

BAZI BATI ANADOLU GAMMARUS TÜRLERİNİN
MİTOKONDRIAL DNA'LARININ RAPD-PCR
TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

FİLİZ SUSUZ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Kasım – 2002

"Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 011041 nolu proje kapsamında desteklenmiştir."

ÖZET**Doktora Tezi****BAZI BATI ANADOLU GAMMARUS TÜRLERİNİN MİTOKONDRIAL
DNA'LARININ RAPD-PCR TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ****Filiz Susuz****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman : Prof.Dr.Ahmet ÖZATA
2002,72 sayfa**

Mitokondrial DNA korunmuş yapı ve organizasyonu özelliklerinden dolayı, türüçi ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA kullanılarak, hem sistematik hem de genetik çalışmalar için, rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği kullanılabilir. RAPD-PCR ekonomik olması ve genomik bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle genetik uzaklıkların belirlenmesi için tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, bazı Batı Anadolu Gammarus türlerinden olan *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus arduus* türlerinin izole edilen mitokondrial DNA'larının 39 primerle amplifikasyonu denenmiştir. Denenen primerlerden 3 tanesinin verdiği amplifikasyon sonuçlarına göre bu türlerin birbirine olan uzaklık dereceleri belirlenmiştir. Bu çalışmada mitokondrial DNA kullanılarak RAPD-PCR tekniğinin, Gammarus türleri için genetik uzaklıkların belirlenmesinde faydalı olabileceğini gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gammarus, RAPD-PCR, genetik uzaklık.

ABSTRACT**PhD Thesis****INVESTIGATION OF MITOCHONDRIAL DNA OF SOME WEST ANATOLIA
GAMMARUS SPECIESES BY RAPD-PCR TECHNIQUE****Filiz Susuz****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor : Prof.Dr.Ahmet OZATA
2002, 72 pages**

Mitochondrial DNA is widely used in order to estimate the amount of genetic variability within and between different populations, because of its conserved structure and organization. Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) can be used for both systematic and genetic studies. This technique was preferred because of its economic and less laborious properties.

In this work, some West Anatolia Gammarus specieses; *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus arduus* were studied. Amplification of mitochondrial DNA of these specieses was carried out with 39 primers. According to the amplification results of 3 primers, genetic distances between these specieses were determined. This study showed that RAPD-PCR technique is usefull to detect the genetic distance between Gammarus specieses.

Key Words: Gammarus, RAPD-PCR, genetic distance

TEŞEKKÜR

1989 yılında üniversiteye girdiğim günden bugüne, her zaman manevi desteğini ve yardımını gördüğüm, çalışmamın her aşamasında engin bilgisinden faydalandığım tez danışmanım Hocam Prof.Dr.Ahmet Özata'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğrencilik yıllarımdan beri gülyüzünü, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen, emeğini, gece gündüz bilgisini ve ilgisini vermekten hiçbir zaman kaçınmayan, bölümümüze PCR tekniğini getiren iyi ve kötü günümde her zaman yanımda olan Hocam H. Mehtap Kutlu'ya şükranlarımı sunarım.

Laboratuvarlarının imkanlarını sonuna kadar açıp, çalışmamda moleküler biyolojinin en son tekniklerini bana öğreten ve çalışma fırsatı veren Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Hocam Doç.Dr.Leyla Açık'a çok teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında kullandığım örneklerini gönderdiği için Hocam Prof Dr.Timur Kırgız'a, deneylerimiz sırasında telefon aracılığıyla dahi engin bilgilerinden faydalandığım Hocam Doç.Dr.Sibel Sümer'e teşekkürlerimi sunarım.

Ankara'da çalıştığım günler sırasında laboratuvardaki yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda bana dostluklarını veren Araştırma Görevlileri Ayten, Dilşat ve Selcen' e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda beraber sevinip beraber üzüldüğümüz, çok şeyi birlikte paylaştığımız, yanımda olmasa bile her zaman yanımda hissettiğim, benim için çok şey ifade eden sevgili Ayla'ya teşekkür ederim. Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Asım'a ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Maddi manevi desteklerini yanımda olmasalar bile hep hissettiğim anneme, babama, ablalarıma, ağabeyime ve Merve ile Ecem' e minnettarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i..
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Gammarus' un Sistematik Özellikleri.✓.....	1
1.2. Tatlı Su Amphipodlarıyla Çalışmanın Önemi.....	4
1.3. Moleküler Sistematikde Kullanılan Bazı Teknikler.....	4
1.3.1 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	5
1.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	6
1.3.2.1. PCR Aşamaları.....	11
1.3.2.2. PCR Optimizasyonu.....	15
1.3.3 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
2.1. Materyal	21
2.1.1. Gammarus Materyali...✓.....	21
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
2.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	22
2.1.3.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.1.2.3 Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	24
2.1.4. Sterilizasyon.....	24
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. Toplanan Gammarus Örneklerinin Tür Tayini...✓.....	24

2.2.2. Örneklerden Mitokondrial DNA İzolasyonu.....	25
2.2.3. DNA Konsantrasyon Tayini.....	25
2.2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	25
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
2.2.6 Genetik Uzaklık Tayini.....	26
3. BULGULAR.....	27
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	64
5. KAYNAKLAR.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

- 1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 12
- 3.1. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex*, Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus*, Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ..29
- 3.2. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex*, Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus*, Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....30
- 3.3. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex*, Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi31
- 3.4. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....32
- 3.5. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....33
- 3.6. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....34

- 3.7. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* ile Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....35
- 3.8. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....36
- 3.9. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Safranbolu istasyonundan toplanan *Gammarus effeltus* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....37
- 3.10. Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* ve Düden istasyonundan toplanan *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....38
- 3.11. Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....39
- 3.12. Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....40
- 3.13. Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus arduus*, ve *Gammarus fossarum* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....41
- 3.14. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....42
- 3.15. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....43

- 3.16. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....44
- 3.17. Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* ve Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....45
- 3.18. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi46
- 3.19. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....47
- 3.20. Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....48
- 3.21. Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* ve Düden istasyonundan toplanan *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi49
- 3.22. Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi50
- 3.23. Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi51
- 3.24. Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi52
- 3.25. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi53

- 3.26. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi54
- 3.27. Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi55
- 3.28. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi56
- 3.29. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi57

ÇİZELGELER DİZİNİ

- 1.1 AgaroZ Jel Elektroforezinde jeldeki agaroZ derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapabilecek DNA molekülü büyüklükleri13
- 2.1 Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve %G+C oranları23
- 3.1 *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effeltus* türlerinin genetik uzaklığı58
- 3.2. *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effeltus* türlerinin dendogramı59
- 3.3. Çalışılan tüm *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effeltus* türlerin örneklerinin dendogramı60

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin-tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu
HCl	: Hidroklorik Asit
Mg ⁺²	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MW	: Moleküler ağırlık
μM	: Mikro molar
μl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
g	: Devir/dakika
T	: °C cinsinden sıcaklık
TE	: Tris-EDTA
T _m	: Erime sıcaklığı
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
Pop	: Populasyon

1. GİRİŞ

1.1. Gammarus'un Sistematik Özellikleri

Tatlısu birikintilerinde, derelerde, su bitkileri üzerinde veya taşların altında yaşayan Gammarus türleri, Malacostraca alt sınıfının Amphipoda ordosunun, Gammaridae familyasının, Crustacea sınıfındandır (Demirsoy, 1998).

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

Amphipoda ordosu tanımlanmış yaklaşık 7000 tür içermektedir (http-1). Vücutları yanlardan basılmıştır. Büyüklükleri ortalama olarak 2-20 milimetre arasında değişir. Genel görünüşleriyle tıknaz yapıdadırlar; daha çok tesbih böceklerine 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 olabilir; bunun yanısıra 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 bulunmaktadır. 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 edilebilir. Telson her zaman son segmentten ayrılmaktadır (Demirsoy, 1998).

Amphipodların bazı türlerinde erkek bireylerin üreme olgunlukları, gözler ve antenlerdeki kimyasal reseptörlerin gelişmesi ile belirlenmektedir. Bu aşamada yüzen amphipod kendine bir eş arar. Üreme süresince erkek amphipod kendinden daha küçük olan dişiye üyeleriyle yakalar. Eşleşen bu amphipodlar beraber yüzer

bir halde görülebilirler. Erkekten dişi üreme kanalına sperm transferi olur (http-2). Gelişme, kuluçka boşluğu içinde gerçekleşmektedir. Senede bir defa döl meydana getirme eğilimi vardır. Tatlı sularda yaşayan türler her defasında 15-50, denizde yaşayan türler ise 2-750 yumurta bırakırlar. 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 gelişmiştir. Polarize güneş ve ay ışığını kullanarak kısa zamanda yönlerini bulabilirler. Ayrıca çok iyi çalışan biyolojik saatleri 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. Baykal Gölü Amphipod türleri bakımından çok zengin bir durum göstermektedir. Yeraltı sularında da büyük sayılarda ve birçok türle temsil edilmektedirler.

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 yaşarlar. Gammarus türlerinin bir kısmı denizde, bir kısmı da tatlısularda yaşamaktadır.

Gammaridae türlerinin büyük bir çoğunluğu detritivor, geriye kalanı leşçil, avcı ve çok azı da parazit olan Amphipodlardır. İç su ve deniz 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 kullanılmaktadırlar (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 kadarki morfolojik gözlemler, Karaman ve Pinkster (1977a, b ve 1987)' in yaptığı sınıflandırılmış türlerin taksonomik konumlarını açıklamak için kullanılan başlıca anahtarlardır. Taksonomik durumlarının tam ve doğru olarak ortaya konulabilmesi için dikkatli bir morfolojik inceleme ve belirli sayıda karakterlerin belirlenmesi gerekmektedir (Karaman ve Pinkster, 1977a, b ve 1987). Gammarus cinsi üyelerinde türler arasında morfolojik farklar çok çarpıcı ve ayırt edici bir biçimde görülmediğinden, Gammarus türlerinin taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanımı yeterli olmayabilir. 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 bir Amphipoda türü kaydı verilmiştir. Bundan başka bugüne kadar Türkiye içsuları genelinde ya da bölgesel olarak özellikle Amphipoda üzerinde yapılmış tek çalışma Kırıkkale ili tatlısu Gammarus türleri ile yapılmış çalışmadır (Yeşilmen, 1996), Amphipoda türleri üzerine yapılmış moleküler düzeyde bir çalışma ise bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bazı Batı Anadolu Gammarus türlerinin, RAPD-PCR yöntemiyle incelenmesidir. Bu amaçla örneklerin mitokondrial DNA'ları kullanılmıştır. Mitokondrial DNA korunmuş yapı ve organizasyon özelliklerinden dolayı, türüçi ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Avisé ve ark. 1979; Moritz, 1987). Crustacea grubunda yapılan incelemelerde, mitokondrial DNA'nın Sitokrom c Oksidaz I (COI) alt ünitesinin, hem türüçi hem de türlerarası farklılığın ortaya konulması için çok güçlü bir materyal olduğu tespit edilmiştir (Palumbi ve ark. 1991).

Toplanan örneklerin mitokondrial DNA'ları izole edildikten sonra RAPD-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA'lar üzerinde bazı değerlendirmeler yapılarak türüçi polimorfizm olup olmadığı ve türlerarası genetik uzaklık olup

olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Gammarus cinsi, sucul toksisite çalışmalarında indikatör olarak yaygın kullanılan bir Amphipoddur. Suda artan kirliliğe, özellikle ağır metallere maruz kalan örneklerin enzim aktivasyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Sucul kirlilik tespitinde faydalı Gammarus'a dayanıklılık kazandıran elbette genlerinde saklı olan bilgilerdir. Bu genlerin tespiti ve sonrasında klonlanması gibi çalışmalarla , kirliliğe dayanıklılık karakteri, çeşitli şekillerde kullanılabilir.

1.2. Tatlı Su Amphipodlarıyla Çalışmanın Önemi

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

Gammarus üyeleri, sulara karışan çevresel kirleticilere karşı balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çeşitli kirleticilere olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cinsin toksikolojik çalışmalarda kullanımı giderek artmaktadır (Arthur, 1980 ve Graney, 1986).

1.3. Moleküler Sistemikte Kullanılan Bazı Teknikler

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

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

1.3.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

DNA polimorfizmleri, nükleotid dizisi farklılığı ile tanımlanabildiklerinden bu polimorfizmi, restriksiyon enzimleri ile elde edilen DNA fragmentlerinin boyutundaki farklılıklardan saptamak mümkündür. Bu yolla gözlenen farklılığa Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) denir (Tanksley ve ark., 1989).

DNA sarmalı, özgül olan restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragment oluşur ve bunlar jel elektroforezinde gözlenebilir. RFLP'ler birçok kalıtsal hastalıkta markır olarak kullanılmaktadır. 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 yöntemin temel unsuru, bakteriyel restriksiyon endonükleazların kesim bölgelerinin olması veya olmamasıyla DNA dizilerindeki çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında kullanılması esasına dayanmaktadır (Laurie ve ark., 1992). Polimorfik markırlar kültürleri ve genotipleri tanımlamak için, nicel özelliği ve niteliği kontrol eden genleri haritalamak için de kullanılmaktadır (Rommens ve ark. 1989).

Restriksiyon fragmenti uzunluk analizlerinde, DNA'yı 4-6 baz çiftlik tanıma bölgelerinden kesen restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Çalışılan örnek bir ya da daha fazla sayıda restriksiyon enzimleriyle kesilir ve oluşan fragmentler, jel elektroforezi kullanılarak moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Fragment büyüklüklerini tahmin etmek için moleküler büyüklük standartları kullanılır. Fragmentleri ultraviyole ışığı altında (260 nm) görünür hale getirmek için etidyum bromür boyama yöntemi kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimleri tanıma bölgelerindeki baz değişimi, baz eklenmesi ya da baz çıkarılması ve dizilimin yeniden düzenlenmesi sonucu farklılıklar ortaya çıkar. RFLP, tür içi düzeyde ve yakından ilişkili taksonlar arasındaki çalışmalar için çok uygundur. Enzimlerin tanıma bölgesindeki değişiklikler sonucu oluşan fragmentlerin varlığı ya da yokluğu, türleri ya da populasyonları tanımada kullanılmaktadır (Tanksley ve ark., 1989).

RFLP analizi için ana yöntem Southern Blotlama tekniğidir. Buna göre izole edilen, herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilen ve agaroz jel elektroforezi yapılarak jel üzerinde yürütülen DNA, daha sonra filtreye geçirilir. 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 yapılabilmektedir (Maniatis ve ark. 1989).

RFLP'lerin genetik araştırmalarda kullanılmasının en önemli dezavantajı kullanılan materyal ve emeğin maliyetinin yüksek olmasıdır. Gerekli olan seviyede RFLP verileri elde etmek de RFLP analizleri için kullanılan bir laboratuvara ihtiyaç duyulması, çok sayıda tür tanımlanacağı durumlarda malzeme ve emeğin daha da artması RFLP analizi 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).

1.3.2. 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 nedeni, diğer moleküler tekniklere oranla daha ucuz, kolay ve hızlı olmasıdır. PCR tekniği, uygun olduğu takdirde, gen klonlamayı büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır (Kumar, 1989).

PCR, moleküler çalışmaların nasıl sürdürüleceğini ve bu alanda olabilecek soruların çoğunu değiştirmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı ile gerçekleştirilen moleküler çalışmaların kolaylaştırılmasına ilave olarak PCR teknolojisi, yeni genlerin ve patojenlerin tanımlanması, nükleotid dizilerinin belirlenmesi gibi pekçok avantajlar da sağlamaktadır (Erich ve ark. 1991).

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 tanımlanmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır. PCR'ın önemli bir özelliği de; özel bir DNA dizisinin seçilip çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. PCR, DNA'nın önemli ölçülerde saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmaması sebebiyle, nükleik asitlerle çalışmada harcanan zaman ve emeği de azaltmaktadır (Saiki ve ark., 1988).

PCR'ın temeli DNA denatürasyonu, primerin birleşmesi ve DNA polimerizasyonu prensiplerine dayanmaktadır (Kumar 1989). Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin her iki ucunda diziyi tanıyan belli sayıda ve DNA'nın her iki zincirine de tamamlayıcı olan primer çiftinin zıt yönde ilerlemesiyle DNA sentezlenmektedir. Çok sayıda devir sonunda reaksiyon tamamlanmaktadır. 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 ucu da sabitlenir. Çünkü bu uçlar ya primer sekanslarından elde edilir ya da primerler tarafından belirlenir. PCR ile orijinal kalıbın her iki molekülünden 2ⁿ sayıda yeni DNA kopyası üretilebilir. 30 döngü sonunda tek bir DNA

molekülünün yaklaşık 2.10^9 kez amplifikasyonu sağlanmış olur (Mullis ve Faloona, 1987; Saiki ve ark., 1988). Her DNA molekülü, 20 devirde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü oluşturabilmektedir. Verim oranı ise deney başına her devirde yaklaşık %85'dir. Bu durum 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 de azalmaktadır (Saiki, 1985).

Sonuç olarak, tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve zincir uzaması reaksiyonları ile istenilen bölge katlanarak artmaktadır. PCR ürününün uzunluğu iki primerin ve hedef DNA bölgesinin uzunluğunun toplamına eşit uzunluktadır. PCR tek iplikçik veya çift iplikçik DNA yı amplifiye edebilir. RNA da hedef bölge olarak seçilip geri transkripsiyon ile cDNA ya bağlanması şeklinde de kullanılabilir.

Amplifiye etme yanında basit işleme kompleks bir kalıptan özel hedef DNA dizisini modifiye etme yeteneği, moleküler biyoloji araştırmalarında (örneğin klonlama ve dizi analizi gibi) birçok olayı kolaylaştırmıştır. Böylece deneysel araştırmalar için yeni alanlar açılmıştır. (Erlich ve ark. 1991)

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

Parafinle fikse edilmiş dokuların DNA kaynağı olarak kullanıldığı metodların gelişmesi 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 sağlanmakta ve kontaminasyon engellenmektedir (Kumar, 1989).

Zarar görmüş, kırılmış DNA kalıbının kullanımı bazen kaçınılmazdır. Bu tip DNA'lar adli uygulamalar ve arkeolojide kullanılmaktadır. PCR bu alanlardaki araştırmalara da bir açıklık getirmiştir (Paabo ve ark. 1989). 7000 yaşındaki bir

insan beyninden alınan mitokondrial DNA'dan yapılan DNA dizi analizi yayınlanmıştır (Paabo ve ark. 1989).

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

PCR ile ilgili daha önceki çalışmalarda, insan genomik DNA sıradaki spesifik bölgeleri amplifiye etmek için *Escherichia coli*'nin DNA polimerazının Klenow fragmenti kullanılmıştır. Ancak zincirlerin birbirinden ayrılması için gerekli yüksek sıcaklıkta bu enzim aktivitesini kaybettiğinden dolayı, her döngünün denatürasyon adımından sonra enzim eklenmesi gerekmektedir. Bu oldukça zor olan adım, *Thermus aquaticus* adı verilen ve sıcak sularda yaşayan bakterilerden izole edilen sıcaklığa dayanıklı Taq DNA Polimeraz enziminin keşfi ile ortadan kaldırılmıştır. Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlanmasıyla, gerekli olan maddeleri içeren tek bir tüp içerisinde, reaksiyonu gerçekleştiren, basit ve kendi kendine çalışan termal cyclus denilen cihazın geliştirilmesiyle PCR 'da çok büyük gelişmeler olmuştur. Genomik DNA' dan, daha uzun PCR ürünleri amplifiye edilebilir. Klenow fragmenti ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları 400 bp iken, Taq DNA polimeraz ile sentezlenen ürünlerin uzunlukları yaklaşık 10 kb kadardır(Erlich ve ark. 1991).

PCR tekniğinin uygulanabilmesi için, "Thermalcyclus" adı verilen cihazda temel olarak 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} tuzları

PCR yöntemi, nükleotid sırası bilinen dizi bölgelerinin dışında kalan bölgelerin çoğaltılmasında da kullanılmaktadır. 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).

PCR' daki dizi analizi için saf kalıbı çok miktarda çoğaltabilme yeteneği, insan genom projesinin dizi analizi görüşlerine de ışık tutmaktadır. Amplifikasyon protokolünün küçük modifikasyonlarıyla PCR, dizi analizi için kalıp görevi görecekteki iplik ürünlerinin oluşturulması için de kullanılabilir. Son zamanlarda, tek bir kalıp DNA' nın, termal çyler tarafından tekrarlı kullanıma izin veren, doğrusal amplifikasyon stratejisini de içeren Taq DNA polimeraz ile zincir sonlandırma dizi analizi için birtakım protokoller geliştirilmiştir (Erich ve ark. 1991).

Genetik haritaların oluşturulması da PCR' a dayanmaktadır. Pekçok RFLP markırları iki allel içerir (restriksiyon enzim kesme bölgesinin varlığı veya yokluğu). Bu markırlar, haritalamada çok allelli markırlardan daha az kullanışlıdır. Çünkü pekçok soyağacı çalışmalarında dört atasal kromozomun hepsinin ayrımını sağlayamaz. (Erich ve ark. 1991)

DNA' daki nükleotid dizileri, türlerin olduğu kadar, organizmaların veya virüs filogenisinin evrimsel geçmişinin belirlenmesi için pekçok bilgi taşımaktadır. Günümüz türlerinden, farklı bireylerden alınan genlerin nükleotid dizilerine dayalı olarak filogenetik ağaçların oluşturulması için çeşitli bilgisayar programları geliştirilmiştir. PCR' ın kullanımından önce, bu derece önemli dizi bilgilerinin elde edilmesinde yaşanan zorluklar moleküler sistematik yaklaşımlarının gelişmesini engellemiştir. Son zamanlarda PCR, farklı insan popülasyonlarından izole edilen mitokondriyal DNA dizilerini amplifiye etmekte kullanılmaktadır. Fosil DNA' ların, ilk kez dizi analizi için, kırılmış DNA' ların çok küçük miktarlarını amplifiye etmek için de PCR kullanılmıştır. mRNA dan amplifikasyonlar yapılarak, gen ifadelerinin analizleri belirlenmektedir. Bu

yaklaşımında revers transkriptaz enzimi ve oligonükleotid primerler ile mRNA kalıbını cDNA' ya çevrilmesi sağlanır. Sıcaklığa dayalı DNA polimeraz, manganezi metal katyonu gibi kullanarak hem DNA dan hem de RNA dan sentez yapabilir. Böylece hem revers transkriptaz adımı, hem de PCR amplifikasyonu aynı enzimle gerçekleştirilmiş olur. Etkili bir revers transkriptaz aktivitesine sahip, sıcaklığa dayanıklı bu polimeraz enziminin kullanımı, mRNA' nın ikincil yapısında daha çok bozulmaya sebep olur ve cDNA nın daha etkili bir şekilde sentezini yapabilir (Erlich ve ark. 1991).

Kanser araştırmalarında PCR, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerdeki spesifik somatik mutasyonların ve kromozomal anormalliklerinin belirlenmesinde de rol oynamaktadır. Philadelphia kromozomu olarak adlandırılan spesifik bir genetik anormallik olan kronik miyeloid lösemi (CML), belirlenen ilk kanser türüdür. Bu kromozomal translokasyonda *abl* ve *bar* genleri birleşirler ve oluşan füzyon transkripti PCR ile belirlenebilmektedir. Çeşitli kanser türlerindeki *ras* onkogenlerindeki bilinen mutasyonların belirlenmesi de PCR amplifikasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Pankreas ve kolon gibi bazı tümörler yüksek oranda *ras* mutasyonları gösterirler (Erlich ve ark. 1991).

Bazı kanser türlerine ise RNA veya DNA' ya sahip tümör virüsleri sebep olmaktadır. Mesela Burket'in lenfbezi kanserine sebep olan Epstein-Barr virüsü, T hücresi lökosit kanserine sebep olan T hücresi lökosit virüsü, karaciğer kanserine sebep olan hepatit B ve serviks kanserine sebep olan insan papilloma virüsleri PCR ile belirlenmektedir.

Adli tıp alanında da PCR, suç yerinde bulunan biyolojik delillerin genetik tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. (Erlich ve ark. 1991)

1.3.2.1. 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

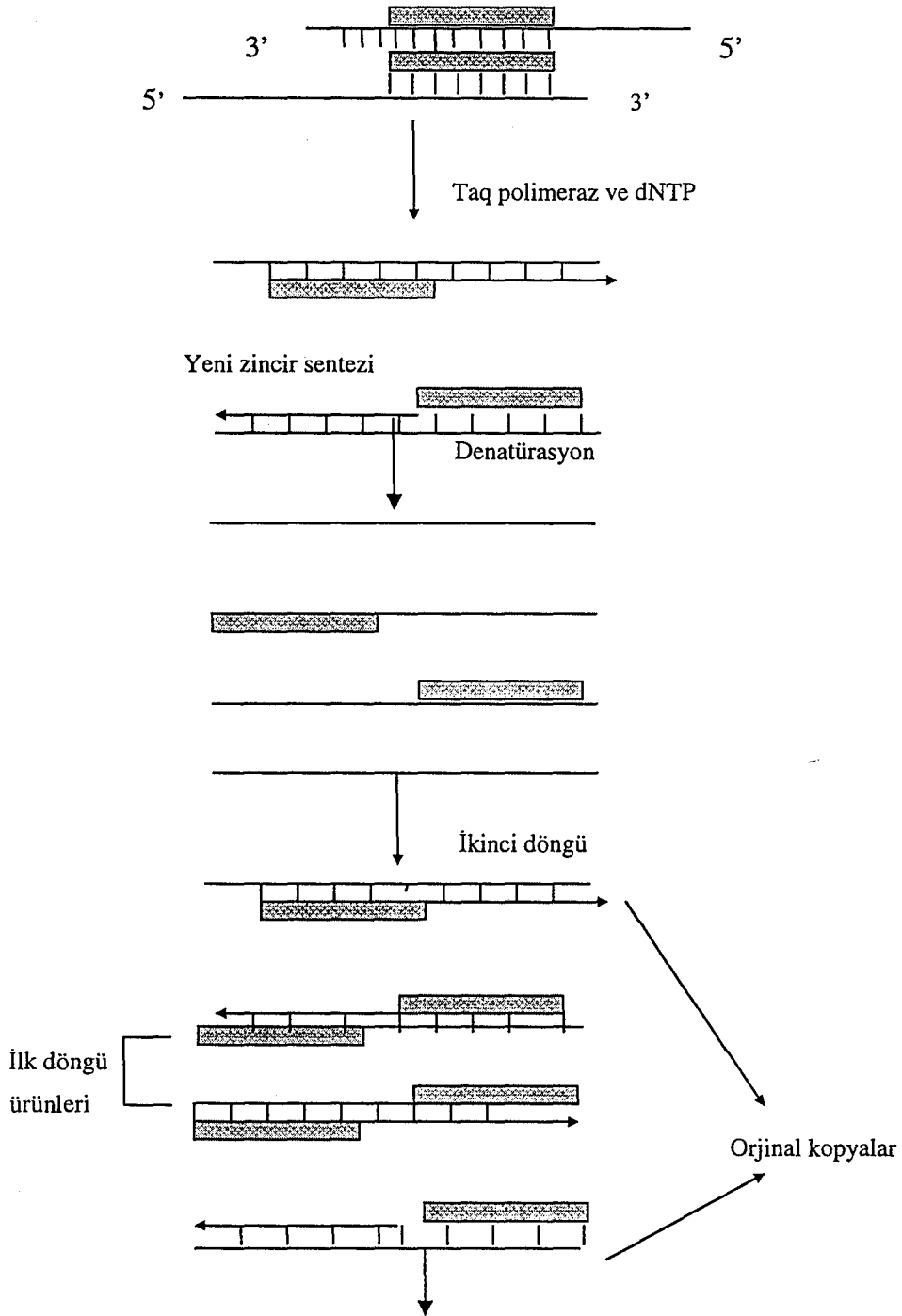
protokollerde belirtilen denatürasyon ısısı 94 °C' dir (Palumbi, 1996). Bu aşamada çoğaltılmak istenen çift sarmal DNA, sarmalları birarada tutan hidrojen bağlarının kopması için yüksek sıcaklık ile denatüre edilir (Saiki ve ark. 1988)

- 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 1) 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 poliakrilamit jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktördür (Çizelge 1.1) (Maniatis ve ark. 1989).

Çizelge 1.1 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 30 döngü sonra $2^{30} = 2\,147\,483\,648$ fragment oluşur

Şekil 1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1.3.2.2. 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. Eğer 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 µM 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 μM 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).

1.3.3. 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 tanımlanmasını 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 parmakizi 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. 1991) 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)

Gammarus türleri üzerine yapılan filogenetik çalışmaları çok az sayıdadır. Meyran ve grubu tarafından, mitokondrial DNA nükleotid dizisi Fransa'da yaygın olan Gammarus cinsinin altı türü arasındaki genetik farklılığın tespit edilmesinde kullanılmıştır (*G. fossarum*, *G. pulex*, *G. lacustris*, *G. wauteri*, *G. roeseli*, *G. minus*). 23 farklı populasyondan 104 örnek taksonomik statüleri ve bunların filogenetik ilişkilerini ortaya koymak için karşılaştırılmıştır. Sitokrom-c-Oksidaz (COI) alt ünite geninin 376 bp bölgesi için nükleotid dizileri çoğaltılmış ve DNA'nın dizi analizi yapılmıştır. Yüksek düzeyde tür içi ve türler arası genetik farklılıklar ortaya koymuşlar ve bundan dolayı da COI geninin amphipod populasyon biyolojisi için güçlü bir markır olduğunu önermişlerdir (Meyran ve ark. 1997).

Bir başka çalışmada, Kuzey ve Güney Alp'lerde yükseklerde bulunan göllerden toplanan *Gammarus lacustris* populasyonları arasındaki filocoğrafik yapının ortaya konulması için mitokondrial DNA dizi analizi kullanılmıştır. 9

farklı popülasyonun 54 bireyinin mitokondrial COI geninin 376 bp lik parçasının karşılaştırılması sonucunda popülasyonlar içinde çeşitlilik gözlenmemiştir. Ancak Kuzey ve Güney popülasyonları arasında farklılıklar ortaya konulmuştur (Meyran ve ark. 1998)

Arjantin'de, RAPD-PCR kullanılarak yapılan bir çalışmada, Arjantin ve Porto Rico'dan toplanan 5 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) popülasyonları arasında tür içi polimorfizm varlığı araştırılmıştır. Bu popülasyonlar arasında yüksek oranda genetik benzerlik olduğu ortaya konulmuştur (Sousa ve ark. 2001).

RAPD markırları *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 ayırtmede (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 macelloria*' ya morfolojik olarak benzer. Burada RAPD-PCR' in kullanımı bu iki tür için gelişen moleküler genetik markır olarak ortaya çıkmaktadır. Yedi adet güvenilir ve tekrar üretilebilen markır; her tür için dört popülasyondaki beşer tane bireyin DNA' larıyla test edilmiştir. Bu yedi primerden elde edilen verilerin analizleri bu türlerin popülasyonlarını 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 güneydoğu 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 yükseltılarak 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

Bu araştırmada *Gammarus pulex*, 1758; *Gammarus uludagi*, 1975; *Gammarus komareki*, 1922; *Gammarus arduus*, 1975; *Gammarus fossarum*, 1836; *Gammarus agrarius*, 1973; *Gammarus effeltus*, 1975 türleri kullanılmıştır. Araştırmada materyal olarak kullanılan bu örnekler %96' lık etil alkol içerisinde muhafaza edilmiştir.

Gammarus pulex, 1758 örnekleri Eskişehir Porsuk ayı, Kanlıkavak Mevkii ve Kunduz ayı, Kırka Beldesinden; *Gammarus uludagi*, 1975 örnekleri Bursa Uludağ'dan; *Gammarus komareki*, 1922; *Gammarus arduus*, 1975; *Gammarus fossarum*, 1836 örnekleri Edirne-Kırklareli bölgesinden *Gammarus agrarius*, 1973 örnekleri Antalya Düden şelalesinden; *Gammarus effeltus*, 1975 Safranbolu bölgesinden toplanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler Tris (Sigma), HCl (Fluka), EDTA (Sigma), Sodyum Hidroksit (Sigma), Tris-HCl (Sigma), NaCl (Merk), Proteinaz K (Sigma), Chelex-100 Resin (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), Glasial asetik asit (Fluka), EDTA (Sigma), Bromfenol mavisi (Sigma), Ethidyum bromürdür (Sigma).

2.1.3. Tampon ve Çözeltiler

2.1.3.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- Stok Tris Çözeltisi: 500 mM Tris pH: 8.0' e HCl ile ayarlanır.
- Stok EDTA Çözeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH (Sodyum Hidroksit) çözeltisi ile pH: 8.0' e ayarlanır.
- NET Tamponu: 30 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH:8.0, 100 µg/ml Proteinaz K (Otoklavdan sonra eklenir).
- % 40 Chelex-100 Resin, 100 µg/ml Proteinaz K (Otoklavdan sonra eklenir).
- TE Tamponu: 10 mM Tris (pH: 8.0), 1 mM EDTA (pH: 8.0) stok çözeltileri kullanılarak hazırlanır.

2.1.3.2. 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
OPB08	GTCCACACGG	70
OPI18	TGCCCAGCCT	70
B4	GGACTGGAGT	60
B6	TGCTCTGCCC	70
B7	GGTGACGCAG	70
B18	CCACAGCAGT	60
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	66,7
UBC372	CCCACTGAC	70
UBC373	CTGAGGAGTG	60
UBC378	GACAACAGGA	50
UBC379	GGGCTAGGGT	70
UBC435	CTAGTAGGGG	60
UBC440	CTGTCTGAACC	60
UBC441	CTGCGTTCTT	50
UBC443	TGATTGCTCG	50
UBC444	GCAGCCCCAT	70
UBC571	GCGCGGCACT	80
UBC572	TTCGACCATC	50
UBC573	CCCTAATCAG	50
UBC574	GCCAGACAAG	60
UBC575	GGAGATGTAC	50
UBC576	CACCTAATGG	50
UBC577	GTCTGATGTG	50
UBC578	GGTGTCCACT	60
UBC579	TGGAATCGTG	50
UBC581	CCCGTTAGGG	60
UBC582	GGTATAGAC	50
UBC586	CCGGTTCCAG	70
UBC587	GCTACTAACC	60
UBC589	GACGGAGGTC	70
UBC590	CCGGCATGTT	60

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

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'.....3')	%G+C İçeriği
UBC591	TCCCTCGTGG	70
UBC592	GGGCGAGTCC	80
UBC596	CCCCTCGAAT	60
UBC598	ACGGGCGCTC	80
UBC599	CAAGAACCGC	60
UBC600	GAAGAACCGC	60

2.1.3.3. 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 L'ye tamamlanır.
- Yükleme Tamponu: % 40 Sukroz, % 0.025 Bromfenol mavisini, % 0.25 Ksilen siyanol (Otoklavlanmadı).
- Ethidyum bromür: 10 mg/ ml derişimde hazırlandı ve koyu şişelerde muhafaza edildi (Otoklavlanmadı).

2.1.4. 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

Toplanarak %96' lık alkolde muhafaza edilen Gammarus örneklerinin tür tayini Karaman ve Pinkster (1977a)' e göre yapılmıştır.

2.2.2 Örneklerden Mitokondrial DNA İzolasyonu

Gammarus örneklerinden mitokondrial DNA elde edilmesi için, örnek önce distile suyla yıkandı ve Janke& Kunkel homojenizatörle, 1 ml Net Tamponu içinde homojenize edildi. Homojenat; nukleus ve hücrel artıkların çökmesi için 1.000 g de, +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant mitokondriyi pelete çökeltmek için 12.000 g de, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen pelete 200 µl Proteinaz K (100 µg/ml) içeren % 40 Chelex 100 süspansiyonu ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve 56 °C'de 1 saat inkübe edildi. 8 dakikalık su banyosundan sonra, 13.000 g de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant tamamen dökülüp, pelet 55 °C lik etüvde, 1 saat kurumaya bırakıldı. Kuruma gerçekleştiikten sonra, 20 µl TE tamponu ilave edilen, DNA izolatu, 20 °C' de muhafaza edildi.

2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Tayini

UV absorbans spektrofotometresi ile 260 nm' de ölçüm yapıldı. Buna göre; $A_{260} = 1$ olduğunda DNA miktarı 50 µg/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 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 ve bu veriye dayanan tablo hazırlandı.

Her bir primer için elde edilen bu tablolar, Phylip 3.5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programında değerlendirilerek, çalışılan Gammarus türlerinin arasındaki ve ayrıca, tür içinde gözlenen genetik yakınlıklar ortaya konulmuştur.

3. BULGULAR

Gammarus pulex, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effeltus*, örneklerinden toplam 129 mitokondriyal DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, RAPD-PCR tekniği ile Çizelge 2.1' de belirtilen primerlerle DNA amplifikasyonu denenmiştir.

Gammarus örneklerinin 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, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Herbir primer için elde edilen değerler, Phylip 3.5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programıyla değerlendirilerek dendogramları elde edildi. Oluşan dendrogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te gözlenen *Gammarus pulex* (Kanlıkavak istasyonu izolatı), *Gammarus pulex* (Kunduz istasyonu izolatı), *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus arduus* örneklerinin M13, OPB08 ve B7 primerleriyle amplifikasyon sonuçları, genetik uzaklık programıyla değerlendirilerek, çalışılan tüm *Gammarus* türlerinin uzaklıklarına (Çizelge 3.1) ait dendogram (Çizelge 3.2) elde edilmiştir.

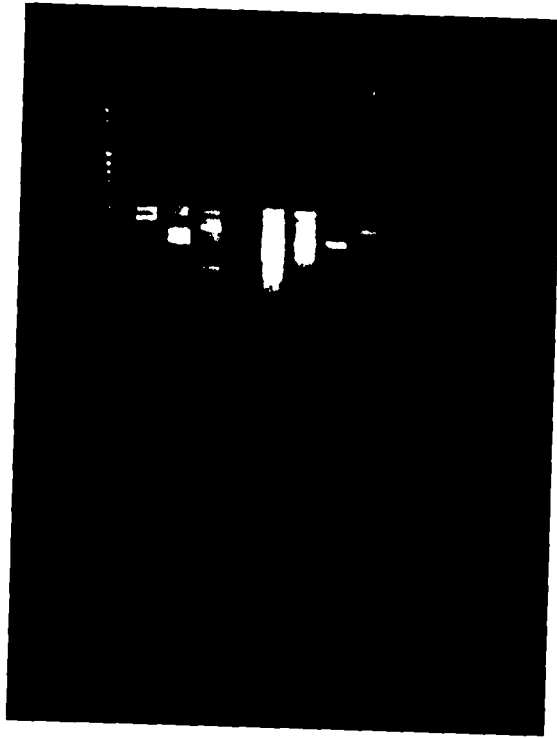
Buna göre Kanlıkavak istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* türünün sırasıyla Kunduz istasyonundan toplanan *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine genetik uzaklığı; 0.4796; 0.7419; 0.5596; 0.4796; 0.6466; 0.6466; 0.9651; 0.7419 olarak bulunmuştur.

Kunduz istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* türünün sırasıyla *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan uzaklığı; 0.7419; 0.2719; 0.3365; 0.3365; 0.3365; 0.5596; 0.4055'dir. *Gammarus uludagi* türünün sırasıyla *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus*

arduus, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan uzaklığı; 0.6466; 0.4055; 0.7419; 0.7419; 1.9459; 1.4351 olarak bulunmuştur.

Gammarus effeltus türünün sırasıyla *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı 0.1542; 0.0488; 0.0488; 0.4796; 0.3365'tir. *Gammarus agrarius* türünün sırasıyla *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı; 0.2113; 0.2113; 0.7419; 0.5596 olarak bulunmuştur. Aynı türden olan *Gammarus arduus* örnekleri arasında genetik uzaklık 0'dır, türüçi polimorfizm bulunmamaktadır. *Gammarus arduus* türünün sırasıyla *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı 0.4055; 0.2719'dur. *Gammarus komareki* türünün *Gammarus fossarum* türüne olan genetik uzaklığı ise 0.1001 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.3'te görülen, populasyon 1'den populasyon 37'ye kadar olan örnekler Kanlıkavak istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* örnekleridir. Populasyon 37'den populasyon 46'ya kadar olan örnekler *Gammarus uludagi* bireyleri; populasyon 46'dan populasyon 71'e kadar olan örnekler Kunduz istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* bireyleri; populasyon 71'den populasyon 93'e kadar olan örnekler *Gammarus effeltus* bireyleri; populasyon 93'ten populasyon 122'ye kadar olan örnekler *Gammarus agrarius* bireyleridir. Populasyon 122 ve populasyon 123 örnekleri *Gammarus komareki* bireyleri; populasyon 124, populasyon 125 ve populasyon 126 örnekleri *Gammarus fossarum* bireyleri; populasyon 127, populasyon 128 ve populasyon 129 örnekleri *Gammarus arduus* bireyleridir. Bu örneklerin değerlendirilmesi (3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29) sonucunda türüçi polimorfizm olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.1 Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* , Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus*, Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp24K

Hat 3 . Gu84U

Hat 4 : Gp90Ku

Hat 5 : Ge50S

Hat 6 : Ga115D

Hat 7 : Ga116D

Hat 8 : Gk180E

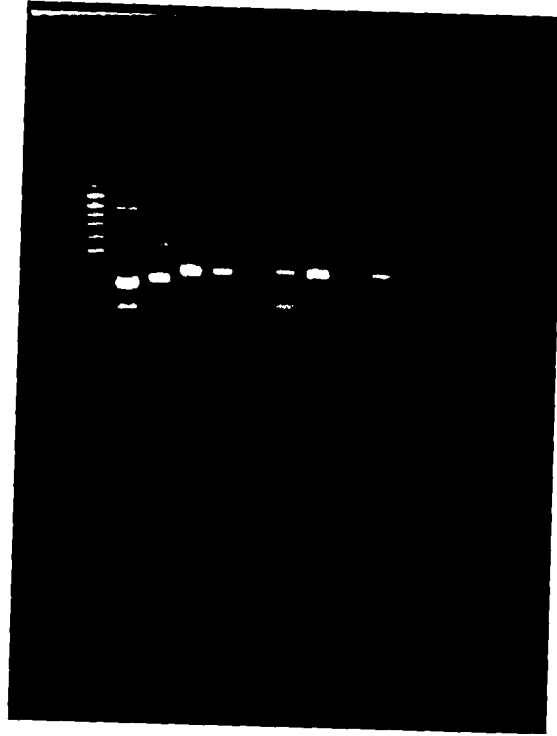
Hat 9 : Gk181E

Hat 10: Gf183E

Hat 11: Gf184E

Hat 12: Gar189E

Hat 13: Gar190E



Şekil 3.2. Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* , Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus*, Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp34K

Hat 3 . Gu70U

Hat 4 : Gp97Ku

Hat 5 : Ge19S

Hat 6 : Ga113D

Hat 7 : Ga115D

Hat 8 : Gk180E

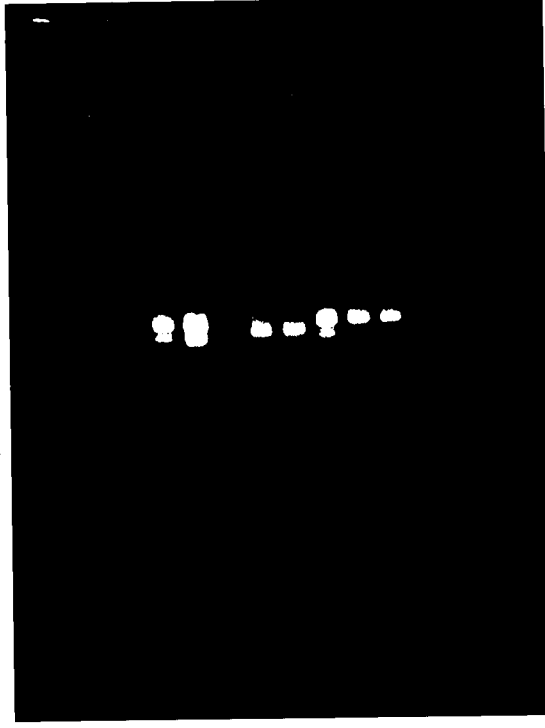
Hat 9 : Gk181E

Hat 10: Gf183E

Hat 11: Gf184E

Hat 12: Gar189E

Hat 13: Gar190E



Şekil 3.3 Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* , Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp24K

Hat 3 . Gp25K

Hat 4 : Gp26K

Hat 5 : Gu84U

Hat 6 : Gu85U

Hat 7 : Gu80U

Hat 8 : Gp90Ku

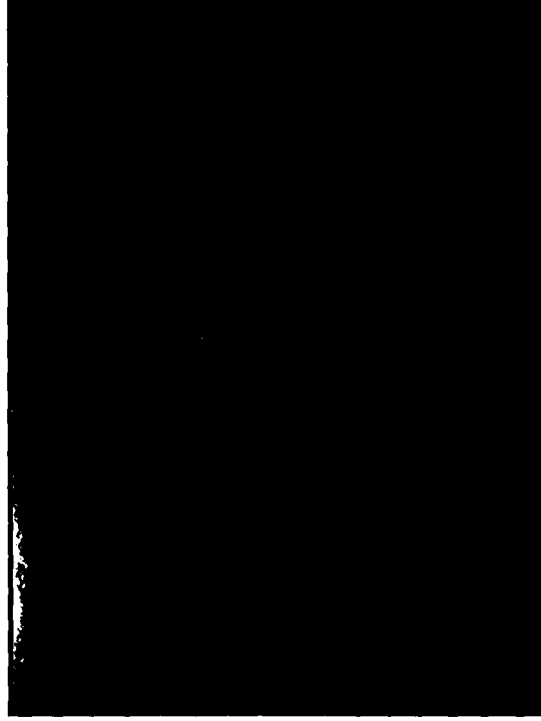
Hat 9 : Gp91Ku

Hat 10: Gp93Ku

Hat 11: Gar189E

Hat 12: Gar192E

Hat 13: Gp35K



Şekil 3.5 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp36K

Hat 3 : Gp37K

Hat 4 : Gp38K

Hat 5 : Gp39K

Hat 6 : Gp40K

Hat 7 : Gp41K

Hat 8 : Gp131K

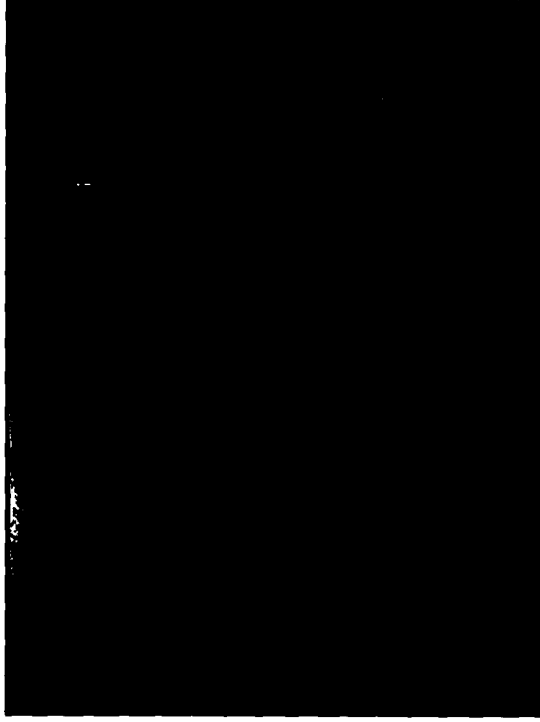
Hat 9 : Gp132K

Hat 10: Gp133K

Hat 11: Gp134K

Hat 12: Gp135K

Hat 13: Gp136K



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

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp137K

Hat 3 : Gp138K

Hat 4 : Gp139K

Hat 5 : Gp140K

Hat 6 : Gp141K

Hat 7 : Gp142K

Hat 8 : Gp143K

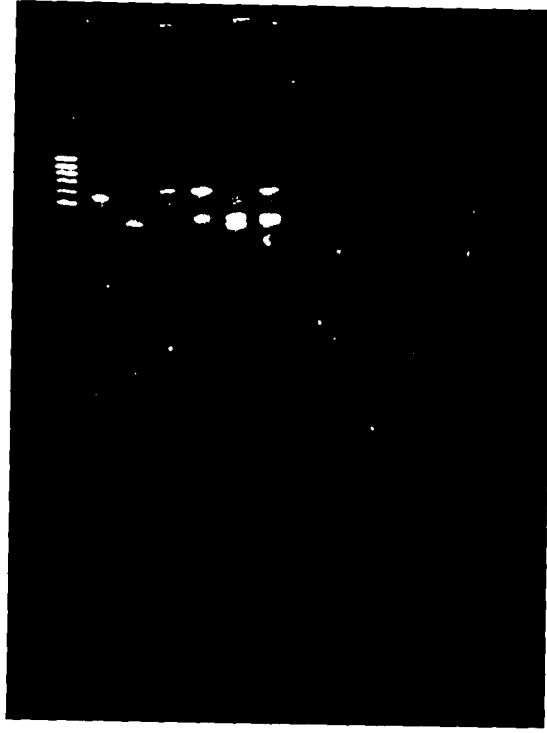
Hat 9 : Gp144K

Hat 10: Gp145K

Hat 11: Gp146K

Hat 12: Gp147K

Hat 13: Gp148K



Şekil 3.7 Kanlıkavak ve Kunduz istasyonlarından toplanan bazı *Gammarus pulex* ile Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp149K

Hat 3 . Gu69U

Hat 4 : Gu71U

Hat 5 : Gu84U

Hat 6 : Gu85U

Hat 7 : Gu86U

Hat 8 : Gu87U

Hat 9 : Gu99U

Hat 10: Gp90Ku

Hat 11: Gp91Ku

Hat 12: Gp92Ku

Hat 13: Gp93Ku



Şekil 3.8 Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp94Ku

Hat 3 : Gp95Ku

Hat 4 : Gp96Ku

Hat 5 : Gp97Ku

Hat 6 : Gp151Ku

Hat 7 : Gp152Ku

Hat 8 : Gp153Ku

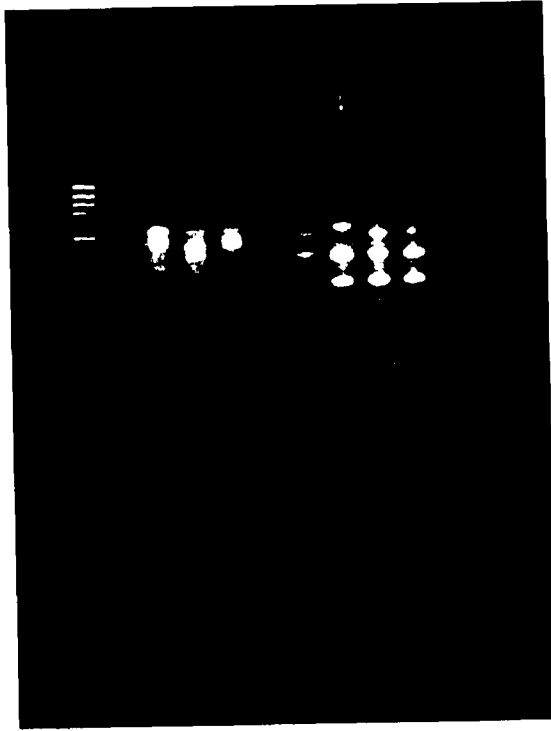
Hat 9 : Gp154Ku

Hat 10: Gp155Ku

Hat 11: Gp156Ku

Hat 12: Gp158Ku

Hat 13: Gp159Ku



Şekil 3.9. Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Safranbolu istasyonundan toplanan *Gammarus effetus* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp160Ku

Hat 3 . Gp161Ku

Hat 4 : Gp163Ku

Hat 5 : Gp162Ku

Hat 6 : Gp166Ku

Hat 7 : Ge17S

Hat 8 : Ge18S

Hat 9 : Ge19S

Hat 10: Ge20S

Hat 11: Ge21S

Hat 12: Ge23S

Hat 13: Ge45S



Şekil 3.10 Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* ve Düden istasyonundan toplanan *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ge50S

Hat 3 : Ge51S

Hat 4 : Ge53S

Hat 5 : Ge170S

Hat 6 : Ge171S

Hat 7 : Ge172S

Hat 8 : Ge173S

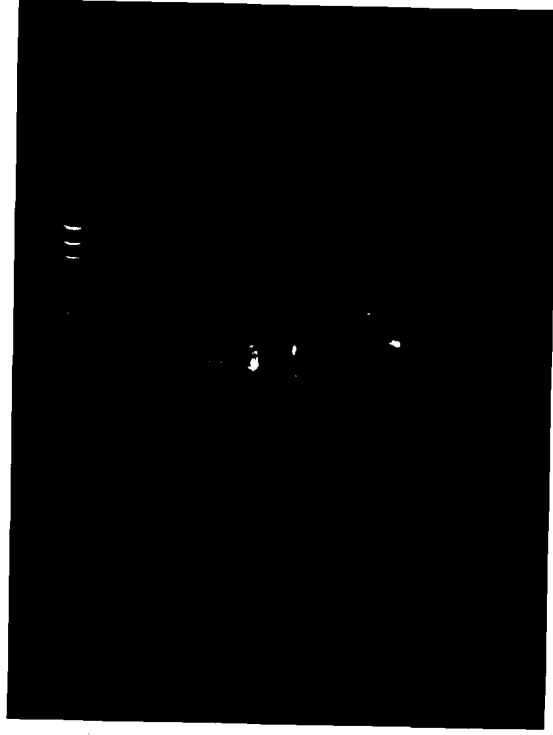
Hat 9 : Ge174S

Hat 10: Ge177S

Hat 11: Ge178S

Hat 12: Ga179S

Hat 13: Gp54D



Şekil 3.11 Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ga55D

Hat 3 : Ga56D

Hat 4 : Ga72D

Hat 5 : Ga73D

Hat 6 : Ga74D

Hat 7 : Ga75D

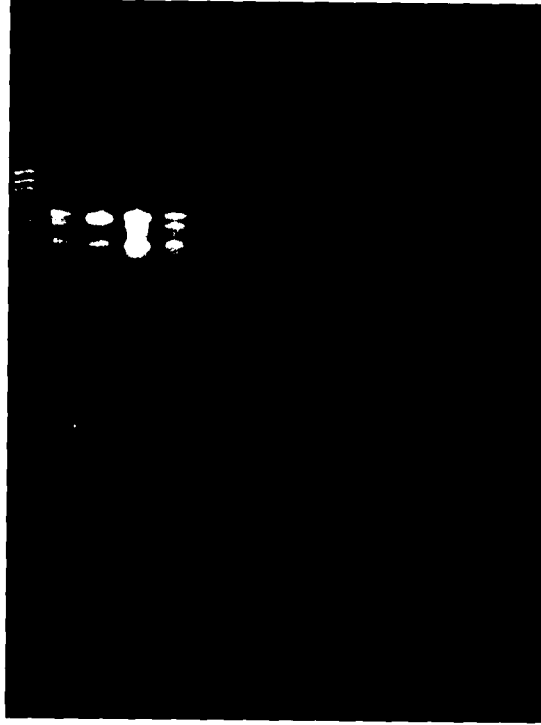
Hat 8 : Ga76D

Hat 9 : Ga109D

Hat 10: Ga110D

Hat 11: Ga111D

Hat 12: Ga112D



Şekil 3.13 Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius*, Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus arduus*, ve *Gammarus fossarum* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ga127D

Hat 3 : Ga128D

Hat 4 : Ga129D

Hat 5 : Ga130D

Hat 6 : Gk180E

Hat 7 : Gk181E

Hat 8 : Gk182E

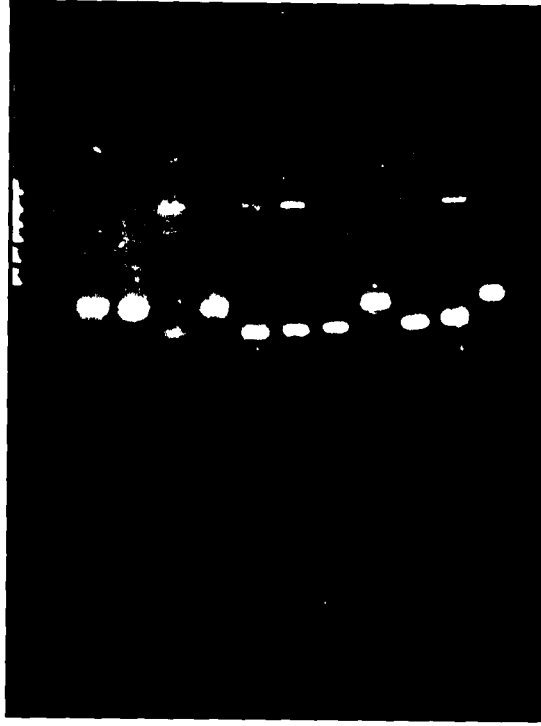
Hat 9 : Gf183E

Hat 10: Gf184E

Hat 11: Gar189E

Hat 12: Gar190E

Hat 13: Gar193E



Şekil 3.14 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp24K

Hat 3 : Gp25K

Hat 4 : Gp26K

Hat 5 : Gp27K

Hat 6 : Gp28K

Hat 7 : Gp29K

Hat 8 : Gp30K

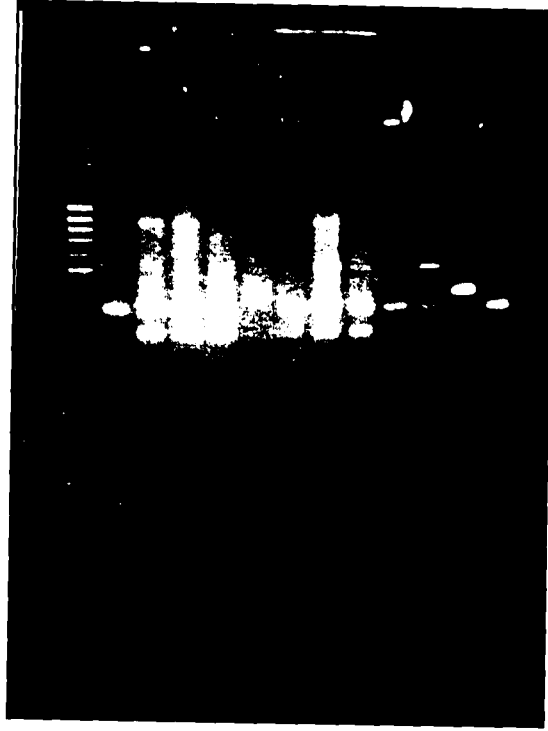
Hat 9 : Gp31K

Hat 10: Gp32K

Hat 11: Gp33K

Hat 12: Gp34K

Hat 13: Gp35K



Şekil 3.15 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp36K

Hat 3 : Gp37K

Hat 4 : Gp38K

Hat 5 : Gp39K

Hat 6 : Gp40K

Hat 7 : Gp41K

Hat 8 : Gp131K

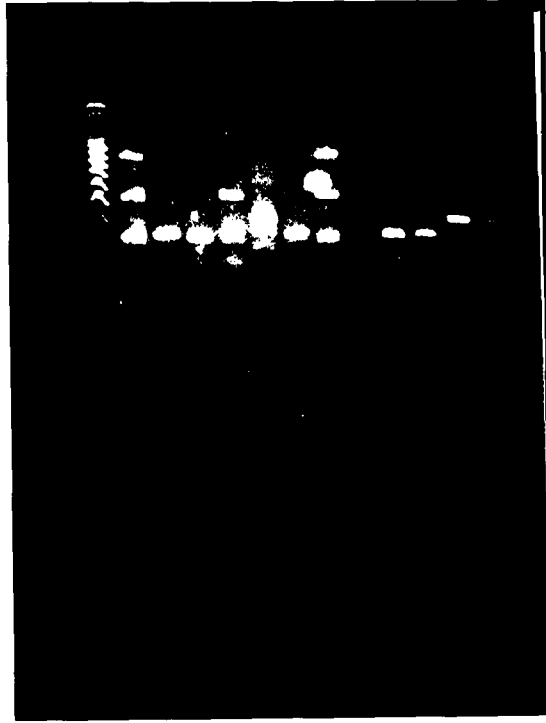
Hat 9 : Gp132K

Hat 10: Gp133K

Hat 11: Gp134K

Hat 12: Gp135K

Hat 13: Gp136K



Şekil 3.16 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp137K

Hat 3 : Gp138K

Hat 4 : Gp140K

Hat 5 : Gp141K

Hat 6 : Gp142K

Hat 7 : Gp143K

Hat 8 : Gp144K

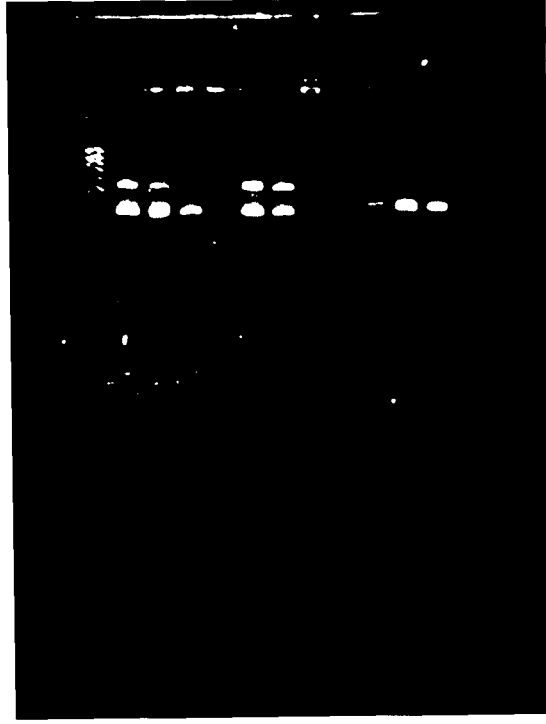
Hat 9 : Gp145K

Hat 10: Gp146K

Hat 11: Gp147K

Hat 12: Gp148K

Hat 13: Gp149K



Şekil 3.17 Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* ve Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gu70U

Hat 3 : Gu69U

Hat 4 : Gu71U

Hat 5 : Gu84U

Hat 6 : Gu85U

Hat 7 : Gu86U

Hat 8 : Gu88U

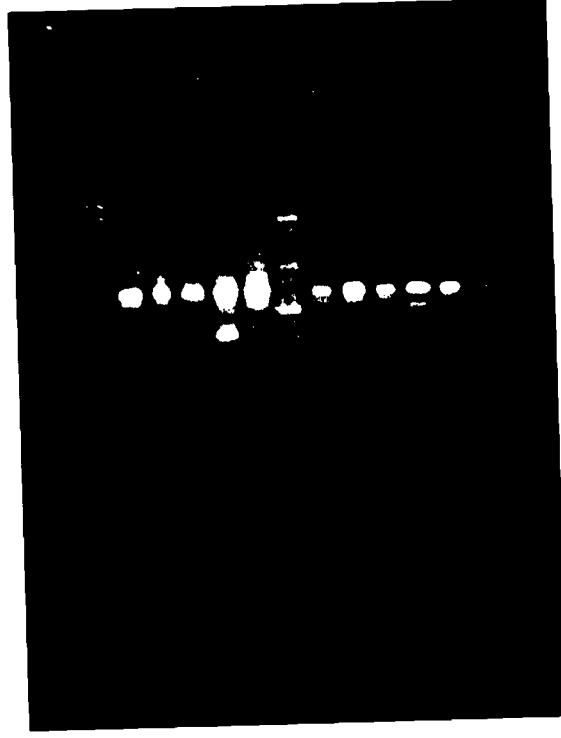
Hat 9 : Gu99U

Hat 10: Gp89Ku

Hat 11: Gp90Ku

Hat 12: Gp91Ku

Hat 13: Gp92Ku



Şekil 3.18 Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp93Ku

Hat 3 : Gp94Ku

Hat 4 : Gp95Ku

Hat 5 : Gp96Ku

Hat 6 : Gp97Ku

Hat 7 : Gp150Ku

Hat 8 : Gp151Ku

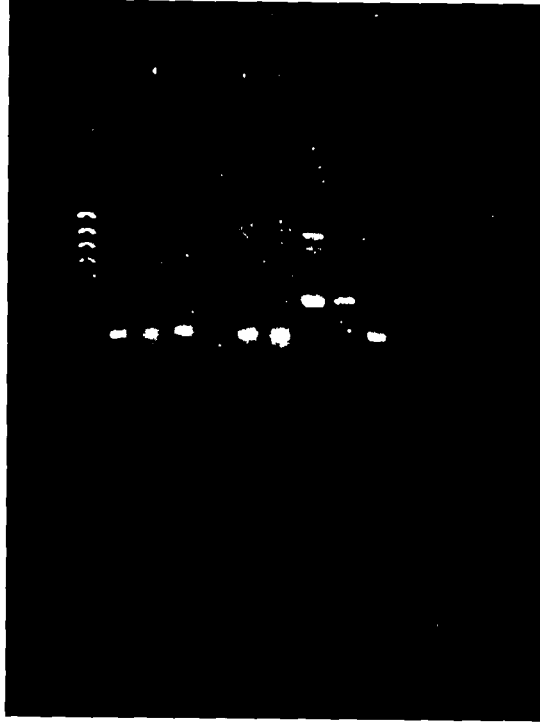
Hat 9 : Gp152Ku

Hat 10: Gp153Ku

Hat 11: Gp154Ku

Hat 12: Gp155Ku

Hat 13: Gp156Ku



Şekil 3.19 Kuzdüz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effetus* bireylerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp157Ku

Hat 3 : Gp159Ku

Hat 4 : Gp161Ku

Hat 5 : Gp162Ku

Hat 6 : Gp163Ku

Hat 7 : Gp165Ku

Hat 8 : Gp166Ku

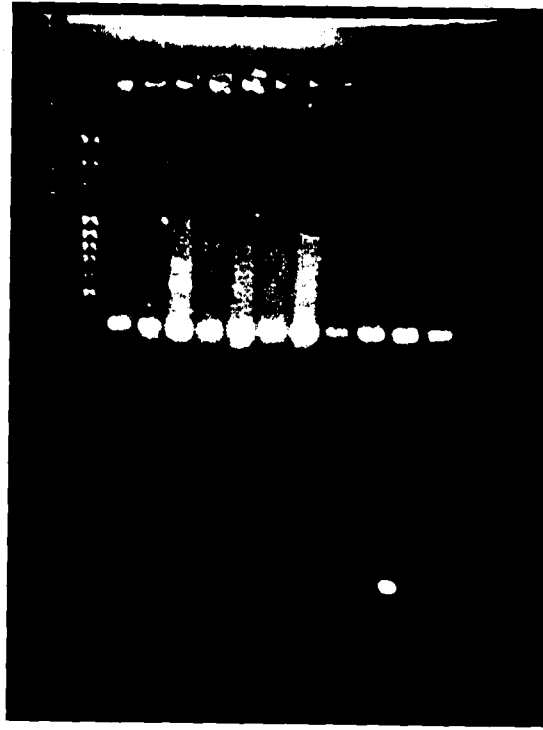
Hat 9 : Gp167Ku

Hat 10: Gp168Ku

Hat 11: Gp169Ku

Hat 12: Gp17S

Hat 13: Gp18S



Şekil 3.20 Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effellus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ge19S

Hat 3 : Ge20S

Hat 4 : Ge21S

Hat 5 : Ge22S

Hat 6 : Ge23S

Hat 7 : Ge44S

Hat 8 : Ge45S

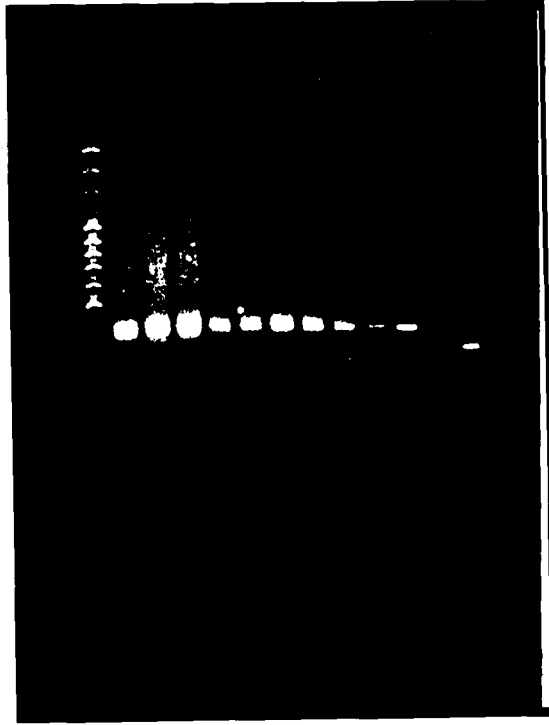
Hat 9 : Ge50S

Hat 10: Ge51S

Hat 11: Ge52S

Hat 12: Ge53S

Hat 13: Ge170S



Şekil 3.21 Safranbolu istasyonundan toplanan bazı *Gammarus effeltus* ve Düden istasyonundan toplanan *Gammarus agrarius* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ge171S

Hat 3 : Ge172S

Hat 4 : Ge173S

Hat 5 : Ge174S

Hat 6 : Ge175S

Hat 7 : Ge177S

Hat 8 : Ge178S

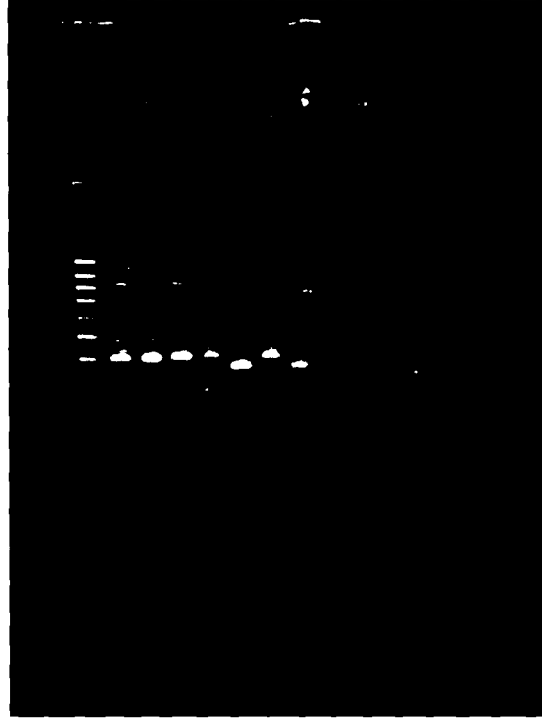
Hat 9 : Ge179S

Hat 10: Ga54D

Hat 11: Ga55D

Hat 12: Ga56D

Hat 13: Ga72D



Şekil 3.22 Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireylerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ga73D

Hat 3 : Ga74D

Hat 4 : Ga75D

Hat 5 : Ga109D

Hat 6 : Ga110D

Hat 7 : Ga111D

Hat 8 : Ga112D

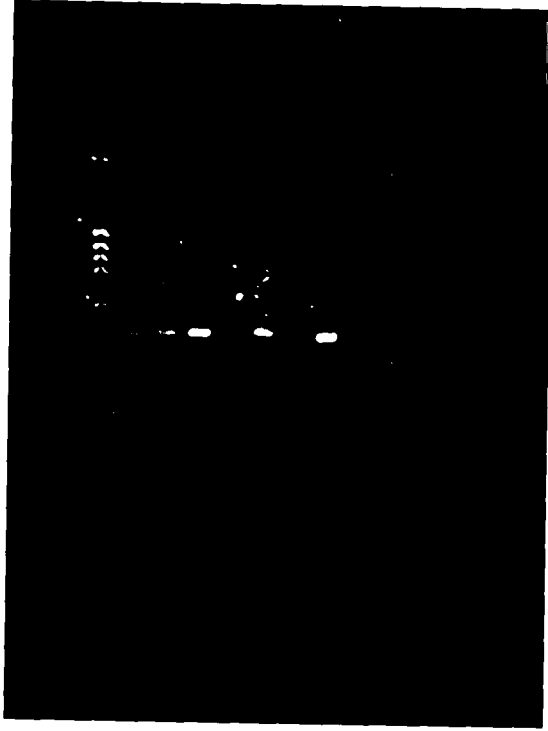
Hat 9 : Ga113D

Hat 10: Ga114D

Hat 11: Ga115D

Hat 12: Ga116D

Hat 13: Ga118D



Şekil 3.23 Düden istasyonundan toplanan bazı *Gammarus agrarius* bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Ga119D

Hat 3 : Ga120D

Hat 4 : Ga121D

Hat 5 : Ga122D

Hat 6 : Ga123D

Hat 7 : Ga124D

Hat 8 : Ga125D

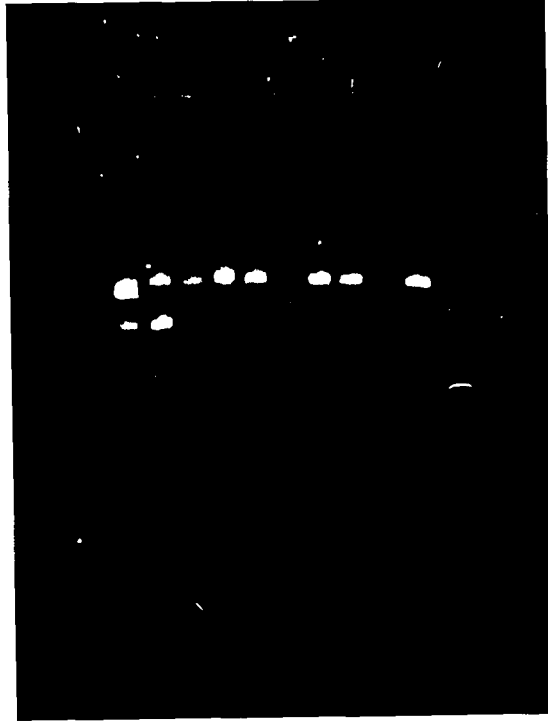
Hat 9 : Ga126D

Hat 10: Ga127D

Hat 11: Ga128D

Hat 12: Ga129D

Hat 13: Ga130D



Şekil 3.24 Edirne istasyonundan toplanan bazı *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* ve *Gammarus arduus* bireyelerine ait, Primer OPB08 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gk180E

Hat 3 . Gk181E

Hat 4 : Gf183E

Hat 5 : Gf184E

Hat 6 : Gf185E

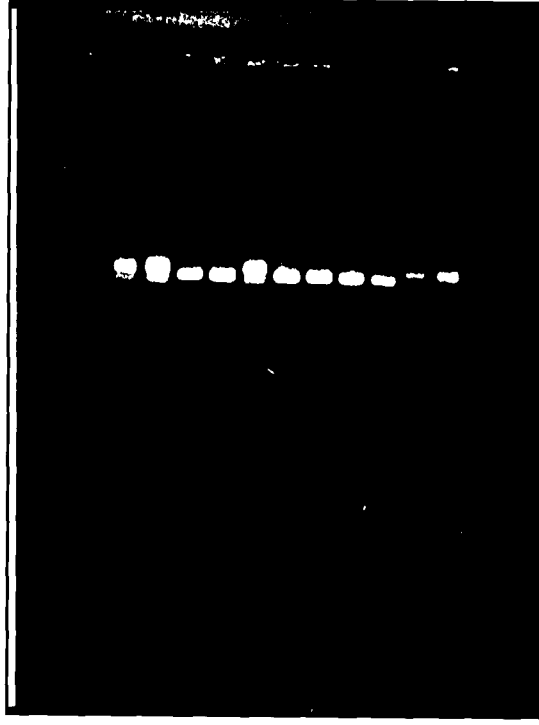
Hat 7 : Gf186E

Hat 8 : Gar189E

Hat 9 : Gar190E

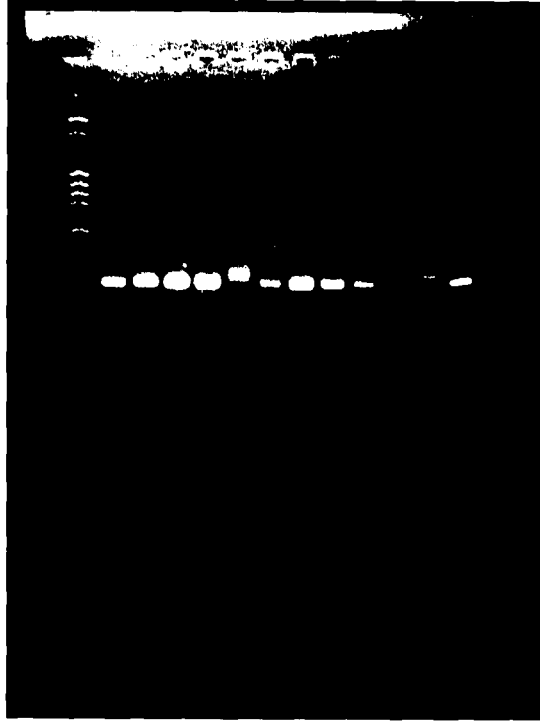
Hat 10: Gar192E

Hat 11: Gar193E



Şekil 3.25 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

- Hat 1 : DNA ladder Plus
Hat 2 : Gp24K
Hat 3 : Gp25K
Hat 4 : Gp26K
Hat 5 : Gp27K
Hat 6 : Gp28K
Hat 7 : Gp29K
Hat 8 : Gp30K
Hat 9 : Gp31K
Hat 10: Gp32K
Hat 11: Gp33K
Hat 12: Gp34K
Hat 13: Gp35K



Şekil 3.26 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp36K

Hat 3 : Gp37K

Hat 4 : Gp38K

Hat 5 : Gp39K

Hat 6 : Gp40K

Hat 7 : Gp41K

Hat 8 : Gp131K

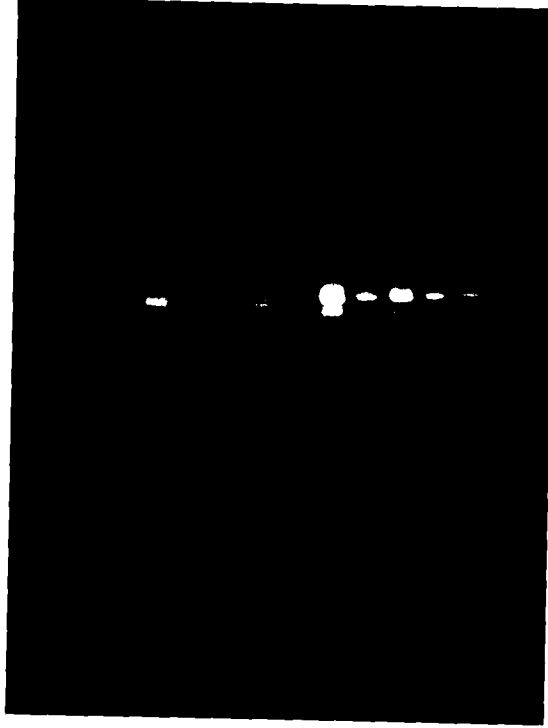
Hat 9 : Gp132K

Hat 10: Gp133K

Hat 11: Gp134K

Hat 12: Gp135K

Hat 13: Gp136K



Şekil 3.27 Kanlıkavak istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gu67U

Hat 3 : Gu69U

Hat 4 : Gu70U

Hat 5 : Gu84U

Hat 6 : Gu85U

Hat 7 : Gu86U

Hat 8 : Gu88U

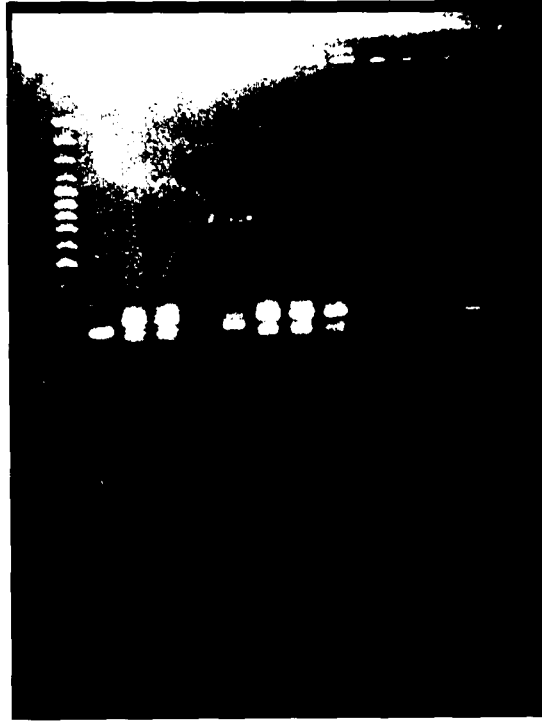
Hat 9 : Gu90U

Hat 10: Gu91U

Hat 11: Gp92Ku

Hat 12: Gp93Ku

Hat 13: Gp94Ku



Şekil 3.28 Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp150Ku

Hat 3 : Gp151Ku

Hat 4 : Gp152Ku

Hat 5 : Gp153Ku

Hat 6 : Gp154Ku

Hat 7 : Gp155Ku

Hat 8 : Gp157Ku

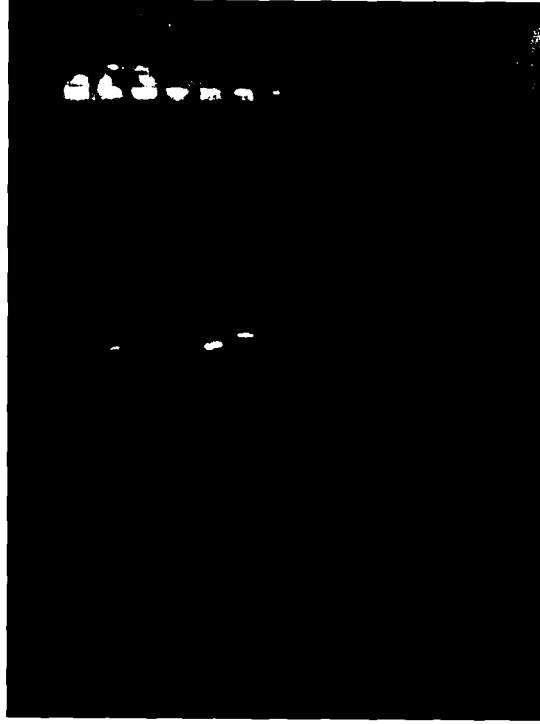
Hat 9 : Gp159Ku

Hat 10: Gp156Ku

Hat 11: Gp162Ku

Hat 12: Gp160Ku

Hat 13: Gp161Ku



Şekil 3.29 Kanlıkavak ve Kunduz istasyonundan toplanan bazı *Gammarus pulex* ve Uludağ istasyonundan toplanan bazı *Gammarus uludagi* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Gp137K

Hat 3 : Gp138K

Hat 4 : Gp139K

Hat 5 : Gp141K

Hat 6 : Gp142K

Hat 7 : Gp143K

Hat 8 : Gu88U

Hat 9 : Gp96Ku

Hat 10: Gp97Ku

Hat 11: Gu99U

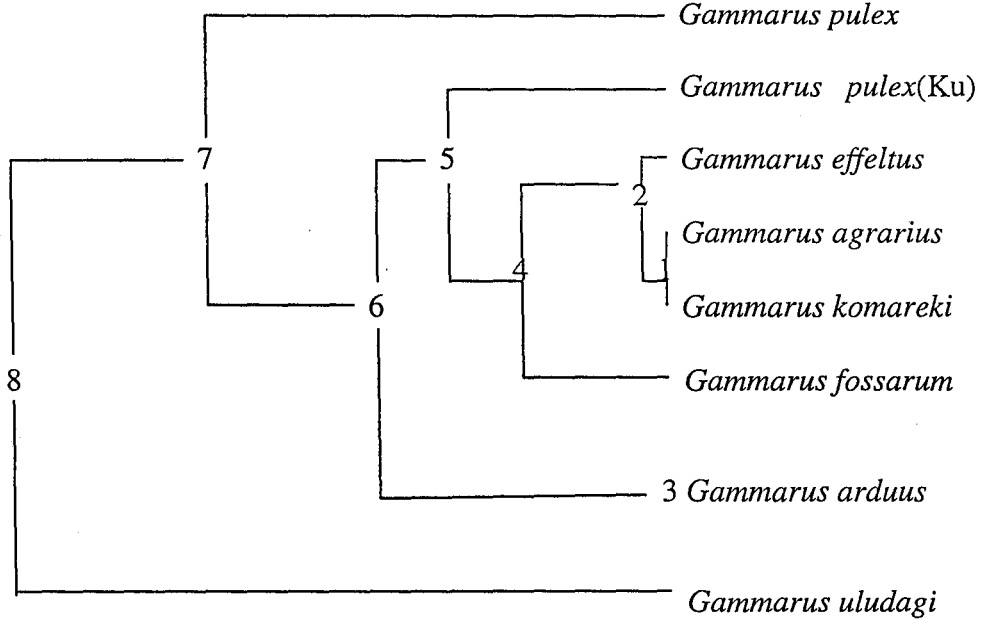
Hat 12: Gp89Ku

Hat 13: Gp98Ku

Çizelge 3.1 *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effellus* türlerinin genetik uzaklığı (Diagonalın altında kalan kısım genetik uzaklık, üstünde kalan kısım genetik benzerliği temsil etmektedir)

	<i>Gammarus pulex</i>	<i>Gammarus uludagi</i>	<i>Gammarus pulex(Ku)</i>	<i>Gammarus effellus</i>	<i>Gammarus agrarius</i>	<i>Gammarus arduus</i>	<i>Gammarus komareki</i>	<i>Gammarus fossarum</i>
<i>G.p.</i>	****	0.4762	0.6190	0.5714	0.6190	0.5238	0.3810	0.4762
<i>G.u.</i>	0.7419	****	0.4762	0.5238	0.6667	0.4762	0.1429	0.2381
<i>G.p</i> (<i>Ku</i>)	0.4796	0.7419	****	0.7619	0.7143	0.7143	0.5714	0.6667
<i>G.e.</i>	0.5596	0.6466	0.2719	****	0.8571	0.9524	0.6190	0.7143
<i>G.ag</i>	0.4796	0.4055	0.3365	0.1542	****	0.8095	0.4762	0.5714
<i>G.ar.</i>	0.6466	0.7419	0.3365	0.0488	0.2113	****	0.6667	0.7619
<i>G.k.</i>	0.9651	1.9459	0.5596	0.4796	0.7419	0.4055	****	0.9048
<i>G.f.</i>	0.7419	1.4351	0.4055	0.3365	0.5596	0.2719	0.1001	****

Çizelge 3.2 *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus komareki*; *Gammarus arduus*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus effeltus* türlerinin dendogramı



(Phylip 3.5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programında değerlendirilmiştir)

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 üretilibilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cins toksikolojik çalışmalarda indikatör olarak yaygınca kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bazı Batı Anadolu Gammarus türlerinin, RAPD-PCR yöntemiyle incelenmesidir. Bu amaçla örneklerin mitokondrial DNA'ları kullanılmıştır. Mitokondrial DNA'nın korunmuş yapı ve organizasyonu özelliklerinden dolayı, türü ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Avisé ve ark. 1979; Moritz, 1987). Crustacea grubunda yapılan incelemelerde, mitokondrial DNA'nın Sitokrom c Oksidaz I (COI) alt ünitesinin, hem türü hem de türlerarası farklılığın ortaya konulması için çok güçlü bir materyal olduğu tespit edilmiştir (Palumbi ve ark. 1991).

Toplanan örneklerin mitokondrial DNA' ları izole edildikten sonra RAPD-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA'lar üzerinde bazı değerlendirmeler yapılarak türü polimorfizm olup olmadığı ve türlerarası genetik uzaklık olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Gammarus cinsi sucül toksisite çalışmalarında indikatör olarak yaygınca kullanılan bir Amphipoddur. Suda artan kirliliğe özellikle ağır metallerle maruz kalan örneklerin enzim aktivasyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Sucül kirlilik tespitinde faydalı Gammarusa dayanıklılık kazandıran elbette genlerinde saklı olan bilgilerdir. Bu genlerin tespiti ve sonrasında klonlanması gibi çalışmalarla , kirliliğe dayanıklılık karakteri, çeşitli şekillerde kullanılabilir. Bu çalışmada *Gammarus* örneklerinin tür içi polimorfizminin ve türlerarası genetik uzaklıkların 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 kadarki morfolojik gözlemler,

hibridizasyon deneyleri ve izozim polimorfizmleri Karaman ve Pinstter (1977a, b, 1987) türlerin taksonomik konumlarını açıklamak için kullanılan yöntemlerdir. Ancak Gammarus'un taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanılması zordur. Dikkatli bir morfolojik inceleme ve belirli sayıda karakterlerin belirlenmesini gerektirir (Karaman ve Pinkster, 1977a, b, 1987). Bu karakterleri gözlemlenmek zordur ve önemli derecedeki morfolojik benzerlikler taksomiye daha da karışık bir hale getirir. Uygulanacak bazı moleküler tekniklerle bu gibi sorunlar önlenebilir (Karaman ve Pinkster, 1977a).

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. Bundan başka bugüne kadar Türkiye içsuları genelinde ya da bölgesel olarak özellikle Amphipoda üzerinde yapılmış tek çalışma Kırıkkale ili tatlısu Gammarus türleri ile yapılmış çalışmadır (Yeşilmen, 1996), Amphipoda türleri üzerine yapılmış moleküler düzeyde bir çalışma ise bulunmamaktadır. 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 oliogonükleotid 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 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).

Gammarus türleri üzerine yapılan filogenetik çalışmaları çok az sayıdadır. Meyran ve grubu tarafından, mitokondrial DNA nükleotid dizi Fransa'da yaygın

olan *Gammarus* cinsinin altı türü arasındaki genetik farklılığın tespit edilmesinde kullanılmıştır (*G. fossarum*, *G. pulex*, *G. lacustris*, *G. wauteri*, *G. roeseli*, *G. minus*). 23 farklı populasyondan 104 örnek taksonomik statüleri ve bunların filogenetik ilişkilerini ortaya koymak için karşılaştırılmıştır. Sitokrom-c-Oksidaz (COI) alt ünite geninin 376 bp bölgesi için nükleotid dizileri amplifiye edilmiş ve DNA 'nın dizi analizi yapılmıştır. Yüksek düzeyde tür içi ve türler arası genetik farklılıklar ortaya koymuşlar ve bundan dolayı da COI geninin amphipod populasyon biyolojisi için güçlü bir markır olduğunu önermişlerdir. (Meyran ve ark. 1997)

Bir başka çalışmada, Kuzey ve Güney Alp'lerde yükseklerde bulunan göllerden toplanan *Gammarus lacustris* populasyonları arasındaki filocoğrafik yapının ortaya konulması için mitokondrial DNA dizi analizi kullanılmıştır. 9 farklı populasyonun 54 bireyinin mitokondrial COI geninin 376 bp lik parçasının karşılaştırılması sonucunda populasyonlar içinde çeşitlilik gözlenmemiştir. Ancak Kuzey ve Güney populasyonları arasında farklılıklar ortaya konulmuştur (Meyran ve ark. 1998)

Arjantin'de, RAPD-PCR kullanılarak yapılan bir çalışmada, Arjantin ve Porto Rico'dan toplanan 5 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populasyonları arasında tür içi polimorfizm varlığı araştırılmıştır. Bu populasyonlar arasında yüksek oranda genetik benzerlik olduğu ortaya konulmuştur (Sousa ve ark. 2001).

RAPD markırları *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. 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 macelloria*' 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 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).

Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te gözlenen *Gammarus pulex* (Kanlıkavak istasyonu izolatu), *Gammarus pulex* (Kunduz istasyonu izolatu), *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum*, *Gammarus arduus* örneklerinin M13, OPB08 ve B7 primerleriyle amplifikasyon sonuçları, genetik uzaklık programıyla değerlendirilerek, çalışılan tüm *Gammarus* türlerinin uzaklıklarına (Çizelge 3.1) ait dendogram (Çizelge 3.2) elde edilmiştir.

Buna göre Kanlıkavak istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* türünün sırasıyla Kunduz istasyonundan toplanan *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*,

Gammarus effeltus, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine genetik uzaklığı; 0.4796; 0.7419; 0.5596; 0.4796; 0.6466; 0.6466; 0.9651; 0.7419 olarak bulunmuştur.

Kunduz istasyonundan toplanan *Gammarus pulex* türünün *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki* ve *Gammarus fossarum* türlerine olan uzaklığı; 0.7419; 0.2719; 0.3365; 0.3365; 0.3365; 0.5596; 0.4055'dir. *Gammarus uludagi* türünün sırasıyla *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan uzaklığı; 0.6466; 0.4055; 0.7419; 0.7419; 1.9459; 1.4351 olarak bulunmuştur.

Gammarus effeltus türünün sırasıyla *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı 0.1542; 0.0488; 0.0488; 0.4796; 0.3365'tir. *Gammarus agrarius* türünün sırasıyla *Gammarus arduus*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı; 0.2113; 0.2113; 0.7419; 0.5596 olarak bulunmuştur. Aynı türden olan *Gammarus arduus* örnekleri arasında genetik uzaklık 0'dır, türüçi polimorfizm bulunmamaktadır. *Gammarus arduus* türünün sırasıyla *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türlerine olan genetik uzaklığı 0.4055; 0.2719'dur. *Gammarus komareki* türünün *Gammarus fossarum* türüne olan genetik uzaklığı ise 0.1001 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonunda örneklerde türüçi polimorfizm gözlenmiş ve, *Gammarus pulex*, *Gammarus uludagi*, *Gammarus effeltus*, *Gammarus agrarius*, *Gammarus arduus*, *Gammarus komareki*, *Gammarus fossarum* türleri arasındaki genetik uzaklıklar tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında Türkiye'de bulunan tüm türler RAPD-PCR ile çalışılarak *Gammarus*'un Türkiye profili ortaya konulabilir.

KAYNAKLAR

- ANDERSEN, W.R. ve 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. ve REITER, P., *Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of Aedes aegypti in Puerto Rico*, Heredity, **76**, 325-334 (1996).
- AVISE J.C. ve FELLEJ J., *Population structure of bluegill Lepomis macrochirus population in man-made reservoirs*, Evolution, **33**, 15-26 (1979).
- BARDAKÇI, F. ve 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).

ERLICH H.A., GELFALD D. ve SNINSKY I., Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science*, **252**, 1643-1650 (1991).

GELİDAY, R., KOCATAŞ, A. ve KATAĞAN, T., *Bafa gölünü 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 specific 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://www.web.odu.edu/sci/biology/jrh/what.is.htm)

[Http-2 museum.vic.gov.au/crust/amphbiol.htm](http://museum.vic.gov.au/crust/amphbiol.htm)

INFANTE M.E., YOTOKOKIS, C. ve LIMA de AZEREDO ESPIN, A.M., *Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera:Calliiphoridae) from southeastern Brazil and northern 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).

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).

MEYRAN J.C. and TABERLET P., *Mitochondrial DNA polymorphism among alpine populations of Gammarus lacustris*, Fresh Water Biology, **39**, 259-265 (1998).

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).

MORITZ C., DOWLING T.E. and BROWN W.M., *Evolution of animal mitochondrial DNA relevance for population biology and systematics*, Annual Review of Ecology and systematics, **18**, 269-292 (1987).

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).

PALUMBI S.R. and BENZI J., Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaid shrimps, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **1** 27-34

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 ibred lines and random amplified polymorphic DNA_s* , *Proc.Natl.Acad.Sci*, **89**, 1477-1481 (1992).

ROMMENS, J.M., IANNUZZ, 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, chrosome walking adn 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).

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 Coeliomyia hominivorax from C.macellaria (Diptera. Calliphoridae)*, Bull.Entomol.Res., **92**, 89-96 (2002).

SOUSA G.B., BLANCO A. and GARDENAL C.N., *Genetic relationships among Aedes Aegypti populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers*, Journal of Medical Entomology, **38**, 371-375 (2001).

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.Acid.Res., **18**, 6531-6535 (1990).

WILLIAM, 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).

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