

**BAZI TABANUS(TABANIDAE, DİPTERA)
TÜRLERİNİN DNA'LARININ RAPD-PCR
TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ**

Öge ARTAGAN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Haziran-2008

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonunca kabul edilen 071028 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Öge ARTAGAN'ın “**Bazı Tabanus (Tabanidae, Diptera) Türlerinin DNA'larını RAPD-PCR tekniği İle İncelenmesi**” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 01.07.2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Yard. Doç. Dr. FİLİZ ALANYALI
Üye : Prof. Dr. AHMET ÖZATA
Üye : Doç. Dr. YÜCEL ŞAHİN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI TABANUS(TABANIDAE, DİPTERA) TÜRLERİNİN GENOMİK DNA'LARININ RAPD-PCR TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

Öge ARTAGAN

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI

2008, 46 sayfa

Sistematik çalışmalarında birçok canlı türünün sınıflandırılması morfolojik özellikleri vasıtasıyla yapılmaktadır. Ancak son yıllarda artan çevre kirliliği ve iklim değişiklikleri canlıların morfolojik özelliklerinde değişikliklere neden olmaktadır. Türlerin tanımlanması, genetik uzaklığın belirlenmesi ve polimorfizmin saptanmasında morfolojik özelliklerin yanında moleküler işaretleyicilerin kullanılması, oldukça önemlidir. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği ekonomik, hızlı olması ve genomik bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle genetik uzaklıkların belirlenmesi için tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, bazı Tabanus türlerinden izole edilen DNA'ların 20 primerle amplifikasyonu denenmiştir. Denenen primerlerden 3 tanesinin verdiği amplifikasyon sonuçlarına göre bu türlerin, birbirine olan uzaklık dereceleri belirlenmiştir. RAPD-PCR tekniği Tabanus türleri için genetik uzaklıkların belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Tabanus, RAPD-PCR, Genetik uzaklık, Filogeni, DNA

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF GENOMIC DNA OF SOME OF THE
TABANUS(TABANIDAE, DIPTERA) SPECIESES BY RAPD-PCR
TECHNIQUE****Öge ARTAGAN****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Filiz ALANYALI****2008, 46 pages**

In systematic studies, many species have been classified according to morphological criteria. However, recently occurring environmental pollution and climatological changes leads to some changes in morphologic features of organisms. Together with morphologic properties, using molecular markers for identification of species, determination of genetic distance and detecting polymorphism is quite important. Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) technique is preferred in order to determine genetic distances since it is economical and rapid and also it does not require genomic information.

In this study, the amplification of 20 primers with genomic DNA isolated from some Tabanus (Tabanidae Diptera) species is tested. According to the amplification results of 3 primers tested, the degrees of diversity from one another are showed. It is demonstrated that RAPD-PCR technique could be used to determine genetic distances for Tabanus species.

Keywords : Tabanus, RAPD-PCR, Genetic distance, Phylogeny, DNA

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresinde desteğini benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya, çalışmanın planlanıp yürütülmesinde ve tezin tamamlanmasında her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen danışmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doc. Dr. Filiz ALANYALI'ya, materyal toplanmasında ve tür tayininde desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yavuz KILIÇ'a laboratuardaki yardımlarını esirgemeyen Uzm. Ferhat ALTUNSOY'a teşekkürlerimi sunuyorum

Her daim maddi manevi desteklerini benden asla esirgemeyen aileme ve gösterdiği sabır ve fedakarlık dolayısıyla eşim Salih ARTAGAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Öge ARTAGAN

Temmuz, 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1 Tabanidae'nin Sistematik özellikleri.....	1
1.2 Tabanidlerin Yaşam Döngüleri	2
1.3 Tabanidlerin Morfoloji.....	4
1.4 Sistematik Çalışmalarında DNA Kullanılarak Çalışılan Temel Metodlar	6
1.4.1 DNA-DNA Hibridizasyonları	6
1.4.2 Restriksiyon Enzim Analizi	6
1.4.3 Klonlama	7
1.4.4 DNA Dizi Analizi	8
1.4.5 PCR ve PCR bazlı Parmakizi Teknikleri	9
1.5 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)	9
1.5.1 RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri	14
1.5.2 PCR aşamaları.....	15
1.5.3 PCR Optimizasyonu.....	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1 Materyal	20
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Tabanidae Türleri	20
2.1.2. Tampon ve Çözeltiler	21
2.1.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2.1.2.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	22

2.1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	22
2.1.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	24
2.1.3 Sterilizasyon.....	24
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. Toplanan Tabanidae Örneklerinin Tür Tayini	24
2.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu.....	24
2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Tayini.....	25
2.2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR).....	25
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	26
2.2.6. Genetik Uzaklık Tayini	26
3.BULGULAR	28
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tabanidlerin yaşam döngüleri.....	4
1.2. Tabanidae ergininde (♀) genel vücut yapısı (Tabanus autumnalis).	5
1.3. Tabanidae ergininde (♀) genel vücut yapısı (Tabanus unifasciatus).....	5
1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu	13
3.1. Mrk. Yarımca Köyünden toplanan bazı Tabanus autumnalis bireylerine ait, Primer B07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	29
3.2. Mrk. Yarımca Köyünden toplanan bazı Tabanus autumnalis bireylerine ait, Primer A02 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	30
3.3. Mrk. Yarımca Köyünden toplanan bazı Tabanus autumnalis bireylerine ait, Primer A07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	31
3.4. Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı Tabanus unifasciatus bireylerine ait, Primer B07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	32
3.5. Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı Tabanus unifasciatus bireylerine ait, Primer A02 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	33
3.6. Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı Tabanus unifasciatus bireylerine ait, Primer A07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.....	19
2.1. Kullanılan Tabanidae türleri, toplandıkları yerler ve toplanma tarihleri	21
2.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotit primerleri ve % G+C oranları	23
3.1. <i>Tabanus autumnalis</i> , <i>Tabanus unifasciatus</i> türlerinin genetik uzaklığı	35

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
C°	: Santigrat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin-tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu
HCl	: Hidroklorik Asit
Mg⁺²	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Mili molar
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
Tm	: Erime sıcaklığı
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
RE	: Restriksiyon Enzimi
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk polimorfizmi

1.GİRİŞ

1.1 Tabanidae'nin Sistematik özellikleri

Dipterlerin Tabanidae familyası türlerinin dişileri evcil sıcakkanlı hayvanlardan, bazıları insanlardan kan emerler, bu sırada bir çok hastalığı etkeninin bulaşmasına neden olurlar, aynı zamanda hayvanlarda et ve süt veriminde önemli kayıplara neden olurlar. Zararlılarla savaşımında, bunların biyolojilerinin ayrıntılı olarak araştırılmasının büyük önemi vardır (Kılıç 1994, Ferreira ve ark. 2002, Barros 2007, Barros 2001).

Birçok canlı türünün sınıflandırılması morfolojik özellikleri ve eşeysel organlarının yapıları vasıtasıyla yapılmaktadır. Fakat son yıllarda canlıların yaşam ortamlarındaki bozulmalar, iklim değişimleri ve çevre kirliliği canlıların morfolojik özelliklerinde değişimlere neden olmaktadır. Bu açıdan morfolojik sınıflandırmanın moleküler veriler ile desteklenmesi son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır (Spakulova ve ark. 2000, Türkoğlu ve Koca 2002, De Prins ve ark. 2002, Spakulova ve ark. 2002)

Tabanidler asıl zararlarını birçok sağlık problemine neden olarak gösterirler. Aynı gün içerisinde değişik insan ve hayvanlardan kan emdikleri için birçok hastalığın taşıyıcı vektörü olabilmektedirler. Örneğin *Tabanus* türleri kan emme işlemini sık sık kesmeleri ve konukçu değiştirmeleri nedeniyle, *Infectious anemia* vd. gibi birçok virüsün, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* vb. gibi birçok bakterinin ve *Thrypanosoma sp.* vd. gibi birçok protozoonun mekanik taşıyıcısı olmaktadır (Chvala ve Jezek 1997, Squitier 1998, Barros 2001, Barros 1996, Ferreira ve ark. 2002, Demirsoy 2003, http-3).

Tabanidlerin kan emmeleri birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Sıcak bir günde evcil hayvanlardan özellikle de sığırlardan toplu halde 100 cm³ kan emebilmektedirler. Bu da et ve süt verimini büyük ölçüde düşürmektedir. A.B.D.'de yapılan bir araştırmada Tabanidae türlerinin neden olduğu zararın yıllık 40 milyon dolara ulaştığı belirlenmiştir (Perich ve ark. 1986, http-1).

Tabanidler kan emme sırasında tükürük bezlerinden kanın pıhtılaşmasını önleyen (Antikoagulin) ve toksik etkilere sahip tükürük salgıları salgılamaktadırlar. Bu nedenle sinek konukçu hayvandan uzaklaştıktan sonra da

yara bir süre kanamaya devam eder. Bu nedenle birçok evcil hayvanın öğlen saatlerinde kan içinde kalarak çok rahatsız olduğu görülür. Bunun dışında kanayan bu bölgeler bazı asalak böcekler için ikincil beslenme bölgeleridir ve bu bölgeler birçok mikroorganizmanın enfeksiyonuna ve üremesine karşı oldukça savunmasızdır. Ayrıca ısırmdan sonra 3-4 saat rahatsız edici sızlama, bazı insanlarda ve hayvanlarda 10-15 saat sürebilen şişlikler meydana gelebilmektedir (Boyes ve Wilkes 1972, Chvala ve Jezek 1997, Barros 2001, Ferreira ve ark 2002, Demirsoy 2003, http-1).

Tabanidae erkekleri ise bitki öz suyu ve yumuşak vücutlu böceklerin vücut sıvıları ile beslenirler, kan emmezler (Chvala ve Jezek 1997, Barros 2001, Ferreira ve ark. 2002, Demirsoy 2003, http-3).

Tabanidae ait birçok türün dişileri sığır, deve, at, eşek, katır, geyik, domuz, köpek, kuş gibi çeşitli evcil ve yabanıl hayvanlardan, hatta insanlardan kan emmektedir. Bunun yanı sıra bazı Tabanidae türlerinin, timsah (Barros 1996, Medem 1981, Henriques ve ark. 2000), kum kertenkelesi, deniz kaplumbağası, kara kaplumbağasına (Philip,1983), anakonda (Philip, 1986) saldırdıkları bilinmektedir.

Tabanidler, bazı patojenleri ve parazitleri biyolojik olarak taşıyabilmektedirler. Bu hastalık etkenleri bulaştırılmadan önce belirli bir dönem sinek vücutu içerisinde gelişimini tamamlar (örn. *Loa loa*). Ancak tabanidlerin biyolojik vektörlüğü çok fazla yaygın değildir. Daha yaygın olarak tabanidler kan bulaşmış ağız parçaları ile hastalık etkenlerinin mekanik vektörlüğünü yapmaktadırlar (Gary ve Lance, 2002; Lehane, 2005).

1.2 Tabanidlerin Yaşam Döngüleri

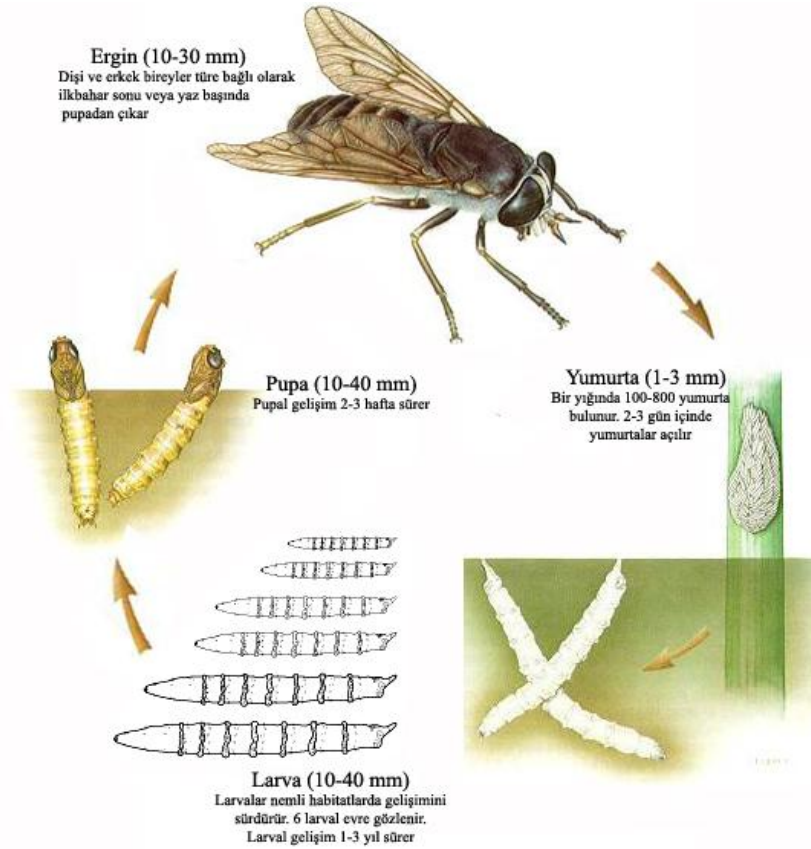
Tabanidae türleri holometabol sineklerdir. Bu nedenle yaşam döngüsü yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört evreden meydana gelir.

Çiftleşme erken saatlerde yani güneşin doğuşundan sonra ya da güneş batışından önce olmaktadır. Erkekler, gün ışığında genel olarak ormanlık alanlarda veya ormanların kenarlarındaki ağaçların arasında bulunurlar. Uçuşları oldukça karakteristiktir. Bir noktada hareketsiz kalırlar ve aniden ileriye fırlarlar.

Ortaya çıkan dişiler çiftleşme alanına uçarlar ve havadaki erkeklerle çiftleşirler. Kopulasyon havada başlar fakat bazı türlerde çevredeki bitkiler üzerinde olduğu görülmüştür. Çiftleşme işlemi yaklaşık 5 dakika sürer.

Ergin dişiler çiftleşip kan emdikten 4–7 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Yumurtalar güneşli günlerde ve günün sıcak saatlerinde su kenarlarındaki sarkık ağaç yaprakları çıkıntılı kayalar, dallar ve aquatik vejetasyon gibi dikey bir yüzey üzerinde tabakalar halinde bırakılır. Yumurtlama süresi türleri göre değişiklik göstermektedir.

Yumurtaların bırakıldığı yüzey her zaman doğrudan doğruya larvaların gelişimini destekleyen ıslak zemindir. Dişi çok kalabalık olan vejetasyona yumurtalarını bırakmaz. Yumurtalar gelişimini 1–3 hafta içinde tamamlar. Bu süre hava koşullarına, özellikle nem oranına bağlı olarak değişebilmektedir. Nem oranı % 80'in altına düştüğünde yumurta içindeki larva devresi de uzamaktadır. Yumurtadan çıkan larva su dibine çamur ve detritus içine iner veya nemli toprak içine girerler (Chvala ve ark. 1972, Chvala ve Jezek 1997).



Şekil 1.1: Tabanidlerin yaşam döngüleri

1.3 Tabanidlerin Morfoloji

Tabanidae türlerini genellikle büyük yapıları, göğüslerinin genişliğinden daha geniş baş kısımları ile hemen tanımak mümkündür (şekil 1.2, şekil 1.3). Vücut uzunlukları küçük türlerde 7–10 mm. kadar olurken *Tabanus* türleri gibi büyük türlerde 20-30 mm. ye ulaşabilmektedir. Tabanidae türleri çoğunlukla siyah, esmer, turuncu, yeşil renklere sahiptir (Chvala ve Jezek 1997, Demirsoy 2003).



Şekil 1.2: Tabanidae ergininde (♀) genel vücut yapısı (*Tabanus autumnalis*).



Şekil 1.3: Tabanidae ergininde (♀) genel vücut yapısı (*Tabanus unifasciatus*).

1.4 Sistematik Çalışmalarında DNA Kullanılarak Çalışılan Temel Metodlar

1.4.1 DNA-DNA Hibridizasyonları

Nükleer DNA hibridizasyonuna dayalı DNA-DNA hibridizasyonunda ilk basamak olarak çift iplikli DNA molekülünün izolasyonu RNA ve proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Alkali yada ısıya maruz kalan DNA da çift zincirdeki hidrojen bağları kopar ve tek zincir haline gelir. Farklı türlerden elde edilen tek zincirli DNA iplikleri uygun koşullar altında bir araya getirildiğinde birbirini tamamlayabilen iplikler tekrar hidrojen bağlarının kurulmasıyla çift zincir formuna dönüşür. Birbirinin komplementeri şeklinde birbirini tamamlayan farklı türlere ait tek zincirler çift zincirli yeni formunu oluşturur. Evrimsel olarak birbirine yakın akraba olan türlerde DNA hibridizasyonu daha yüksek verimle gerçekleşir. Bu teknikte, tek zincirli DNA'ları biri radyoaktif olarak işaretlenir ise işaretli olanın hangi DNA ile hibridize olduğu anlaşılır. Verimli sonuç alınmasında reaksiyon koşulları önemli bir yer tutmaktadır. En önemli parametreler sıcaklık ve tuz konsantrasyonudur. DNA'nın yeni hibrid formu kromatografi ya da santrifugasyon ile ölçülebilir. Teknik nisbeten pahalı ve uzun zaman gerektirir (Gülbitti Onarıcı ve Sümer, 2003).

1.4.2 Restriksiyon Enzim Analizi

Bakterilerden izole edilen Restriksiyon endonükleazlar olarak adlandırılan bir grup enzim çift iplikli özgün DNA dizilerini keser. RE'ler Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Tip I RE'ler DNA'yı tanıdığı bölgeden 1000 baz çiftlik uzaklıkta özgül olmayan yerlerden asimetrik olarak kesmektedirler. Tip III RE'ler ise DNA'yı tanıma bölgesinden 24-26 baz çiftlik uzaklıktan keserek 5-7 baz çiftlik asimetrik fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip I ve Tip III RE'ler kesim sırasında ATP'ye ihtiyaç duyarlar Tip II RE'ler kesim sırasında enerjiye ihtiyaç duymazlar ve DNA'yı tanıma bölgesinden keserek 4-8 baz çiftlik küt uç veya yapışkan uç şeklinde palindromik fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip II RE'ler bu sahip oldukları özelliklerinden dolayı genelde filogenetik çalışmalarda

kullanılırlar. Restriksiyon enzimi ile kesilen fragment sayısı enzimin DNA üzerinde tanıdığı spesifik bölge sayısına bağlıdır. Nükleotit dizisindeki değişiklikler RE tanıma bölgelerini etkiler. Farklı tanıma bölgelerinin varlığı türlerin karşılaştırılmasına yardımcı olur(Solak ve ark. 2000, Gülbitti Onarıcı ve Sümer 2003). DNA’da meydana getirilen fragmentlerinin büyüklüğü ve sayısını karşılaştırılarak RFLP(Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) yöntemiyle analiz etmek mümkündür (Meghen ve ark. 2002; Anonim 2005).

Görülen fragment sayı farklılıkları, mutasyonlar veya ilgili moleküldeki restriksiyon kesim bölgelerinin varlığı veya yokluğu ile açıklanmaktadır. Bu teknik, nükleer ya da mtDNA’da geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Genetik uzaklık, polimorfizmin belirlenmesi, ortak ebeveyn veya prenatal tanı, gen klonlanması, doku tiplmesi, enfeksiyon ajanlarının tespiti gibi çalışmalarda uygulanmaktadır. (Meghen ve ark.. 2002; Anonim 2005).

RFLP yönteminde RE DNA molekülü üzerinde farklı tanıma bölgelerine sahip enzimler yardımıyla molekül üzerindeki dizi farklılıkları tesbit edilebilmektedir. DNA molekülü özgül RE ile belli bir nükleotid sırasını tanıyıp kesim yapar farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. DNA molekülü üzerinde meydana gelen değişiklikler restriksiyon enzimlerinin spesifik kesim bölgelerinin kaybolmasına ya da yeni kesim bölgelerinin ortaya çıkmasına, sonuçta kesilen parça büyüklüklerinin değişimine neden olur.

1.4.3 Klonlama

Sistemik çalışmalarında büyük miktarlarda saf DNA ya ihtiyaç vardır. Klonlamada ilk basamak restriksiyon endonükleazlar ile DNA’nın kesilmesidir. Bir diziyi klonlamak için, ilgili DNA dizisi ve plazmit kesilir ve komplementer uçlar oluşturulur. Uygun koşullar altında kesilmiş parçalar karıştırılır (bir araya getirilir) ve plazmit DNA’sı ilgili DNA dizisi ile bütün oluşturur. DNA ligaz enzimiyle parçalar birleştirilir ve oluşan yeni DNA’ya rekombinant DNA denir. Rekombinant DNA bakteri içine sokulur. İlgili DNA bölgesini içeren bakteri düşük derecelerde uzun süre saklanabilir. İhtiyaç duyulduğunda stok’dan küçük

miktarlarda alınarak sıvı besi yerine aşılama yapılarak çoğaltılabilir(Gülbitti Onarıcı ve Sümer, 2003).

1.4.4 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi sistematik çalışmalarında yeni bir yaklaşım olmasına rağmen filogenetik ilişkilere moleküler yaklaşımda en çok kullanılan teknikler arasındadır. Dizi analizinde; Tag DNA polimeraz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak dizisi saptanacak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenebilmektedir. Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması metodu kullanılmaktadır. Bu yöntem, DNA polimerazların dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri substrat olarak kullanılmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, primer, dNTP karışımı ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylece reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçalarının oluşması gerçekleşmektedir. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Dizi analiz sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Dolayısıyla bu molekül zincir uzamasını durdurur ve zincirin son nükleotidini oluşturur. Yeni sentezlenen DNA molekülleri denature poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılır ve otoradyografi ile görüntülenir. Taksonomistler için genlerin genetik varyasyonunu doğru tahmin etmenin en kesin yolu DNA dizi analizi olarak görülmektedir. Ancak DNA baz dizi bilgilerinin elde edilmesi uzun çaba, zaman ve maliyet gerektirdiği için son olarak tercih edilir (Gülbitti Onarıcı ve Sümer, 2003; Hwank ve Kim 1999; Ütük ve ark, 2005).

1.4.5 PCR ve PCR bazlı Parmakizi Teknikleri

PCR metodu klonlamaya gerek kalmadan DNA'nın milyonlarca kopyasının elde edilmesini sağlayan bir metod olduğu için tercih edilen bir yöntemdir. Çok küçük miktarlardaki kalıp DNA'dan spesifik DNA parçalarının amplifikasyonunun in vitro olarak termal cyclus yardımıyla gerçekleştirilmesi PCR bazlı parmak izi teknikleri yakın akraba türler arasında ve populasyondaki bireyler arasında, RAPD-PCR, AFLP, gibi çok çeşitli tekniklerle genetik çeşitliliğin tahmini için başarılı bir şekilde geliştirildiler. Bu teknikler genetik haritalandırma ve diagnostik uygulamalar için DNA işaretleyicileri oluştururlar. DNA'nın kısmi PCR amplifikasyonuna dayanan RAPD işaretleyicileri kısa oligonükleotit dizilerini oluşturur. Bireyler arasındaki polimorfizmler primer bağlanma bölgelerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. RAPD işaretleyicileri agaroz jel elektroforezi yardımıyla kolayca analiz edilir. AFLP DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmesi ve kesilen uçlara adaptörlerin ligasyonu, oluşan parçaların PCR ile çoğaltılması ve oluşan parçaların poliakrilamid jelde analizi işlemlerini kapsar. AFLP işaretleyicileri bitki ve hayvan üretiminde, tıbbi teşhis, adli tıp ve mikrobiyal tiplmeyi de içeren birçok DNA parmakizi tekniğinde yüksek hassasiyete sahiptir (Gülbitti Onarıcı ve Sümer, 2003).

1.5 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)

Moleküler biyoloji çalışmalarında genetik polimorfizmi saptamak için çok sayıda DNA işaretleyicileri geliştirilmiştir. Son yıllarda DNA işaretleyicileri geliştirmek için en sık kullanılan teknik RAPD-PCR tekniğidir. RAPD işaretleyicileri, kısa ve rastgele oligonükleotit primerleri kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin amplifiye edilmiş ürünleri olduklarından, önceden dizinin bilinmesi gerekmez. RAPD tekniğinin ucuz, kısa sürede çok sayıda DNA işaretleyicisi geliştirmedeki etkinliği önemlidir (Bardakçı, 2001). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA'daki özgün bölgelerin klonlamaya gerek duyulmadan milyonlarca kopyasının primerler vasıtasıyla enzimatik olarak in vitro olarak

sentezlenmesidir RAPD nükleotit dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonudur, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın tür içi ve türler arası polimorfizmin belirlenmesini sağlar. Günümüzde PCR; doğada yaşayan çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi, evölüsyon çalışmaları, DNA haritalaması, tohum saflığının belirlenmesi, babalık tayini, HIV, Chlamydia gibi çeşitli hastalık patojenlerinin tanısı, genlerdeki somatik mutasyonların belirlenmesi, adli tıp gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Arı Ş., 2008).

PCR moleküler biyoloji çalışmalarında güvenilir, çabuk, kolay uygulanabilir olması spesifik, az miktarda DNA ile çalışılabilmesi, sekans bilgilerine gereksinim duyulmaması, tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması ve RFLP'den daha fazla polimorfizm elde edilmesi nedeniyle tercih edilir (Ütük ve ark., 2005).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak iki farklı kelebek türü olan *Pieris brassica* ve *P.indica* (Family: Pieridae)'nın genetik benzerlik ve farklılıkları 2 primer (P12, P17) kullanılarak ortaya konmuştur (Sharma ve ark., 2006).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak farklı kuluçhanedeki damızlık gökkuşacağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) arasındaki genetik çeşitlilik belirlenmiştir (Akhan, 2005).

Bemisia tabaci'nin (beyazsineklerinin) Iberian popülasyonunun genetik çeşitliliği RAPD-PCR yöntemiyle çalışılmıştır (Moya, 2001).

Türkiyede yetişen ve nikeli yapraklarında biriktirme özelliği nedeniyle ekolojik değeri olan bazı *Alyssum* L.(Brassicaceae) türleri arasındaki tür içi polimorfizm RAPD-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada toplam 42 primer denenmiş bunlardan 5 primer polimorfik bantlar vermiş ve OP118 genetik uzaklığın tanımlanması için seçilmiştir (Babaoğlu, 2004).

Sex kromozomlarının morfolojik ayrımları birçok balıkta belirgin değildir. Nil tilapia balığının (*Oreochromis niloticus*) rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markerleri kullanılarak cinsiyet ayrımı yapılmıştır (Bardakçı, 2000).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak *Cochliomyia hominivorax* türünün altı tanesi güneydoğu Brezilya'dan, bir tanesi kuzey Arjantin'den olmak üzere yedi

popülasyon 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* popülasyonlarında taranan alt bölümlerin RAPD ile açıklanabildiğini göstermiştir (Infante ve ark. 1999).

Entomolojik araştırmalar için birbirinden farklı DNA işaretleyicileri bulunmaktadır. DNA işaretleyicileri çok küçük miktarlarda saklanmış, kuru ya da eski örnekler kullanılarak çalışılabilmektedir. İntra ve inter spesifik ayırımlarda geniş uygulama alanına sahiptir (Loxdale ve Lushai, 1998).

RAPD-PCR önceki çalışmalarda sivrisineklerin (Wilkerson 1995, Ballinger-Crabtree, 1993), çekirgelerin (Chapco, 1992), midyelerin (Raich, 1993) türlerinin tanımlanmasında kullanılmıştır.

Bir Diptera olan *Cochliomyia hominivorax*, henüz erginleşmediği dönemde, *Cochliomyia macelloria*’ya morfolojik olarak benzer. Burada RAPD-PCR’ın kullanımı bu iki tür için gelişen moleküler genetik markır olarak ortaya çıkmaktadır. Yedi adet güvenilir ve tekrar üretilebilen markır; her tür için dört popülasyondaki beşer tane bireyin DNA’larıyla test edilmiştir. Bu yedi primerden elde edilen verilerin analizleri bu türlerin popülasyonları arasında türler arası polimorfizm olduğunu göstermiştir. İstatistik sonuçları iki türü ayırt etmek için RAPD-PCR tekniğinin yeterliliğini % 100 destekler niteliktedir (Skoda ve Foster, 2002).

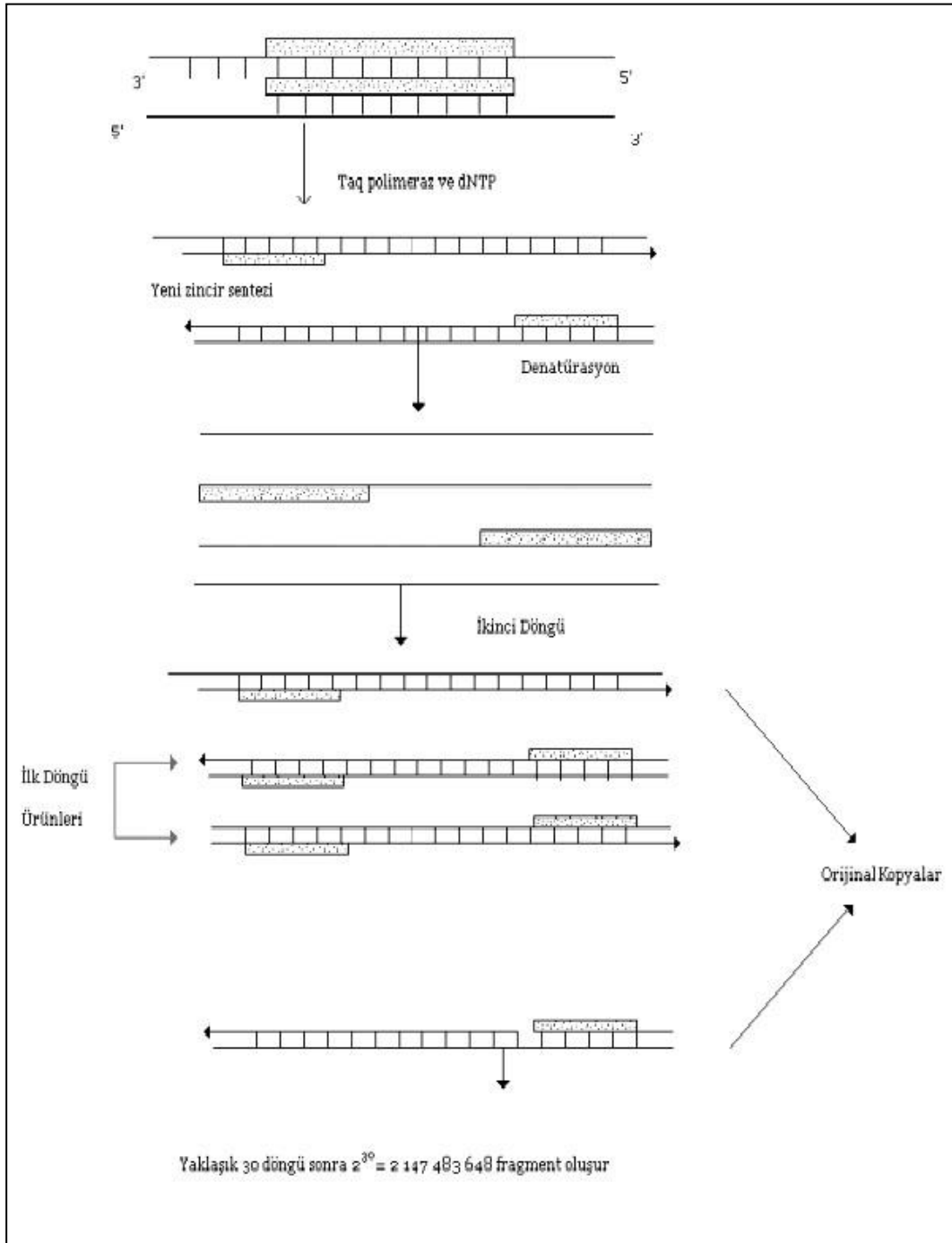
Kolombiya, Venezuela, Hollanda Antilleri, Porto Riko’dan elde edilen ondört *Artemia* örneği ve *Artemia franciscana*, üstün türlere ait olan Amerika’dan alınan referans örnekleri, genetik farklılıklarını göstermek için RAPD tekniğiyle analiz edilmiştir. Kolombiya, Venezuela ve Hollanda Antilleri içerisinde 2 örnek incelenmiş ve 2 farklı grup tesbit edilmiştir (Camargo ve ark.. 2002)

Tuzlu su karidesi olan *Artemia*, biseksüel ve partenogenetik formları olan kolektif olarak aşırı tuzlu bölgelerde yaşayan canlı grubudur. Son zamanlarda, Tibet’te 4490 m yükseklikte bir karbonat gölünde tanımlanan *A. tibetiana*, çapraz üretkenlikleri için eski (*A. salina*, *A. urmiana*, *A. sinica*.) ve yeni dünya türleri (*A. franciscana*) farklılıkları RAPD ve allozim yöntemleri ile karşılaştırılmıştır (Abatzopoulos, 2002).

Enchytraeus variatus ve *Enchytraeus crypticus* (Annelida), laboratuvar şartlarında genellikle çaprazlanamayan iki türdür. Işık mikroskopunda ayırt etmek mümkün değildir 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 kadar değişen 199 DNA parçasının karşılaştırılmasıyla *Enchytraeus crypticus* % 15 *Enchytraeus variatus* % 19 polimorfizm göstermiştir (Schirmacher ve ark., 1998).

“Black ve arkadaşları (1992)” biyokimyasal ve morfolojik genetik polimorfizmlerin nadir olduğu aphidlerde (Homoptera) 4 aphid türü (yeşil böcek, Rus buğday aphidi, arasındaki genetik polimorfizm RAPD-PCR tekniği ile tesbit edilmiştir. Allozim çalışmalarının kıyasla RAPD-PCR tekniğinde türler arasında daha geniş genetik varyasyonlar tesbit edilmiştir.

Sivrisinek populasyonları üzerinde genetik varyasyonları baz alarak ayırt etmek ve tanımlamak için genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin 10 bazlık primerler kullanılarak RAPD-PCR tekniği ile tesbit edilmiştir. 11 farklı coğrafik bölgeden *Aedes aegypti* sivrisinek türlerinden izole edilen genomik DNA lar rastgele dizilime sahip primer kullanılarak çoğaltılmıştır. 3 farklı primer kullanılarak oluşan fragmentlerin analizi sonucunda bireyler arasında ve alttürler arasında % 89 farklılık ortaya konmuştur. RAPD-PCR tekniği artropoda moleküler taksonomisi, coğrafik populasyonların ilişkisi ve vektör hareketi gibi epidemiyolojik çalışmalarda oldukça yararlı sonuçlar ortaya koymaktadır (Ballinger-Crabtree ve ark., 1992).



Şekil 1.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (Susuz, 2002)

1.5.1 RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri

Standard RAPD teknolojisi, PCR tarafından uygun sıcaklıklar altında genomik DNA'nın nanogram miktarlarını çoğaltmak için primer olarak kullanılan rastgele dizilimli kısa sentetik oligonükleotidleri kullanır. Çoğaltılan ürünler genelde agaroz jel üzerinde ayrılır ve ethidium bromid ile boyanır. Kısa primerlerle yapılan PCR amplifikasyonu aynı zamanda daha karmaşık DNA parmak izi profillerini ortaya çıkarmak için de kullanılmıştır. Her ne kadar bu yaklaşımlar, rastlantısal primerlerin uzunlukları, amplifikasyon şartları ve görsel metotlara göre değişiklik gösterse de, hepsi standard PCR dan farklıdır; şöyle ki, gelişmiş güzel sıralanmış sadece bir oligonükleotid kullanılır ve analize tabi tutulan genom ile ilgili hiçbir eski bilgi gerekmez (Bardakçı 2001).

Termal döngü boyunca uygun sıcaklığında, rastgele sıralanmış oligonükleid primerleri, örnek genomik DNA'nın tamamlayıcı dizilerindeki pek çok önemli bölümü birbirine bağlar ve eğer bu bölümler kendi içerlerinde birbirlerinden çoğaltılabilir uzaklıkta iseler, farklı DNA örnekleri ortaya çıkarır. Çoğaltılan DNA profili öncelikle, çoğaltılan her bir ürünün sonunda oligonükleotid primerleri ile örnek DNA arasındaki nükleotid ardışık homolojiye dayanmaktadır. Farklı örnek DNA lar arasındaki nükleotid varyasyonu, önemli bölümlerdeki değişimlerden dolayı bağları varlığı ya da yokluğu ile sonuçlanır. RAPD polimorfizmlerin bir sebebi de, ekleme/silme gibi yeniden yapılan kromozal düzenlemelerdir. Böylelikle, bir heterozigot içerisindeki aynı allellerden elde edilen amplifikasyon ürünleri, uzunluk bakımından değişmektedir ve RAPD profilindeki bağların varlığı ve yokluğu olarak teşhis edilecektir. RAPD profilindeki bağlarının profili, az sertlikteki minisatelit DNA parmak izi şekillerininkine benzemektedir ve bu yüzden de RAPD parmak izi diye adlandırılmaktadır. Ortalama olarak, her primer genomdaki pek çok farklı bölgenin'nin amplifikasyonunu yönlendirmektedir, böylece RAPD şekillerinde allelizm pek fark edilmemektedir. Başka bir deyişle, DNA segmenti heterozigot ya da homozigot olabilen lokus tarafından çoğaltılıp çoğaltılmadığını ayırt etmek mümkün değildir. RAPD markerları bu yüzden daha baskındır (Bardakçı, 2001).

1.5.2 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 sıcaklığı 94 °C'dir (Palumbi, 1996). Bu aşamada çoğaltılmak istenen çift sarmal DNA, sarmalları bir arada 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 (Extension): 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 1.4) 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 tamamlanmasında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılır. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri ethidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. 100 baz çiftinden daha küçük moleküllerin ayırımında agaroz jel elektroforezi yetersiz kaldığı için, bunların ayırımında genellikle poliakrilamid jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel

hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktördür (Çizelge1,1) (Maniatis ve ark. 1989).

1.5.3 PCR Optimizasyonu

Enzim Konsantrasyonu

Diğer parametreler optimum iken her 100µL reaksiyonda Taq DNA polimeraz için tavsiye edilen konsantrasyon oranı 1-2.5 ünite(SA=20ünite/pmol) arasındadır. Ancak enzim gereksinimi kalıp veya primere bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir. Bir PCR optimizasyonunda, enzim konsantrasyonlarının 0.5-5 ünite/100µL olarak ayarlanmalı ve jel elektroforezi ile sonuçlar teyit edilmelidir. Enzim konsantrasyonu çok yüksek olursa non spesifik ürünler birikebilir ve çok düşük enzim konsantrasyonunda ise istenilen ürün yetersiz miktarda ortaya çıkabilir (Innis ve Gelfald, 1990).

Deoksinükleotid Trifosfatlar

Stok dNTP solüsyonları pH:7'ye nötralize edilmiş olmalı ve konsantrasyonları spektrofotometrik olarak belirlenmelidir. Primer stoklar 10mM'a dilüye edilmeli ve -20°C'de saklanmalıdır. Önerilen stok çalışma solüsyonunun içeriği her bir dNTP için 1mM dır. PCR'ın tekrar eden döngüleri sırasında dNTP'lerin stabiliteleleri 50 döngü sonrasında, yaklaşık olarak %50 oranında kalır.

Ürün, spesifite ve verimlilik arasındaki optimum dengede herbir sonuç için deoksinükleotid konsantrasyonları 20-200µM arasında olmalıdır. Reaksiyon sırasındaki yanlış eşleşmeleri en aza indirmek için dNTP'ler eşit konsantrasyonlarda eklenmelidir. Düşük dNTP konsantrasyonları hedef olmayan bölgelerde yanlış primer seçimini minimuma indirir ve nükleotitlerin yanlış eşleşme ihtimalini azaltır. Hedef sekansın uzunluğu ve kompozisyonu için uygun olan düşük dNTP konsantrasyonuna karar verilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Magnezyum Konsantrasyonu

Magnezyum iyon konsantrasyonunun optimize edilmesi yararlıdır. Magnezyum konsantrasyonu şunları etkileyebilir: primer bağlanması, ürün spesifitesi, primer-dimer oluşumu, enzim aktivitesi ve verimliliği. Taq DNA polimeraz serbest magnezyumun kalıp DNA primerler ve dNTPlere bağlanması için gereklidir. PCR reaksiyonunda magnezyum miktarı toplam dNTP derişiminin 0.5-2.5 mM üzerinde olmalıdır. Primer stoklarda ya da kalıp DNA'daki, EDTA ve diğer bileşenler magnezyum konsantrasyonunu bozabilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Diğer Reaksiyon Bileşenleri

PCR için önerilen tampon miktarı 20°C'de 10-50mM Tris-HCl olmalıdır (pH: 8.3-8.8). Primerin kalıp DNA ipliğine bağlanmasını kolaylaştırmak için reaksiyon karışımı 50mM'a kadar KCl içerebilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerlerin DNA İpliğine Bağlanması

Primerlerin bağlanması için gerekli olan süre ve sıcaklık, primerlerin baz kompozisyonuna, uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlıdır. Primerlerin uygun bağlanma sıcaklığı erime sıcaklığının (T_m) 5 °C altındadır (Innis ve Gelfand, 1990). Genellikle 55-72 °C aralığında bağlanma en iyi sonucu verir. Standart primer konsantrasyonunda (0.2µM) bağlanma sadece birkaç saniye alır. Bağlanma sıcaklığının artması yanlış bağlanmış primerlere karşı ayırımı artırır ve yanlış nükleotitlerin uzamasını azaltır. İlk birkaç döngüdeki spesifik bağlanma sıcaklığı reaksiyonun spesifitesini artırır. PCR da uzun primerler kullanmak ve uzama, bağlanma için 55 °C'den 75 °C'ye iki sıcaklık kullanmak denaturasyon için 94 °C'den 97 °C'ye bir sıcaklık seçmek en iyi sonuçları verir (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerin Uzaması

Primerlerin uzaması hedef dizinin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve sıcaklığa bağlıdır. Primer uzama sıcaklığı genellikle 72°C'dir. 72°C'de bir dakikalık uzama zamanı 2kb uzunluğuna kadar olan ürünler için yeterli olduğu düşünülür. Ancak daha uzun uzama süreleri erken döngülerde substrat konsantrasyonu çok düşük olduğunda, geç döngülerde ise ürün konsantrasyonu enzim konsantrasyonunu aştığında (yaklaşık olarak 1nM) yardımcı olabilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Denaturasyon Zamanı ve Sıcaklık

PCR'in yersizliğindeki en büyük olasıklıklı neden kalıp DNA ya da PCR ürününün eksik denatürasyonudur. Tipik denaturasyon koşulları 30 saniye için 95 °C ya da 15 saniye için 97 °C'dir, ancak yüksek sıcaklıklar özellikle G+C konsantrasyonu fazla hedefler için uygun olabilir. DNA zincirinin ayrılma sıcaklığındaki denaturasyonu sadece birkaç saniyeyi alır (Innis ve Gelfand, 1990).

Devir Sayısı

Optimum devir sayısı diğer parametreler optimize edildiğinde temel olarak hedef DNA'nın başlangıç konsantrasyonuna bağlı olacaktır. Gereğinden fazla döngü kurmak arka planda istenmeyen yan ürünlerin oluşmasını arttırabilir. Düşük döngülerde çalışmak da yetersiz ürün oluşmasına sebep olur. Yüksek primer konsantrasyonları yanlış primer bağlanmasını ve istenmeyen ürünlerin oluşumunu arttırabilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerler

0.1ve 0.5µM arasındaki primer konsantrasyonları genellikle optimumdur. Yüksek primer konsantrasyonları yanlış primer seçimlerine, spesifik olmayan ürün oluşumuna, kalıp DNA'dan bağımsız primer dimer oluşumuna sebep olur.

Spesifik olmayan ürünler ve primer-dimer oluşumları enzim, dNTP, primer gibi PCR bileşenleri ile yarışan düşük oranda ürün elde edilmesine neden olan substratlardır(Innis ve Gelfand, 1990).

Çizelge 1.1 Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki (Susuz, 2002)

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (Baz Çifti) (bp)
0,3	5000-60000
0,6	1000-20000
0,7	800-10000
0,8	500-7000
1,2	400-6000
1,5	200-3000
2	100-2000

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Tabanidae Türleri

Araştırmada materyal olarak kullanılan Tabanidae örnekleri Haziran 2007 de arazi çalışması yapılarak toplandı. Kurutularak muhafaza edildi.

Filum : Arthropoda (V. Siebold Stannuis, 1845)

Altfilum : Antennata (Linne, 1758)

Klasis : Insecta (Brauer, 1885)

Altklasis : Pterygota (Long, 1889)

Ordo : Diptera (Linne, 1758)

Altordo : Bracyhcera (Mcquart, 1894)

Familya : Tabanidae (Leach, 1819)

Altfamilya : Tabaninae

Tür : *Tabanus autumnalis* Linne,1761

Tür : *Tabanus unifasciatus* Loew, 1858

Çalışma süresince DNA izolasyonu ve PCR ile çoğaltılan türlerin tayini, toplandıkları yerler ve yakalanma tarihleri Çizelge 2.1. de verilmiştir. Toplanan türler arasında ergin bireylerin sistematik teşhisleri Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ tarafından yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Kullanılan Tabanidae türleri, toplandıkları yerler ve toplanma tarihleri

Türler	Toplandıkları yerler Ve Tarih	Çalışılan örnek sayısı
<i>Tabanus autumnalis</i> Linne,1761	Temmuz 2007 Mrk. Yarımca Köyü	12 ergin
<i>Tabanus unifasciatus</i> Loew, 1858	Temmuz 2007 Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi	12 ergin

2.1.2. Tampon ve Çözeltiler

2.1.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler Hekzadesiltrimetilamonyum Bromid (Fluka), Sodyum Hidroksit (Sigma), Tris-HCL (Sigma), NaCl (Merk), Etanol (Fluka), İzopropanol (Fluka), Fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) (Sigma), Proteinaz K (Fermentas), Sarkosil (Sigma), EDTA (Sigma), Sodyum Hidroksit (Sigma), Sodyum asetat (Sigma)'dır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda 25 nM 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 bromür (Sigma)'dür.

2.1.2.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- Stok Tris Çözeltisi: 500 mM Tris pH: 8.0'e HCl ile ayarlandı.
- Stok EDTA Çözeltisi: 500M EDTA (Etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH (Sodyum Hidroksit) çözeltisi ile pH: 8.0'e ayarlandı.
- %20'lik sarkosil çözeltisi hazırlandı.
- TE Tamponu: 10 mM Tris (pH: 8.09, 1 mM EDTA (pH: 8.0) stok çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

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

- Nükleotid Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- MgCl₂ : 25mM
- 10 X Taq Polimeraz Tamponu: 100 mM 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 2.2 Çalışmada kullanılan oligonükleotit primerleri ve %G+C oranları

Primerin Adı	Primerlerin Dizisi (5'.....3')	% G+C İçeriği
A01	CAGGCCCTTC	70
A02	TGCCGAGCTG	70
A03	AGTCAGCCAC	60
A07	GAAACGGGTG	60
B01	GTTTCGCTCC	60
B03	CATCCCCCTG	70
B05	TGCGCCCTTC	70
B07	GGTGACGCAG	70
B10	CTGCTGGGAC	70
B11	GTAGACCCGT	60
B13	TTCCCCGCT	70
B16	TTTGCCCGGA	60
C16	CACACTCCAG	60
C19	GTTGCCAGCC	70
D01	ACCGCGAAGG	70
D03	GTCGCCGTCA	70
K03	CCAGCTTAGG	60
K13	GGTTGTACCC	60
R08	CCCGTTGCCT	70
T17	CCAACGTCGT	60

2.1.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

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

2.1.3 Sterilizasyon

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

2.2. Yöntem

2.2.1. Toplanan Tabanidae Örneklerinin Tür Tayini

Eskişehir Merkez. Yarımca Köyü ve Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi bölgelerinden toplanan, kurutularak muhafaza edilen Tabanid örneklerinin tür tayini Prof. Dr. Yavuz KILIÇ ve Uzm. Ferhat ALTUNSOY tarafından yapıldı.

2.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu

Tabanidae türlerine ait örneklerden genomik DNA izolasyonu için örnekler distile su ile yıkandı steril 1.5 ml'lik ependorflara yerleştirildi her bir örneğin üzerine 200µL distile su, 50 µL 0.5M EDTA, 10 µL %20'lik sarkozil, 5 µL proteinaz K solüsyonu (20mg/mL), 10 µL 1M Tris-HCl(pH:8), 5 µL 5M NaCl ilav edilip steril kürdan yardımıyla ezildi. İyice homojen bir karışım elde edildi.

Karışım daha sonra 65°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda eşit hacimde fenol-kloroform-izoamilalkol(25:24:1) ilave edildi ve 5 dakika dairesel çalkalayıcıya kondu. Hücresel yapıların çökmesi için 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki sulu tabaka alındı (ortadaki beyaz tabakaya değmeden) ve yeni bir santrifüj tüpüne kondu. 100 µL su ilave edilip 12000 rpm de tekrar santrifüj edildi. Üstteki sulu tabaka alınıp yeni tüpün üzerine ilave edildi. Yeni santrifüj tüpüne aktardığımız sulu tabaka üzerine 0.1 hacimde 3M sodyum asetat eklendi ve yavaşça çalkalandı. Karışımın üzerine 2 hacim absolu etanol eklendi yavaşça karıştırıldı ve -20 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 13000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp, pelet 200µL suda resüspanse edilerek üzerine 0.1 hacimde 0.3 M sodyum asetat eklendi ve 440 µL absolu etanol ilave edilerek yavaşça çalkalandı. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice döküldü. Pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. DNA kuruduktan sonra DNA miktarına bağlı olarak 50-100 µL TE tampon eklendi. -20 °C’de muafaza edildi.

2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Tayini

UV absorbans spektrofotometresi ile 260 nm’de ölçüm yapıldı. Buna göre; $A_{260}=1$ olduğunda DNA miktarı 50µg/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 reaksiyonunu 0.5mL propilen tüplerde 50 μ L'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)	
72 °C'de	5 dakika	

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 ve ark., 1989). Yatay konumda elektroforez kullanıldı. %2 agaroz, TAE tamponunda kaynatılarak çözüldükten sonra 1 μ L Ethidyum bromür eklendi. Hazırlanan agaroz biraz soğuduktan sonra, uygun tarak seçildi ve plak, TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir PCR örneğinden 10 μ L, yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.

PCR ürünleri 40-90 V arasında serbest akımda yürütüldü. Jeller UV translüminatör üzerinde görüntülendi. Jellerin fotoğrafları Vilber Lourmat jel görüntüleme sisteminde çekildi.

2.2.6. Genetik Uzaklık Tayini

Her bir *Tabanidae* 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.

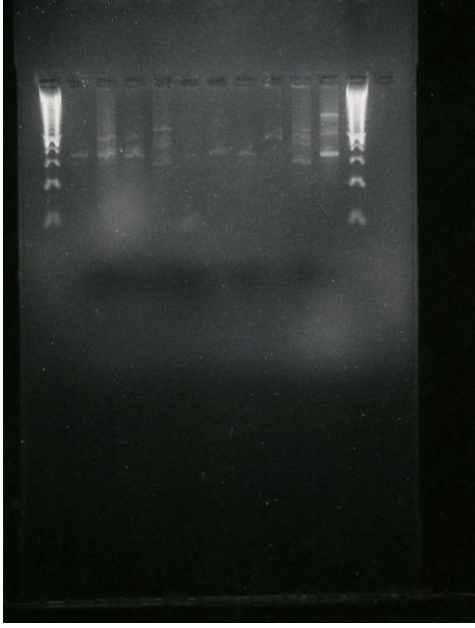
Her bir primer için elde edilen bu tablolar, Phylip 3.5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik uzaklık Dendogram programında değerlendirilerek, çalışılan Tabanus türlerinin arasındaki genetik yakınlıklar ortaya konulmuştur.

3.BULGULAR

Tabanus autumnalis, *Tabanus unifasciatus* örneklerinden toplam 24 genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra RAPD-PCR tekniği ile çizelge 2.2’de belirtilen primerlerle DNA amplifikasyonu yapılmıştır.

Tabanid örneklerinin B7, A2, A7, primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri % 2’lik agaroz jel elektroforezinde 90 V’da 30 yürütülerek UV translüminatörde incelendi ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6.). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Her bir primer için elde edilen değerler, Phylip 3.5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programıyla değerlendirilerek dendogramları elde edildi. Oluşan dendogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3’te gözlenen *Tabanus autumnalis* (Merkez. Yarımca Köyü) örneklerinin B07, A02 ve A07 primerleriyle amplifikasyon sonuçları, genetik uzaklık programıyla değerlendirilerek, çalışılan *Tabanus autumnalis*, *Tabanus unifasciatus* türlerinin uzaklıkları (Çizelge 3.1) belirlenmiştir. Buna göre Merkez Yarımca Köyünden toplanan *Tabanus autumnalis* türünün Eskişehir Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi’den toplanan *Tabanus autumnalis* türüne genetik uzaklığı 0.7419 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.1 Mrk. Yarımcı Köyünden toplanan bazı *Tabanus autumnalis* bireyelerine ait, Primer B07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1: DNA ladder plus

Hat 2: *Tabanus autumnalis*

Hat 3: *Tabanus autumnalis*

Hat 4: *Tabanus autumnalis*

Hat 5: *Tabanus autumnalis*

Hat 6: *Tabanus autumnalis*

Hat 7: *Tabanus autumnalis*

Hat 8: *Tabanus autumnalis*

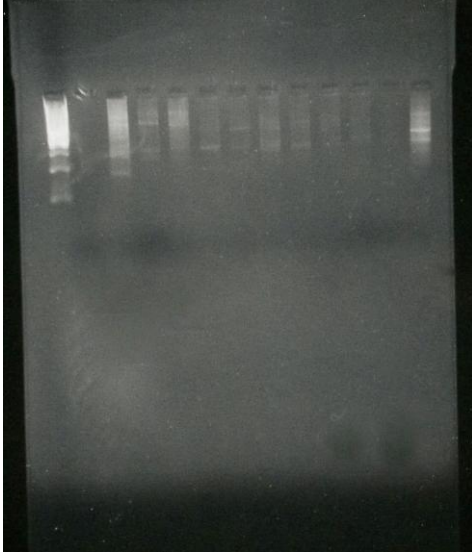
Hat 8: *Tabanus autumnalis*

Hat 9: *Tabanus autumnalis*

Hat 10: *Tabanus autumnalis*

Hat 11: *Tabanus autumnalis*

Hat 12: DNA ladder plus



Şekil 3.2 Mrk. Yarımca Köyünden toplanan bazı *Tabanus autumnalis* bireylerine ait, Primer A02 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1: DNA ladder plus

Hat 2: *Tabanus autumnalis*, Mrk. Yarımca Köyü

Hat 3: *Tabanus autumnalis*

Hat 4: *Tabanus autumnalis*

Hat 5: *Tabanus autumnalis*

Hat 6: *Tabanus autumnalis*

Hat 7: *Tabanus autumnalis*

Hat 8: *Tabanus autumnalis*

Hat 8: *Tabanus autumnalis*

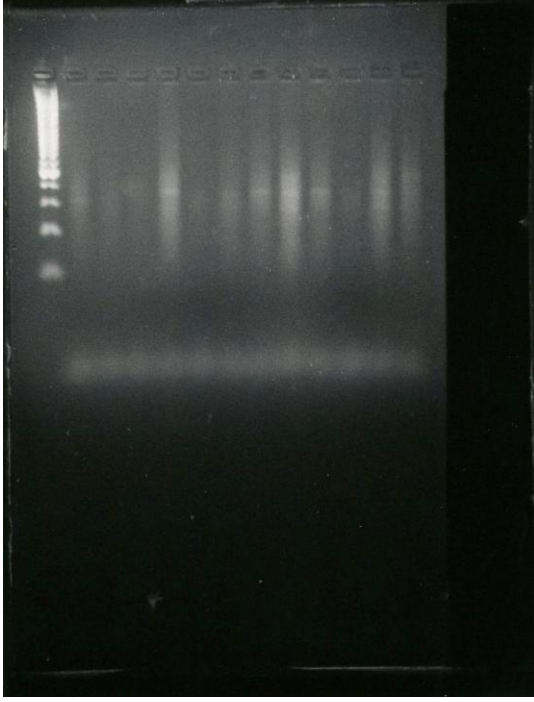
Hat 9: *Tabanus autumnalis*

Hat 10: *Tabanus autumnalis*

Hat 11: *Tabanus autumnalis*

Hat 12: *Tabanus autumnalis*

Hat 13: *Tabanus autumnalis*



Şekil 3.3 Mrk. Yarımcı Köyünden toplanan bazı *Tabanus autumnalis* bireylerine ait, Primer A07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1: DNA ladder plus

Hat 2: *Tabanus autumnalis*

Hat 3: *Tabanus autumnalis*

Hat 4: *Tabanus autumnalis*

Hat 5: *Tabanus autumnalis*

Hat 6: *Tabanus autumnalis*

Hat 7: *Tabanus autumnalis*

Hat 8: *Tabanus autumnalis*

Hat 8: *Tabanus autumnalis*

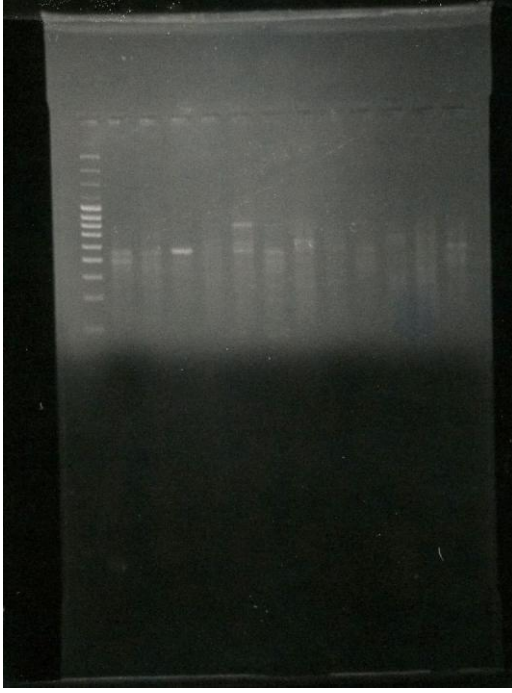
Hat 9: *Tabanus autumnalis*

Hat 10: *Tabanus autumnalis*

Hat 11: *Tabanus autumnalis*

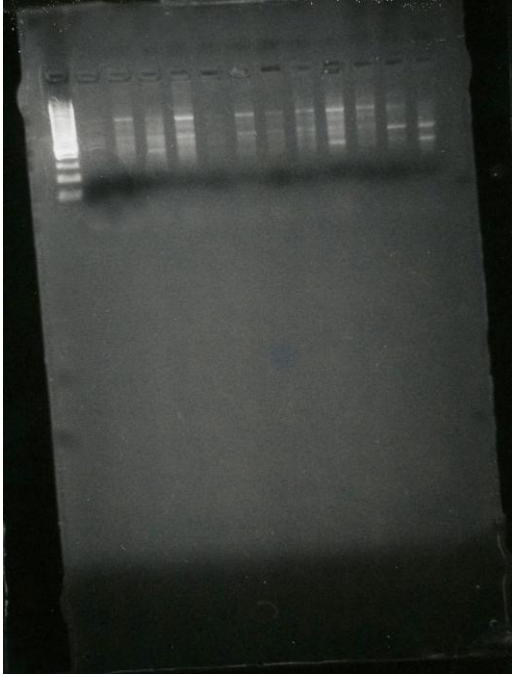
Hat 12: *Tabanus autumnalis*

Hat 13: *Tabanus autumnalis*



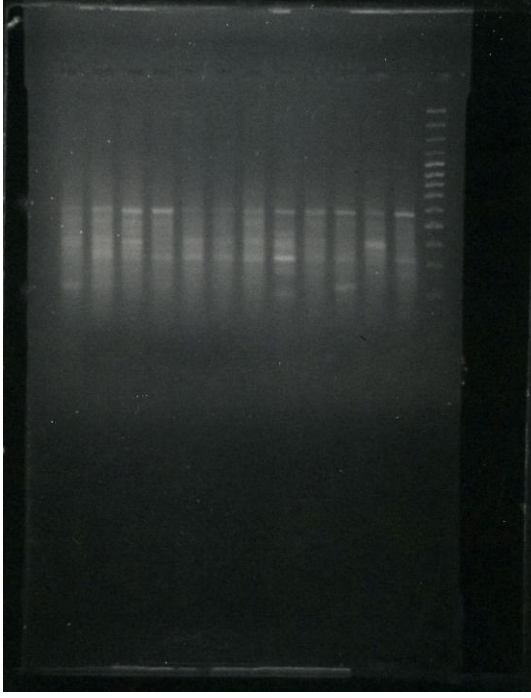
Şekil 3.4 Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı *Tabanus unifasciatus* bireylerine ait, Primer B07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

- Hat 1: DNA ladder plus**
Hat 2: *Tabanus unifasciatus*
Hat 3: *Tabanus unifasciatus*
Hat 4: *Tabanus unifasciatus*
Hat 5: *Tabanus unifasciatus*
Hat 6: *Tabanus unifasciatus*
Hat 7: *Tabanus unifasciatus*
Hat 8: *Tabanus unifasciatus*
Hat 8: *Tabanus unifasciatus*
Hat 9: *Tabanus unifasciatus*
Hat 10: *Tabanus unifasciatus*
Hat 11: *Tabanus unifasciatus*
Hat 12: *Tabanus unifasciatus*
Hat 13: *Tabanus unifasciatus*



Şekil 3.5 Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı *Tabanus unifasciatus* bireylerine ait, Primer A02 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

- Hat 1: DNA ladder plus**
Hat 2: *Tabanus unifasciatus*
Hat 3: *Tabanus unifasciatus*
Hat 4: *Tabanus unifasciatus*
Hat 5: *Tabanus unifasciatus*
Hat 6: *Tabanus unifasciatus*
Hat 7: *Tabanus unifasciatus*
Hat 8: *Tabanus unifasciatus*
Hat 8: *Tabanus unifasciatus*
Hat 9: *Tabanus unifasciatus*
Hat 10: *Tabanus unifasciatus*
Hat 11: *Tabanus unifasciatus*
Hat 12: *Tabanus unifasciatus*
Hat 13: *Tabanus unifasciatus*



Şekil 3.6 Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan bazı *Tabanus unifasciatus* bireyelerine ait, Primer A07 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

Hat 1: *Tabanus unifasciatus*

Hat 2: *Tabanus unifasciatus*

Hat 3: *Tabanus unifasciatus*

Hat 4: *Tabanus unifasciatus*

Hat 5: *Tabanus unifasciatus*

Hat 6: *Tabanus unifasciatus*

Hat 7: *Tabanus unifasciatus*

Hat 8: *Tabanus unifasciatus*

Hat 8: *Tabanus unifasciatus*

Hat 9: *Tabanus unifasciatus*

Hat 10: *Tabanus unifasciatus*

Hat 11: *Tabanus unifasciatus*

Hat 12: *Tabanus unifasciatus*

Hat 13: DNA ladder plus

Çizelge3.1 *Tabanus autumnalis*, *Tabanus unifasciatus* türlerinin genetik uzaklığı (Diagonalin altında kalan kısım genetik uzaklık, üstünde kalan kısım genetik benzerliği temsil etmektedir.)

	<i>Tabanus autumnalis</i>	<i>Tabanus unifasciatus</i>
<i>T.a.</i>	****	0.4762
<i>T.u.</i>	0.7419	****

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Tabanus autumnalis*, *Tabanus unifasciatus* türlerinin genetik çeşitliliği RAPD-PCR moleküler markır tekniği kullanılarak araştırıldı. Elde edilen sonuçlar aynı cinse ait iki türün önemli oranda genetik çeşitliliğinin bulunduğunu gösterdi.

Birçok canlı türünün sınıflandırılması morfolojik özellikleri vasıtasıyla yapılmaktadır. Evrimsel süreç boyunca canlıların yaşam ortamlarındaki değişiklikler canlıların morfolojik özelliklerinde değişimlere neden olmaktadır. Morfolojik sınıflandırmanın moleküler analizler ile desteklenmesi oldukça önemlidir (Spakulova ve ark. 2002, Türkoğlu ve Koca 2002, De Prins ve ark. 2002, Spakulova ve ark. 2000).

AFLP, RFLP, RAPD-PCR gibi moleküler markır teknikleri kullanılarak genetik uzaklığın tahmini ve genetik çeşitliliğin araştırılması kısa sürede verimli ve güvenilir sonuçlar üretmesi sağlaması bakımından oldukça uygun oldukları için sıklıkla kullanılmaktadır (Winfield ve ark., 1998 ve Jones ve ark., 1997).

RAPD markırlar, popülasyon genetiği çalışmaları, genetik haritalama, bitki ve hayvan yetiştiriciliği, tarımda tohum saflığının belirlenmesi, DNA parmak izi çalışmaları, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, analık babalık tayini, kromozoma özgü DNA fragmentlerinin tanımlanması, genom haritalama, sistematik ve evölüsyon çalışmalarında canlı türlerinin tanısı ve türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi gibi birçok alanda oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir (Williams ve ark. 1990).

32 ordo içinde yaklaşık olarak 1.200.000 türe sahip olan insecta sınıfı en geniş canlı gurubunu oluşturmaktadır. Diptera ordosu insecta sınıfa dahil en geniş ordolardan birisidir. Sinekler ekolojik dengenin sürekliliğinin sağlanması açısından oldukça önemli bir gurubu oluşturmanın yanında insan sağlığı, veterinerlik, adli tıp, tarım ve ekonomi gibi çok çeşitli alanlarda da yaşamsal öneme sahiptir. Tabanidae türleri evcil ve yabanıl hayvanlar da hastalıklara neden olan birçok virüs, bakteri, protozoon ve helmintlerin başlıca mekanik vektörlerini oluşturmaktadırlar. Aynı zamanda sıcakkanlı hayvanlardan kan emmeleri sırasında verdikleri rahatsızlık sonucu et ve süt veriminde ekonomik kayıplara neden olan canlı grubudur.

Birçok böcek türünün sınıflandırılması morfolojik özellikleri vasıtasıyla yapılmaktadır. Ancak değişen çevre ve iklim koşulları morfolojik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır. Sistematik çalışmalarda morfolojik çalışmalar moleküler verilerle desteklenmesim oldukça önemlidir. Böcek türleri için doğru tanımlama, sınıflandırma yapmak daha ileri düzeyde biyolojileri, ekolojileri, epidemiyolojileri, davranışları ve kontrolü hakkında bilgi sahibi olmak için oldukça önemlidir (Spakulova ve ark. 2000, Türkoğlu ve Koca 2002, De Prins ve ark. 2002, Spakulova ve ark. 2002). Diptera ordosunun kapsamlı bir şekilde sınıflandırılmasında gün geçtikçe yaygın bir şekilde yapılmaktadır (Blackman ve ark. 2003, Boyes ve Wilkes 1972, Aswathanarayana ve ark. 1996, Coutsis ve ark. 1999, Soldan ve Putz 2000, De Prins ve ark. 2002, De Prins ve ark 2003) Bu çalışmada hemen hemen tamamı zararlı olan *Tabanus* cinsine ait iki türün genetik farklılıkları araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, farklı *Tabanus* türlerinde yapılacak genetik uzaklık tayini ile türlerin teşhisleri yapılabilir ve akrabalık ilişkileri saptanabilir. Bu çalışmada uygulanan yöntem ek olarak farklı moleküler markırlar teknikler kullanılarak Diptera ordosuna ait diğer familyalarda da polimorfizmleri ya da genetik uzaklıkları saptanabilir.

Merkez Yarımca Köyünden toplanan *Tabanus autumnalis*, Esk- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi toplanan *Tabanus unifasciatus* türüne olan uzaklığı 0.7419 olarak saptanmıştır.

Sex kromozomlarının morfolojik ayrımları birçok balıkta belirgin olmadığı için Nil tilapia balığının (*Oreochromis niloticus*) rastgele çoğaltılmış polimorfik (RAPD) DNA markerleri kullanılarak cinsiyet ayırımı yapılmıştır (Bardakçı, 2000).

P12 ve P17 primerleri kullanılarak *Pieris brassica* ve *P.indica* (Family:Pieridae) isimli iki kelebek türü arasındaki genetik benzerlikler ve farklılıklar RAPD-PCR işaretleyicileri kullanılarak ortaya konulmuştur. Her iki primerde de bantlar oluşmasına rağmen, *P.indica* bireylerinin P12 primeri ile amplifikasyonu başarısız olurken P17 de aynı tüe için az sayıda bant oluşmuştur. Her iki primer de iki farklı tip bant profili ortaya çıkardılar. Tip I bantları her iki cinsiyet tarafından paylaşılırken, Tip II bantları cinsiyete özgü sonuçlar verdi.

Bazı Batı Anadolu *Gammarus* popülasyonları arasındaki polimorfizm RAPD-PCR tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Bu popülasyonlar arasında tür içi ve türler arası genetik farklılıklar tesbit edilmiştir. *Gammarus arduus* örnekleri arasında genetik uzaklık 0'dır, tür içi polimorfizm bulunmamaktadır (Susuz F., 2002).

Bu çalışmada *Tabanus autumnalis*, *Tabanus unifasciatus* türleri arasındaki genetik uzaklıklar tespit edilmiştir. Çalışmanın devamı olarak farklı *Tabanus* türleri ile çalışmaya devam edilerek *Tabanus*'un Eskişehir profili ortaya konulabilir.

Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3, Merkez Yarımca Köyünden toplanan *Tabanus autumnalis* türünün A07, A02 ve B07 primerleriyle amplifikasyon sonuçlarıdır. Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6 da Eskişehir- Sarıcakaya yolu Şöförlerçeşmesi bölgesinden toplanan *Tabanus unifasciatus* türünün A07, A02 ve B07 primerleriyle amplifikasyon sonuçları bulunmaktadır. Her iki türün amplifikasyon sonuçları genetik uzaklık programıyla değerlendirilerek, çalışılan iki *Tabanus* türünün genetik uzaklıkları (Çizelge 3.1) elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Bossier, P., Sorgeloos, P. ve Beardmore, J.A. (2002), *Genetic charecterization of Artemia tibetiana (Crustacea: Anostraca)*, Biological Journal of the Linnean Society, **75**, 333-344.
- Akhan, S. ve Canyurt, S.A. (2005), *Üç farklı kuluçhanedeki damızlık gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972) stokları arasında genetik çeşitliliğin RAPD-PCR yöntemiyle belirlenmesi üzerine bir araştırma*, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.
- Arı, Ş., ve Arda, N. (2008), "DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması", *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* (Ed: Temizkan, G.), Nobel Kitabevi, 116-117.
- Aswathanarayana, N.V. ve Aswalt, S.K. (1996), *Karyology of five species of tettigonids (Orthoptera: Tettigoniidae)*, Cytobios, **86**, 167-176.
- Babaoğlu, S., Açıık, L., Çelebi, A. ve Adıgüzel N. (2004), *Molecular Analysis of Turkish Alyssum L. (Brassicaceae) Species by RAPD-PCR and SDS-PAGE methods*, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi **17(3)**, 25-33.
- Ballinger-Crabtree, M.E., Black, W.C., ve Miller B.R. (1992), *Use of Genetic Polymorphisms Detected by the Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for Differentiation and Identification of Aedes aegypti Subspecies and Populations*, The American Society of Tropical Medicine and Hygie, **47(6)**, 893-901.
- Bardakçı, F. (2000), *The use of random amplified polimorfik DNA(RAPD) markers in sex discrimination in Nile Tilapia, Oreochromis niloticus (Pisces:Cichlidae)*, Turk J. Biol., **24**, 169-175.

- Bardakçı, F. (2001), *Random amplified polimorphic DNA(RAPD) markers*, Turk. J. Biol., 185-196.
- Barros, A.T.M. (2001), *Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil*, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, **96(7)**, 917-923.
- Barros, A.T.M. ve Foil, L.D. (2007), *The influence of distance on movement of tabanids (Diptera:Tabanidae) between horses*, Veterinary Parasitology, **144**, 380-384.
- Barros, A.T.M. (1996), *Seasonality of Phaetotabanus fervens (Diptera:Tabanidae) in the Pantanal region, Brazil*, Mem Inst Oswaldo Cruz, **91**, 159.
- Black, W.C., Du Teau N.M., Puterka G.J., Nechols J.R. ve Pettorini J.M. (1992), *Use of the random amplified polimorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polimorphism in aphids (Homoptera:Aphidae)*, Bulletin of Entomological Research, **82**, 151-159.
- Blackman, R.L., Brown, P.A., Ramirez, C.C. ve Niemeyer, H.M. (2003), *Karyotype variation in the South American apid genus Neuquenaphis (Hemiptera, Aphididae, Neuquenaphidinae)*, Hereditas, **138**, 6-10.
- Boyes, J.W. ve Wilkes, A. (1972), *Chromosomes of Tabanidae*, Can J Genet Cytol. **14(1)**, 95-104.
- Camargo, W.N., Bossier, P., Sorgeloos, P., ve Sun Y. (2002), *Preliminary genetic data on some Caribbean Artemia franciscana strains based on RAPD's*, Hydrobiologia, **468**, 245-249.

- Chapco, W., Ashton, N.W., Martel, R.K.B. ve Antonishyn, N. (1992), *A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers*, *Genome*, **35**, 569-574.
- Chvala, M. ve Jezek, J. (1997), *Aquatic insects of North Europe-a Taxonomic Handbook*, Ed. Anders N. Nilsson, 2.
- Chvala, M., Lyneborg, L. ve Moucha J. (1972), *The horseflies of Europe (Diptera: Tabanidae)*, Ent. Soc. Copenhagen, E. W. Classey Ltd. Hampton.
- Coutsis, J.G., Puplesiene, J. ve De Prins, W. (1999), *The chromosome number and karyotype of Polyommatus (Agrodiaetus) ripartii and Polyommatus (Agrodiaetus) aroaniensis from Greece (Lepidoptera: Lycaenidae)*, *Vlaamse Vereniging Voor Entomologie*, **27**, 81-84.
- Demirsoy, A. (2003), *Yaşamın temel kuralları. Entomoloji Cilt II – Kısım II* Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye 747-793.
- De Prins, J., De Prins, W. ve Dall'Asta U. (2002), *The karyotype of Cameraria ohridella (Lepidoptera: Gracillariidae)*, *Vlaamse Vereniging Voor Entomologie*, **30**, 5-10.
- De Prins, J., De Prins, W. ve De Coninck, E. (2003), *The pupal morphology of Cameraria ohridella compared with that of the genus Phyllonorycter (Lepidoptera: Gracillariidae)*, *J. Pest Science*, **76**, 145-150.
- Ferreira, R.L.M., Henriques, A.L. ve Rafael, J.A. (2002), *Activity of Tabanids (Insecta: Diptera: Tabanidae) Attacking the Reptiles Caiman crocodilus (Linn.) (Alligatoridae) and Eunectes murinus (Linn.) (Boidae), in the Central Amazon, Brazil*, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. **97**(1), 133-136.

Gary, M. ve Lance, D. (2002), *Medical Entomology* Academic Press, Kanada.

Gülbitti Onarıcı, S. ve Sümer, S. (2003), *Protein and DNA in systematic biology*, Turk J. Biol., **27**, 47-55.

Henriques, A.L., Ferreira, R.L.M., Vidal, J.F. ve Rafael, J.A. (2000), *Betrequia ocellata* Oldroyd (Diptera, Tabanidae, Rhinomyzini) blood feeding on *Caiman crocodilus* (Linnaeus) (Crocodylia, Alligatoridae) in Manaus, Brazil, Revta Bras Zool., **17**, 609-613.

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

http-1 : http://creatures.ifas.ufl.edu/livestock/deer_fly.html

http-3 : <http://dermatology.cdlib.org/DOJvol5num2/centerfold/tabaniids.html>

Infante, M.E., Yotokokis, C. ve Lima de Azerado Espin, A.M. (1999), *Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and nouthern Argentina*, Genome, **42** (4), 772-779.

Innis, M.A. ve Gelfald, D.H. (1990), *PCR protocols: A guide to methods and application*, Academic Pres, San Diego, USA.

Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F. (1997), *Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories*, Mol. Breed., **3**, 381–390.

- Kılıç, A.Y. (1994), *Eskişehir Çevresi Tabanidae (Diptera) Türlerinin Günlük Aktiviteleri Üzerine Bir Çalışma*, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Edirne.
- Krcmar, S. (2005), *Seasonal Abundance of Horse Flies (Diptera: Tabanidae) from two Locations in Eastern Croatia*, Journal of Vector Ecology, **30(2)**, 316-321.
- Lehane, M.J. (2005), *The Biology of Blood-Sucking in Insects*, Cambridge University Press, Cambridge, 237-240.
- Loxdale, H.D. ve Lushai G. (1998), *Molecular Markers in Entomology*, Bulletin of Entomological Research, **88**, 577-600.
- Maniatis, T., Sambrook, J. ve Fritchi, F.F. (1989), *In molecular cloning a laboratory manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour.
- Medem, F. (1981), *Tabanids (Diptera:Tabanidae) as ectoparasites on caimans (Crocodylia: Alligatoridae) in eastern Colombia*, Cespedesia, **10**, 123-191.
- Meghen, C., Machugh, D.E. and Bradley, D.G. 2002. *Genetic characterization and West African cattle*.
<http://www.fao.org/docrep/t1300t/genetic%20characterization.html>
- Moya, A., Guirao, P., Cifuentes, D., Beitia, F. ve Cenis, J.L. (2001), *Genetic diversity of Iberian populations of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction*, Molecular Ecology, **10**, 891-897.
- Olyrod, H. (1954), *The Tabanids (Diptera:Tabanidae) of the Ethiopian Region*, Vol. II, Tabanus and Related Genera, British Museum (Natural History), London, 341.

- Palumbi, S.R. (1996), *The polymerase chain reaction in molecular systematics*, Nucleic Acids II, Second II, Sunderland USA.
- Perich, M.J., Wright, R.E. ve Lusby, K.S. (1986), *Impact of horse-flies (Diptera: Tabanidae) on beef cattle*, J. Eco. Ent., **79**, 128-131.
- Philip, C.B. (1986), *A collection of four species of Tabanidae flies taken from anaconda snake in Peru in May 1984*. Pan Pac Entomology, **63**, 23.
- Philip, C.B. (1983), *A unique, divergent developmental dependence of a Galapagos tabanid (Diptera:Tabanidae)*, Wasmann J Biology,**41**, 47-49.
- Raich, T.J., Archer, J.L., Robertson, M.A., Tabachnick, W.J. ve Beaty, B.J. (1993), *Polymerase Chain Reaction approaches to Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) identification*, J. Med. Entomol., **30**, 228-232.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. ve Erlich, H.A. (1988), *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, Science, **239**, 487-491.
- Schirmacker, A., Schmidt, H. ve Wilfried, W. (1998), *RAPD-PCR investigations on sibling species of terrestrial Enchytraeus (Annelida: Oligochaeta)*, Biochemical Systematics and Ecology, **26**, 35-44.
- Sharma, V.L., Bhatia, S., Gill, T.K., Bardan, A.A., Kumari, M., Jagmohan, J.S. ve Sobti, R.C. (2006), *Molecular Characterization of Two Species of Butterflies (Lepidoptera:Insecta) through RAPD-PCR Technique*, The Japan Mendel Society, **71**(1),81-85.

- Skoda, S.R. ve Foster, J.E. (2002), *Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating Coeliomyia hominivorax from C. macellaria* (Diptera Calliphoridae), *Bull. Entomol. Res.*, **92**, 89-96.
- Soldan, T. ve Putz, M. (2000), *Karyotypes some Central European mayflies (Ephemeroptera) and their contribution to phylogeny of the order*, *Acta. Soc. Zool. Bohem.*, **64**, 437-445.
- Spakulova, M., Casanova, J.C., Laplana Guillen, N. ve Kralova, L. (2000), *A karyological study of the spirurid nematode Mastophorus muris (Nematoda: Spirocercidae)*, *Parasite*, **7**, 173-177.
- Spakulova, M., Kralova, I., Dudinak, V. ve Reddy, P.V. (2002), *Karyotype of Acanthocephalus lucii: The first record of suppernumerary chromosomes in thorny-headed worms*, *Parasitol Res*, **88**, 778-780.
- Susuz, F., (2002), *Bazı Batı Anadolu Gammarus Türlerinin Mitokondrial DNA'larının RAPD-PCR Tekniği İle İncelenmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Squitier, J.M. (1998), *Deer flies, yellow flies and horse flies, Chrysops, Diachlorus, and Tabanus spp.*, Featured Creatures from the Entomology and Nematology Department, University of Florida, EENY-028.
- Solak, M., Bağcı, H., Şengil, A.Z. ve Öztaş, S. (2000), *Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel Bilgiler)*, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı, Yayın No:5, Afyon.
- Türkoğlu, S. ve Koca, S. (2002), *Karyotype , C- and G- band patterns and DNA content of Callimenus (Bradyporus) macrogaster macrogaster*, *Journal of Insect Science*, **2**(24), 1-4.

- Ütük, A.E., Şimşek, S. ve Koroğlu, E. (2005), Echinococcus Cinsinin Moleküler Genetik Karakterizasyonu, Türkiye Parazitoloji Dergisi, **29** (3), 171-176.
- Welsh, J. ve McChelland, M. (1990), *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*, Nucl. Acids Res., **18**, 7213-7218.
- Welsh, J., McChelland M. ve Sobral, B.W.S. (1991), *Parantage determination in maize hybrids using arbitrary primed polymerase chain reaction (APPCR)*, Ther. Appl. Genet., **82**, 473-476.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Klein, T.A., Gaffigan, T.V., Bergo, E. ve Consolim, J. (1995), *Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of four cryptic species related to Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil*. J. Med. Entomol. **32**, 697-704.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V. (1990), *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, Nucl. Acid. Res., **18**, 6531-6535.
- Winfield, M. O., Arnold, G. M., Cooper, F., Le Ray, M., White, J., Karp, A. And Edwards, K. J. (1998), *Study of genetic diversity in Populus nigra subsp. betulifolia in the Upper Severn area in the UK using AFLP markers*. Mol. Ecol. **7**, 3-10.