

164653

**RAPD-PCR TEKNİĞİ İLE GAMMARUS
TÜRLERİNİN FİLOGENETİK İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

AYLA DÜZEN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos- 2002

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Komisyonunca kabul edilen 001053 no'lu proje
kapsamında desteklenmiştir.**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**RAPD-PCR TEKNİĞİ İLE GAMMARUS TÜRLERİNİN FİLOGENETİK
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Ayla DÜZEN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr.Ahmet ÖZATA
2002, 60 sayfa

Bazı türlerin hem sistematik hemde genetik çalışmaları için bazı moleküler markırlar geliştirilmiştir. Bunlar izozim, restriksiyon uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve rastgele çoğaltılmış polimeraz DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) dur. RAPD-PCR ekonomik olması ve genomik bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle genetik polimorfizmin belirlenmesi için tercih edilmiştir.

Bu çalışmada Eskişehir, Porsuk Çayı'nın Regülatör ve Kanlıkavak istasyonlarından *Gammarus pulex* örnekleri toplandı. Bu örneklerin DNA' larının 19 primerle amplifikasyonu denenmiştir. Denenen primerlerden 3 tanesinin verdiği amplifikasyon sonuçlarına göre; *Gammarus pulex*'de tür içi polimorfizm olduğu belirlendi. Bu çalışma RAPD-PCR tekniğinin tür içi varyasyonların belirlenmesinde faydalı olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Gammarus, RAPD-PCR, Filogeni, Porsuk Çayı.

ABSTRACT**M.Sc.Thesis****THE IDENTIFICATION OF RELATIONSHIP BETWEEN GAMMARUS
SPECIES BY RAPD-PCR****Ayla DÜZEN****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Programme****Adviser : Prof.Dr.Ahmet ÖZATA
2002, 60 pages**

Molecular markers are currently being developed for identification of some species using isozymes, restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). RAPD-PCR is economic, less laborious and does not need genetic information.

In this work genetic polymorphism on intraspecies by RAPD-PCR method was studied. *Gammarus pulex* was collected from Regulator and Kanlıkavak area of Porsuk River, Eskisehir. Amplification with 19 primers of these samples DNA was tried with respect to the result of 3 of amplification. As a result of three amplification intraspecific polymorphism of *Gammarus pulex* was detected. According to our study, RAPD-PCR was found to be useful to determine genetic variation among *Gammarus pulex* species.

Keywords: Gammarus, RAPD-PCR, Phylogeny, Porsuk River

TEŞEKKÜR

Lisans öğrenimimden bu yana manevi desteğini ve yardımını gördüğüm, çalışmamın her aşamasında engin bilgisinden faydalandığım tez danışmanım Sayın Hocam Prof.Dr.Ahmet ÖZATA' ya şükranlarımı sunarım.

Tez çalışma konumu belirleyerek, beni moleküler biyolojinin en etkili tekniklerinden birini öğrenmeye yönlendiren; bilgisini, güleryüzünü, alçakgönüllüğünü ve iyi niyetini benden esirgemeyerek pek çok konuda kendime örnek aldığım Hocam Doç.Dr.H.Mehtap KUTLU' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarlarının imkanlarını sonuna kadar açan, çalışmamın her aşamasında beni bilgilendiren, tezimde uygulanan tekniği öğretmekle birlikte diğer moleküler teknikler üzerinde inceleme ve çalışma fırsatı veren Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Hocam Doç.Dr. Leyla AÇIK' a şükranlarımı sunarım.

Aynı laboratuvarında haftalarca çalıştığımız, öğrenme aşamasındayken yaptığım her hatayı anlayışla karşılayan, sorularıma sabırla cevap veren, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bundan sonrada öyle olacağına inandığım Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' den Arş.Gör.D.Ayten ÇELEBİ' ye çok teşekkür ederim.

Yaptığımız deneylerde sevinç ve hayal kırıklıklarını birlikte paylaştığımız, bana katlanan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve hayatımda önemli bir yeri olan sayın Hocam Öğr.Gör.Filiz SUSUZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi desteklerini benden asla esirgemeyen, uzakta olsak hep yanımda hissettiğim, zor günlerimde bana en büyük desteği veren annem babam Münise-Haşim DÜZEN ve kardeşlerim Kurtuluş-Çınar DÜZEN'e çok minnettarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Gammarus' un Sistematikteki Yeri	1
1.2. Gammarus' un Sistematik Özellikleri.....	1
1.3. Tatlı Su Amphipodlarının Önemi.....	3
1.4. Porsuk Havzası' nın Tanımı ve Kirliliği.....	4
1.5. Moleküler Sistematikde Kullanılan Bazı Teknikler.....	6
1.5.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	6
1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	7
1.5.2.1. PCR Aşamaları.....	10
1.5.2.2. PCR Optimizasyonu.....	13
1.5.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Gammarus Materyali.....	19
2.1.2. Tampon ve Çözeltiler.....	19
2.1.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
2.1.2.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	20
2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	20
2.1.2.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	21
2.1.3. Sterilizasyon.....	22

2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Toplanan <i>Gammarus</i> Örneklerinin Tür Tayini.....	22
2.2.2. <i>Gammarus pulex</i> Türüne Ait Bireylerden Total DNA İzolasyonu...22	
2.2.3. DNA Konsantrasyon Tayini.....	23
2.2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	23
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
2.2.6 Genetik Uzaklık Tayini.....	24
3. BULGULAR.....	25
3.1. Regülatör İstasyonundan Toplanan <i>Gammarus pulex</i> Örneklerinin Genetik Uzaklıklarının İncelenmesi.....	25
3.2. Kanlıkavak İstasyonundan Toplanan <i>Gammarus pulex</i> Örneklerinin Genetik Uzaklıklarının İncelenmesi.....	39
3.3. Regülatör–Kanlıkavak İstasyonlarından Toplanan <i>Gammarus pulex</i> Örneklerinin Genetik Uzaklıklarının İncelenmesi.....	44
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	49
5. KAYNAKLAR.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	12
3.1. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	27
3.2. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	29
3.3. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	31
3.4. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	33
3.5. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	35
3.6. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	37
3.7. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	40
3.8. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	42
3.9. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	45
3.10. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Porsuk Nehri' nin 1994 yılına ait kirlilik parametreleri.....	4
1.2. Agaroz Jel Elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapabilecek DNA molekülü büyüklükleri.....	11
2.1. Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve %G+C oranları.....	21
3.1. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	28
3.2. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	28
3.3. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	30
3.4. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış.....	30
3.5. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	32
3.6. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	32
3.7. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	34
3.8. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	34
3.9. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	36

3.10. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	36
3.11. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	38
3.12. Regülatör istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	38
3.13. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	41
3.14. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	41
3.15. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	43
3.16. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış.....	43
3.17. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin uzaklıkları.....	46
3.18. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	46
3.19. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin genetik uzaklıkları.....	48
3.20. Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı <i>Gammarus pulex</i> bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

- bp : Baz çifti
- BOD : Biyokimyasal Oksijen ihtiyacı
- C : Sitozin
- °C : Santigrat
- COD : Kimyasal Oksijen ihtiyacı
- CTAB : Hekzadesiltrimetilamonyum Bromid
- DNA : Deoksiribonükleik Asit
- D : Türler arası genetik uzaklık
- dNTP : Deoksinükleotid tri Fosfat
- DO : Çözünmüş Oksijen
- EDTA : Etilendiamin-tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu
- G : Guanin
- HCl : Hidroklorik Asit
- Mg⁺² : Magnezyum
- MgCl₂ : Magnezyum Klorür
- km : Kilometre
- m : Metre
- ml : Mililitre
- mm : Milimetre
- mM : Mili molar
- MW : Moleküler ağırlık
- µM : Mikro molar
- µl : Mikrolitre
- ng : Nanogram
- NaOH : Sodyum Hidroksit
- N_A : A bireylerinin toplam bant sayısı
- N_B : B bireylerinin toplam bant sayısı
- N_{AB} : A ve B bireylerinin ortak bant sayısı
- NH-N : Amonyak azotu
- NO-N : Nitrit azotu
- NO₃-N : Nitrat azotu

- PCR : Polymerase Chain Reaction
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm : Devir/dakika
S : Bireyler arasındaki genetik benzerlik
T : °C cinsinden sıcaklık
TE : Tris-EDTA
T_m : Erime sıcaklığı
UNDP : Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı
UV : Ultraviyole
V : Volt
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Gammarus'un Sistematikteki Yeri

Gammarus cinsi Gammaridae familyası, Amphipoda ordosu, Malacostraca alt sınıfına ait bir Crustacea (Kabuklular)'dir.

1.2. Gammarus'un Sistematik Özellikleri

Crustacea (Kabuklular) büyük çoğunluğu su içerisinde küçük kısmı da sucul ortamlara bağımlı olarak yaşar. Özellikle küçük kabuklular su içerisindeki yaşamın, besin zinciri bakımından, çok önemli bir halkasını oluşturmaları nedeniyle oldukça önemlidir. Kabuklular, eklem bacaklıların birincil olarak suda yaşayan tek sınıfıdır. Karasal ya da yarı karasal yaşayanlar bu uyum için çok büyük bir değişiklik göstermezler. Kabuklular iki büyük gruba ayrılırlar: Entomostraca daha çok küçük kabukluları, Malacostraca ise daha büyük kabukluları kapsar.

Amphipod ordosu yaklaşık tanımlanmış 7000 tür içerir (http-1). Vücutları yanlardan basılmıştır. Büyüklükleri ortalama olarak 2-20 milimetre arasında değişir. Genel görünüşleriyle tıknaz yapıdadırlar; daha çok tesbihböceklerine benzerler (onlardan en önemli farkları yanlardan basık olmaları, kalplerinin ve solungaçlarının abdomende değil göğüste olmasıdır); çoğu saydamdır, bazıları gri, kahverengi, kırmızı, yeşil ya da mavimsi yeşil renkli olanlar vardır; birkaç planktonik türü tamamen saydamdır. Baş, göğsün ilk 1. ya da 2. (Caprellidae'de) segmenti ile kaynaşmıştır. Sefalotoraksın arkasında, eklemli olarak birbirine bağlanmış 7 ya da 6 segment bulunur. Karapaks yoktur. Abdomen, göğüsten belirli bir şekil ve büyüklük bakımından ayrılmaz. Abdomende, üyelerinin yapısı ile ilgili olarak, her biri 3 segmentten oluşmuş iki kısım (metasom, urosom) ayırt edilir. Telson her zaman son segmentten ayrılır (Demirsoy, 1998).

Amphipodların bazı türlerinde erkek bireylerin üreme olgunlukları gözler ve antenlerdeki kimyasal reseptörlerin gelişmesi ile açıklanır. Bu aşamada yüzen amphipod kendine bir eş arar. Üreme süresince erkek amphipod kendinden daha

küçük olan dişiyi üyeleriyle yakalar. Eşleşen bu amphipodlar beraber yüzer bir halde görülebilir. Erkekten dişi üreme kanalına sperm transferi olur (http-2). Gelişme, kuluçka boşluğu içinde geçer. Senede bir defa döl meydana getirme eğilimi vardır. Her defasında tatlı sularda yaşayan türler 15-50, denizde yaşayan türler ise 2-750 yumurta bırakır. Gelişme doğrudan doğrudur. Yumurtalardan çıkan yavrular ana hatları ve üye sayısı bakımından ergin hayvanlara benzerler. Yalnız anten parçalarının sayısı ve üyelerin şekilleri erginlerden farklıdır (Demirsoy, 1998). Bazı türler kuluçka bölgesinden ayrıldıktan sonra yeni bireylere ebeveyn ilgisi gösterir (http-2).

Amphipodlar daha çok denizlerde, bir kısmı tatlısularda çok azı da nemli ve sıcak karalarda yaşarlar (Talitroides). Genellikle kıyılarda bulunurlar. Kıyılarda yaşayanlarda güçlü yön bulma duyusu vardır. Polarize güneş ve ay ışığı kullanarak kısa zamanda yönlerini bulurlar. Ayrıca çok iyi çalışan bir biyolojik saat sayesinde, deniz-kara trafiğini dikkatli bir şekilde saptayabilirler. Bir kısmı yırtıcıdır, bir kısmı parçalanmış hayvansal ve bitkisel maddelerle beslenirler. Antenleriyle detritusu karıştırır ve besin maddelerini maksillipet ya da diğer ağız üyelerinin kılları ile süzerler. Yürüyerek, tırmanarak, sıçrayarak, tutunarak ve yüzerek hareket eden türleri vardır. Yan yan hareket etmeleri çoğunda (Gammaridae) tipiktir. Bir kısmı çamurda Baykal Gölü Amphipod türleri bakımından çok zengin bir durum gösterir. Yer altı sularında da büyük sayılarda ve birçok türle temsil edilirler.

Gammaridae örneklerinin vücutları ince yapılıdır. Birinci antenlerde genellikle bir kamçı bulunur. İkinci antenler birincilerle hemen hemen aynı uzunluktadır. Göğüs bacaklarının ilk 4 çiftinde kaide parçaları çok geniştir. Abdomenin son üye çifti diğerleriyle aynı uzunlukta ya da onlardan daha uzundur. Yüzerek hareket ederler. Çoğu acı ya da tatlı sularda yaşar. Gammarus: Türlerinin bir kısmı denizde, bir kısmı da tatlısularda yaşar. *Gammarus pulex* : Uzunluğu 12-15 mm. Hızlı akan derelerde bulunurlar (Demirsoy, 1998).

Gammaridae türlerinin büyük bir çoğunluğu detritivor, geriye kalanı leşçil, avcı ve çok azıda parazit olan Amphipodlardır. İç su ve denizel ekosistemlerde önemli yeri olan bir gruptur. Sucul ortamlardaki besin zincirinde balık besini olmanın yanı sıra, doğa ekonomisi açısından, özellikle detritus ve çürümekte olan

bitkisel artıklardan hayvansal proteine geçişte rol oynadıkları gibi ekolojik problemlerle ilgili deneysel çalışmalarda da obje olarak kullanılır (Yeşilmen, 1996).

Gammarus cinsi, Kuzey yarımkürede Avrupa ve Kuzey Afrika'da fazla sayıda taksa ile geniş bir alana yayılmış durumdadır. Bu da taksonomik problemlere neden olmaktadır (Karaman ve Pinkster, 1977a, b ve 1987). Şimdiye kadar ki, morfolojik gözlemler, hibridizasyon deneyleri ve izozim polimorfizmleri Karaman ve Pinkster (1977a, b ve 1987)' in yaptığı sınıflandırılmış türlerin taksonomik konumlarını açıklamak için kullanılan başlıca kriterlerdir. Gammarus'un taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanılması zordur. Dikkatli bir morfolojik inceleme ve belirli sayıda karakterlerin belirlenmesini gerektirir (Karaman ve Pinkster, 1977a, b ve 1987). Bu karakterleri gözlemek zordur ve önemli derecedeki morfolojik değişimler taksonomiye daha da karışık bir hale getirir. Uygulanacak bazı moleküler tekniklerle bu gibi sorunlar önlenebilir (Karaman ve Pinkster, 1977a ve 1987).

Ülkemizde bugüne kadar iç sulardan Karaman ve Pinkster (1977a, b ve 1987) tarafından 6 cinse ait 40, Geliday ve arkadaşları (1977) tarafından da 1 Amphipoda türü kaydı verilmiştir. Ancak bugüne kadar Türkiye içsuları genelinde ya da bölgesel olarak özellikle Amphipoda üzerinde yapılmış herhangi bir faunistik çalışma yoktur (Yeşilmen, 1996).

1.3. Tatlı Su Amphipodlarının Önemi

Tatlı su Amphipodları akut toksiklik testlerinde, toksik maddeler için en duyarlı organizma olarak kullanılır. Bu grup, kimyasal kirlilikten ve ağır metal birikiminden en fazla etkilenen grup olarak tespit edilmiştir. Amphipodların çevresel stres faktörlerine ve toksikantlara cevapları hakkında yapılan çalışmalarda yeterli değildir (Malins, 1991 ve Arthur, 1980).

Gammarus spp.' lar sulara karışan çevresel kirleticilere, balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çok çeşitli kirleticilere olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cinsin

toksikolojik çalışmalardaki kullanımı giderek artmaktadır (Arthur, 1980 ve Graney, 1986).

1.4. Porsuk Havzası'nın Tanımı ve Kirliliği

Porsuk çayı; Kütahya ili sınırlarında bulunan Tokul köyü yakınlarından 1170 m.' lik yükseklikten Batı Anadolu Platosundan çıkarak doğu yönüne doğru 435,8 km. mesafelik bir akımla Sakarya nehrine akarsu kavşağında 600 m.' lik bir yükseklikte birleşmektedir (Sandıkçı, 1996). Porsuk çayı Sakarya nehri'nin en önemli koludur. Diğer kolları Sarısu, Seydisuyu, Bardakçı'dır. Porsuk çayı' nın toplam uzunluğu 255 km.' dir (http-3). Porsuk Çayı' nda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Kalkınma Programının (UNDP) katkısı ile yürütülmüş olan su kalitesini izleme ve havza bazında su planlaması konularında çalışmalar bulunmaktadır. Bu projelerin amacı; mevcut su kaynaklarının tespiti, kirlenici kaynakların belirlenmesi, çayın atıkları özümleme hacminin belirlenmesi ve atık yüklerindeki azaltmaların veya yeni kirlenicilerin çaya verilmesinin sınırlandırılması sonucunda su kalitesindeki değişiklik ve iyileştirmenin araştırılıp, su kalitesi ile ilgili gerekli veri sisteminin oluşturulmasıdır. Porsuk Nehri'nin 1994 yılına ait bazı kirlilik parametreleri Çizelge 1.1' de verilmiştir (Sandıkçı, 1996).

Çizelge 1.1 Porsuk Nehri'nin 1994 yılına ait kirlilik parametreleri

İSTASYONLAR										
Parametre	Parametre Birimi	Yıl	Ağaç köy	Çalça	Beş değirmen	Sabuncu	Benzinlik	Şeker Çirtliği	Yeşildon	Yunus emre
T	°C	94	14.3	14.4	14.2	11.1	15.9	14.0	13.6	14.9
NH-N	mg/lt	94	0.33	12.7	12.7	14.0	0.85	4.92	3.07	4.11
NO-N	mg/lt	94	0.02	9.39	0.65	0.64	0.07	0.15	0.10	0.06
NO-N	mg/lt	94	1.52	5.65	5.53	5.13	2.73	0.72	0.61	0.35
COD	mg/lt	94	17.6	32.7	32.4	32.9	29.8	388.5	191.5	139
DO	mg/lt	94	9.4	7.0	6.7	7.0	9.9	4.7	4.5	4.7
BOD	mg/lt	94	1.4	9.5	8.5	8.6	3.1	229.2	75.3	68.5

Porsuk Nehri' nin aktığı alan içerisinde Kütahya ve Eskişehir illeri bulunmaktadır. Nehir suyu Kütahya' nın merkezine kadar kirlenmemiş bir şekildedir. Ancak belediye, endüstriyel ve evsel atıklar suyun kirlenmesine neden olmaktadır. Porsuk suyu Eskişehir' e gelmeden önce üst kısımda bir baraj rezervuarlarıyla tutularak yeterli suyun sağlanması amacıyla kaynak zenginleştirilip kalite yükseltilmeye çalışılmaktadır. Eskişehir'den aşağı olan akımda nehir şehirden gelen; tekstil fabrikası, devlet demir yolları lokomotif fabrikası, şeker fabrikası, belediye mezbahası, organize sanayi bölgesinin atıkları ,kanalizasyon ve evsel atıklarla kirlilik seviyesi artmaktadır. Porsuk Çayı' nın tüm Eskişehir' in atıklarını aldıktan sonra şeker çiftliği gözlem istasyonunda hemen hemen bütün parametreleri açısından 4. sınıf su kalitesinde olduğu belirlenmiş, hidrobiyolojik çalışmalarda da hiçbir canlıya rastlanmamıştır (Sandıkçı, 1996). Bu nedenlerle Porsuk Çayı' ndaki canlılar üzerinde yapılacak biyokimyasal ve moleküler çalışmalarla kirliliğe dayanıklılık veya duyarlılığın belirlenmesi ileride yapılabilecek çalışmalara da ışık tutması açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada Porsuk Nehri' nin iki farklı bölgesi (Regülatör, Kanlıkavak)' nden örnekleri toplanmıştır. Örneklerin morfolojik tür tayinleri yapılmıştır. Toplanan örneklerin DNA' ları izole edildikten sonra RAPD-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA' lar üzerinde bazı değerlendirmeler yapılarak tür içi polimorfizm olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. *Gammarus* cinsi sucül toksiklik çalışmalarında indikatör olarak yaygınca kullanılan bir Amphipoddur. Suda artan kirliliğe özellikle ağır metallere oldukça hassastırlar. Yapılan bazı çalışmalarda birtakım ağır metallere maruz kalan örneklerin enzim aktivasyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Sucül kirlilik tespitinde faydalı *Gammarus* direnç ve ya duyarlılık kazandıran elbette genlerinde saklı olan bilgilerdir. Bu genlerin tespiti ve sonrasında klonlanmasıyla kirliliğe dayanıklılık karakteri çeşitli şekillerde kullanılabilir. Bu çalışmada *Gammarus pulex* tür içi polimorfizminin belirlenmesi ileride bu örnekler arasındaki başka farklılıkların (biyokimyasal ve diğer moleküler özellikler gibi) tespiti için öncü olacaktır.

1.5. Moleküler Sistematikte Kullanılan Bazı Teknikler

Türlerin tanımlanması ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması, gittikçe önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Türlerinin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bunların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri yanısıra son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış rRNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulse Alan Jel Elektrofoezi (PFGE), Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve DNA dizi analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılmaktadır.

Bu yöntemlerin herbiri ile canlılar cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırılmaya ve tanımlanmaya çalışılmaktadır. Her yöntemin uygulama, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

1.5.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

RFLP analizlerinin temelinde DNA fragmentlerinin restriksiyon yerlerindeki genetik polimorfizmin belirlenmesi vardır. Bu yöntem izozimler ya da diğer protein markırlardan daha çok polimorfizm belirler. RFLP analizi birçok hastalıkta da kalıtsal markır olarak kullanılır. DNA sarmalı, özgül olan restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragment oluşur ve bunlar jel elektroforezinde gözlenebilir. Bu fragmentler RFLP olarak adlandırılır. RFLP'nin iki türü bulunmaktadır.

1. Restriksiyon Bölge Polimorfizmleri: Bu gruptakiler daha önceden var olan enzim kesme bölgesini değiştiren ya da yeni kesim bölgeleri oluşturan tek baz değişimleridir. İki allele sahip ve özgül enzimlerle tanımlanabilirler.
2. Eksilme, Araya Girebilme Polimorfizmleri: Bunlar iki allele sahip birçok enzimle tanımlanabilirler (Tanksley ve ark., 1989).

Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Botstein ve ark., 1980)'nin ilk defa 1980' li yıllarda geliştirilmesi ile DNA markırları genetik çeşitliliğin

saptanmasında kullanılmıştır. Bu yöntemde temel unsur, bakteriyal restriksiyon endonükleazların kesim bölgelerinin olması veya olmamasıyla DNA dizilerindeki çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır (Laurie ve ark., 1992). Polimorfik markırlar kültürleri ve genotipleri tanımlamak için, nicel özelliği ve niteliği kontrol eden genleri haritalamak için de kullanılır (Rommens ve ark., 1989).

RFLP analizi için ana yöntem Southern Blotlama tekniğidir. Buna göre izole edilen DNA herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve agaroz jel elektroforezi yapılarak jel üzerinde yürütülür. DNA ethidyum bromid ile boyandıktan sonra bantlar UV altında gözlenir ve tek iplikli hale geldikten sonra filtreye geçirilir. Daha sonra filtre üzerindeki DNA radyoaktif işaretlenmiş bir DNA parçası (prob) ile hibridize edilir. Bundan sonra filtre otoradyografi kaseti içine alınarak fotoğraf filmi üzerine geçmesi sağlanır. Film banyo edilerek ortaya çıkan fragmentlerin analizi yapılır (Maniatis ve ark., 1989).

RFLP'nin genetik kaynakların karakterizasyonunda kullanılmasının en önemli dezavantajı kullanılan materyal ve emeğin maliyetinin yüksek olmasıdır. Gerekli olan seviyede RFLP datası elde etmek için RFLP analizleri için kullanılan bir laboratuvara ihtiyaç duyulması, çok sayıda tür tanımlanacağı durumlarda malzeme ve emeğin daha da artması RFLP analizinin tercihini sınırlandırmaktadır (Andersen ve Fairbanks, 1990). RFLP analizlerinin, teknik karmaşıklığı dışındaki bir diğer dezavantajı da tanımlama aşamalarındaki kısa ömürlü radyoizotopların geniş oranda kullanılıyor olmasıdır (Waugh ve Powell, 1992).

1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk olarak 1985'de tanımlanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Saiki ve ark., 1985) gen analizlerinin kolaylaşmasına imkan sağlamıştır. Bu tekniğin kabul görmesinin başlıca nedenleri, diğer moleküler tekniklere oranla daha ucuz, kolay ve hızlı olmasıdır. PCR tekniği, uygun olduğu takdirde, gen klonlamayı büyük ölçüde kolaylaştırır (Kumar, 1989).

PCR tekniği, DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığıyla çoğaltılmasını sağlayan basit ama başarılı sonuçlar verebilen in vitro DNA sentezi yöntemidir (Saiki ve ark., 1988). PCR ile özel bir DNA dizisi seçilip çoğaltılır. Bu

özellik sadece o dizinin tanınmasını sağlamakla kalmaz, DNA'nın analiz edilmesini de sağlar. PCR, DNA'nın önemli ölçelerde saflaştırılmasını gerektirmemesi sebebiyle, nükleik asitlerle çalışmada harcanan zaman ve emeği azaltmakta ve hücresiz klonlama olarak adlandırılmaktadır (Saiki ve ark., 1988).

PCR'ın temeli DNA denatürasyonu, primerin birleşmesi ve DNA polimerizasyonu prensiplerine dayanır (Kumar, 1989). çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin her iki ucunda diziyi tanıyan belli sayıda ve DNA'nın her iki zincirinde tamamlayıcı olan primer çiftinin zıt yönde ilerlemesiyle DNA sentezinin çok sayıda devir sonunda gerçekleştirilmesidir. Her devirde DNA miktarı ikiye katlanır. Böylece bir sonraki PCR devri için kalıp sayısı da iki katına çıkmış olur. İlk devir sabit bir 5'ucu ve değişken bir 3' ucu olan bir DNA sentezlenmesi ile sonuçlanır. Daha sonra sentezlenen DNA'nın her iki ucuda sabitlenir. Çünkü bu uçlar ya primer sekanslarından elde edilir ya da primerler tarafından belirlenir. PCR ile orijinal kalıbın her iki molekülünden 2^n sayıda yeni DNA kopyası üretilebilir. 30 döngü sonunda tek bir DNA molekülünün yaklaşık 10^{10} kez amplifikasyonu şeklinde açıklanabilir (Mullis ve Faloona, 1987; Saiki ve ark., 1988). Her DNA molekülü, 20 devirde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü vermektedir. Deneyde ortaya çıkan verim ise her devir için yaklaşık %85'dir. Bu da 20 devirde genel verimin 10^6 'dan yaklaşık $2,2 \times 10^5$ (1,8520)'e düşmesine neden olmaktadır. Enzimin tanınması gereken DNA molekülündeki artış ve tekrar tekrar ısınma sonucu enzim aktivitesindeki azalma nedeniyle devir sayısı arttıkça verim azalmaktadır (Saiki, 1985).

PCR ile saç teli, sperm ve değişik dokulardan elde edilen az sayıdaki hücreden DNA amplifikasyonu yapılabilir. Ayrıca parafinlenmiş dokular ve kan için uygulanmaktadır (Mullis ve Floona, 1987).

Parafinle fikse edilmiş dokuların DNA kaynağı olarak kullanıldığı metodların gelişmemesi ile birlikte klinik teşhislerde PCR uygulamalarının kullanımında büyük artış olmuştur (Kumar, 1989 ve Shibata ve ark., 1988). Parafin kesitler öncelikle bir tüp içinde birbirini takip eden deparafinizasyon, deproteinizasyon ve organik maddelerin uzaklaştırılması işlemlerine tabii tutulur.

Böylelikle analiz hızının artması sağlanır ve kontaminasyon engellenir (Kumar, 1989).

Adli uygulamalar ve moleküler arkeolojide zarar görmüş DNA kalıbının kullanılması zorunludur. PCR bu alanlardaki araştırmalara da bir açıklık getirmiştir (Paabo ve ark., 1989).

Uygun primer seçimi PCR amplifikasyonunun başarısını etkileyen faktörlerdendir (Rappolee ve ark.ve 1989; Kumar, 1989). Genellikle 15-30 baz uzunluğunda sentetik oligonükleotidler kullanılır. İdeal bir primerde G+C oranı %50 olmalıdır. İki primer hemen hemen aynı erime özelliklerine sahip olmalı ve birbirinin tamamlayıcısı olmamalıdır. Ayrıca hedefteki tek olan dizilere hibridize olmamalıdır (Kumar, 1989).

Orijinal PCR işleminde (Saiki ve ark., 1985) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti kullanılmıştır. Klenow enzimi yüksek doğrulukta DNA sentezini sağlayan, kullanışlı ve güvenilir bir enzimdir. Ancak termal denatürasyon nedeniyle her devirden sonra enzim eklemek gerekmektedir. Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen termostabil DNA polimerazın kullanılmaya başlanması ile birlikte PCR tekniğinin etkisi artmıştır (Saiki ve ark., 1988). Taq polimeraz olarak adlandırılan bu enzim 95 °C' ye kadar termal denatürasyona oldukça dirençlidir. 70-80 °C arasında optimum, 37 °C'de ise çok düşük bir aktiviteye sahiptir. Enzim yüksek bir verimliliğe sahiptir ve birkaç kilobaz uzunluğundaki segmentleri amplifiye edebilir (Saiki, 1988).

PCR tekniğinin uygulanabilmesi için temel olarak "Thermalcycler" adı verilen cihazda aşağıda sıralanan maddeler olmalıdır:

- Çoğaltılacak (amplifiye edilecek) olan DNA,
- Bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan oligonükleotid primer,
- Primerlere bağlanarak bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapabilecek olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP),
- Polimeraz enziminin çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve tuzlar
- Enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg^{+2}

PCR yöntemi, nükleotid sırası bilinen dizi bölgelerinin dışında kalan bölgelerin çoğaltılmasında da kullanılır. Ters dönmüş PCR olarak adlandırılan bu yaklaşımda; çoğaltılacak olan diziler in vitro yuvarlatma ile ters çevrilip, ayrı bir bölgede yeniden açılır. Böylelikle nükleotid sırası bilinmeyen bir dizi, sırası bilinen iki dizi arasında kalmış olur. Nükleotid sırası bilinen diziler primer bağlanması için kullanılarak nükleotid sırası bilinmeyen dizilerin çoğaltılması mümkün olmaktadır (Triglia ve ark., 1988).

1.5.2.1. PCR Aşamaları

PCR; DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon), primerlerin bağlanması (Annealing), primerlerin uzaması (Extension) olmak üzere 3 aşamada gerçekleşmektedir.

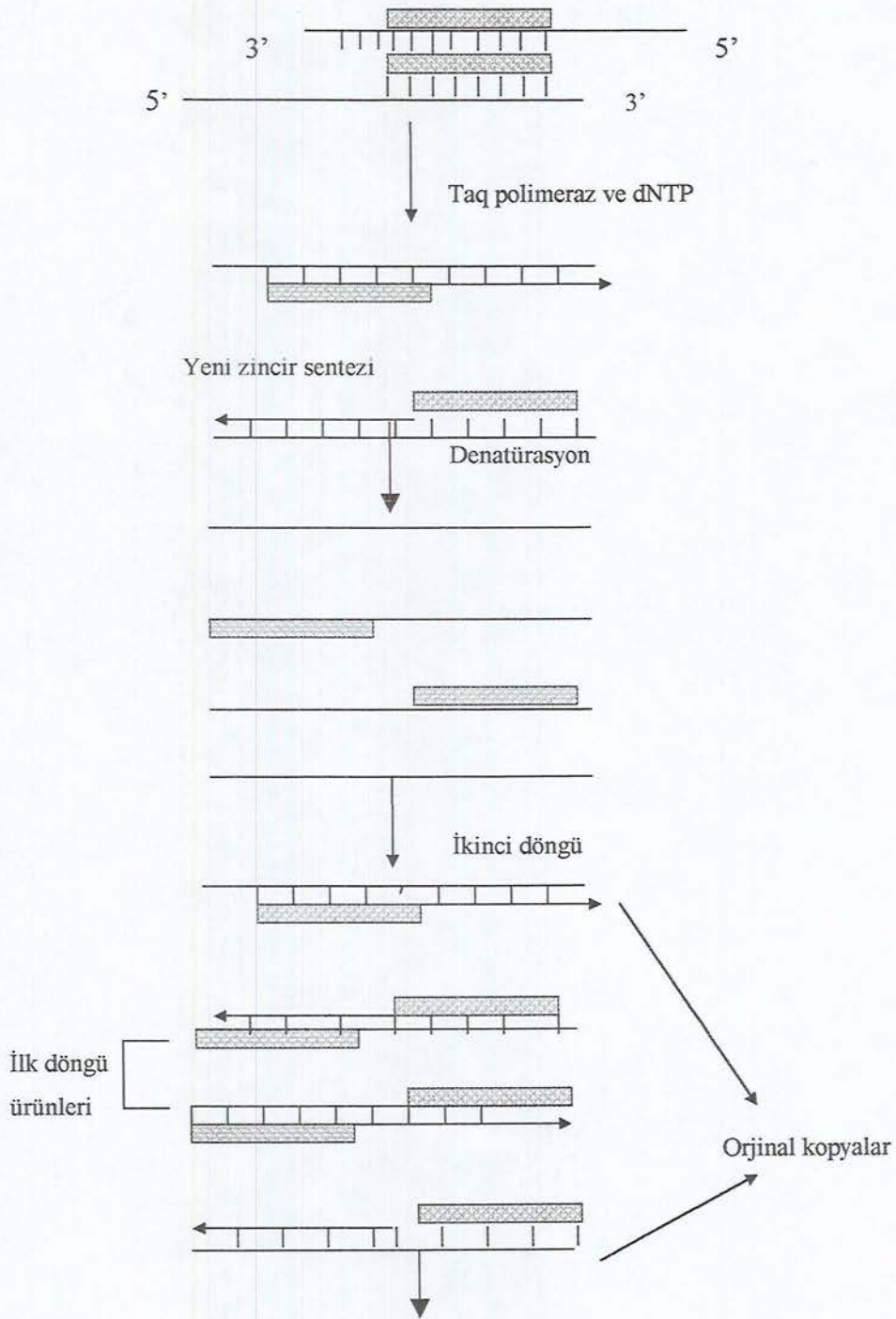
- a. DNA İpliklerinin Birbirinden Ayrılması (Denatürasyon): Sıcaklık ile DNA çift iplikten tek ipliğe dönüşür. Bazı protokollerde belirtilen denatürasyon ısısı 94 °C' dir (Palumbi, 1996). Bu aşamada çoğaltılmak istenen çift sarmal DNA, sarmalları birarada tutan hidrojen bağlarının kopması için yüksek ısı ile denatüre edilir (Saiki ve ark., 1988)
- b. Primerlerin Bağlanması (Annealing): DNA'ya özgü olan primer adı verilen oligonükleotid, birinci aşamada elde edilen DNA sarmalında kendisine tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile birleşir. Primerler hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu başlattıkları için primer yani öncü olarak adlandırılır. Primerlerin bağlanması aşamasında sıcaklık 40-60 °C'ye düşürülür. Primerin bağlanması için gereken süre ve sıcaklık amplifikasyon primerlerinin derişimi ve uzunluğuna bağlıdır (Saiki ve ark., 1988).
- c. Primerlerin Uzaması (Ekstension): Bağlanma tamamlandıktan sonra primer hibritleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için yüksek sıcaklığa dayanıklı olan Taq DNA polimeraz

kullanılır. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 °C sıcaklık uygulanır.

PCR tekniğinde bu üç temel aşama (Şekil) bir döngüyü oluşturur ve bu döngü 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Bu döngüler sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tanımlanmasında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılır. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri ethidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. 100 baz çiftinden daha küçük moleküllerin ayırımında agaroz jel elektroforezi yetersiz kaldığı için, bunların ayırımında genellikle poliakrilamid jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktördür (İşcan ve ark., 2000).

Çizelge 1.2 Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklükleri

Jeldeki agaroz miktarı (g/100 ml)	Etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklüğü (bp)
0,3	5000 - 60000
0,6	1000 - 20000
0,7	800 - 10000
0,9	500 - 7000
1,2	400 - 6000
1,5	200 - 3000
2,0	100 - 2000



Yaklaşık 30döngü sonra $2^{28} = 268\ 435\ 456$ fragment oluşur

Şekil 1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1.5.2.2. PCR Optimizasyonu

Enzim Konsantrasyonu

Taq DNA polimeraz aktivitesi için önerilen derişim, diğer parametreler en yüksek iken her 100 ml reaksiyonda 1-2.5 ünite arasındadır. Bu miktar kalıp veya primere bağlı olarak değişebilir. Bir PCR'ı planlarken her 100 ml'de 0.5-5 ünite arasında enzim derişimi denenerek sonuçlar jel elektroforezinde kontrol edilmelidir. Eđer enzim konsantrasyonu çok yüksekse oluşumu belli olmayan ürünler birikir, eğer çok düşükse istenen üründen yetersiz miktarda oluşur (Innis ve Gelfand, 1990).

Deoksinükleotid Trifosfatlar

Stok dNTP çözeltileri pH: 7.0 olmalı. 1 mM dNTP içeren stok çalışmaları önerilir. 20-200 μ M arasındaki deoksinükleotid derişimlerinde ürün miktarı, özellik ve doğruluk açısından optimal denge ile sonuçlanır. Düşük dNTP derişimleri hedef olmayan yerlerde yanlış primer seçimini minimuma indirir ve yanlış birleşim nükleotidlerin çoğalma ihtimalini azaltır. Hedef dizinin kompozisyonu ve uzunluğu için uygun olan düşük dNTP derişimine karar verilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Magnezyum Derişimi

Magnezyum derişimi, primerlerin bağlanması, PCR ürünleri ve kalıp DNA ipliklerinin ayrılma sıcaklığında yabancı primer-dimer oluşumuna, enzim aktivitesine ve doğruluğuna etki eder. PCR' da Mg^{+2} miktarı toplam dNTP derişiminin 0,5-2,5 mM üzerinde olmalıdır (Innis ve Gelfand, 1990).

Diğer Reaksiyon Bileşenleri

Sıcaklık 20 °C olduğunda PCR için 10-50 mM Tris-HCl (pH: 8.3-8.8) tamponu önerilir. Primerin DNA ipliğine bağlanmasını kolaylaştırmak için reaksiyon karışımına 50 mM' e kadar KCl eklenebilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerlerin DNA İpliğine Bağlanması

Primerlerin birleşmesi için gerekli olan sıcaklık ve süre, primerlerin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve baz kompozisyonuna bağlıdır. Uygun bağlanma sıcaklığı primerlerin erime derecesinin (T_m) 5 °C altındadır. Genellikle 55-72 °C 'de bağlanma sıcaklığı en iyi sonucu verir. Bağlanma sıcaklığının artması yanlış bağlanan primerlere karşı ayrımı artırır ve primerlerin 3' ucundaki yanlış nükleotid uzamasını azaltır (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerin Uzaması

Primer uzama zamanı, hedef dizinin uzunluğu, sıcaklığı ve derişimine göre değişiklik gösterir. Genellikle 72 °C'de primer uzamaları gerçekleşir. 72 °C' de bir dakikalık uzama zamanı 2 kb uzunluğuna kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990).

Denatürasyon Zamanı ve Sıcaklık

PCR'ın yetersizliğine en büyük neden kalıp DNA ve PCR ürünlerinin eksik denatürasyonudur. Tipik denatürasyon durumları 30 saniye için 95 °C veya 15 saniye için 97 °C' dir. Yüksek sıcaklıklar özellikle G+C bakımından zengin hedefler için uygundur. Eksik denatürasyon DNA tortularının geri yükselmesine ve bu sebeple ürün veriminin düşmesine neden olur. Bunun tam tersi olarak çok yüksek ve çok uzun denatürasyon da gereksiz yere enzim aktivitesinin kaybına neden olur (Innis ve Gelfand, 1990).

Devir Sayısı

Diğer parametreler optimize edildiğinde optimum devir sayısı hedef DNA'nın başlangıç derişimine bağlıdır. Gereğinden fazla devir, spesifik olmayan yan ürünlerin miktarını ve karışıklığını artırabilir. Düşük ürün verimine neden olur (Innis ve Gelfand, 1990).

Primer

Genellikle 0.1 ve 0.5 μ M arasında primer derişimleri optimaldir. Yüksek primer derişimleri ve yanlış primer seçimleri, spesifik olmayan ürünlerin toplanmasına, primer- dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan kalıp DNA'dan bağımsız yabancı maddelerin meydana gelmesine neden olur. Spesifik olmayan bu ürünler enzim, dNTP ve primerler için istenen ürünlerle yarışan substratlardır. Tipik primerler 18-28 nükleotid uzunluğunda % 50-60 G+C özelliklerine sahiptir (Innis ve Gelfand, 1990).

1.5.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)

DNA dizi bilgisine duyulan ihtiyaçtan dolayı PCR yönteminin kullanımı sınırlıdır (Williams, 1990). PCR'ın rastgele primerlerle yapılmasıyla herhangi bir genomda rastgele bulunan bölgenin amplifikasyonu sağlanmaktadır. RAPD tekniği; genomun moleküler karakterizasyonunu dizileme, klonlama gerektirmemesi ve az miktarda DNA' ya ihtiyaç duyulması nedeniyle basit ve hızlıdır.(Welsh ve McChelland, 1990; Williams ve ark., 1990; Waugh ve Powell, 1992).

Bu teknikte rastgele nükleotid dizisine sahip primerler, genomik DNA' nın çeşitli bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Oluşan fragmentlerin sayısı ve büyüklüğü, kullanılan primerin nükleotid dizisi ve kalıp DNA' da bu baza bağlı olarak genoma özgü parmak izi oluşturur (Klein- Lankhorst ve ark., 1991).

RAPD-PCR yönteminde primerlerin genomik DNA' ya bağlandığı bölgelerdeki nokta mutasyonları ve bu bölgeler arasında inversiyon ve delesyon

gibi olaylar polimorfizmin ortaya çıkmasında rol oynar (Caetano-Anolles ve ark., 1991).

RAPD markırlar, populasyon genetiği çalışmaları, genetik haritalama, bitki ve hayvan yetiştirme çalışmaları, DNA parmak izi çıkarılması için oldukça uygundur. RAPD markırlar aynı zamanda kromozoma özgü DNA fragmentlerinin hızlı tanımlanması ve izolasyonunu sağlayan etkili bir polimorfizm tahlili sağlar. RAPD markırlar, genom haritalama otomasyonunu, genomu tanımlamak için gerekli fenotipik markır sayısının az olduğu organizmalarda genetik analiz gücünün artmasını sağlar. Bu metodun en avantajlı yanı genotip tayininin otomatikleştirilebilmesidir. RAPD markırlarla yapılan genetik haritalamada, RFLP ya da PCR' la yapılanlara göre daha etkili ve daha büyük bir markır yoğunluğu elde edilebilir (Williams ve ark., 1990). Tüm bu bilgiler göstermiştir ki; RAPD teknolojisi, genetik farklılık çalışmaları, DNA parmak izi çalışmaları (Welsch ve ark., 1991; Michelmores ve ark., 1991; Giovannoni ve ark., 1991; Klein ve ark., 1992) ve genetik haritaların çıkarılması için uygun bir yöntemdir (Reiter ve ark., 1992). RAPD-PCR tekniği donmuş dokulardan elde edilen DNA örneklerinde yapılan denemelerde olumlu sonuçlar vermiştir (Thomson ve Henry, 1993)

RAPD markerları *Gliricidia* (Chalmers ve ark., 1992), siyah *Aspergilli'* nin yakın türleri (Megnegneau ve ark., 1993), parazitik protozoa (Tibayrenc ve ark., 1993)' larda, genetik çeşitliliği kontrol etmede ve ekonomik açıdan önemi olan *Tilapia* tür ve alt türlerini ayırtetmede (Bardakçı ve Skibiski, 1994; Naish ve ark., 1995) başarıyla uygulanmıştır.

Enchytraeus variatus ve *Enchytraeus crypticus* (Annelida), laboratuvar şartlarında çaprazlanamayan iki türdür. Elektron mikroskopunda bile zor ayırt edilebilirler. Ancak biyokimyasal olarak üç allozimleri ile ayırt edilebilirler. 15 farklı oligonükleotid primerle RAPD-PCR tekniği denenmiş ve iki tür arasında genetik farklılık belirlenmiştir. Uzunlukları 260' dan 1800 bp' ye değişen kadar değişen 199 DNA parçasının karşılaştırılmasıyla *Enchytraeus crypticus* % 15 *Enchytraeus variatus* % 19 polimorfizm göstermiştir (Schirmacher ve ark., 1998)

Bir Diptera olan *Cochliomyia hominivorax*, henüz erginleşmediği dönemde, *Cochliomyia macelloriaya'* ya morfolojik olarak benzer. Burada RAPD-PCR' ın

kullanımı bu iki tür için gelişen moleküler genetik markır olarak ortaya çıkmaktadır. Yedi adet güvenilir ve tekrar üretilebilen markır; her tür için 4 populasyondaki beşer tane bireyin DNA' larıyla test edilmiştir. Bu yedi primerden elde edilen verilerin analizleri bu türlerin populasyonlarını arasında türler arası polimorfizm olduğunu göstermiştir. İstatistik sonuçları iki türü ayırt etmek için RAPD-PCR tekniğinin yeterliliğini % 100 destekler niteliktedir (Skoda ve Foster, 2002).

Aphidler (Homoptera) morfolojik ve biyokimyasal farklılıkların çok az görüldüğü bir gruptur. RAPD-PCR tekniği ile allozim çalışmalarının tam tersine 4 aphid (yeşil böcek, Rus buğday aphidi, bezelye aphidi, kahverengi ambrosia aphidi) arasında genetik varyasyonlar tespit edilmiştir (William ve ark., 1992).

Bir diğer çalışmada RAPD-PCR tekniği kullanılarak yine *Cochliomyia hominivorax* türünün altı tanesi güney doğu Brezilya' dan, bir tanesi kuzey Arjantin' den olmak üzere yedi populasyonu arasındaki genetik çeşitlilik çalışılmıştır. RAPD-PCR' da kullanılan 12 primer için yüksek oranda çeşitlilik gözlenmiştir. Bu markırlarla elde edilen sonuçlarla yalnızca potansiyel gen akışı değil, bunların genetik ilişkileri de belirlenmiştir. Sonuçlar *Cochliomyia hominivorax* populasyonlarında taranan alt bölümlerin RAPD ile açıklanabildiğini göstermiştir (Infante ve ark., 1999).

RAPD' in populasyon genetiğindeki dezavantajı; dominant markır olarak ayrılan allellerin yoğunluğudur. RAPD-PCR, amplifikasyonu yapılabilecek herhangi bir allel için hem homozigot hem de heterozigot olan bireylerden alınan kalıp DNA ile fragment verir. Ancak homozigot resesif bireylerde fragment oluşmaz. Dominantlık populasyonlar içinde rastgele birleşmeyi engeller. Çünkü bireysel genotipler ayırt edilemez (Apostol, 1996).

RAPD yöntemi RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. Yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. RAPD' ler izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda markır elde edilmesini sağlar. Van Heusden ve Bachmann (1992)' a göre türler arası ve tür içinde RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm kaydedilebilmektedir (Whitkus ve ark., 1994). RAPD yönteminde izole edilen DNA'nın çok küçük miktarları (~ 25ng)

PCR yöntemi ile çoğaltılır. Sıcaklık 95 °C yükseltilerek DNA denatüre edilir. DNA çoğaltımında genomik DNA' nın belirli bölgelerine homolog olan primer dizileri (tek iplikli diziler) DNA sentezini başlatmada rol oynarlar. Yüksek sıcaklıkta aktif olan Taq polimeraz enzimi ile iki primer arasında kalan DNA bölgesi çoğaltılır. Reaksiyon sonunda elde edilen ürünler, ethidyum bromid ile boyanmış jelde yürütülerek DNA fragmentleri UV altında incelenir (Maniatis, 1989).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Gammarus Materyali

Araştırmada materyal olarak kullanılan Gammarus cinsine ait örnekler Eskişehir, Porsuk Çayı'nın Regülatör ve Kanlıkavak bölgelerinden toplandı. Toplanan örnekler %96'lık etil alkol içerisinde muhafaza edildi.

2.1.2. Tampon ve Çözeltiler

2.1.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler Hekzadesiltrimetilamonyum Bromid (Fluka), Polivinilpirolidon (Fluka), 2-Merkaptoetanol (Sigma), Tris (Sigma), HCl (Fluka), EDTA (Sigma), Sodyum Hidroksit (Sigma), CTAB (Fluka), Tris-HCl (Sigma), NaCl (Merk), Etanol (Fluka), İsopropanol (Fluka), İsoamil alkol (Fluka), Kloroform (Fluka), Sodyum asetat (Sigma)'dir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda 25 mM dNTP (Fermantas), 25mM MgCl₂ (Fermantas), 10 X Taq Polimeraz Tamponu (Fermantas), 5 u/µl Taq polimeraz (Fermantas), Oligonükleotid Primerler (Biolegio, Research Genetics) tampon ve çözeltileri kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler Agaroz (Prona), Tris base (Sigma), Glasiyal asetik asit (Fluka), EDTA (Sigma), Bromfenol mavisi (Sigma), Ethidyum bromür (Sigma)'dir.

2.1.2.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- Stok Tris Çözeltisi: 500 mM Tris pH: 8.0' e HCl ile tamamlanır.
- Stok EDTA Çözeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH (Sodyum Hidroksit) çözeltisi ile pH: 8.0' e ayarlanır.
- 2 X CTAB Ekstraksiyon Tamponu: 100 mM Tris-HCl pH:8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, % 2 Hekzadesiltrimetilamonyum Bromid, % 2 Polivinilpirolidon (40.000 MW), % 0.2 2-Merkaptoetanol (Kullanmadan önce eklenir).
- Etanol
- İsoopropanol- Kloroform-İsoamil alkol: 96 ml kloroform ve 4 ml isoamil alkol karıştırılarak hazırlanır.
- 3 M Sodyum Asetat (NaOAc)
- TE Tamponu: 10 mM Tris (pH: 8.0), 1 mM EDTA (pH: 8.0) stok çözeltileri kullanılarak hazırlanır.

2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Nükleotid Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- MgCl₂: 25mM
- 10 X Taq Polimeraz Tamponu: 100mM Tris-HCl (pH: 8.3), 500 mM KCl, 1 mg/ ml Jelatin
- Taq Polimeraz: 5 u/ µl
- Primerler: Kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'.....3')	%G+C İçeriği
A1	CAGGCCCTTC	70
A2	TGCCGAGCTG	70
LA1	GGGTAACGCC	70
LA11	TTATGAAACGACGGCCAGT	47,4
LA12	ACGACCCACG	70
LA13	CACCACGCCT	70
OPB08	GTCCACACGG	70
OPI18	TGCCCAGCCT	70
B4	GGACTGGAGT	60
B6	TGCTCTGCCC	70
B7	GGTGACGCAG	70
B18	CCACAGCAGT	60
M13	GAGGGTGGCGTTCT	66,7
OPA07	GAAACGGGTG	60
OPR03	ACACAGAGGG	60
UBC443	TGATTGCTCG	50
UBC444	GCAGCCCCAT	70
UBC576	CACCTAATGG	50
UBC578	GGTGTCCACT	60

2.1.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz: % 0.8 ve % 2 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanır.
- Tris asetat (TAE) Tamponu: 242 g Tris base, 57.1 ml Glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0) distile su ile 1 ml'ye tamamlanır.
- Yükleme Tamponu: % 40 Sukroz, % 0.025 Bromfenol mavisi, % 0.25 Ksilen siyanol (Otoklavlanmadı).
- Ethidyum bromür: 10 mg/ ml derişimde hazırlandı ve koyu şişelerde muhafaza edildi (Otoklavlanmadı).

2.1.3. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler 121 °C' de 20 dakika otoklavlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Toplanan *Gammarus* Örneklerinin Tür Tayini

Eskişehir Porsuk Çayı'nın Regülatör ve Kanlıkavak bölgelerinden toplanan, %96' lık alkolde muhafaza edilen *Gammarus* örneklerinin tür tayini Karaman ve Pinkster (1977a)' e göre yapıldı. Örneklerin *Gammarus pulex* türü olduğu tespit edildi.

2.2.2. *Gammarus pulex* Türüne Ait Bireylerden Genomik DNA İzolasyonu

Gammarus pulex türünden genomik DNA' nın elde edilmesi için; bir adet örnek 1,5 ml' lik ependorf tüpü içerisinde 300 µl CTAB tamponunda steril kürdanla parçalandı. Homojenat 65 °C çalkalamalı su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Üzerine 300 µl soğuk kloroform: isoamil alkol (96:4) eklenip + 4 °C' de 13.000 rpm (devir/dakika)'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir ependorfa aktarılıp tekrar 300 µl soğuk kloroform: isoamil alkol (96:4) eklendi. +4 °C' de 13.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üzerine 600 µl soğuk isopropanol ve 25 µl 3 M Sodyum asetat eklenip oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İnkübasyonun ardından + 4 °C' de 13.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Sıvı tamamen dökülüp 100 µl soğuk %70 etanol eklendikten sonra + 4 °C' de 13.000 rpm' de 5 dakika santrifüjü yapıldı. Alkol tamamen dökülüp ependorf 55 °C etüvde 30 dakika kurumaya bırakıldı. Ependorf kuruduktan sonra 20 µl TE tamponu eklendi ve izolat -20 °C' de muhafaza edildi.

2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Tayini

UV absorbanans spektrofotometresi ile 260 nm' de ölçüm yapıldı. Buna göre; $A_{260} = 1$ olduğunda DNA miktarı 50 $\mu\text{g/ml}$ ' dir. DNA saflığı için ise $A_{260}/A_{280} = 1,8$ formülü kullanılarak bulunan değer 1,8' e eşit ise saf DNA, büyük ise saf olmayan DNA elde edildiğine karar verildi.

2.2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR)

RAPD-PCR uygulamaları için Maniatis ve ark. (1989)' nın önerdiği yöntem kullanıldı. Çizelge 2.1' de baz dizilimleri ve % G+C oranları verilen rastgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA'nın herhangi bir bölümü rastgele çoğaltıldı.

PCR reaksiyonu 0.5 ml propilen tüplerde 50 μl ' lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi.

Uygulanan PCR Programı:

96 °C'de	30 saniye (Denatürasyon)	} 45 Döngü
30 °C'de	30 saniye (Primerlerin bağlanması)	
72 °C'de	30 saniye (DNA sentezi)	

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendi ve daha sonra - 20 °C' de saklandı.

2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

RAPD-PCR ürünlerinin analizi için % 2' lik agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi (Maniatis et al, 1989). Yatay konumda elektroforez kullanıldı. % 2 agaroz, TAE tamponunda kaynatılarak çözüldükten sonra 1 μl Etidyum bromür eklendi. Hazırlanan agaroz biraz soğuduktan sonra, uygun tarak yerleştirilen elektroforez plağına döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak çekildi ve plak, TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir PCR örneğinden 10 μl , yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.

PCR ürünleri 40-90 V arasında serbest akımda yürütüldü. Jeller UV translüminatör üzerinde görüntülendi. Jellerin fotoğrafları polaroid makina (DS Polaroid Screen Instant Camera 100 X 81mm) da Polaroid black & White 667 filmi ile çekildi.

2.2.6. Genetik Uzaklık Tayini

Her *Gammarus pulex* örneği için her bir primerden elde edilen PCR ürününün agaroz jelde oluşturduğu DNA bantları birbirleri ile karşılaştırılarak, bant varlığında 1, yokluğunda ise 0 olarak kabul edildi. Örnekler arasındaki genetik benzerlik "S" olarak adlandırıldı $S = 2 \times N_{AB} / N_A + N_B$ formülü kullanılarak hesaplandı. Bu formülde; N_{AB} ; A ve B bireylerinin ortak bant sayısı, N_A ; A bireylerinin toplam bant sayısı, N_B ; B bireylerinin toplam bant sayısıdır.

Bu hesaplama sonrası, D olarak adlandırılan türler arası genetik uzaklık $D = 1 - S$ formülüne göre hesaplandı ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapılarak dendogramlar elde edildi (Wolf ve Rijini, 1993).

3. BULGULAR

Regülatör ve Kanlıkavak istasyonlarından toplanan *Gammarus pulex* örneklerinin total DNA izolasyonları yapıldıktan sonra RAPD-PCR tekniği ile Çizelge 2.1’ de belirtilen primerlerle DNA amplifikasyonu denenmiştir.

3.1 Regülatör İstasyonundan Toplanan *Gammarus pulex* Örneklerinin Genetik Yakınlıklarının İncelenmesi

Regülatör istasyonundan toplanan *G.pulex* bireylerinin OPB08, B7, M13 primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri % 2’ lik agaroz jel elektroforezinde 90 V’ da 30 dakika yürütülerek UV translüminatörde incelendi ve polaroid film kullanılarak fotoğrafları çekildi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Her bireyin toplam bant sayısı belirlendi. Bireylerin birbirleriyle genetik uzaklıkları hesaplandı (Çizelge 3.1, 3.3, 3.5, 3.7, 3.9, 3.11). Bu hesaplamalar sonucunda bulunan değerler kullanılarak SPSS programı ile dendrogramlar elde edildi (Çizelge 3.2, 3.3, 3.5, 3.9, 3.11). Oluşan dendrogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.1’ e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.1)’ lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendograma (Çizelge 3.2) göre genetik uzaklıkları 0 olan G76R, G78R, G70R, G75R, G71R, G73R, G79R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla; G72R ile G74R’ nin; G83R’ nin; G91R ile G15R*’ nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.2).

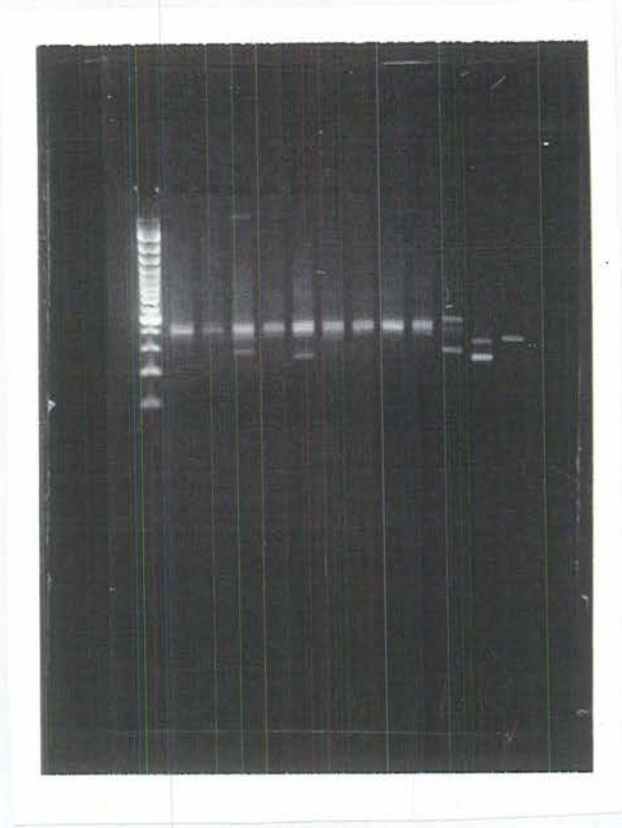
Primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.2’ e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.3)’ lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendograma (Çizelge 3.4) göre genetik uzaklıkları 0 olan G37R, G9R, G24R, G22R, G34R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G32R’ nin; G38R ile G39R (birbirlerine genetik uzaklığı 0’ dır)’ nin; G31R, G30R, G21R (birbirlerine genetik uzaklığı 0’ dır) oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.4).

Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.3' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.5)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.6) göre birbirlerine genetik uzaklıkları 0 olan G26R, G32R, G15R, G20R, G28R, G16R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G19R ile G21R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)' nin; G22R' nin; G13R' nin; G14R ile G18R (birbirlerine genetik uzaklığı 1' dır)' nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.6).

Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.4' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.7)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.8) göre birbirlerine genetik uzaklıkları 0 olan G11R, G12R, G1R, G7R, G8R, G4R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G6R ile G9R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)' nin; G10R' nin; G2R ile G3R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır); G5R' nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.8).

Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.5' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.9)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.10) göre G10R ile G19R arasındaki genetik uzaklık 0.33' dür. Bu gruba G8R yakındır. G18R, G10R' ye G19R' ye olduğundan daha yakındır. G6R ile G20R arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G16R ile G21R arasındaki genetik uzaklık 0.66' dir. G2R ile G4R arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G5R, G2R' ye G4R' ye olduğundan daha yakındır (Çizelge 3.10).

Primer M13 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.6' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.11)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.12) göre GR5, GR6, GR4, GR1 arasındaki genetik uzaklık 0' dır. Bu gruba, G34R ile G26R (birbirlerine genetik uzaklığı 0 dır) grubu, G32R ile G33R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)' nin oluşturduğu grup daha yakındır (Çizelge 3.12).



Şekil 3.1 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : G70R

Hat 3 : G71R

Hat 4 : G72R

Hat 5 : G73R

Hat 6 : G74R

Hat 7 : G75R

Hat 8 : G76R

Hat 9 : G78R

Hat 10 : G79R

Hat 11 : G83R

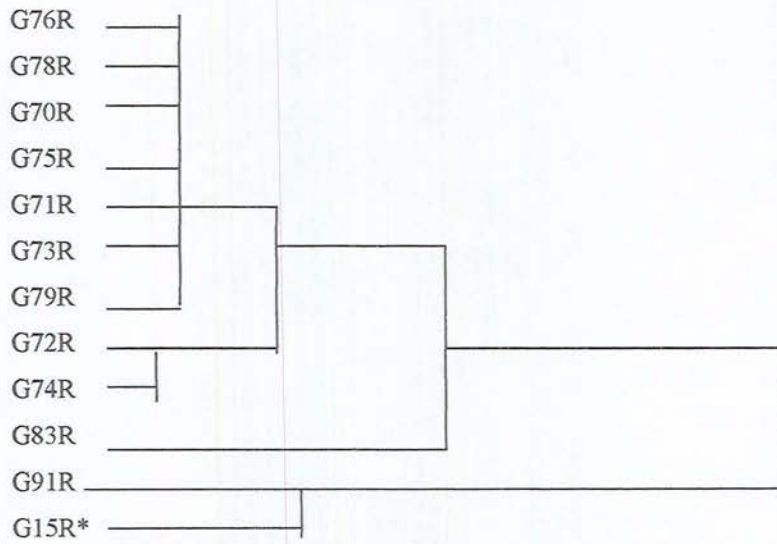
Hat 12 : G91R

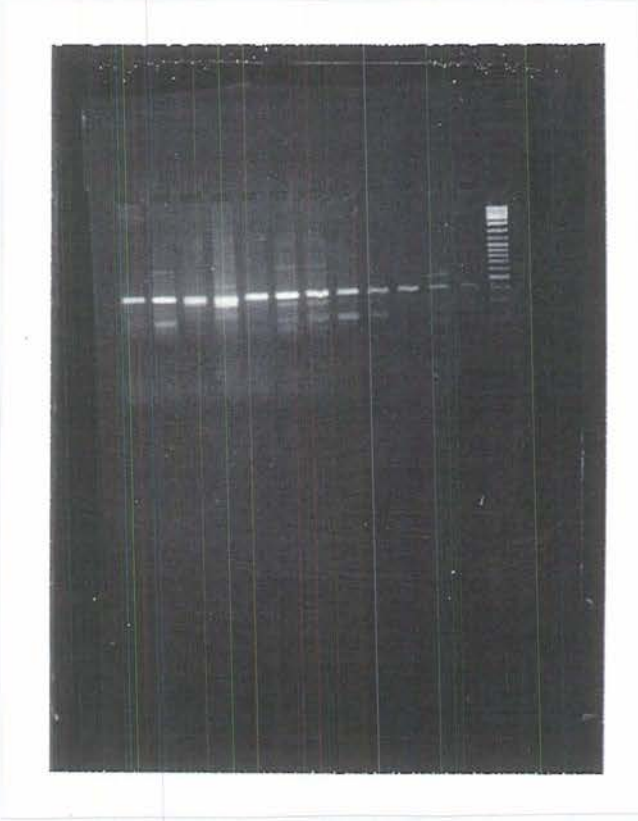
Hat 13 : G15R*

Çizelge 3.1 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G70R	G71R	G72R	G73R	G74R	G75R	G76R	G78R	G79R	G83R	G91R	G15R*
G70R	0											
G71R	0	0										
G72R	0.33	0.33	0									
G73R	0	0	0.33	0								
G74R	0.20	0.20	0.14	0.20	0							
G75R	0	0	0.33	0	0.20	0						
G76R	0	0	0.33	0	0.20	0	0					
G78R	0	0	0.33	0	0.20	0	0	0				
G79R	0	0	0.33	0	0.20	0	0	0	0			
G83R	0.60	0.60	0.43	0.60	0.66	0.60	0.60	0.60	0.60	0		
G91R	1	1	0.66	1	0.60	1	1	1	1	1	0	
G15R*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.33	0

Çizelge 3.2 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.2 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1 : G24R

Hat 2 : G21R

Hat 3 : G22R

Hat 4 : G32R

Hat 5 : G34R

Hat 6 : G31R

Hat 7 : G30R

Hat 8 : G38R

Hat 9 : G39R

Hat 10 : G37R

Hat 11 : G6R

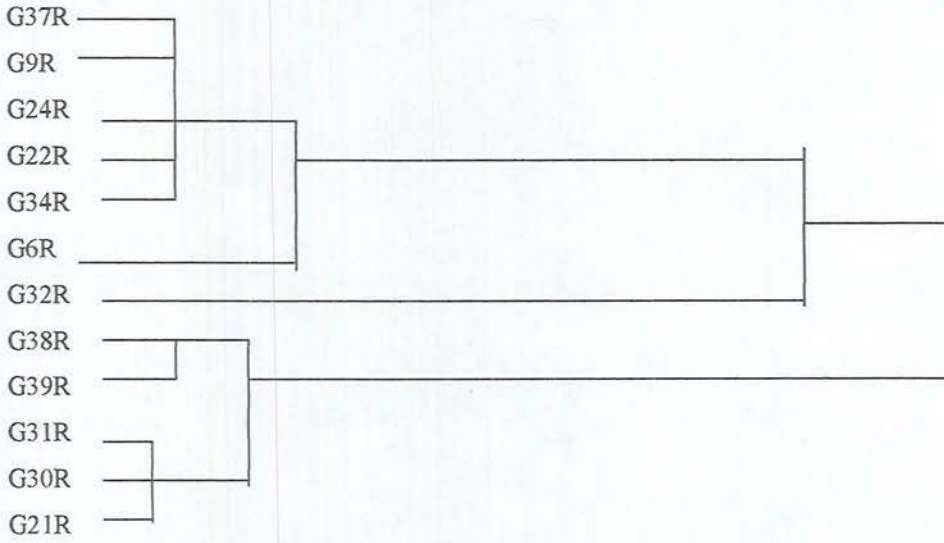
Hat 12 : G9R

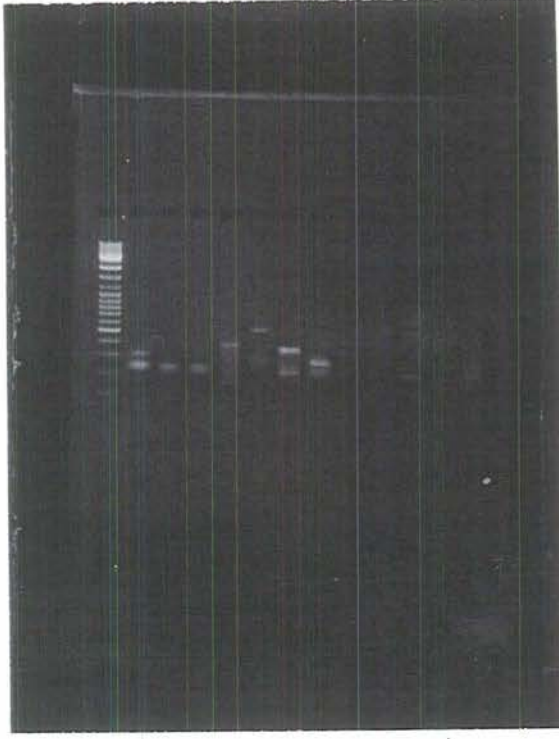
Hat 13 : DNA Ladder Plus

Çizelge 3.3 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G24R	G21R	G22R	G32R	G34R	G31R	G30R	G38R	G39R	G37R	G6R	G9R
G24R	0											
G21R	0.60	0										
G22R	0	0.60	0									
G32R	0.66	0.78	0.66	0								
G34R	0	0.60	0	0.66	0							
G31R	0.66	0.11	0.66	0.80	0.66	0						
G30R	0.66	0.11	0.66	0.80	0.66	0	0					
G38R	0.50	0.14	0.50	0.75	0.50	0.25	0.25	0				
G39R	0.50	0.14	0.50	0.75	0.50	0.25	0.25	0	0			
G37R	0	0.50	0	0.66	0	0.66	0.66	0.50	0.50	0		
G6R	0.33	0.66	0.33	0.71	0.33	0.71	0.71	0.50	0.60	0.33	0	
G9R	0	0.60	0	0.66	0	0.66	0.66	0.50	0.50	0	0.33	0

Çizelge 3.4 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.3 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder mix

Hat 2 : G15R

Hat 3 : G13R

Hat 4 : G14R

Hat 5 : G16R

Hat 6 : G18R

Hat 7 : G19R

Hat 8 : G20R

Hat 9 : G21R

Hat 10 : G22R

Hat 11 : G28R

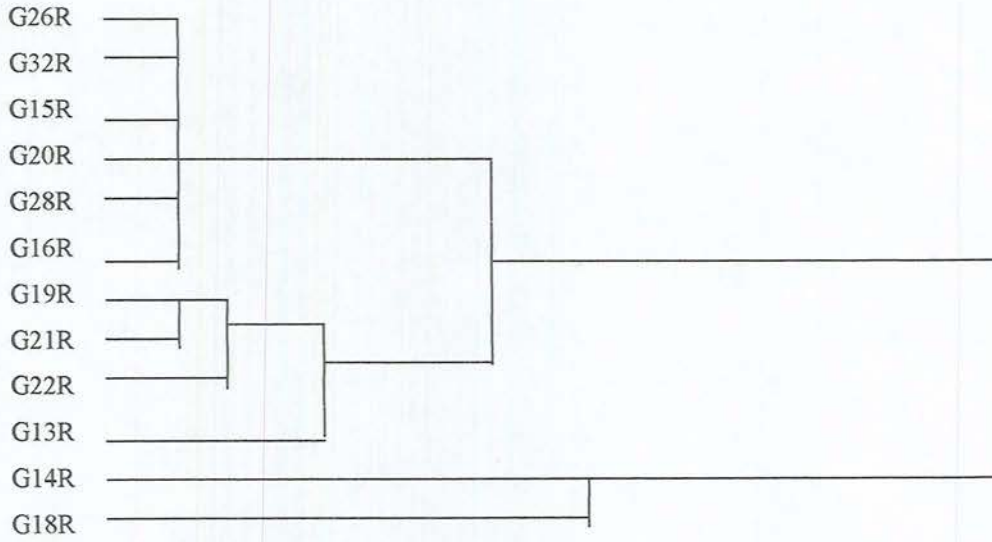
Hat 12 : G26R

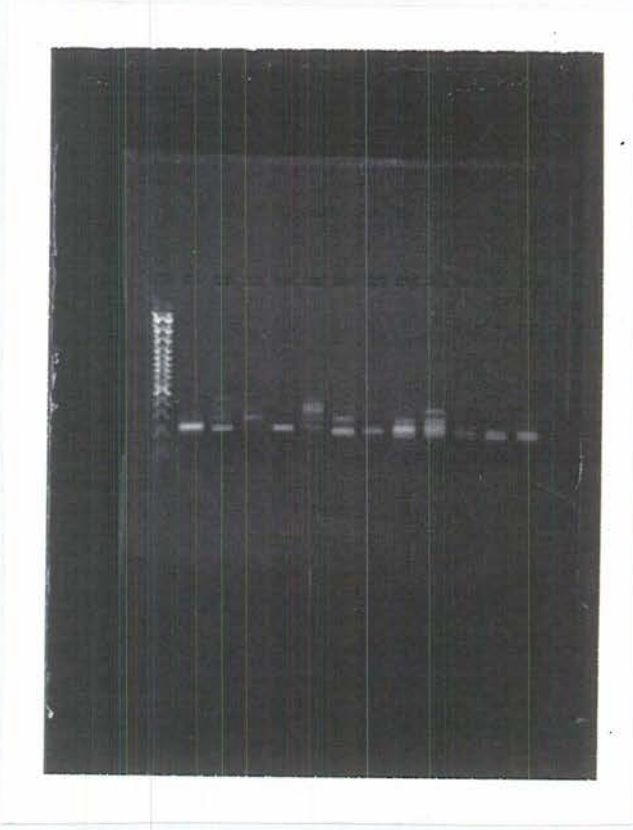
Hat 13 : G32R

Çizelge 3.5 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G15R	G13R	G14R	G16R	G18R	G19R	G20R	G21R	G22R	G28R	G26R	G32R
G15R	0											
G13R	0.50	0										
G14R	1	0.60	0									
G16R	0	0.50	1	0								
G18R	1	1	1	1	0							
G19R	0.33	0.60	0.50	0.33	1	0						
G20R	0	0.50	1	0	1	0.33	0					
G21R	0.33	0.60	0.50	0.33	1	0	0.33	0				
G22R	0.50	0.66	0.60	0.50	0.60	0.20	0.50	0.20	0			
G28R	0	0.50	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0		
G26R	0	0.50	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0	0	
G32R	0	0.50	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0	0	0

Çizelge 3.6 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.4 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder plus

Hat 2 : G1R

Hat 3 : G2R

Hat 4 : G3R

Hat 5 : G4R

Hat 6 : G5R

Hat 7 : G6R

Hat 8 : G7R

Hat 9 : G9R

Hat 10 : G10R

Hat 11 : G8R

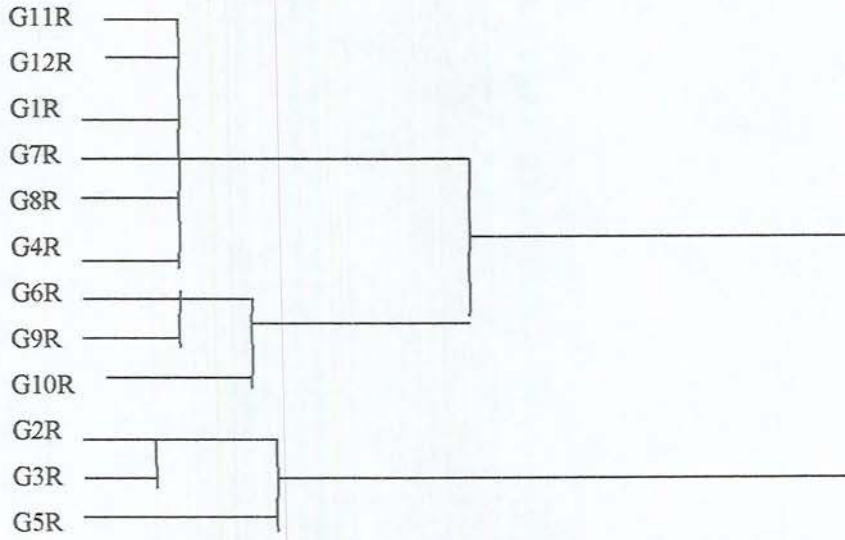
Hat 12 : G11R

Hat 13 : G12R

Çizelge 3.7 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G1R	G2R	G3R	G4R	G5R	G6R	G7R	G9R	G10R	G8R	G11R	G12R
G1R	0											
G2R	1	0										
G3R	1	0.20	0									
G4R	0	1	1	0								
G5R	1	0.50	0.33	1	0							
G6R	0.33	0.60	0.50	0.33	1	0						
G7R	0	1	1	0	1	0.33	0					
G9R	0.33	0.60	0.50	0.33	1	0	0.33	0				
G10R	0.50	0.33	0.20	0.50	0.50	0.20	0.50	0.20	0			
G8R	0	1	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0		
G11R	0	1	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0	0	
G12R	0	1	1	0	1	0.33	0	0.33	0.50	0	0	0

Çizelge 3.8 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





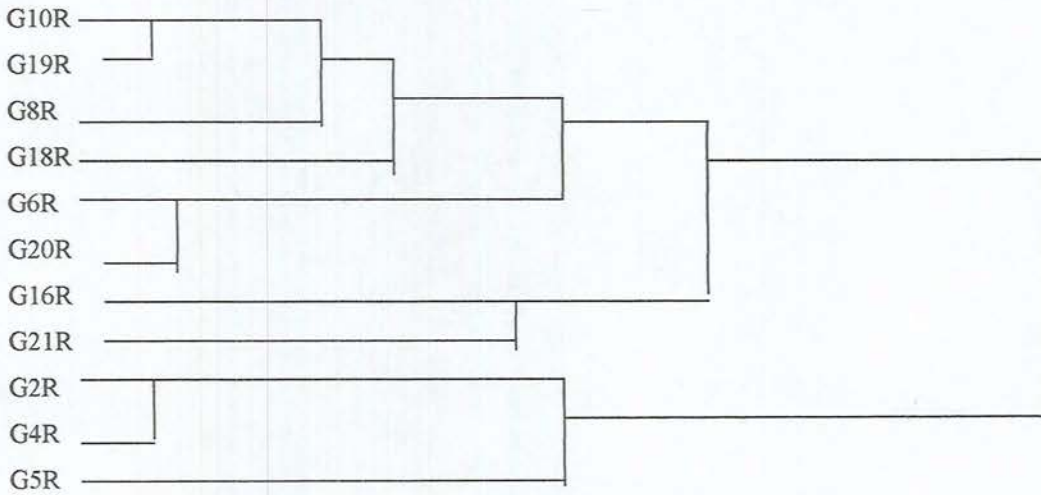
Şekil 3.5 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

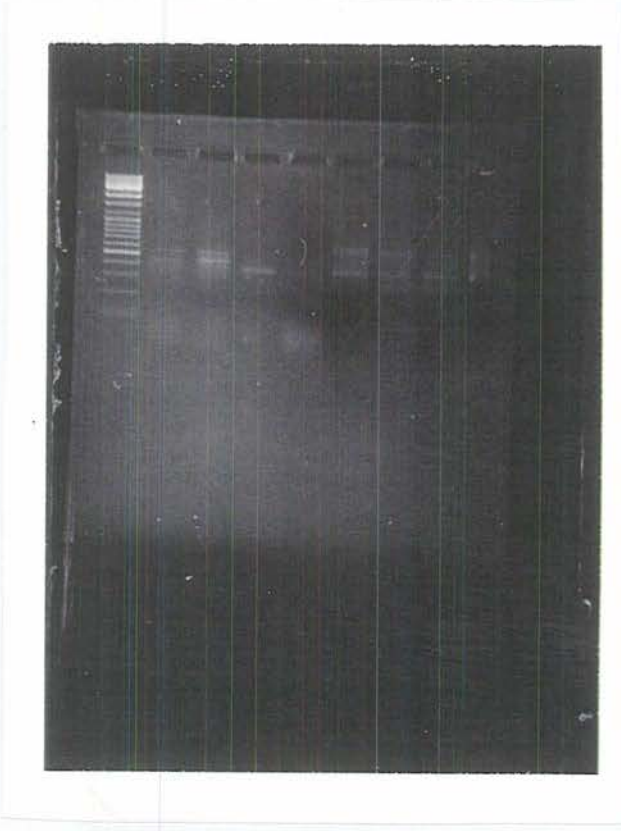
- Hat 1 : -
Hat 2 : G2R
Hat 3 : G4R
Hat 4 : G5R
Hat 5 : G6R
Hat 6 : G8R
Hat 7 : G10R
Hat 8 : G16R
Hat 9 : G18R
Hat 10 : G19R
Hat 11 : G20R
Hat 12 : G21R
Hat 13 : G9R

Çizelge 3.9 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G2R	G4R	G5R	G6R	G8R	G10R	G16R	G18R	G19R	G20R	G21R
G2R	0										
G4R	0.50	0									
G5R	0.43	0.71	0								
G6R	1	1	1	0							
G8R	0.50	0.50	1	0.50	0						
G10R	0.75	0.75	0.45	0.50	0.50	0					
G16R	1	1	0.55	0.66	0.66	0.60	0				
G18R	0.50	0.50	0.71	0.50	0.50	0.50	1	0			
G19R	0.60	0.60	0.50	0.20	0.20	0.33	0.43	0.60	0		
G20R	1	1	1	0.50	0.50	0.50	0.66	0.50	0.60	0	
G21R	1	1	0.71	1	1	0.50	0.66	0.50	0.60	0.50	0

Çizelge 3.10 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.6 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder plus

Hat 2 : G32R

Hat 3 : G33R

Hat 4 : G34R

Hat 5 : G26R

Hat 6 : GR1

Hat 7 : GR4

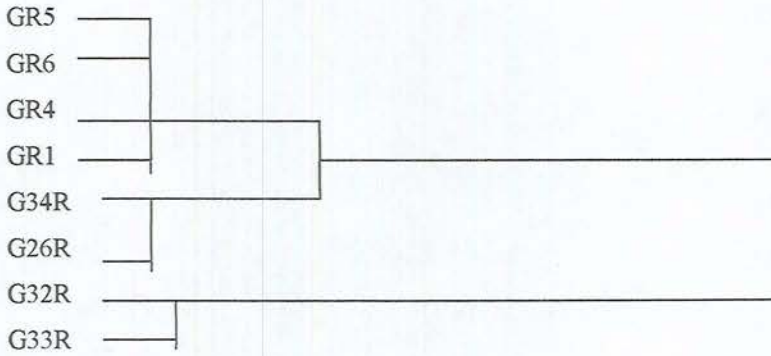
Hat 8 : GR5

Hat 9 : GR6

Çizelge 3.11 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G32R	G33R	G34R	G26R	GR1	GR4	GR5	GR6
G32R	0							
G33R	0	0						
G34R	1	1	0					
G26R	1	1	0	0				
GR1	1	1	0.33	0.33	0			
GR4	1	1	0.50	0.50	0.20	0		
GR5	1	1	0.50	0.50	0.20	0	0	
GR6	1	1	0.50	0.50	0.20	0	0	0

Çizelge 3.12 Regülatör istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı.

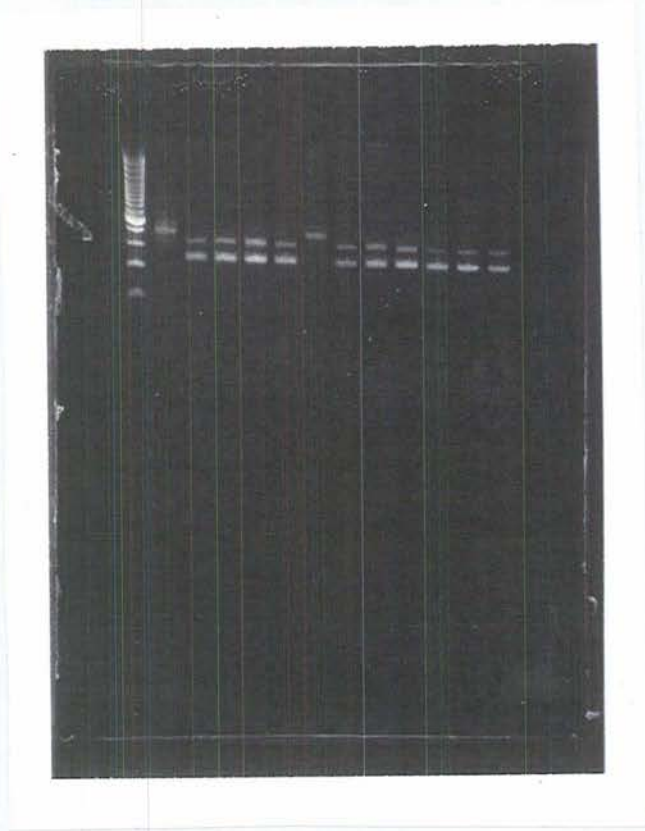


3.2 Kanlıkavak İstasyonundan Toplanan *Gammarus pulex* Örneklerinin Genetik Yakınlıklarının İncelenmesi

Kanlıkavak istasyonundan toplanan *G.pulex* bireylerinin OPB08, B7 primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri % 2' lik agaroz jel elektroforezinde 90 V' da 30 dakika yürütülerek UV translüminatörde incelendi ve poloroid film kullanılarak fotoğrafları çekildi (Şekil 3.7, 3.8). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Her bireyin toplam bant sayısı belirlendi. Bireylerin birbirleriyle genetik uzaklıkları hesaplandı (Çizelge 3.13, 3.15). Bu hesaplamalar sonucunda bulunan değerler kullanılarak SPSS programı ile dendogramlar elde edildi (Çizelge 3.14, 3.16). Oluşan dendogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.7' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.13)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.14) göre G57K, G58K, G45K, G55K, G56K, G57K, G54K, G47K, G48K, G46K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G41K ve G50 arasındaki genetik uzaklık 0.33' dür. G41K ve G50K' nin ilk gruba genetik uzaklığı 1' dir (Çizelge 3.14).

Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.8' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.15)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.16) göre G49K, G59K, G46K, G48K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. Bu gruba sırasıyla G56K' nın; G55K' nın G57K' nın G47K' nın G54K (birbirlerine genetik uzaklıkları 0' dır)' nın G42K'nın; G45K ile G50K (birbirlerine genetik uzaklıkları 1' dır)' nın oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.16).



Şekil 3.7 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : G41K

Hat 3 : G45K

Hat 4 : G46K

Hat 5 : G47K

Hat 6 : G48K

Hat 7 : G50K

Hat 8 : G52K

Hat 9 : G54K

Hat 10 : G55K

Hat 11 : G56K

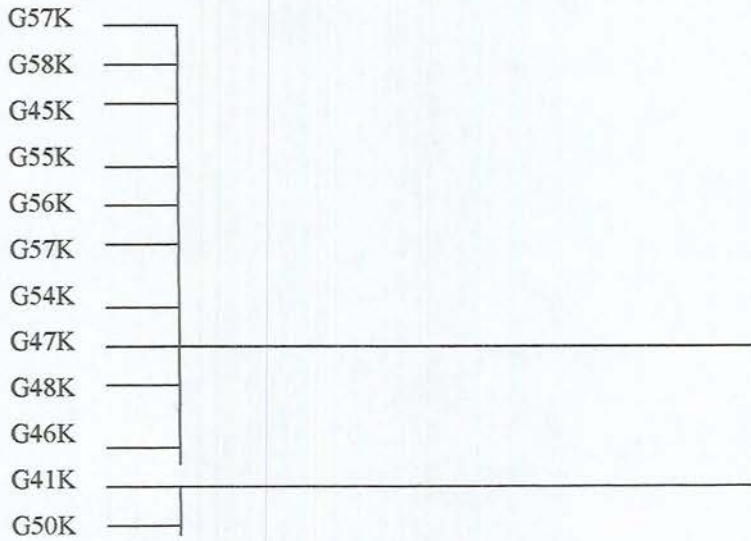
Hat 12 : G57K

Hat 13 : G58K

Çizelge 3.13 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerinin genetik uzaklıkları

	G41K	G45K	G46K	G47K	G48K	G50K	G52K	G54K	G55K	G56K	G57K	G58K
G41K	0											
G45K	1	0										
G46K	1	0	0									
G47K	1	0	0	0								
G48K	1	0	0	0	0							
G50K	0.33	1	1	1	1	0						
G52K	1	0	0	0	0	1	0					
G54K	1	0	0	0	0	1	0	0				
G55K	1	0	0	0	0	1	0	0	0			
G56K	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
G57K	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
G58K	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.14 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.8 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder plus

Hat 2 : G42K

Hat 3 : G45K

Hat 4 : G46K

Hat 5 : G47K

Hat 6 : G48K

Hat 7 : G49K

Hat 8 : G54K

Hat 9 : G50K

Hat 10 : G55K

Hat 11 : G57K

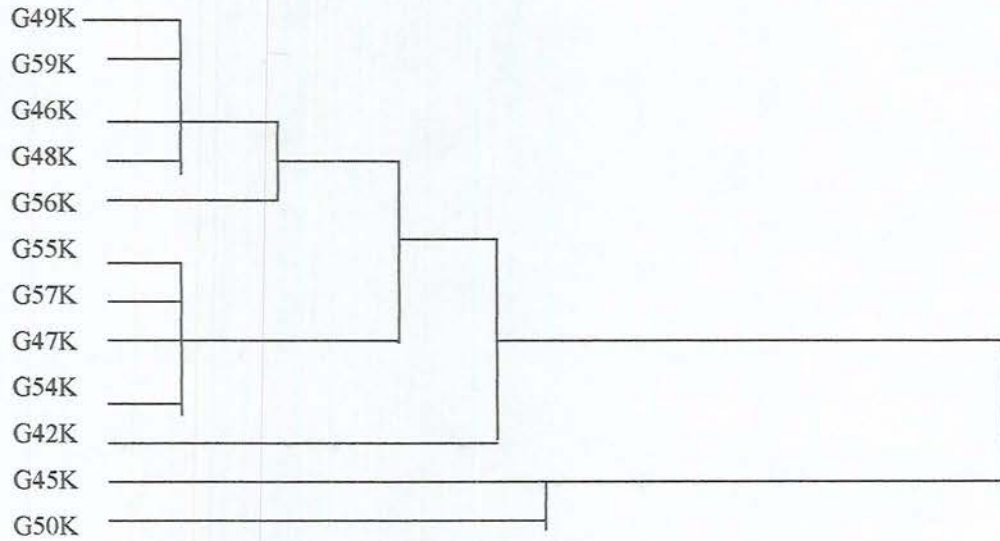
Hat 12 : G59K

Hat 13 : G56K

Çizelge 3.15 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G42K	G45K	G46K	G47K	G48K	G49K	G54K	G50K	G55K	G57K	G59K	G56K
G42K	0.											
G45K	1	0										
G46K	0.50	1	0									
G47K	0.33	1	0.33	0								
G48K	0.50	1	0	0.33	0							
G49K	0.50	1	0	0.33	0	0						
G54K	0.33	1	0.33	0	0.33	0.33	0					
G50K	0.33	1	1	1	1	1	1	0				
G55K	0.33	1	0.33	0	0.33	0.33	0	1	0			
G57K	0.33	1	0.33	0	0.33	0.33	0	1	0	0		
G59K	0.50	1	0	0.33	0	0	0.33	1	0.33	0.33	0	
G56K	0.60	1	0.20	0.50	0.20	0.20	0.50	1	0.50	0.50	0.20	0

Çizelge 3.16 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı

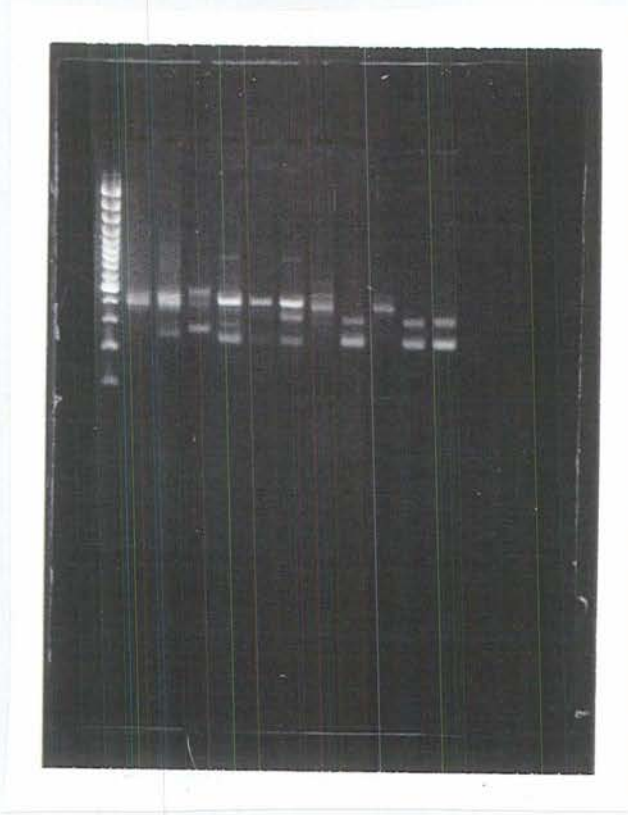


3.3 Regülatör-Kanlıkavak İstasyonlarından Toplanan *Gammarus pulex* Örneklerinin Genetik Yakınlıklarının İncelenmesi

Regülatör ve Kanlıkavak istasyonundan toplanan *G.pulex* bireylerinin OPB08, B7 primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri % 2' lik agaroz jel elektroforezinde 90 V' da 30 dakika yürütülerek UV translüminatörde incelendi ve poloroid film kullanılarak fotoğrafları çekildi (Şekil 3.9, 3.10). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Her bireyin toplam bant sayısı belirlendi. Bireylerin birbirleriyle genetik uzaklıkları hesaplandı (Çizelge 3.17, 3.19). Bu hesaplamalar sonucunda bulunan değerler kullanılarak SPSS programı ile dendrogramlar elde edildi (Çizelge 3.18, 3.20). Oluşan dendogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.9' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.17)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.18) göre G52K, G54K, G45K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G74R ve G21R arasındaki genetik uzaklık 0.25' dir. G24R ile G30R arasındaki genetik uzaklık 0.33 dür. G83R ile G41K arasındaki genetik uzaklık 0.33' dür. G70R ile G50K arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G74R ile G21R' ve G24R ile G30R grupları ilk grup olan Kanlıkavak gruplarına G83R ile G41R ve G70R ile G50K' nın oluşturduğu gruptan daha yakındır (Çizelge 3.18).

Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.10' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.19)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.20) göre G50K ile G20R arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G49K' nın bu ikiliye genetik uzaklığı 0.50' dir. G46K ile G59K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G54K' nın bu ikiliye genetik yakınlığı 0s' dır. G57K ile G55K arasındaki genetik yakınlık 0' dır. G19R' nin bu ikiliye genetik uzaklığı 0.20' dir (Çizelge 3.20).



Şekil 3.9 Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder plus

Hat 2 : G70R

Hat 3 : G74R

Hat 4 : G83R

Hat 5 : G21R

Hat 6 : G24R

Hat 7 : G30R

Hat 8 : G41K

Hat 9 : G45K

Hat 10 : G50K

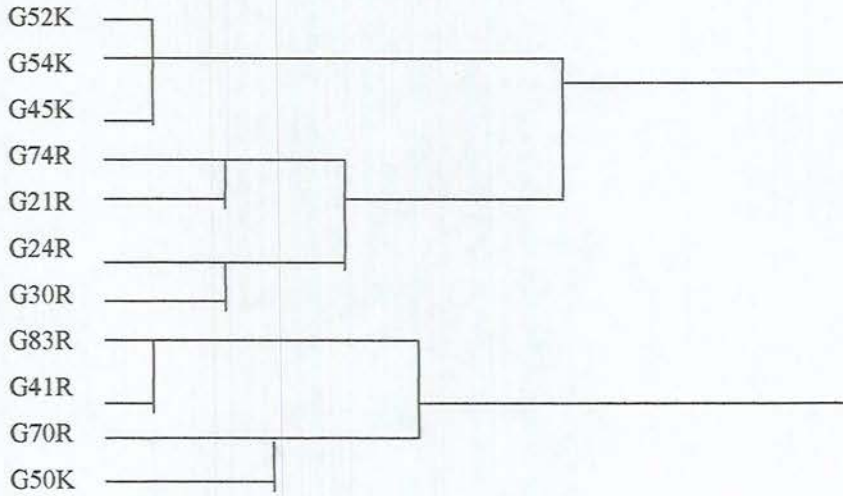
Hat 11 : G52K

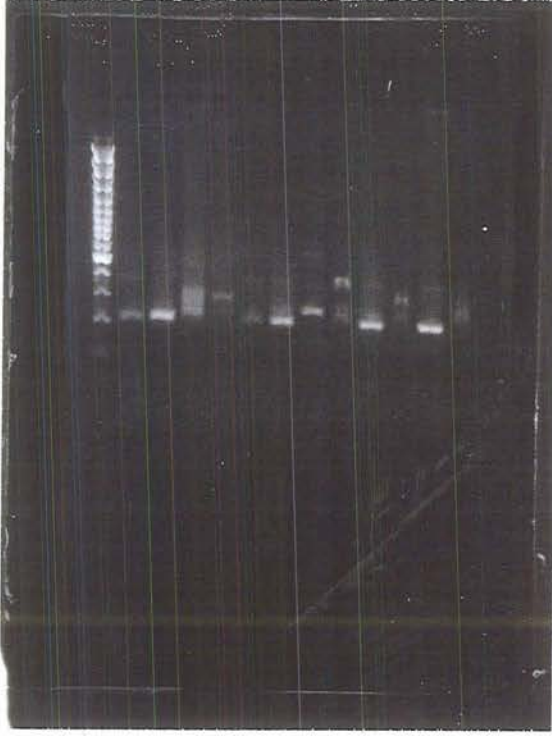
Hat 12 : G54K

Çizelge 3.17 Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin genetik uzaklıkları

	G70R	G74R	G83R	G21R	G24R	G30R	G41K	G45K	G50K	G52K	G54K
G70R	0										
G74R	0.20	0									
G83R	0.60	0.66	0								
G21R	0.43	0.25	0.75	0							
G24R	0.50	0.20	1	0.43	0						
G30R	0.66	0.43	1	0.33	0.33	0					
G41K	0.60	0.66	0.33	0.75	1	1	0				
G45K	1	0.60	1	0.71	0.50	0.33	1	0			
G50K	0.50	0.60	0.60	0.71	0.50	0.66	0.60	1	0		
G52K	1	0.60	1	0.71	0.50	0.33	1	0	1	0	
G54K	1	0.60	1	0.71	0.50	0.33	1	0	1	0	0

Çizelge 3.18 Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı





Şekil 3.10 Regülatör-Kanlıkavak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1 : DNA ladder plus

Hat 2 : G46K

Hat 3 : G47K

Hat 4 : G49K

Hat 5 : G50K

Hat 6 : G59K

Hat 7 : G57K

Hat 8 : G4R

Hat 9 : G19R

Hat 10 : G20R

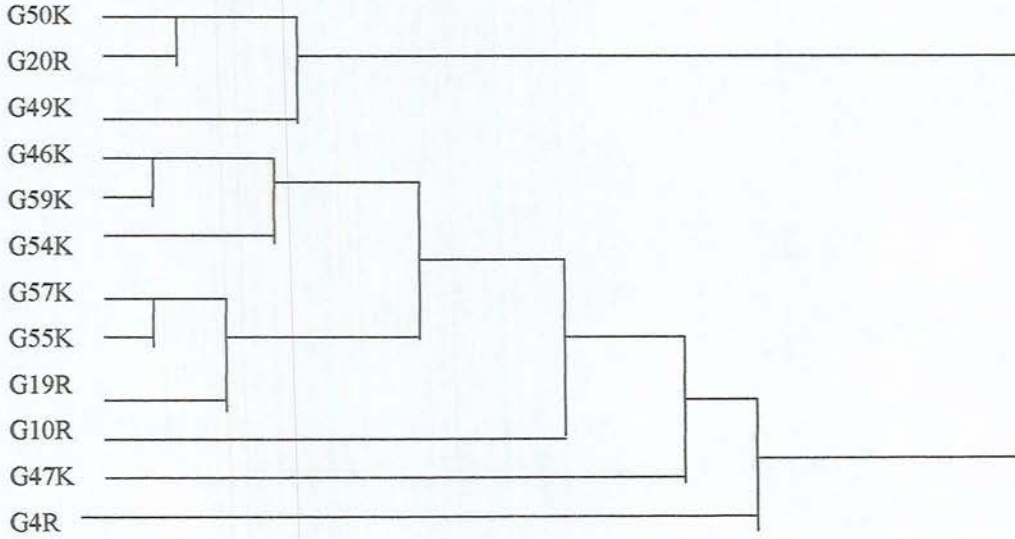
Hat 11 : G54K

Hat 12 : G10R

Çizelge 3.19 Regülatör-Kanlıkvak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerinin genetik uzaklıkları

	G46K	G47K	G49K	G50K	G59K	G57K	G4R	G19R	G55K	G20R	G54K	G10R
G46K	0											
G47K	0.33	0										
G49K	0.60	0.50	0									
G50K	1	1	0.50	0								
G59K	0	0.33	1	1	0							
G57K	0.20	0.50	1	1	0.20	0						
G4R	1	1	1	1	1	0.60	0					
G19R	0.50	1	1	1	0.50	0.20	0.50	0				
G55K	0.20	0.50	1	1	0.20	0	0.60	0.20	0			
G20R	1	1	0.50	0	1	1	1	1	1	0		
G54K	0	1	1	1	0	0.20	1	0.50	0.20	1	0	
G10R	0.60	0.50	0.66	0.50	0.60	0.33	0.60	0.20	0.33	0.50	0.60	0

Çizelge 3.20 Regülatör-Kanlıkvak istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerinin kümeleme yöntemi ile hazırlanmış dendrogramı



4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gammarus spp.' lar sulara karışan çevresel kirleticilere, balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çok çeşitli kirleticilere (kanalizasyon atıkları, ağır metaller gibi) olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilebilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cins toksikolojik çalışmalarda indikatör olarak yaygınca kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Porsuk Nehri' nin iki farklı bölgesi (Regülatör, Kanlıkavak)' nden *Gammarus pulex* örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerin DNA' ları izole edildikten sonra RAPD-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA' lar üzerinde bazı değerlendirmeler yapılarak tür içi polimorfizm olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda birtakım ağır metallere maruz kalan örneklerin enzim aktivasyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Sucul kirlilik tespitinde faydalı *Gammarus* direnç ve ya duyarlılık kazandıran elbette genlerinde saklı olan bilgilerdir. Bu genlerin tespiti ve sonrasında klonlanmasıyla kirliliğe dayanıklılık karakteri çeşitli şekillerde kullanılabilir. Bu çalışmada *Gammarus pulex* tür içi polimorfizminin belirlenmesi ileride bu örnekler arasındaki başka farklılıkların (biyokimyasal ve diğer moleküler özellikler gibi) tespiti için öncü olacaktır.

Gammarus cinsi, Kuzey yarımkürede Avrupa ve Kuzey Afrika' da tatlı sularda ve denizlerde fazla sayıda taksa ile geniş bir alana yayılmış durumdadır. Bu derece geniş yayılım göstermesi taksonomik problemlere neden olmaktadır (Karaman ve Pinkster, 1977a, b, 1987). Şimdiye kadar ki, morfolojik gözlemler, hibridizasyon deneyleri ve izozim polimorfizmleri Karaman ve Pinster (1977a, b, 1987) türlerin taksonomik konumlarını açıklamak için kullanılan yöntemlerdir. Ancak *Gammarus*' un taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanılması zordur (Pinkster, 1983). Dikkatli bir morfolojik inceleme ve belirli sayıda karakterlerin belirlenmesini gerektirir (Karaman ve Pinkster, 1977a, b, 1987). Bu karakterleri gözlemlemek zordur ve önemli derecedeki morfolojik benzerlikler taksomiye daha da karışık bir hale getirir (Pinkster, 1983).

Uygulanacak bazı moleküler tekniklerle bu gibi sorunlar önlenabilir (Karaman ve Pinkster, 1977a).

Bugüne kadar ülkemizde iç sulardan Karaman ve Pinkster (1977a, b, 1987) tarafından 6 cinse ait 40, Geliday ve arkadaşları (1977) tarafından da 1 Amphipoda türü kaydı verilmiştir. Ancak bugüne kadar Türkiye içsuları genelinde ya da bölgesel olarak özellikle Amphipoda üzerinde yapılmış herhangi bir faunistik çalışma yoktur (Yeşilmen, 1996). Gammarusun sucul kirliliğe duyarlı bir organizma olması, bu canlının taksonomisi, biyokimyası ve moleküler yapısı ile ilgili yapılacak çalışmalara önem kazandırmaktadır.

RAPD-PCR tekniğinde rastgele nükleotid dizisine sahip oligonükleotid primerler, genomik DNA'nın çeşitli bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Oluşan fragmentlerin sayısı ve büyüklüğü, kullanılan primerin nükleotid dizisi ve kalıp DNA'da bu baza bağlı olarak genoma özgü parmak izi oluşturur (Klein-Lankhorst ve ark., 1992).

RAPD markırlar, populasyon genetiği çalışmaları, genetik haritalama, bitki ve hayvan yetiştirme çalışmaları, DNA parmak izi çıkarılması için oldukça uygundur. RAPD markırlar aynı zamanda kromozoma özgü DNA fragmentlerinin çabuk tanımlanması ve izolasyonunu sağlayan etkili bir polimorfizm tahlili sağlar. RAPD markırlar, genom haritalama otomasyonunu, genomu tanımlamak için gerekli fenotipik markır sayısının az olduğu organizmalarda genetik analiz gücünün artmasını sağlar. Bu metodun en avantajlı yanı genotip tayininin otomatikleştirilebilmesidir (Williams ve ark., 1990).

Enchytraeus variatus ve *Enchytraeus crypticus* (Annelida), laboratuvar şartlarında çaprazlanamayan iki türdür. Elektron mikroskopunda bile zor ayırt edilebilirler. Ancak biyokimyasal olarak üç allozimleri ile ayırt edilebilirler. Almanya' da bu iki türün 15 farklı oligonükleotid primerle RAPD-PCR tekniği denenmiş ve aralarında genetik farklılık olduğu belirlenmiştir. Uzunlukları 260' dan 1800 bp' ye değişen kadar değişen 199 DNA parçasının karşılaştırılmasıyla *Enchytraeus crypticus* % 15 *Enchytraeus variatus* % 19 polimorfizm göstermiştir (Schirmacher ve ark., 1998).

Bir Diptera olan *Cochliomyia hominivorax*, henüz erginleşmediği dönemde, *Cochliomyia macelloriaya*' ya morfolojik açıdan oldukça benzerdir. Burada

RAPD-PCR yöntemi bu iki tür için gelişen moleküler genetik markır olarak kullanılmıştır. Yedi adet güvenilir ve tekrar üretilebilen markır; her tür için 4 populasyondaki beşer tane bireyin DNA' larıyla test edilmiştir. Bu yedi primerden elde edilen verilerin analizleri bu türlerin populasyonlarını arasında türler arası polimorfizm olduğunu göstermiştir. İstatistik sonuçları iki türü ayırt etmek için RAPD-PCR tekniğinin yeterliliğini % 100 destekler desteklemektedir (Skoda ve Foster, 2002).

Aphidler (Homoptera) morfolojik ve biyokimyasal farklılıkların çok az görüldüğü bir gruptur. RAPD-PCR tekniği ile allozim çalışmalarının tam tersine 4 aphid (yeşil böcek, Rus buğday aphidi, bezelye aphidi, kahverengi ambrosia aphidi) arasında genetik varyasyonlar tespit edilmiştir (William ve ark., 1992).

Bir diğer çalışmada RAPD-PCR tekniği kullanılarak yine *Cochliomyia hominivorax*. türünün altı tanesi güney doğu Brezilya' dan, bir tanesi kuzey Arjantin' den olmak üzere yedi populasyonu arasındaki genetik çeşitlilik çalışılmıştır. RAPD-PCR' da kullanılan 12 primer için yüksek oranda çeşitlilik gözlenmiştir. Bu markırlarla elde edilen sonuçlarla yalnızca potansiyel gen akışı değil, bunların genetik ilişkileri de belirlenmiştir. Sonuçlar *Cochliomyia hominivorax* populasyonlarında taranan alt bölümlerin RAPD ile açıklanabildiğini göstermiştir (Infante ve ark., 1999).

Bu çalışmada Regülatör istasyonu örneklerinin primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.1' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.1)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.2) göre genetik uzaklıkları 0 olan G76R, G78R, G70R, G75R, G71R, G73R, G79R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla; G72R ile G74R' nin; G83R' nin; G91R ile G15R*' nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.2). Şekil 3.2' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.3)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.4) göre genetik uzaklıkları 0 olan G37R, G9R, G24R, G22R, G34R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G32R' nin; G38R ile G39R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)' nin; G31R, G30R, G21R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır) oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.4).

Regülatör istasyonunun Primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.3' den yapılan hesaplama (Çizelge 3.5)'lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.6) göre genetik uzaklıkları 0 olan G26R, G32R, G15R, G20R, G28R, G16R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G19R ile G21R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)' nin; G22R' nin; G13R' nin; G14R ile G18R (birbirlerine genetik uzaklığı 1' dır)' nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.6). Şekil 3.4' den yapılan hesaplama (Çizelge 3.7)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.8) göre genetik uzaklıkları 0 olan G11R, G12R, G1R, G7R, G8R, G4R bir grup oluşturur. Bu gruba yakın diğer gruplar sırasıyla G6R ile G9R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır)'nin; G10R' nin; G2R ile G3R (birbirlerine genetik uzaklığı 0' dır); G5R' nin oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.8). Şekil 3.5' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.9)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.10) göre G10R ile G19R arasındaki genetik uzaklık 0.33' dür. Bu gruba G8R yakındır. G18R, G10R' ye G19R' ye olduğundan daha yakındır. G6R ile G20R arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G16R ile G21R arasındaki genetik uzaklık 0.66' dır. G2R ile G4R arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G5R, G2R' ye G4R' ye olduğundan daha yakındır (Çizelge 3.10).

Regülatör örneklerinin primer M13 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.6' dan yapılan hesaplama (Çizelge 3.11)'lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.12) göre GR5, GR6, GR4, GR1 arasındaki genetik uzaklık 0' dır. Bu gruba, G34R ile G26R (birbirlerine genetik uzaklığı 0 dır) grubu, G32R ile G33R (birbirlerine genetik uzaklığı 0 dır)' nin oluşturduğu grup daha yakındır (Çizelge 3.12).

Kanlıkavak istasyonu örneklerinin primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.7' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.13)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.14) göre G57K, G58K, G45K, G55K, G56K, G57K, G54K, G47K, G48K, G46K arasındaki genetik uzaklık 0' dır.

G41K ve G50 arasındaki genetik uzaklık 0.33' dır. G41K ve G50K' nın ilk gruba genetik uzaklığı 1' dir (Çizelge 3.14).

Kanlıkavak örneklerinin primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.8' den yapılan hesaplama (Çizelge 3.15)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.16) göre G49K, G59K, G46K, G48K arasındaki genetik uzaklık 0 dır. Bu gruba sırasıyla G56K' nın; G55K' nın G57K' nın G47K' nın G54K (birbirlerine genetik uzaklıkları 0' dır)' nın G42K'nın; G45K ile G50K (birbirlerine genetik uzaklıkları 1' dir)' nın oluşturduğu gruplardır (Çizelge 3.16).

Regülatör ve Kanlıkavak örneklerinin primer OPB08 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.9' dan yapılan hesaplama (Çizelge 3.17)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.18) göre G52K, G54K, G45K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G74R ve G21R arasındaki genetik uzaklık 0.25' dir. G24R ile G30R arasındaki genetik uzaklık 0.33 dır. G83R ile G41K arasındaki genetik uzaklık 0.33' dır. G70R ile G50K arasındaki genetik uzaklık 0.50' dir. G74R ile G21R' ve G24R ile G30R grupları ilk grup olan Kanlıkavak gruplarına G83R ile G41R ve G70R ile G50K' nın oluşturduğu gruptan daha yakındır (Çizelge 3.18).

Regülatör ve Kanlıkavak örneklerinin primer B7 ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonuçlarına göre, Şekil 3.10' e göre yapılan hesaplama (Çizelge 3.19)' lardan elde edilen genetik uzaklık hesaplamalarından kümeleme yöntemi ile hazırlanan dendrograma (Çizelge 3.20) göre G50K ile G20R arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G49K' nın bu ikiliye genetik uzaklığı 0.50' dir. G46K ile G59K arasındaki genetik uzaklık 0' dır. G54K' nın bu ikiliye genetik yakınlığı 0' dır. G57K ile G55K arasındaki genetik yakınlık 0' dır. G19R' nin bu ikiliğe genetik uzaklığı 0.20' dir (Çizelge 3.20).

Bu çalışmanın sonucunda; Eskişehir, Porsuk Çayı, Regülatör ve Kanlıkavak *Gammarus pulex* türü örnekleri arasında polimorfizm olduğu tespit edilmiştir. Regülatör örnekleri kendi arasında, Kanlıkavak örnekleri kendi arasında polimorfiktir. Aynı zamanda ve iki istasyon örneklerinin birbirlerine göre polimorfik olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

ANDERSEN, W.R. and FAIRBANKS, P.J., *Molecular Markers: important tools for plant genetic resource characterization*, Diversity, **6** (3&4), 51-53 (1990).

ARTHUR, J.W., *Review of freshwater bioassay procedure for selected Amphipods*, ASTM STP 715 A.L., 98-108 (1980).

APOSTOL, B.L. and REITER, P., *Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of Aedes aegypti in Puerto Rico*, Heredity, **76**, 325-334 (1996).

BARDAKÇI, F. and SKIBINSKI, D.O.F., *Application o the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification*, Heredity, **73**, 117-123 (1994).

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. Ve DAVIS, R.L., *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism*, Am.J.Hum.Genet., **32**, 314-331 (1980).

CAETTANO-ANOLLES., G., BASCAM, B.J. ve GRESSHOFF, P.M., *DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers*, Biotechnology, **9**, 553-557 (1991).

CHALMERS, K.J., WAUGH, R., SPRENT, J.I. ve POWELL, W., *Detection of genetic variation between and within populations of Gliricidia sepium and G.maculata using DNA markers*, Heredity, **69**, 465-472 (1992).

DEMİRSOY, A., *Yaşamın temel kuralları, omurgasızlar=invertebrate (böcekler dışında)*, Cilt I-Kısım I, İkinci baskı, Ankara (1998).

GELİDAY, R., KOCATAŞ, A. ve KATAĞAN, T., *Bafa gölüni Peracarida ve Holocarida (Crustacea, Malacostraca) türleri hakkında*, Ege Üniv. Fen Fak. Derg., Seri B, **1(4)**, 311-318 (1977).

GIOVANNONI, J.J., WING, R.A., GANAL, M.W. ve TANSKLEY, S.D., *Isolation of molecular markers from spesific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations*, Nucleic Acid Res., **19**, 6553-6558 (1991).

GRANEY, L.R., *Effects of long term exposure to pentachlorophenol on the free aminoacid pool and energy reserves of the freshwater Amphipod Gammarus pseudolimnaeus Bousfield (Crustacea, Amphipoda)*, Ecotox and Environ. Safety, **12**, 233-251 (1986).

Http-1 www.web.odu.edu/sci/biology/jrh/what.is.htm

Http-2 museum.vic.gov.au/crust/amphbiol.htm

Http-3 www.essaglik.gov.tr/giris.htm

INFANTE M.E., YOTOKOKIS, C. ve LIMA de AZEREDO ESPIN, A.M., *Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera:Calliphoridae) from southeastern Brazil and nouthern Argentina*, Genome, **42 (4)**, 772-779 (1999).

INNIS, M.A. ve GELFAND, D.H., *PCR protocols: A guide to methods and application*, Academic Press, San Diego, USA (1990).

İŞCAN, M., AÇIK, L., ÖZKARA, A., KARAGÖZ, T., AKBIYIK, F. ve HIZEL, N., *Klinik laboratuvarlarda moleküler yöntemler*, Türk Biyokimya Derneği, Ankara (2000).

KARAMAN, G.S. ve PINKSTER, S., *Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and Adjacent Region of Asia (Crustacea-Amphipoda) part I Gammarus pulex-group and related species*, Bijdragen Tot de Dierkunde (Contribution to Zoology), The Art. Lib.Comm. Plant. Midd., 45A, Amsterdam, The Netherlands (1977a).

KARAMAN, G.S. ve PINKSTER, S., *Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and Adjacent Region of Asia (Crustacea-Amphipoda) part II Gammarus roeseli-group and related species*, Bijdragen Tot de Dierkunde (Contribution to Zoology), The Art. Lib.Comm. Plant. Midd., 45A, Amsterdam, The Netherlands (1977b).

KARAMAN, G.S. ve PINKSTER, S., *Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and Adjacent Region of Asia (Crustacea-Amphipoda) part I Gammarus balkanicus-group and related species*, Bijdragen Tot de Dierkunde (Contribution to Zoology), The Art. Lib.Comm. Plant. Midd., 45A, Amsterdam, The Netherlands (1987).

KLEIN-LANKHORST, RM., VERMUNT, A., WEIDE, R., LIHARSKA, T. ve ZABEL, P., *Isolation of molecular markers for tomato (L. Esculentum) using random amplified polymorphic DNA (RAPD)*, Theor.Appl.Genet., **83**, 108-114 (1991).

KUMAR, R.ve BARBACID, M., *Oncogene detection at the single cell level*, Oncogene, **3**, 647-651 (1988).

KUMAR, R., *The technique of polymerase chain reaction*, Technique A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology, **1(3)**, 133-152 (1989).

LAURIE, D.A., SMAPE, J.W. ve GALE, M.D., *DNA marker techniques for genetic analysis in Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, The Aden Press, Oxford (1992).

MALINS, D.C., *Perspectives in aquatic toxicology*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **31**, 371-399 (1991).

MANIATIS, T., SAMBROOK, J. ve FRITCHI, F.F., *In molecular cloning a laboratory manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor (1989).

MEGNEGNEAU, B., DEBETS, F. ve HOEKSTRA, R.F., *Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplified polymorphic DNA*, Curr.Genet., **23**, 323-329 (1993).

MEYRAN, J.C., MONNORET, M. ve TABERLET, P., *Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus Gammarus (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitDNA sequences*, Mol. Phylo.Evol., **8**, 1-10 (1997).

MICHELMORE, R.W., PARAN, I. ve KESSELL, R.V., *Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a regions by using segregating population*, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, **88**, 9828-9832 (1991).

MULLIS, K.B., FALOONA ve F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction*, Met.Enzymol., **155**, 335-350 (1987).

NAISH, K.A., WARREN, M., BARDAKÇI, F., SKIBINSKI, D.O.F., CARVALHO, G.R. ve MAIR, G.C., *Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of Oreochromis niloticus (Pisces: Cichlidae)*, Molecular Ecology, **4**, 271-274 (1995).

PAABO, S., HIGUCHI, R.G. ve WILSON, A.C. , *Ancient DNA and the polymerase chain reaction*, J.Biol.Chem., **264**, 9709-9712 (1989).

PALUMBI, S.R., *The polymerase chain reaction in molecular systematics*, Nucleic Acids II, **Second II**, Sunderland USA (1996).

RAPPOLEE, D.A, WONG, A., MARK, D. ve WERB, Z., *Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small number of cells*, J.Cell Biochem., **39**, 1-11 (1989).

REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMAEN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. ve SCOLNICK, P.A., Global and local- genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA_s, Proc.Natl.Acad.Sci, **89**, 1477-1481 (1992).

ROMMENS, J.M., IANNUZZI, M.C., KEREM, B., DRUMM, M.L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J.L., KENNEDY, D., HIDIKA, N., ZSIGA, M., BUCWARD, M., RIORDAN, J.R., TSUI, L.C. ve COLLINS, F.S., *Identification of the cystic fibrosis gene, chromosome walking and jumping*, Science, **245**, 1059-1065 (1989).

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. ve ARNHEIM, N., *Enzymatic amplification of beta- globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*, Science, **230**, 1350-1354 (1985).

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. ve ERLICH, H.A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, Science, **239**, 487-491 (1988).

SANDIKÇI, A., *Porsuk kirliliği*, Yüksek lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye (1996).

SCHIRMACKER, A., SCHMIDT, H. ve WILFRIED, W., *RAPD-PCR investigations on sibling species of terrestrial Enchytraeus (Annelida: Oligochaeta)*, Biochemical Systematics and Ecology, **26**, 35-44 (1998).

SHIBATA, D.K., ARNHEIM, N. ve MARTIN, W.J., *Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction*, J.Exp.Med., **167**, 225-230 (1988).

SKODA, S.R. ve FOSTER, J.E., *Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C.macellaria* (Diptera. Calliphoridae)*, Bull.Entomol.Res., **92**, 89-96 (2002).

TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. ve BONIERBALE, M.W., *RFLP mapping in plant breeding new tools for and old science*, Biotechnology, **7**, 258-264 (1989).

TIBAYRENC, M., MEUBAUER, K., BARNABE, C., GUERRINI, F., SKARECKY, D. ve AYALA, F.J., *Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis*, Proc.Natl.Acad.Sci., **90**, 1335-1339 (1993).

THOMPSON, D. ve HENRY, R., *Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis*, Plant Molecular Biology Reporter, **11(3)**, 202-206 (1993).

TRIGLIA, T., PETERSON, M.G. ve KEMP, D.J., *A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences*, Nucleic Acids Res., **16**, 8186 (1988).

WAUGH, R. ve POWELL, W., *Using RAPD markers for crop improvement*, Focus, **101**, 186-191 (1992).

WELSH, J. ve McCHELLAND, M., *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*, Nucl.Acids Res., **18**, 7213-7218 (1990).

WELSH, J. ve McCHELLAND, M., SOBRAL, B.W.S., *Parantage determination in maize hybrids using arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR)*, Ther.Appl.Genet., **82**, 473-476 (1991).

WHITKUS, R. ve DOEBLEY, J., *Nuclear DNA markers in systematics and evolution, DNA markers in plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands (1994).

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. ve TINGEY, S.V., *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, Nucl.Acids.Res., **18**, 6531-6535 (1990).

WILLIAMS, C.B., NANCY, M.D.T., GARY, I.P., JAMES, R..N. ve JENNIFER, M.P., *Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:Aphididae)*, Bull.Entomol.Res., **82**, 151-159 (1992).

WOLF, K. ve RIJINI, J.P., *Rapid detection of genetic variability in Chisanthemun using random primers*, Heredity, **71**, 345-341 (1993).

YEŞİLMEN, T.Ö. ve KIRGIZ, T., *Kırklareli ili tatlı su Gammarus (Gammaridae-Amphipoda) türleri*, Tr. J. of Zool., **20**, 315-318 (1996).