiotic metabolism.”, *Life Sciences Pharmacogenetics*, 303: 91-110 (1999).

Gülşen, O., Mutlu, M., “Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları”, *Alatarım*, 4: 27-37 (2005).

Güz, N., Kılınçer, N., “Böcek sistematğinde moleküler markörlerin kullanımı”, *Türkiye Entomoloji Bülteni* 2(2): 125-145 (2012).

Herman, L.H., “Nomenclatural changes in the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera)”, *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 264: 182-189 (2001).

Hoy, M.A., “Insect molecular genetics, in insect molecular genetic”, *Academic Press*, U.S.A., 808 p. (2003).

Hu, J., Vick, B.A., “Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping”, *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 289-294 (2003).

Hu, J., Ochoa, O.E., Truco, M.J., Vick, B.A., “Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa*) genotyping”, *Euphytica*, 144: 225-235 (2005).

Hubby, J.L., Lewontin, R.C., “A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*”, *Genetics*, 54(2): 577-594 (1966).

Hwang, U.W., Kim, W., “General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics”, *Korean Journal of Parasitology*, 37(4): 215-228 (1999).

Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J.N., Lang, D.J., “Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting”, *Crop Science*, 42: 2118-2127 (2002).

Koç, K., Ayyıldız, N., “Türkiye faunası için yeni *Eustigmaeus* (Acari: Actinedida, Stigmaeidae) türleri”, *XV.Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ankara, 5-9 (2000).

Konieczny, A., Ausubel, F.M., “Procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers”, *Plant Journals*, 4: 403-410 (1993).

Krantz, G.W., Walter, D.E., “A manual of Acarology”, *Texas Tech University Press*, Lubbock, 807 p. (2009).



Kraus, B., Hunt, G., “Differentiation of *Varroa jacobsoni* populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD)”, *Apidologie*, 26: 283-290 (1995).

Kwon, D.H., Kim, H., Oh, J.H., Lee, S., Lee, S.H., “Establishment of an acaricide-susceptible *Tetranychus urticae* strain and its species confirmation based on morphological and molecular characters”, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14: 379-385 (2011).

Li, G., Quiros, C.F., “Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*”, *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 455-461 (2001).

Loxdale, H.D., Lushai, G., “Molecular markers in Entomology”, *Bulletin of Entomological Research*, 88(6): 577-600 (1998).

Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Jia, G., Deng, J., Wang, C., Wang, Q., Mei, L., Lin, X., “Assessment of four DNA fragments (CO1, 16SrDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida)”, *Parasites and Vectors*, 7(93): 2-11 (2014).

Marilla, E.F., Scoles, G.J., “The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny”, *Genome*, 39: 646-654 (1996).

Matioli, A.L., Pallini, A., Tavares, M.G., “Genetic similarity among *Agistemus pallinii* (Acari: Stigmaeidae) found in citrus orchards in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil”, *Neotropical Entomology*, 38(2): 262-266 (2009).

Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., , “MICROSAT, The microsatellite distance program”, *Stanford University Press*, 15-19 (1995).

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., “Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction”, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273 (1986).

Nagaraju, J., Kathirvel, M., Subbaiah, E.V., Muthulakshmi, M., Kumar, L.D., “FISSR-PCR: A simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping”, *Molecular Cellular Probes*, 16: 67-72 (2002).

Özdemir, M., Taşkiran, P., “Ahmediye Yüzenadası”, *Turkish Studies*, 1(1): 91-105 (2006).

Özhatay, N., “Türkiye’nin BTC boru hattı boyunca önemli bitki alanları”, *Bakü-Tiflis-Ceyhan Ham Petrol Boru Hattı Projesi*, 233-239 (2006).

Pérez, F.F., “Clase: Arachnida Orden Prostigmata”, *Revista IDE@-Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA)*, 14: 1-8 (2015).

Que, S., Xin, T., Yi, J., Zou, Z., Li, L., Xia, B., “Complete mitochondrial genome of *Aleuroglyphus ovatus* (Acari: Acaridae)”, *Mitochondrial DNA*, 18: 36-40 (2014).

Radwell, A.J., Dowling, A.P.G., Smith, I.M., Kaliki, V., “*Kongsbergia robisoni* sp. (Acari: Hydracnidae: Aturidae) from the interior highlands of North America based on morphology and molecular genetic analysis”, *International Journal of Acarology*, 37 (1): 194-20 (2010).

Richardson, B.J., Brian, P., Adams, M., “Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies”, *Academic Press*, London, 349 p. (1986).

Sambrook, J., Russell, D.W., “The basic polymerase chain reaction”, *Molecular cloning a laboratory manual*, Dallas, *Cold Spring Harbor*, 245-270 (2006).

Smith, A.D., Kaufman, W.R., “Molecular characterization of the vitellogenin receptor from the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae)”, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43:1-9 (2013).

Somma, M., Querci, M., “The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms”, *World Health Organization Regional Office for Europe*, 9: 75-80 (2006).

Stammers, M., Harris, J., Evans, G.M., Hayward, M.D., Foster, J.W., “Use of random PCR (RAPD) technology to analyze phylogenetic relationships in the *Lolium Festuca* complex”, *Heredity*, 74: 19-27 (1995).

Strachan, T., Read, A.P., “Human Molecular Genetics 2, 4<sup>nd</sup> ed.”, *BIOS Scientific Publishers*, Oxford, 781 p. (1999).

Summers, F.M., Price, D.W., “New and redescription species of *Ledermuelleria* from North America (Acarina: Stigmaeidae)”, *Hilgardia*, 31: 369-387 (1961).

Şeker, S., “Ülkemizde yetiştirilen farklı çekirdeklik kabak popülasyonlarının bazı tane özelliklerinin saptanması ve RAPD yöntemi ile genetik ilişkilerinin belirlenmesi”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tekirdağ, 35-36 (2012).

Terzi, B., “İran’da yayılış gösteren küçük balarısı (*Apis florea fabricius*) toplumlarında genetik varyasyonun RAPD yöntemiyle araştırılması”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Zonguldak, 15-20 (2008).

Tseng, Y.-H., “Mites of the family Stigmaeidae of Taiwan with key to genera of the world (Acarina: Prostigmata)”, *Phytopathologist & Entomologist*, 9: 1-52 (1982).

Tümay, S., “Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da bulunan Staphylinidae familyasına ait *Ocypus* cinsi üyelerinin moleküler sistematik analizi”, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Balıkesir, 58 (2011).

Van Oppen, M.J., Rico, C., Turner, G.F., Hewitt, G.M., “Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in lake malawi cichlids”, ***Molecular Biology and Evolution***, 17: 489-498 (2000).

Wagner, H.W., Sefc, K.M., “Identity 1.0. Freeware program for the analysis of microsatellite data”, ***Centre for Applied Genetics***, 3(14): 65-86 (1999).

Walter, D.E., Krantz, G., Lindquist, E., “Acari. The mites”, <http://tolweb.org/Acari> (1996).

Walter, D.E., Proctor, H.C. “Mites: Ecology, evolution and behaviour”, ***University of New South Wales Press***, Netherlands, 494 p. (1999).

Walter, D.E., Proctor, H.C., “Mites in soil, An interactive key to mites and other soil microarthropods”, ***CSIRO Publishing***, Queensland, 180 p. (2001).

Weiland, J.J., Yu, M.H., “A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet”, ***Crop Science***, 43: 814–881 (2003).

Wood, T.G., “Stigmaeidae (Acari: Prostigmata) from the British Solomon Islands”, ***Acarologia***, 13(1): 65-87 (1971).

Wood, T.G., “New and redescribed species of *Ledermuelleria* Oudms. and *Villersia* Oudms. (Acari: Stigmaeidae) from Canada”, ***Acarologia***, 13: 301-318 (1972).

Wood, T.G., “Revision of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata) in the Berlese Collection”, *Acarologia*, 15: 76-95 (1973).

Woolley, T.A., “Acarology. Mites and human welfare”, *Wiley-Interscience Publications*, New York, 484 p. (1988).

Yabsley, M.J., Clay, S.E., Gibbs, S.E.J., Cunningham, M.W., Austel, M.G., “Morphologic and molecular characterization of a *Demodex* (Acari: Demodicidae) species from white-tailed deer (*Odocoileus Virginianus*)”, *ISRN Parasitology*, 2013: 1-7 (2013).

Yılmaz, S., Devran, Z., “Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları”, *Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü*, 35-41 (2003).

Zhang, Z.-Q., “Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness”, *Zootaxa*, 3148: 1-237 (2011).

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., “Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification”, *Genomics*, 20: 176-183 (1994).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Boyabat'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Boyabat'ta, lise öğrenimini ise Sinop'ta tamamladı. 2008 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.