G. OLCABEY, 2012

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KAYSERİ VE NİĞDE İLLERİNDE *POPULUS* SPP. ' DE GAL OLUŞTURAN *PEMPHIGUS SPYROTHECAE* AFİT TÜRÜNÜN ORTAMDAN KAYNAKLANABİLECEK GENETİK FARKLILIKLARININ ANALİZİ

GÜLAY OLCABEY

Temmuz 2012

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KAYSERİ VE NİĞDE İLLERİNDE *POPULUS* SPP. ' DE GAL OLUŞTURAN *PEMPHIGUS SPYROTHECAE* AFİT TÜRÜNÜN ORTAMDAN KAYNAKLANABİLECEK GENETİK FARKLILIKLARININ ANALİZİ

GÜLAY OLCABEY

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Gazi GÖRÜR

Temmuz 2012

Gülay OLCABEY tarafından Doç. Dr. Gazi GÖRÜR danışmanlığında hazırlanan "**Kayseri ve Niğde İllerinde *Populus* spp. de Gal Oluşturan *Pemphigus spyrothecae* Afit Türünün Ortamdan Kaynaklanabilecek Genetik Farklılıklarının Analizleri** " adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Coşkun TEZ

Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Doç. Dr. Gazi GÖRÜR

Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Yrd. Doç. Dr. Osman SEYYAR

Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ..../..../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..../..../20.... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Osman SİVRİKAYA

MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülay OLCABEY

ÖZET

KAYSERİ VE NİĞDE İLLERİNDE *POPULUS* SPP. ' DE GAL OLUŞTURAN *PEMPHIGUS SPYROTHECAE* AFİT TÜRÜNÜN ORTAMDAN KAYNAKLANABİLECEK GENETİK FARKLILIKLARININ ANALİZİ

OLCABEY, Gülay

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Gazi GÖRÜR

Temmuz 2012, 33 sayfa

Bu çalışmanın amacı *Populus* spp.'de gal oluşturan *Pemphigus spyrothecae' nin* rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) belirteçlerini kullanarak genetik çeşitliliğini belirlemektir. Niğde ve Kayseri illerinin 20 farklı bölgesinden toplanan afitler 14 RAPD primeri kullanılarak genetik farklılıklar incelenmiş ve 11 primerin bant verdiği görülmüştür. Niğde örneklerinde polimorfik lokus sayısı 40 ve polimorfizm oranı %80 olarak belirlenmiş, Kayseri populasyonunda ise polimorfik lokus sayısı 28 ve polimorfizm oranı %56 olarak belirlenmiştir. Niğde populasyonunun örneklendiği alan daha heterojen olduğu için bu farklılık ortaya çıkmış olabilir. Populasyonlar arasındaki gen akış oranının da (Nm) 3,44 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Niğde ve Kayseri populasyonlarına ait genetik benzerlik değeri 0.9076 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, tür içi çeşitlilik olmasına rağmen Niğde ve Kayseri populasyonlarının birbirine benzer olduklarını göstermektedir. Bu sonuçlar *Pemphigus spyrothecae* türünün genetik yapısı üzerinde coğrafik koşulların etkili olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler daha fazla örnekle, primerle ve diğer moleküler yöntemlerle desteklenirse daha büyük anlam ifade edecektir.

Anahtar Sözcükler: Afit, *Pemphigus spyrothecae*, RAPD

SUMMARY

ANALYSES OF ENVIRONMENTALLY BASED GENETIC DIFFERENCES OF *PEMPHIGUS SPYROTHECAE* SPECIES THAT CAUSE GAL FORMATION ON *POPULUS* SPP. IN KAYSERİ AND NİĞDE PROVINCES

OLCABEY, Gülay

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Associate Professor Dr. Gazi GÖRÜR

July 2012, 33 pages

The aim of this study was determine the genetic variability of *Pemphigus spyrothecae* galled on *Populus* spp. using the Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD) markers. 20 sampled populations from various localities of the Niğde and Kayseri provinces were studied by using 14 RAPD primers and 11 of the 14 primers showed clear band patterns. There were 40 polymorphic loci and rate of polymorfism was 80% in Nigde population while 28 polimorphic loci and rate of polymorfism was 56% in Kayseri population. These differences in polymorfism rate between two populations might be resulted from geographically higher heterogenity in Nigde population area. There was 3.44 gene flow (Nm) between Nigde and Kayseri populations. Furthermore, genetic identity between two populations was 0.9076. The present study indicated that Niğde and Kayseri populations were similar, although they had intrapopulation variability. Overall elevation of the findings indicated the effects of geographical conditions on the genetic structure of the *P.spyrothecae.* It should be better to support these findings with other molecular techniques by applying more primers and bigger samples size.

Keywords: Aphid, *Pemphigus spyrothecae*, RAPD

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar her aşamada yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve öğretici eleştirileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gazi GÖRÜR' e, laboratuvar çalışmalarımda bana rehberlik eden, pratik ve teorik olarak bütün bilgilerini bana aktaran Erciyes Üniversitesi Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Servet ÖZCAN' a ve Prof. Dr. Coşkun TEZ' e ve Bozok Üniversitesi Öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Fahriye ÖZCAN' a,Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ' a, Yrd. Doç. Dr. Tuba ARTAN ONAT' a, Yrd. Doç. Dr. Fulya SAYGILI' ya, Yrd. Doç. Dr. Osman SEYYAR' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

FEB 2010/17 kodlu projeye desteklerinden dolayı Niğde Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında daima yanımda olan arkadaşım Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi Hayal AKYILDIRIM' a ve tezimin yazım aşamalarında eleştiri ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan arkadaşım Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi Özhan ŞENOL' a teşekkür ederim.

Ayrıca bütün yaşamım boyunca bana gösterdikleri maddi ve manevi fedakarlıkları için değerli aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak hayatıma kattığı anlamla bana mutluluk veren nişanlım Erhan ERGİN ve ailesine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET……iv
SUMMARY……v
TEŞEKKÜR……vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ……vii
ÇİZELGELER DİZİNİ……ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ……xi
BÖLÜM 1.GİRİŞ……1
1.1 Böceklerle Yapılan Moleküler Çalışmalar……2
1.2 Afitlerle Yapılan Moleküler Çalışmalar……3
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER……8
2.1 RAPD Tekniği……8
2.1.1 RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri……8
2.1.2 PCR Programı……9
2.1.2.1 DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)……9
2.1.2.2 Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)……9
2.1.2.3 Primerlerin Uzaması (Primer Extension)……10
2.1.3 RAPD Tekniğinin Değişkenleri……10
2.1.4 RAPD Yönteminin Avantaj ve Sınırlılıkları……11
2.2 *Pemphigus spyrothecae'* nın genel özellikleri……12
BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT……13
3.1 *Pemphigus spyrothecae* türünün çalışma alanından toplanması……13
3.2 Çalışma materyali *Pemphigus spyrothecae* türünün muhafazası……14
3.3 Moleküler Çalışmalar……15
3.3.1 DNA İzolasyonu……15
3.3.2 RAPD Primerleri……16
3.3.3 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu……16
3.3.4 Agaroz Jelin Hazırlanması……17
3.3.5 Agaroz Jel Elektroforezi……18
3.3.6 Agaroz Jelin Görüntülenmesi……18

3.3.7 RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi……...…..18
3.3.8 Veri Analizleri…….…….……..…18
BÖLÜM IV. BULGULAR…….…….……..….19
4.1 *P. spyrothecae*'nin Niğde ve Kayseri popülasyonlarının istatiksel analizi……27
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE SONUÇ…….……..……29
KAYNAKLAR…….……...31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.1 *P. spyrothecae* gallerinin toplandığı lokaliteler……..…14

Çizelge 3.3.2.1 Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve baz dizilimleri……16

Çizelge3.3.3.1 RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları…….17

Çizelge 3.3.3.2 RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları…17

Çizelge 4.1 Sonuç veren 11 primerden elde edilen polimorfik bant sayısı……... 25

Çizelge 4.2 Niğde ve Kayseri populasyonlara ait örnekler için sonuç veren 11 primerin lokalitelere göre vermiş olduğu polimorfik bant sayıları……. 26

Çizelge 4.1.1 *P. spyrothecae'* nin Nei'ye (1987) göre Niğde ve Kayseri populasyonlarının ortalama genetik varyasyon analiz sonuçları…...…..27

Çizelge 4.1.2 *P. spyrothecae* alt popülasyonlarında genetik farklılaşma analizi……...27

Çizelge 4.1.3 *P. spyrothecae'* nin Niğde ve Kayseri populasyonlarına ait genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları...……...28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1.1 RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi……...……8

Şekil 2.1.1.2 RAPD bant profillerini gösteren örnek bir agaroz jel görüntüsü……...9

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 2.2.1 *Populus* spp. üzerinden örneklenen *P. spyrothecae* türüne spesifik galler…….12
Fotoğraf 4.1 S21 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……19
Fotoğraf 4.2 S37 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……20
Fotoğraf 4.3 S39 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……20
Fotoğraf 4.4 S40 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen Kayseri populasyonu bant profilleri…….21
Fotoğraf 4.5 S40 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen Niğde populasyonu bant profilleri……...……....21
Fotoğraf 4.6 S41 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……22
Fotoğraf 4.7 S59 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……22
Fotoğraf 4.8 S71 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……23
Fotoğraf 4.9 S72 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……23
Fotoğraf 4.10 S78 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……24
Fotoğraf 4.11 S79 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri……24

BÖLÜM I

GİRİŞ

Afitler konak bitki türüne spesifik olmaları, üreme periyotlarının kısalığı, döngüsel partenogenez ile tür içi genetik çeşitlilik göstermeleri ve kısa sürede çok fazla sayıda bireye ulaşmaları, çevresel koşullara kısa sürede adapte olma yeteneğini sağlayan teleskopik generasyon özelliği, konak bitkisine özgü yeni özellikleri kısa sürede kazanabilmeleri gibi özelikleri ile son yıllarda birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir. Bu özelliklerine ilaveten son zamanlarda yayılım alanlarını genişlettikleri ve tarımsal ürünlere verdikleri zararı da artırdıkları belirlenmiştir. Değişen ortam koşulları fizyolojik, morfolojik, kalıtsal ve davranışsal uyumlar göstermeleri gibi birçok özellik afitlerin önemini artırmaktadır. Ayrıca afitler bunlardan başka hastalıklı bitkilerden aldıkları virüsleri sağlıklı bitkilere taşıyarak önemli bir virüs vektörü olarak da karşımıza çıkar. Bu nedenle bitkilerde çok önemli miktarlarda ürün kayıplarına ve dolayısıyla ekonomik zarara neden olmaktadır. Son 20 yıl süresince, afit populasyonlarının genetik yapısı, afit kökenli virüslerin artarak yayılması, bitki direncine karşı başarılı olabildiği biyotoplarda ortaya çıkan insektisit dirençliliğinin gelişmesi nedeniyle ilgi çekici bir hale gelmiştir. Afitler fitofag böceklerdir ve bunlar konak olarak kullandıkları bitkilerin dağılımına bağlı olarak yayılım gösterirler. Eğer konak bitki türleri herbivor böceklere karşı farklı seçici çevreleri oluştururs populasyonlar arasında adaptif genetik farklılaşmalar artabilir. Afitler, böcek populasyonlarının konağa bağlı genetik yapılaşmasını belirlemek için model bir sistem oluştururlar. Çünkü afitler yüksek oranda konak spesifiktirler ve konak bitki afit populasyonlarının genetik yapısını etkileyen önemli bir faktörtür [1].

Afitler yukarıda belirtilen genel özellikleri nedeniyle ekologların, sistematikçilerin ve genetik araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Özellikle sistematikçiler ve genetik çalışmalar yapan araştırmacılar açısından afitler; basit genom yapıları ve dişi ağırlıklı populasyon yapıları nedeniyle önem kazanmaktadır. Bunlara ilaveten afitlerin sahip olduğu özellikler nedeniyle simpatrik türleşmeye aday en iyi gruplardan birisi olduğu düşünülmektedir. Bütün bu bilgiler doğrultusunda amaçlanan bu çalışma ile farklı lokalitelerde aynı konak bitkiyi kullanan ve gal oluşumuna yol açan afit türünde ekolojik, coğrafik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilecek genetik farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çerçevede konak bitki ilişkisi, gal oluşturma zamanları ve

populasyon dinamiği iyi bilinen ve çalışma alanı olarak seçilen alanlarda oldukça yaygın olarak görülen *Populus* türleri üzerinde beslenen *Pemphigus spyrothecae* türü çalışma materyali olarak seçilmiştir. Aynı afit türünün Niğde ve Kayseri illerinde kavak üzerinde oluşturduğu gallerden seçilen bireylerinde RAPD yöntemi ile genetik analizler gerçekleştirilmiştir.

1.1 Böceklerle Yapılan Moleküler Çalışmalar

Böceklerle yapılan çalışmalarda özellikle ekolojik ve taksonomik uygulamalarda moleküler yöntemlerin kullanılması yaygınlık kazanmıştır. Bu çalışmalarda amaçlarına ve çalışılan gruba göre değişik yöntemler uygulanmıştır, fakat RAPD uygulamalarının tek olarak veya diğer yöntemlerle birlikte sıklıkla uygulandığı görülmüştür. Bu uygulamalardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

2012 yılında Tunus'ta hurma ağacının yaygın bir zararlısı olan *Oryctes agamemnon* türünün genetik çeşitliliğini ortaya koymak için RAPD belirteçleri kullanılmıştır. Çalışma 6 primer ile gerçekleştirilmiştir. Polimorfik belirteç %' sinin Mrah Lahwar' da %27,77, Nasr' da % 55,44 olduğu belirlenmiştir. Bütün populasyonda ise ortalama % 40,22 polimorfik belirteç belirtilmiştir. Bu çalışma ortam koşullarının populasyonlarda yol açabileceği genetik çeşitliliğin çalışılmasında RAPD tekniklerinin etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir [2].

Çukurova'nın farklı lokalitelerinden toplanan *Trichogramma* türlerinin, moleküler yöntemler kullanılarak teşhisi yapılmıştır. ITS2, 28SD2, COI ve RAPD belirteçlerinin *Trichogramma* türlerini ayırt etmede kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tür içi ve türler arası farklılıkları belirlemek için 50 farklı RAPD primeri denenmiş ve bunlardan 6 tanesi ayırt edici bant vermiştir. RAPD primerlerinden elde edilen bantlara göre örneklerin arasındaki genetik uzaklık hesaplanmış ve bu uzaklıkların % 0,05 ile % 79,85 arasında değiştiği belirlenmiştir [3].

Beyaz sinek, *Bemisia tabaci* (Genn), Brezilya'da 60' dan fazla bitki virüsünü taşıyan en zararlı türlerden biridir. *B. tabaci* biyotipleri ve 2 farklı beyaz sinek türü arasındaki genetik ilişkiyi açıklamak için RAPD belirteçlerinin kullanıldığı bir çalışma yapılmış ve 12 populasyondan elde edilen 109 *B. tabaci*' nin dişi bireylerinin örnekleri analiz edilmiştir. Toplam genetik çeşitliliğin populasyonlar içinde ortalama % 56,70 olduğu belirtilmiştir [4].

1.2 Afitlerle Yapılan Moleküler Çalışmalar

Moleküler yöntemler, diğer böcek gruplarında olduğu gibi afitlerde de populasyon ya da bireyler arasında var olan benzerlik ya da farklılıkların saptanmasında ve taksonomik birimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla moleküler yöntemlerin kullanılması 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Populasyon ve türlerin genetik çeşitliliği ve polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ilk moleküler yöntemleri protein ve allozim elektroforezi oluşturmaktadır [5].

Pike ve arkadaşları *Pemphigus* afit cinsinin çeşitli türleriyle mitokondriyal sitokrom oksidaz I ve II sekans yöntemini uygulayarak bu türlerin sosyal yaşam davranışlarını, ekolojilerini çalışmışlar ve bu türlerden üçü üzerinde yoğunlaşmışlardır (*P. bursarius, P populi, P. spyrothecae*). Bu türlerin gal yapılarını, ekolojilerini, gal yapma sürelerini, sosyal davranışlarını, gal içindeki afit bireylerinin yoğunluğunu ve asker bireyleri çalışmışlardır. *P. populi'* nin çok kısa bir gal fazı olduğu, asker bireylerinin olmadığı ve gal içindeki afit yoğunluğunun diğer iki türe göre daha seyrek olduğu; *P. bursarius'* un morfolojik olarak değil de davranışsal olarak asker afitlere sahip olduğu; *P. spyrothecae'* nin ise en uzun gal fazına sahip olduğu, asker afitlerden oluşan oldukça yoğun bir populasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Her tür için 766-845 baz çifti sekanslanmış ve *P. bursarius*'un 223.bazında tek bir baz delesyonu oluşmuştur. Bu çalışma mtDNA-COI-II sekans yöntemi sayesinde *Pemphigus* türlerinin farklı sosyal yaşam davranışları olduğunu, gal yapma sürelerinin ve gal içeirisindeki bireylerin sayısının değiştiğini göstermektedir [6].

D'acier ve arkadaşları *Aphis* cinsinin filogenisini yeniden oluşturmak amacıyla sitokrom oksidaz I ve II genlerini kullanmışlar ve sitokrom-b gen sekansının kullanılabilirliğini test etmişlerdir. COI/COII için ortalama baz kompozisyonu ortaya koymuşlardır [7].

Odagiu ve arkadaşları afitlerde farklı DNA ekstaksiyon ve örnekleme metodlarını çalışmışlardır. Çeşitli yakalama sistemlerini kullanmışlar ve örneklerin bir kısmını %80 etanol içerisinde bir kısmını ise -80°C de muhafaza etmişlerdir. DNA eksraksiyon metodu olarak da uygun kitleri ve CTAB ekstraksiyon protokolünü tercih etmişlerdir. İki farklı ortamda saklanan örneklerden eksrakte edilen DNA'nın ortalama miktarı arasında istatistiksel olarak çok önemli bir farklılık kaydedilmemiştir [8].

Myzus persicae bitki virüslerinin önemli bir vektörüdür. Malloch ve arkadaşları, *M. persicae* afit türü ile mikrosatellit markır analizini çalışmışlar ve farklı DNA ekstraksiyon metodları ile farklı PCR metodlarını denemişlerdir. DNA ekstraksiyonunda urea plus phenol chloroform, salting out, chelex 100 chelating ion exchange resin ve sodyum hidroksit ekstraksiyonu metodlarını, PCR amplifikasyonunda ise PCR Ready-to-go beads, Tag polimeraz, High fidelity Tag polimeraz metodlarını kullanmışlardır. Böylece *M. persicae* ile yapılan genetik çalışmalarda hangi DNA ekstraksiyon metodunun ve hangi PCR metodunun daha kullanışlı ve uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir [9].

Shufran ve arkadaşları Amerika'daki rus buğday afit biyotipi içindeki ve arasındaki sınırlı genetik varyasyonu çalışmışlar ve Amerika' daki *Diuraphis noxia* biyotipinin kökenini ve genetik akrabalığını anlamak için 3 moleküler belirteç kullanmışlardır. Sadece iki bireyde tek bir rastgele amplifiye olmuş polimorfik DNA polimorfizmi bulunmuştur [10].

Shufran ve arkadaşları 1986 ve 2006 yılları arasında Meksika, Güney Afrika ve Amerika'dan topladıkları Rus Buğday afiti üzerinde mtDNA sitokrom oksidaz I geninin 332 baz çiftlik bir kısmını çalışmışlardır. İki afit bireyinin 2 nükleotidi dışında, Amerika'dan alınan populasyonda COI sekans çeşitliliği bulunmamıştır. Amerika'dan toplanan bireyler Meksika, Türkiye, Fransa ve Güney Amerika'dan toplanan bir afitle benzer bir COI dizisine sahip olduğu belirtilmiştir. Güney Afrika'dan alınan afit ise sadece 2 baz çiftiyle farklılık göstermiştir [11].

Peng ve arkadaşları farklı mevsimlerde ve farklı konak bitkilerden topladıkları *Aphis gossypii*'nin DNA polimorfizmini belirlemek için RAPD-PCR tekniğini kullanmışlardır. 20 primerden 3 tanesi seçilip dizi analizi için kullanılmıştır. Çin dikenli dişbudak ağacı üzerinde konaklayan afitler, diğer 4 konak bitkideki afitlerden DNA düzeyinde oldukça açık bir şekilde farklılaşmışlardır. Böylece pamuk afitleri 3 gruba ayrılmıştır: ilkbahar ve sonbahar sarı renkli afitler, ilkbahar ve yaz yeşil renkli afitler ve yaz mevsiminde sarı cüce formda afitler. Ancak sarı cüce formdaki afitlerin genetik ilişkisi ilkbahar ve sonbahar yeşil renkli afitlerine oldukça yakındır [12].

Çindeki, *Sitobion avenae* populasyonunun genetik ilişkilerini karakterize etmek için 588 baz çifti, mitokondrial sitokrom oksidaz alt ünite I (mtDNA-COI) geninin dizi analizi yapılmış ve farklı coğrafyalardaki populasyonlar karşılaştırılmıştır. Farklı buğday

yetiştirilen arazilerde 17 lokaliteden 269 birey toplanmıştır. Filogenetik analizler, tüm haplotiplerin yüksek oranda birbirleriyle içten bağlı olduğunu göstermektedir. 8 haplotipin herbiri sadece bir lokalitede bulunurken, diğer haplotipler farklı lokalitelerde geniş yayılım göstermişler ve Kuzey Çin'de yüksek oranda genetik çeşitlilik gözlenmiştir [13].

Raboudi ve arkadaşları , patates afiti *Macrosiphum euphorbiae*'nın Thomas (Hemiptera:Aphididae) 15 populasyonunun genetik yapısını RAPD belirteçleri ile karakterize etmişler. Rastgele seçilmiş 5 primer ile 113 polimorfik bölge açığa çıkarmıştır. Bu da her primerde ortalama 22.6 polimorfik bandla polimorfik yapının tahmin edilmesinde kullanılmıştır. Moleküler varyans analizlerinde (AMOVA) populasyon içinden ziyade (%21.84), populasyonlar arası (%78.16) önemli genetik farklılık gözlenmiştir. Dizi analizlerine bağlı genetik mesafe, toplanan 15 populasyonun 3 gruba ayrıldığını ortaya çıkarmıştır. Bunlardan ilki güneyden toplanmış ve konağından bağımsız olarak bir grup içinde farklılaşmıştır. Diğeri ise coğrafik kökenlerinden ve konaklarından bağımsız olarak iki gruba dağılmışlardır. Bu sonuçlar *M. euphorbiae'* de genetik farklılaşmanın ilk kanıtı olarak sunulmaktadır [14].

Güney Brezilya'dan 20 lokaliteden buğday ve yulaf üzerinden *Metopolophium dirhodum* afit türünden 23 koloni toplanmış ve RAPD belirteçleri kullanılarak bu bireylerin genetik çeşitliliği üzerinden coğrafik aralıkları ve konak bitkinin bu çeşitliliğe etkisi araştırılmıştır. 27 RAPD primeri test edilmiş ve bunlardan sadece 4 tanesi polimorfizm göstermiştir. Bu durum *M. dirhodum* türünün çok sayıda kromozom varyasyonu gösterdiği ile açıklanmıştır. 14 farklı genotip dizi analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Mokeküler varyans analizi, buğday türleri üzerinden toplanmış nesiller üzerinden moleküler markırlar aracılığıyla yapılmıştır. Simpatrik afit populasyonlarındaki genetik farklılıktan konak bitkinin sorumlu olduğu düşünülmüştür [15].

Inbar ve arkadaşları İsrail'de yaptıkları çalışmada, *Pistacia* spp. üzerinde gal oluşturan 14 afit türünün evrimi için mitokondrial DNA' nın sitokrom oksidaz I ve sitokrom oksidaz II sekansına dayanarak türler arası filogenetik ilişkiyi ortaya koymuşlardır ve aynı konak bitki üzerinde 5 farklı gal tipi gözlemlemişlerdir. Bu da bu türlerin aynı konak bitki üzerinde yaşasalar dahi farklı sosyal yaşam davranışlarının ve ekolojilerinin olduğunu göstermektedir [16].

Nicol ve arkadaşları, Yeni Zelanda'da tanımlanan *Metopolophium dirhodum* ve *Elotobıum abietinum* afit türlerinin arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için RAPD-PCR metodunu kullanmışlardır. Yeni Zelanda ve UK populasyonlarında *E. abietinum* için belirlenen genetik varyasyon *M. dirhodum* için belirlenen genetik varyasyondan daha düşük olarak ortaya çıkmıştır [17].

El Mujtar ve arkadaşları, Arjantin' de yaptıkları bir çalışmada *Cinara cupressi* ve *C. tujafilina* afit türlerini COIS ve COIA primerlerini kullanarak PCR-RFLP metodu ile moleküler olarak karakterize etmişlerdir. *Austrocedrus chilensis* üzerinde konaklayan bu afit türlerini tanımlamak için COI genine bağlı olarak PCR-RFLP metodunun değerlendirilmesini amaçlamışlardır. *C. cupressi* türüne ait diziler, %91-92 oranında *C. thujafilina* türüne ait dizilerle nükleotit benzerliği göstermiştir [18].

Bulman ve arkadaşları 2005 yılında Yeni Zelanda' da bulunan tahıl ürünlerinden ve otlardan topladıkları *Rhopalosiphum padi* afit türleri üzerinde RAPD-PCR metodu ile genetik analiz çalışmışlardır. 1995 yılında toplanan örnekler üzerinde çok sayıda *R. padi* nesli belirlemişler ancak sonraki RAPD-PCR çalışmaları için Yeni Zelanda' da *R. padi'* nin baskın olan nesillerinin sayısının 2 nesle kadar düştüğünü belirtmişlerdir [19].

Lu ve arkadaşları 2007 yılında Tayvan' da 20 RAPD primeri kullanarak RAPD-PCR yöntemiyle Aphidinae grubunun toplam 11 üyesiyle genetik analiz çalışmışlar ve karışık populasyonlarda RAPD-PCR-SCAR DNA verilerinin türe özgü DNA parçalarının belirlenmesinde kullanışlı bir metot olduğu sonucuna varmışlardır [20].

Helmi ve arkadaşları Mısır' da farklı tahıl ürünlerinden ve farklı lokalitelerden topladıkları 11 afit türünün birbirleri arasındaki filogenetik ilişkilerini RAPD ve ISSR teknikleriyle analiz etmişlerdir. 11 afit türüne karşılık, bu türlerin tanımlanması için 8 RAPD primerini test etmişlerdir. Test edilen primerlerle bu 11 tür arasında 37 bant (%22.2) belirlenmiştir [21].

Lushai ve arkadaşları 1997' de RAPD-PCR tekniğini kullanarak *Rhopalosiphum padi* ve *Sitobion avenae'* nin bazı klonlarının farklı aseksüel ergin fenotiplerinin bir veya birkaç RAPD-PCR bandı ile farklılaşabildiğini belirlemişlerdir. Her iki türde de 248 ve 296 baz çiftlik bantlar dizi analizine tabi tutulmuş ve A/T 'ce zengin bulunmuştur. Böylelikle birbirinden farklı olsa da bu iki türün birbirine benzer genetiksel özellik gösterdiği belirlenmiştir [22].

İtalyanın farklı bölgelerinden 18 *Myzus persicae* populasyonu toplanmış ve populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği araştırmak için RAPD-PCR tekniği kullanılmıştır. 24 primerden 20' sinin ayırt edici bantlar verdiği görülmüş ve *M. persicae* populasyonları 2 gruba ayrılmıştır. Merkez ve Güney İtalya afitleri aynı dizideyken, Kuzey İtalya afitleri daha çok diğer dizilerde lokalize olmuşlardır [23].

Tunus' un farklı bölgelerinden Rosaceae ve Rutaceae familyaları üyelerinden toplanan *Aphis spiraecola* populasyonlarının genetik çeşitliliğinin seviyesini belirlemek için RAPD belirteçleri ve mitokondrial sitokrom oksidaz I geni sekansı kullanılmıştır. Tunus' daki bu türün seksüel üreme fazının olmamasından kaynaklanan düşük bir genetik çeşitlilik belirlenmiş ve genetik yapının coğrafik yapı ile ilişkili olmadığı ancak konak bitkinin genetik çeşitliliğin ayrılmasında önemli bir etken olduğu görülmüştür [24].

Afitlerle yapılan çalışmalara genel olarak bakıldığında konak bitki kullanımına ve coğrafik farklılıklara bağlı olarak genetiksel farklılıklar gösterdikleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çerçevede planlanan bu çalışma ile de *P.spyrothaceae* türünün aynı konak bitki üzerinde fakat farklı coğrafik alanlarda kavak bitkisi üzerinde gal oluşturduklarında acaba benzer şekilde genetiksel farklılık ortaya koyup koymadığının araştırılması amaçlanmıştır.

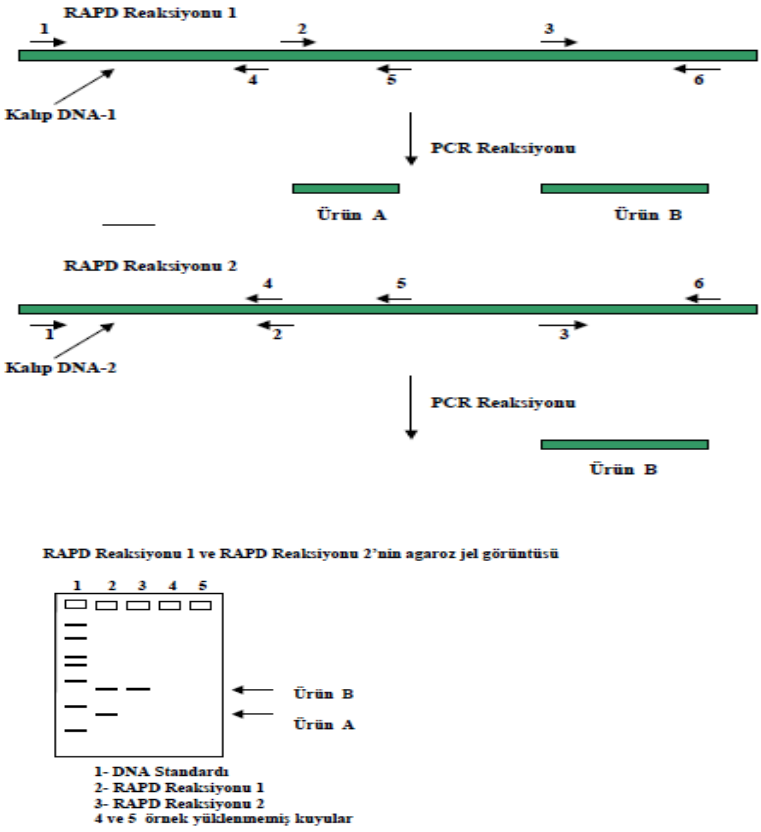
BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 RAPD Tekniği

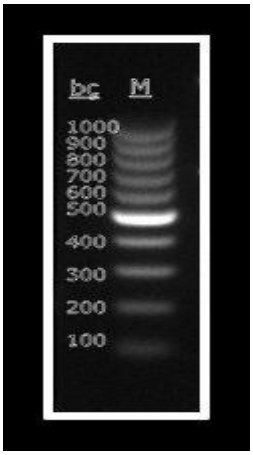
2.1.1 RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk defa 1990' da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reksiyonu' nu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Aynı yıllarda diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirmiştir. 1991 tarihinde ise bu metodla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitden daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir metod yayınlanmıştır [25].



Şekil 2.1.1.1 RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi [25]

RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 9-10 bp oligonükleotidin düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir [25]. Şekil 2.1.1.1'de şematik olarak bu teknik gösterilmiştir. Şekil 2.1.1.2' de RAPD bant profillerini gösteren örnek bir agaroz jel fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 2.1.1.2 RAPD bant profillerini gösteren örnek bir agaroz jel görüntüsü

2.1.2 PCR Programı

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR, basit, spesifik ve hassas bir tekniktir. PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır [25].

2.1.2.1 DNA Zincirinin Açılması (Denaturation):

Kalıp DNA (template DNA), 92-95 ^{o}C' de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilmektedir [26].

2.1.2.2 Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing):

Reaksiyon sıcaklığının 37-65 ^{o}C' ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [26].

2.1.2.3 Primer Uzaması (Primer Extension):

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72 ^{o} C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır. PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile primerin toplam uzunluğu kadardır. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır [26].

2.1.3 RAPD Tekniğinin Değişkenleri

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyon, primer karışımları RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR' da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir. RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir. Moleküler sistematik çalışmalarında organizmalardan öncelikle DNA'nın izolasyonu gereklidir. RAPD reaksiyonlarında, DNA' nın kalitesi çok önemlidir. RAPD tekniğinde çoğaltma, kullanılan primerin uzunluğuna, primerin GC içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotitin yerine duyarlıdır. Bu teknikte $MgCl_2$, dNTP ve *Taq* DNA polimeraz konsatrasyonlarının çalışılan gruba özgü optimum koşullarının belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir [25].

DNA Ağırlık Belirteci : Jelde yürütülen DNA'ların büyüklüklerini belirlemek için 100 bç DNA Ladder Plus kullanılmıştır.

6X Loading Dye Solution : Jelde yürütülen DNA'nın nereye kadar yürütüldüğünü belirlemek için 10(DNA)/3(yükleme solüsyonu) oranında yükleme solüsyonu olarak kullanılmıştır.

dNTP Mix : PCR reaksiyonu esnasında polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan nükleotidlerin sağlanması için kullanılmıştır.

Taq* DNA Polimeraz :Taq* DNA polimeraz, PCR reaksiyonu esnasında polimerizasyonun gerçekleşmesi için kullanılmıştır.

2.1.4 RAPD Yönteminin Avantaj ve Sınırlılıkları

Moleküler sistematikte kullanılan DNA temeline dayalı diğer bazı temel teknikler; Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış Parça Polimorfizm (AFLP), Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit (SSR) Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR), Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (SSCP), Denatüre Gradient Jel Elektroforezi (DGGE), Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Dizi (CAPs) ve Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi (SCARs)'dir.

Genel olarak bu tekniklerle karşılaştırıldığında RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilmektedir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır. Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır. Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır. Farklı araştırıcılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır. Bununla beraber metodun sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterezigotları teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için

diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir [25].

2.2 *Pemphigus spyrothecae'* nın genel özellikleri

P. spyrothecae türü yaşamını tamamen birincil konak üzerinde geçiren tipik bir yaşam döngüsüne sahiptir. *P. spyrothecae* konak bitkisinin yaprağının petiyolünde spiral şekilli galler oluşturan ve yaklaşık 6 ay süren uzun bir gal fazına sahiptir [27].

Morfolojik olarak özelleşmiş asker afitlerden oluşan oldukça yoğun bir populasyonla karakterize edilir. Bu türün asker bireyleri çok saldırgandır, predatörlerine stiletleriyle vurarak öldürebilirler. Asker bireylerin varlığı koloninin düşmanlarından korunmasında oldukça etkilidir [2].

Fotoğraf 2.2.1 *Populus* spp. üzerinden örneklenen *P. spyrothecae* türüne spesifik galler (Orijinal)

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 *Pemphigus spyrothecae* türünün çalışma alanından toplanması

P. spyrothecae türünün farklı coğrafik alanlarda aynı konak bitki üzerinde bulunduğunda kalıtsal farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla Niğde' nin 11, Kayseri' nin ise 9 farklı lokalitesinden örneklemeler yapılmıştır. Bu örneklemeler yapılırken 2 soruya cevap aranması amaçlanmıştır; 1) Aynı il içerisinde var olan coğrafik farklılıklar genetiksel farklılıklara yol açmış olabilir mi? 2) 2 farklı ilden toplanan örnekler arasında genetiksel açından bir farklılık var mı? Burada sonuca ulaşabilmek için her 2 ilden de örneklemeler yapılırken mümkün olduğunca farklı coğrafik özellikteki lokalitelerden örnekleme yapılmaya çalışılmıştır. Yapılan arazi çalışmasında *P. spyrothecae* örneklerinin toplandığı lokaliteler çizelge 3.1.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1 *Pemphigus spyrothecae* gallerinin toplandığı lokaliteler

Örnek kodu	Örneğin alındığı lokalite	Ortalama rakım (m)	Toplanma tarihi
B1	Kemerhisar	1100	16.09.2010
B2	Çiftlik	1550	09.10.2010
B3	Azatlı	1332	09.10.2010
B4	Burç/Kavaklıgöl	1600	06.11.2010
B5	Elmalı	1332	06.11.2010
B6	Çamardı	1600	30.09.2011
B7	Edikli	1332	29.09.2011
B8	Karaatlı	1332	29.09.2011
B9	Gümüşler	1229	29.09.2011
B10	Bor	1100	18.07.2010
B11	Merkez	1229	11.09.2009
E1	İncesu(Kayseri İncesu arası)	983	29.07.2010
E2	İncesu(İncesu çıkışı)	983	29.07.2010
E3	Yukarı Talas	1191	29.07.2010
E4	Mithatpaşa mah./Kocasinan	1100	29.07.2010
E5	Erc.Ünv./Talas(1)	1100	28.07.2010
E6	Hacılar	1350	29.07.2010
E7	Kocasinan	1100	29.07.2010
E8	Erc.Ünv.Kampüs/Talas(2)	1100	28.07.2010
E9	Talas(3)	1100	12.09.2011

3.2 Çalışma materyali *Pemphigus spyrothecae* türünün muhafazası

Araştırma materyalini oluşturan *P. spyrothecae* türüne özgü spesifik galler -20°C'de dondurucuda ve gal içerisinden alınan bireyler ise %96' lık etil alkolde muhafaza edilmiştir. Kullanılacak olan örnekler fırça yardımıyla 5' erli gruplar halinde ependorf tüplerine aktarılmıştır.

3.3 Moleküler Çalışmalar

3.3.1 DNA İzolasyonu

Önceden preparasyonu ve teşhisi yapılmış, gale spesifik olduğu belirlenen *P. spyrothecae* türünün moleküler çalışmaları için öncelikle DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu için DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, PureLink Genomic DNA Kits) kullanılmıştır. Dondurulmuş haldeki örnekler DNA kontaminasyonuna izin verilmeden 180 µl PBS tamponu ile ezilmiştir.

INVITROGEN Kit Protokolü;

- Ependorf tüplerine aktarılan ezilmiş örneklerin her birine 20 µl Proteinaz K eklenir.
- Lysis işlemi tamamlanana kadar 1-4 saat 55 ^{o} C 'de inkübe edilir.
- Tüpler oda sıcaklığında 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir.
- Lizata 20 µl RNase A eklenir ve vortekslenir. Sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklenir ve homojen bir solüsyon elde edebilmek için vortekslemek suretiyle iyice karıştırılır.
- Lizata 200 µl %96-100 etanol eklenir ve vortekslenir.
- Lizat kolonlara (~640 µl)yüklenir.
- Oda sıcaklığında 1 dakika 10000g' de santrifüj edilir.
- Koleksiyon tüpleri çıkarılır ve kolonlar yeni koleksiyon tüplerine yerleştirilir.
- 500 µl etanolle hazırlanmış Wash Buffer 1 ile kolon yıkanır.
- Oda sıcaklığında 1 dakika 10000g'de kolonlar santrifüj edilir. Koleksiyon tüpleri çıkarılır ve kolonlar yeni koleksiyon tüplerine yerleştirilir.
- 500 µl etanolle hazırlanmış Wash Buffer 2 ile kolon yıkanır.
- Kolonlar oda sıcaklığında 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir.
- Kolonlar steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir.
- 25-200 µl Genomic Elution Buffer ile DNA ayrıştırılır.
- Kolonlar oda sıcaklığında 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilir.
- DNA kısa süreli olarak saklanacaksa 4°C , uzun süreli olarak saklanacaksa -20°C 'de muhafaza edilir.

3.3.2 RAPD Primerleri

RAPD-PCR için Bio Basic Inc. firmasına ait 14 adet RAPD primeri kullanılmıştır. Primerler 10 nükleotid uzunluğunda olup, nükleotid dizileri ve GC içerikleri çizelge 3.3.2.1. ’de verilmiştir. Çalışma için bu primerler rastgele seçilmiştir.

Çizelge 3.3.2.1 Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve baz dizilimleri [3].

Primer Adı	Baz Dizilimi(5’-3’)	%GC	Baz Uzunluğu (bç)
S16	5’- TTT GCC CGG A-3’	60	10
S21	5’- CAG GCC CTT C-3’	70	10
S37	5’- GAC CGC TTG C-3’	60	10
S39	5’-CAA ACG TCG G -3’	60	10
S40	5’- GTT GCG ATC C- 3’	60	10
S41	5’- ACC GCG AAG G-3’	70	10
S43	5’-GTC GCC GTC A -3’	70	10
S47	5’- TTG GCA CGG G-3’	70	10
S59	5’- CTG GGG ACT T -3’	60	10
S71	5’-AAA GCT GCG G-3’	60	10
S72	5’-TGT CAT CCC C- 3’	60	10
S78	5’-TGA GTG GGT G -3’	60	10
S79	5’- GTT GCC AGC C-3’	70	10
S89	5’-CTG ACG TCA C -3’	60	10

3.3.3 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu

RAPD-PCR koşullarının standardize edilmesi için reaksiyon bileşenlerinin miktarları ve reaksiyon koşulları yapılan ön denemelerle optimize edilmiştir. RAPD-PCR reaksiyon karışımı toplamda 15 µl olacak şekilde çizelge 3.3.3.1’ de verilmiştir. RAPD-PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra PCR reaksiyonları Applied Biosystems marka gradiyent thermocycler kullanılarak çizelge 3.3.3.2’ de verilen programa göre uygulanmıştır.

Çizelge 3.3.3.1 RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

RAPD-PCR bileşenleri	**Konsantrasyon**
dH_2O	6.05 µl
$MgCl_2$	1.2 µl
Tag Buffer	1.5 µl
Dntp	0.5 µl
BSA	1.5 µl
RAPD primer	2 µl
Tag DNA polimeraz	0.25 µl
DNA	2 µl

Çizelge 3.3.3.2 RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

İşlem	**Sıcaklık(^{0}C)**	**Süre(sn)**	**Döngü Sayısı**
Ön denatürasyon	94	120	1 Döngü
Denaturasyon	94	60	45 Döngü
Primerin DNA'ya Yapışma safhası	36	120	
Uzama Safhası	72	120	
Son Uzama Safhası	72	600	1 Döngü

3.3.4 Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünü için % 1'lik agaroz jel hazırlanır. Bir erlen içerisine 1.5 g agaroz ve üzerine 150 ml 10xTAE (Trisma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA) çözeltisi eklenerek karıştırılır. Karışım mikrodalgada agaroz tamamen çözünene kadar ısıtılır. Sonra üzerine 10mg/ml'lik Ethidium Bromide çözeltisinden 8 µl eklenir ve manyetik karıştırıcıda 40-45°C'ye gelinceye kadar karıştırılır. Taraklar elektroforez tankı içerisine yerleştirilir ve karışım tanka dökülür. Bu sırada solüsyon içerisinde hava kabarcığı

kalmamasına dikkat edilmelidir. Yaklaşık 20 dakika sonra taraklar çıkartılır ve tank içerisine elektroforez tamponu eklenir.

3.3.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri üzerine 2 µl yürütme jeli (Loading Dye) eklenip karıştırılır. Karışım jelde açılan kuyucuklara yüklenir. Jele 100 volt doğrusal akım verilerek örneklerin jel üzerinde, elektriksel alanda 80 dakika yürümesi sağlanır.

3.3.6 Agaroz Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez tankından çıkarılan jel, jel görüntüleme cihazına yerleştirilir ve UV ışını altında görüntülenerek fotoğrafı çekilir. Jeller Quantum- ST4 1100/20M marka görüntüleme sistemi ile dökümante edilmiştir.

3.3.7 RAPD bantlarının değerlendirilmesi

Fotoğrafı çekilen jel görüntüleri görsel olarak değerlendirilmiş ve tüm bantlar değerlendirmeye alınmıştır. RAPD bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100–1000 baz çifti arasındaki bantları içeren DNA standardı (GenerulerTM 100 bç DNA Ladder, MBI Fermentas) kullanılmıştır.
Çalışılan örneklerde bantlar var olma ve olmama durumuna göre değerlendirilmiştir. Var olan her bir bant için “1” rakamı, olmayan bant için ise “0” rakamı kullanılmıştır.

3.3.8 Veri analizleri

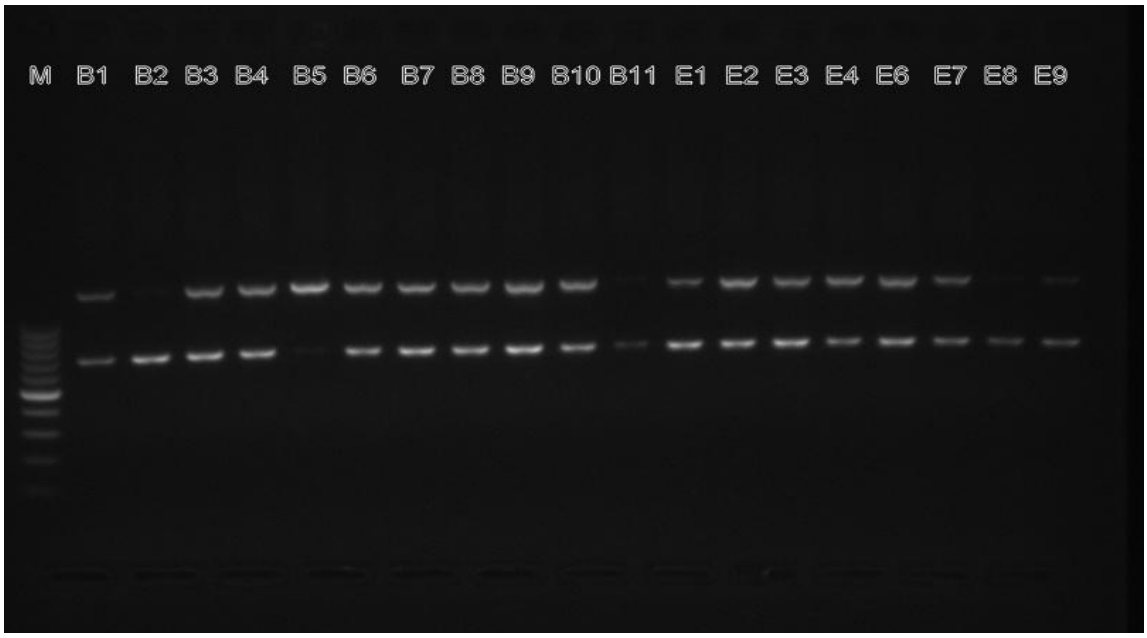
Elde edilen veri matrisi ile bireyler arasında genetik benzerlik ve mesafe oranı, polimorfizm oranı, heterozigotluk değerleri gibi istatistikler POPGENE (Population Genetic Analysis Software) programı ile hesaplanmıştır [28]. Populasyonlar arası benzerlik ve uzaklık çeşitli yöntemlerle belirlenebilir. Bu çalışmada uygulanan Nei (1972) indeksine göre benzerlik ve farklılık indeksi “0” ve “1” arasında değişmektedir. İndeks değeri “0” iken tam benzer olduğunu, indeks “1” e doğru yaklaştıkça benzerliğin azaldığını gösterir. Nei indeksinde, genetik farklılığın temel olarak mutasyon ve genetik sürüklenmeden kaynaklanabileceği belirtilmektedir.

BÖLÜM IV

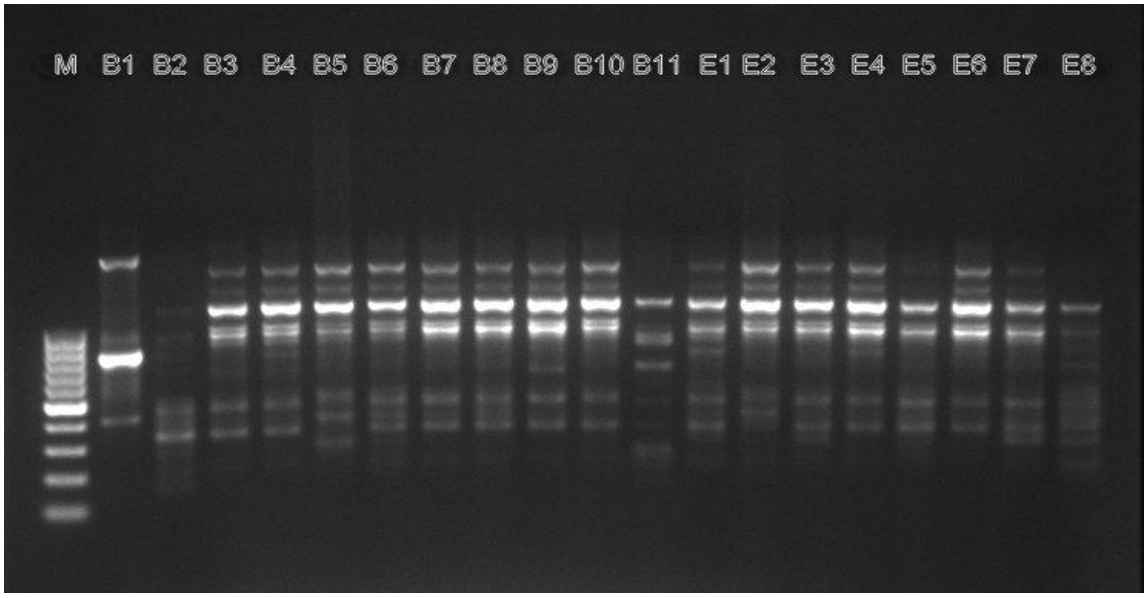
BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan 14 RAPD primerinden 11 tanesi, Kayseri ve Niğde illerindeki toplam 20 lokaliteden elde edilen afit örnekleri için değerlendirme yapılabilecek özellikte bant sonuçları vermiştir. Sonuç alınan 11 primere ait agaroz jel elektroforezi görüntü fotoğrafları 4.1-11'de verilmiş ve bantların değerlendirilmesi ile oluşturulan veri setinin analizi, POPGENE programı ile yapılmıştır [28].

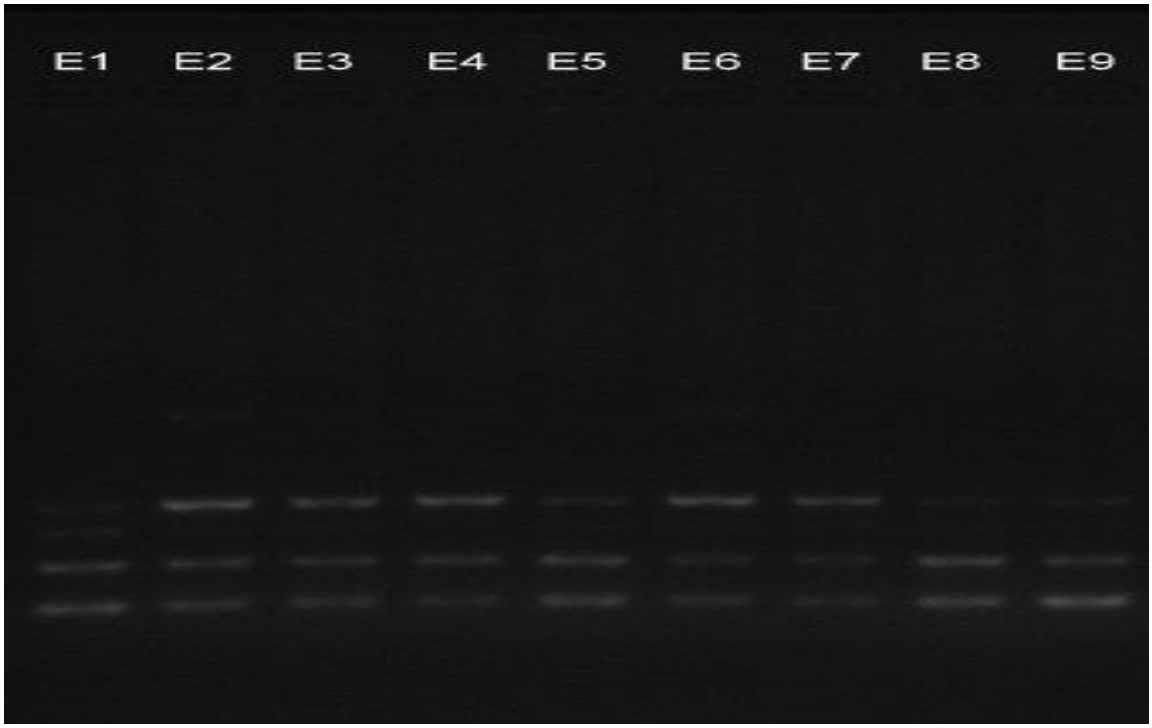
Fotoğraf 4.1 S21 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E5:Talas(1)/Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



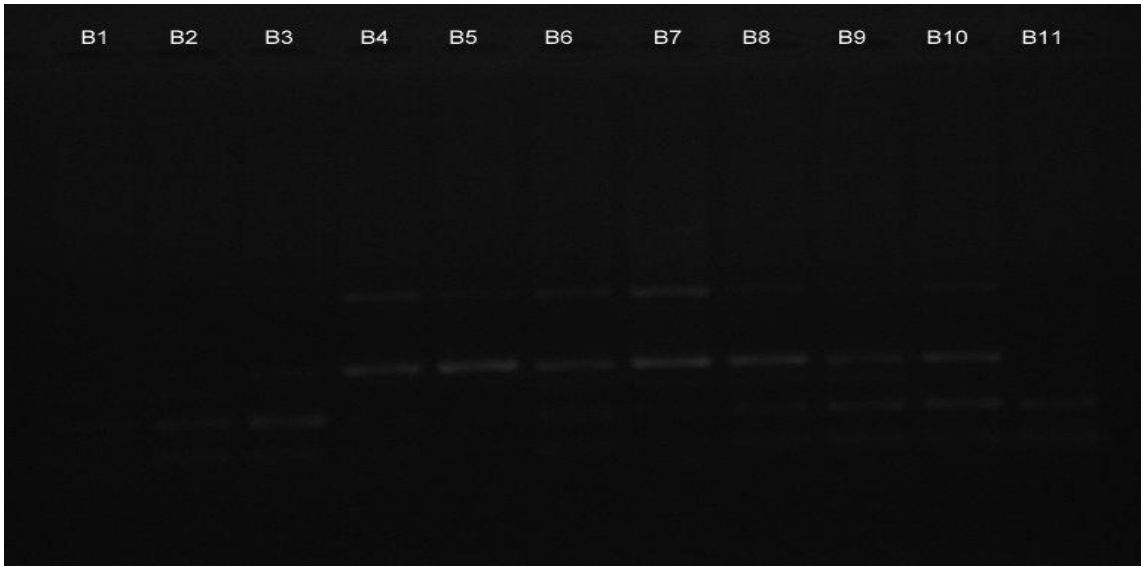
Fotoğraf 4.2 S37 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



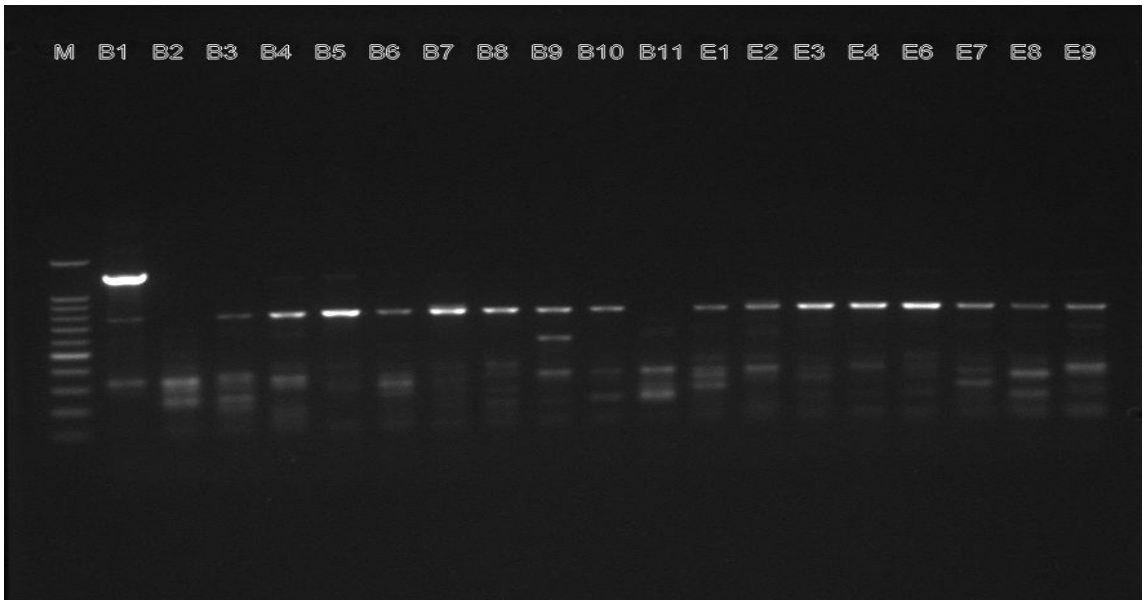
Fotoğraf 4.3 S39 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E5:Talas(1)/Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri



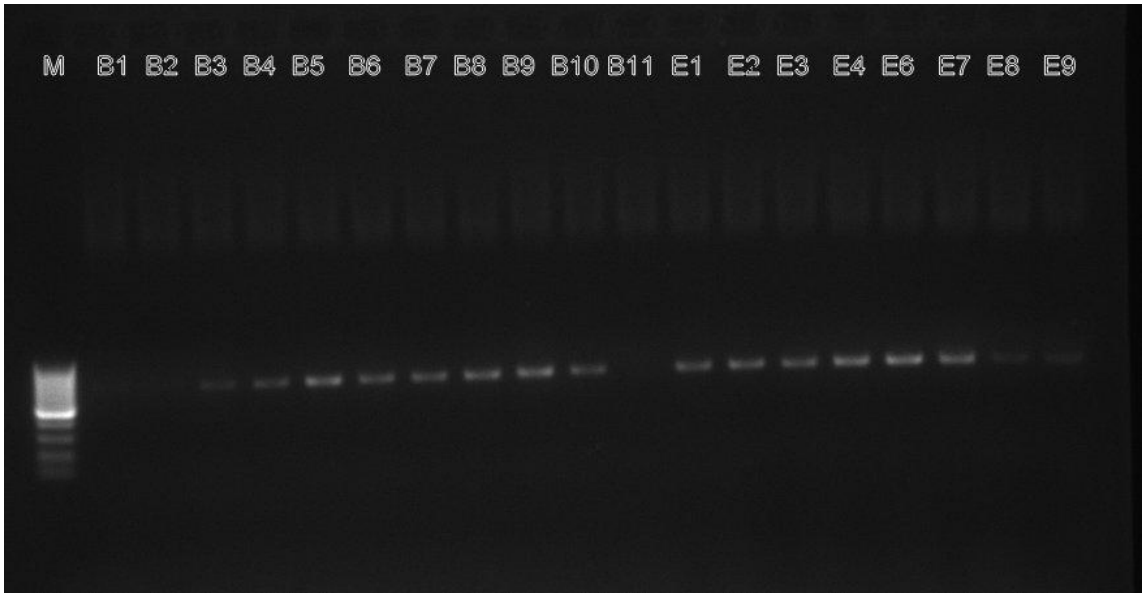
Fotoğraf 4.4 S40 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen Kayseri populasyonu bant profilleri M:Belirteç, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E5:Talas(1)/Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



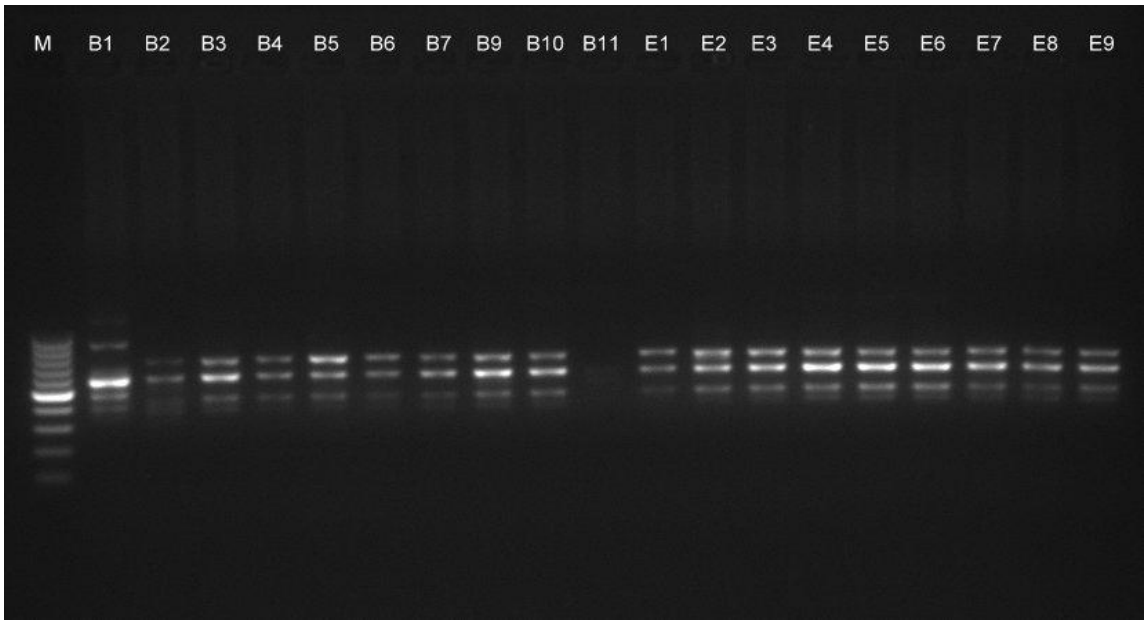
Fotoğraf 4.5 S40 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen Niğde populasyonu bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde



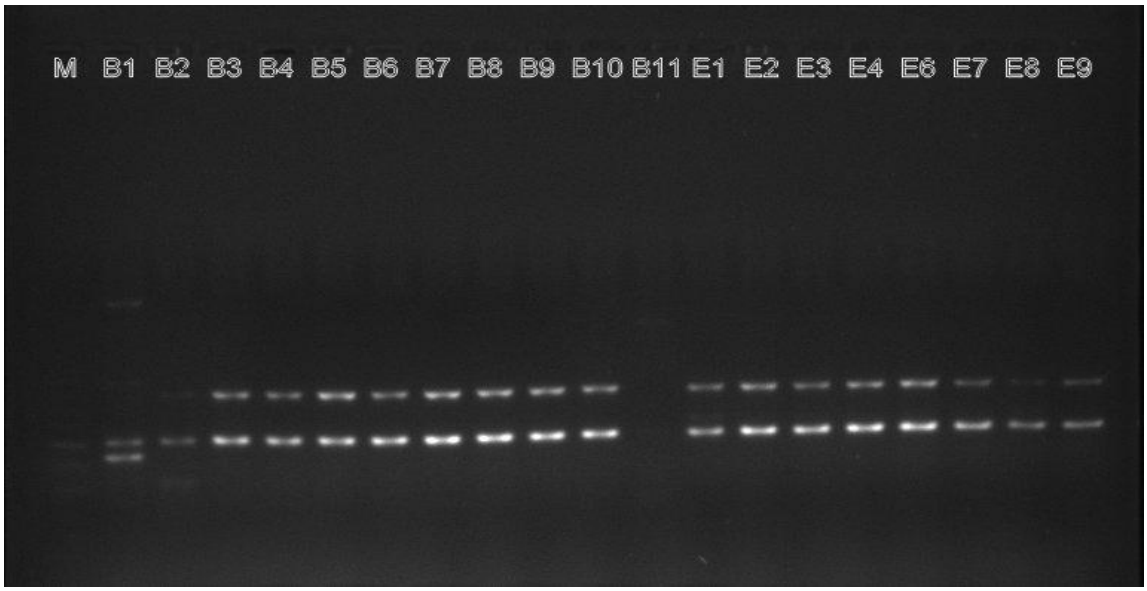
Fotoğraf 4.6 S41 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



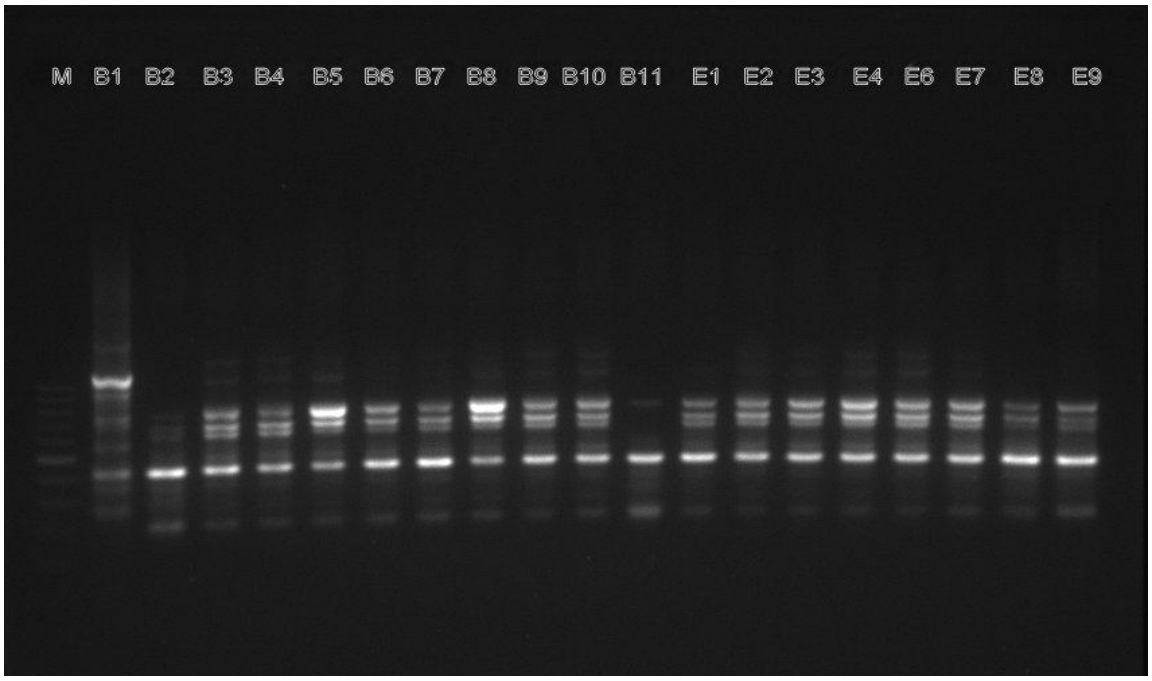
Fotoğraf 4.7 S59 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



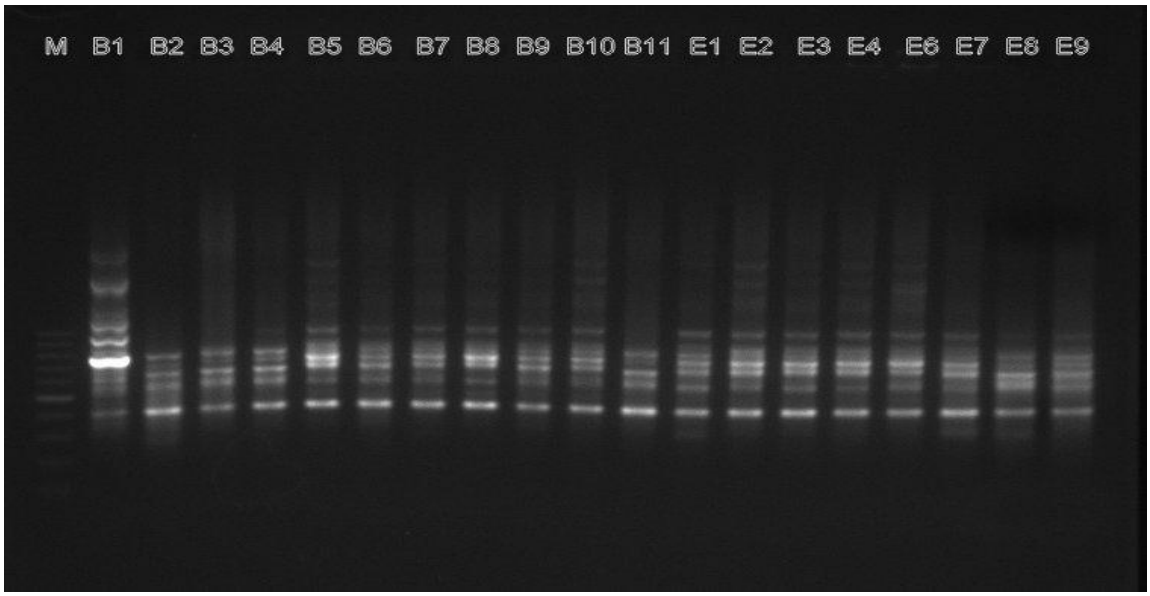
Fotoğraf 4.8 S71 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E5:Talas(1)/Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



Fotoğraf 4.9 S72 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



Fotoğraf 4.10 S78 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri



Fotoğraf 4.11 S79 RAPD primeri ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant profilleri M:Belirteç, B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri

P. spyrothecae örnekleri için sonuç veren 11 RAPD primerinden elde edilen polimorfik bant sayısı, toplam 52 olarak tespit edilmiş olup en yüksek polimorfik bant sayısı sekiz bant ile S79 primerinde iken, en düşük bant sayısı ise S21 ve S59 primerlerinde bir bant olarak tespit edilmiştir. S37 primerinin 2 bant, S39 primerinin 7 bant, S40 primerinin 4 bant, S41 primerinin 7 bant, S71, S72 ve S78 primerlerinin 6 bant ve S89 primerinin ise 2 bant verdiği görülmüştür (Çizelge 4.1, 4.2).

Çizelge 4.1 Sonuç veren 11 primerden elde edilen polimorfik bant sayısı

Primer Adı	**Baz Dizilimi(5'-3')**	**Polimorfik bant sayısı**
S21	5'- CAG GCC CTT C-3'	1
S37	5'- GAC CGC TTG C-3'	2
S39	5'-CAA ACG TCG G -3'	7
S40	5'- GTT GCG ATC C- 3'	4
S41	5'- ACC GCG AAG G-3'	7
S59	5'- CTG GGG ACT T -3'	1
S71	5'-AAA GCT GCG G-3'	6
S72	5'-TGT CAT CCC C- 3'	6
S78	5'-TGA GTG GGT G -3'	6
S79	5'- GTT GCC AGC C-3'	8
S89	5'-CTG ACG TCA C -3'	2

Çizelge 4.2 Niğde ve Kayseri populasyonlara ait örnekler için sonuç veren 11 primerin lokalitelere göre vermiş olduğu polimorfik bant sayıları B1:Kemerhisar/Niğde, B2:Çiftlik/Niğde, B3:Azatlı/Niğde, B4:Burç Köyü/Niğde, B5:Elmalı/Niğde, B6:Çamardı/Niğde, B7:Edikli/Niğde, B8:Karaatlı/Niğde, B9:Gümüşler/Niğde, B10:Bor/Niğde, B11:Merkez/Niğde, E1-E2:İncesu/Kayseri, E3:Yukarı Talas/Kayseri, E4:Mithatpaşa mah./Kayseri, E6:Hacılar/Kayseri, E7:Kocasinan/Kayseri, E8:Talas(2)/Kayseri, E9:Talas(3)/Kayseri

Primer	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**	**B8**	**B9**	**B10**	**B11**		**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**E5**	**E6**	**E7**	**E8**	**E9**
S21	----	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-----		1	1	1	1	1	1	1	1	1
S37	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2
S39	4	5	6	7	5	6	6	6	6	6	5		5	5	7	6	4	6	6	4	2
S40	----	1	2	2	2	3	2	3	2	3	1		4	3	4	3	4	4	4	4	3
S41	3	3	4	4	7	4	3	5	3	3	3		5	3	3	2	----	5	4	4	5
S59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-----		1	1	1	1	1	1	1	1	1
S71	5	3	3	3	3	3	3	----	3	4	1		3	6	3	5	5	5	3	3	3
S72	6	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1		2	2	2	2	----	2	2	2	2
S78	5	2	4	4	4	5	5	4	5	5	2		5	5	4	4	----	6	6	4	5
S79	8	5	5	5	6	7	7	6	6	6	4		7	7	7	7	----	7	7	5	6
S89	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	----	----	----

4.1 *P. spyrothecae*'nin Niğde ve Kayseri populasyonlarının istatiksel analizi

P. spyrothecae'nin Niğde ve Kayseri populasyonları için Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik varyasyon değerleri, Çizelge 4.1.4'de verilmiştir. Niğde populasyonu için genetik çeşitlilik değeri H= 0.2542, Kayseri populasyonu için ise genetik çeşitlilik değeri H=0.2290 olup ortalama genetik çeşitlilik değeri H=0,2776, ortalama polimorfik lokus sayısı 46 ve ortalama polimorfik lokus yüzdesi ise % 92 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.4).

Çizelge 4.1.1 *P. spyrothecae*' nin Nei'ye (1987) göre Niğde ve Kayseri populasyonlarının ortalama genetik varyasyon analiz sonuçları

Lokalite	Örnek sayısı	Na	Ne	H	I	P	% P
Niğde	55	1,8000	1,4499	0,2542	0,3816	40	80
Kayseri	45	1,5600	1,4082	0,2290	0,3322	28	56
Ortalama	100	1,9200	1,4651	0,2776	0,4225	46	92

P.spyrothecae populasyonlarının genetik farklılaşmayı (Nei 1987) ifade eden değerleri Çizelge 4.1.5'te verilmiştir. Populasyonlar arasında genetik farklılaşmayı ifade eden Gst değeri 0,1267 iken populasyonlar arasında gen akışını gösteren Nm değeri ise 3,4451'dir (Çizelge 4.1.5). Çizelge 4.1.5' e göre genetik farklılaşmanın ölçüsü olan Gst değerinin 0,1267 olarak bulunması orta derecede bir farklılaşmayı ifade ederken gen akışının nispeten yüksek olduğu bilinmektedir.

Çizelge 4.1.2 *P. spyrothecae* alt popülasyonlarında genetik farklılaşma analizi (Nei 1987)

Örnek sayısı	Ht	Hs	Gst	Nm
100	0.2767	0.2416	0.1267	3.4451

P. spyrothecae'nin Niğde ve Kayseri populasyonları arasındaki genetik mesafe ve genetik benzerlik değerleri Nei'ye (1972) göre hesaplanmış ve Çizelge 4.1.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.1.6' ya göre Niğde ve kayseri populasyonlarının yaklaşık olarak % 91 civarında bir benzerlik gösterdiği görülmektedir. İki populasyon arasındaki genetik benzerliğin yüksek olması çok yüksek genetik farklılaşma olmaması ve gen akışının nispeten yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4.1.3 *P. spyrothecae*' nin Niğde ve Kayseri populasyonlarına ait genetik mesafe (alt diyagonal) ve genetik benzerlik (üst diyagonal) hesaplamaları (Nei 1972)
1:Niğde 2:Kayseri

	1	**2**
1	*****	0.9076
2	0.0969	*****

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tür içi ve türler arası genetiksel farklılıkların ortaya çıkışında populasyonların yaşadığı alanın coğrafik özelliklerinin etkin bir rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Bu etki sonucunda görülebilecek tür içi genetik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında böceklerde ve spesifik olarak afitlerde RAPD tekniklerinin uygulandığına ve başarılı sonuçlar ortaya konulduğuna dair çok sayıda çalışma vardır [14,15,19,23].

Bu çalışmanın ana materyalini oluşturan *P. spyrothecae* türünün Niğde ve Kayseri'den örneklendiği lokalitelerin coğrafik özellikleri değerlendirildiğinde Niğde populasyonunun örneklendiği alanların coğrafik olarak daha heterojen özellikler gösterdiği, özellikle de daha yüksek rakımlı alanlardan örnekleme yapılmıştır. Bu heterojen coğrafik koşulların etkili olabileceği düşünülerek, Niğde populasyonlarında polimorfik lokus sayısı 40 ve polimorfizm oranı % 80 civarında ölçülmüştür.

Kayseri populasyonlarının örneklendiği alanların coğrafik özellikleri Niğde populasyonları ile kıyaslandığında birbirine daha fazla benzer özellikler göstermiş ve Kayseri populasyonlarında polimorfik lokus sayısı 28, polimorfizm oranı ise % 56 olarak belirlenmiştir.

Bir populasyondaki heterozigotluk oranının yüksekliği o populasyonda genetik çeşitliliğin yüksekliğini göstermektedir. Heterozigotluk göstergelerinden biri olarak etkili allel sayısı (N_e) dikkate alınmaktadır. Niğde ve Kayseri populasyonlarının etkili allel sayıları dikkate alındığında Niğde populasyonlarının etkili allel sayısının (1,45) Kayseri populasyonlarının etkili allel sayısından (1,40) kısmen de olsa yüksek olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısındaki bu farklılık Niğde örneklerinin elde edildiği alanın daha heterojen olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada 11 primer ile elde edilen verilerin analizi sonucunda Niğde ve Kayseri populasyonları arasındaki genetik benzerlik değeri indeksi (0,9076), genetik farklılık değeri indeksi (0,0969) olarak bulunmuştur. Genetik benzerlik ve genetik uzaklık indekslerinin hesaplanmasının yanında populasyondaki heterozigotluk oranı verileri de değerlendirilmiş ve populasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu (HS) 0,2416; tüm populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu (HT) 0,2767; her örnek için gözlenen allel sayısı (Na) 1,9200; etkili allel sayısı (Ne) 1,4651 olarak belirlenmiştir. Elde edilen heterozigotluk verileri, genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerlerini

destekleyici veriler göstermiştir. Hesaplanan genetik benzerlik ve farklılık indeksleri değerlendirildiğinde Niğde ve Kayseri'den örneklenen *Pemphigus spyrothecae* populasyonları arasında benzerlik değerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Her ne kadar Niğde populasyonlarının örneklendiği alan, Kayseri populasyonlarının örneklendiği alandan daha heterojen olsa da populasyonlar arasında büyük genetiksel farklılıklara yol açabilecek düzeyde olmadığı görülmektedir. Bunlara ilaveten populasyonlar arasındaki gen akış değeri de (Nm) dikkate alındığında hesaplanması gen akışı değerinin (Nm=3,44) nispeten yüksek oranda bulunması, gen akışının devam ettiğini göstermektedir. Nispeten yüksek düzeyde gen akışı iki populasyonun benzerlik oranlarının da yüksek olmasında önemli rol oynamıştır.

Örnekleme yapılan alanların coğrafik özellikleri dikkate alındığında populasyonlar arasında ortaya çıkan bu farklılıkta ortam koşullarının rol oynadığı kabul edilebilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar benzer şekilde Tunus'ta *Macrosiphum euphorbiae* 'nin farklı coğrafik bölgelerdeki aynı konak bitkilerden örneklenen populasyonlardaki genetik farklılıkların RAPD teknikleri ile gösterilmesi ile paralellik göstermektedir [14]. Bu çalışmada aynı konakta beslenen afit türünün coğrafik koşullara göre genetik yapısında farklılık gösterilmiştir. Buna karşılık genetik çeşitlilik üzerine etki edebilen bir diğer faktör de konak bitkidir. Tunus' ta yapılan bir çalışmada, Rosaceae ve Rutaceae familyaları üyelerinden örneklenen *Aphis spiraecola* populasyonlarının genetik çeşitliliğini karakterize etmek için RAPD belirteçleri kullanılmış ve genetik çeşitlilik üzerinde coğrafik yapının değil konak bitkinin önemli bir etken olduğu görülmüştür [24]. Ayrıca coğrafik faktörlerin genetik farklılıklar üzerinde her zaman aynı oranda etkili olmadığı, coğrafik faktörün etki gücünün önemi de daha önce bazı çalışmalarda gösterilmiştir [2].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar göre coğrafik koşullar Niğde ve Kayseri populasyonlarının kendi içlerindeki çeşitlilikte önemli rol oynasalar da iki populasyon arasında çok büyük farklılık yaratacak kadar güçlü olmadığı anlaşılmaktadır. RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliğinin sınırlı olmasından dolayı *P. spyrothecae* türünün genetik karakterizasyonunun ortaya konulmasında daha fazla lokalite ve örnek üzerinde bu tekniğin yanı sıra diğer moleküler tekniklerin de kullanılmasının daha güvenilir ve destekleyici bilgiler elde edilmesini sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

[1] Dixon, A.F.G., Aphid Ecology, Chapman & Hall, 1998.

[2] Abdallah, Z., Mezghani- Kkhemakhem, M., Bouktila, D., Makni, H. and Makni, M., Genetic diversity of an invasive pest (Oryctes agamemnon Burmeister, Coleoptera: Scarabaeidae) of date palm in Tunisia, inferred from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, 7(7), 1170-1176, 2012.

[3] Sümer, F., Çukurova bölgesi' ndeki Trichogramma türlerinin (Hymenoptera, Trichogrammatidae) teşhisinde moleküler yöntemlerin kullanımı, Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2009.

[4] Lima, L. H. C., Campos, L., Moretzsohn, M. C., Navia, D. and De Oliveira, M. R. V., Genetic diversity of Bemisia tabaci (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers, 25, 2, 217-223, 2002.

[5] Avise, J. C., Molekuler markers, natural history and evolution chapman and hall, London, 1994.

[6] Pike, N., Whitfield, J. A. and Foster, W. A., Ecological correlates of sociality in *Pemphigus* aphids, with a partial phylogeny of the genus, 7:185, 2007.

[7] Coeur d'acier, A., Jousselin, E., Martin, J.- F., Rasplus, J.- Y., Phylogeny of the genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitocondrial DNA sequences, 44, 598-611, 2007.

[8] Odagiu, A., Oroian, I., Balteanu, V., Iederan, C., Braşovean, I., Balint, C., Improving sample preparation and DNA extraction method in aphids, 41(1), 2009.

[9] Molloch, G., Highet, F., Kasprowicz, L., Pickup, J., Neilson, R. and Fenton, B., Microsatellite marker analysis of peach-potato aphids (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae) from Scottish suction traps, 96, 573-582, 2006.

[10] Shufran, K. A. and Payton, T. L., Limited genetic variation within and between Russian Wheat Aphid (Hemiptera : Aphididae) biotypes in the United States, 102(1): 440-445, 2009.

[11] Shufran, K. A., Kirkman, L. R. and Puterka, G. J., Absence of mitokondrial DNA sequence variation in russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae) populations consistent with a single introduction into the United States, 80(4), 319-326, 2007.

[12] Peng, G., Xiao-xi, Z., Xiao-wen, Y., Xiao-feng, C., RAPD-PCR detection of DNA polymorphism of cotton aphid, 7(1), 41-46, 2000.

[13] Xu, Z., Chen, J., Cheng, D., Liu, Y., Frederic, F., Genetic Variation Among the Geographic Population of the Grain Aphid, Sitobion avenae (Hemiptera: Aphididae) in China Inferred from Mitochondrial COI Gene Sequence, 10(7), 1041-1048, 2011.

[14] Raboudi, F., Makni, H. and Makni, M., Genetic diversity of potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*, populations in Tunisia detected by RAPD, 19(1): 133-140, 2011.

[15] Lopes-da-Silva Luiz, M. and Gonzaga Esteves Vieira, Analysis of the genetic diversity in*Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera, Aphididae) by RAPD markers,

[16] Inbar, M., Wink, M. and Wool, D., The evolution of host plant manipulation by insects: moleculer and ecological evidence from gall-forming aphids on *Pistacia*, 32, 504-511, 2004.

[17] Nicol, D., Armstrong, K.F., Wratten, S.D., Walsh, P., Cameron, C.M., Lahmann, C. and Frampton, C., Genetic diversity of two introduced aphid species in New Zealand, 322-326, 1997.

[18] El Mujtar, V., Covelli, J., Delfino, M. and Grau, O., Moleculer identification of *Cinara cupressi* and *Cinara thujafilina* (Hemiptera, Aphididae), 38(2):505-512, 2009.

[19] Bulman, S. R., Stufkens, M. A. W., Nichol, D., Harcourt, S. J., Harrex, A. L., Teulon, D. A. J., Rhopalosiphum aphids in New Zealand. I. RAPD markers reveal limited variability in lineages of *Rhopalosiphum padi*, 32:29-36, 2005.

[20] Lu, W. N., Wu, Y. T. and Kuo, M. H., Development of species- specific primers for the identification of aphids in Taiwan, 43(1): 91-96, 2008.

[21] Helmi, A., Khafaga, A. F. and El- Fatih, M. M., Molecular fingerprinting of cereal aphids in Egypt (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) using RAPD and ISSR markers, 6(1):363-376, 2011.

[22] Lushai, G., Loxdale, H. D., Brookes, C. P., Von Mende, N., Harrington, R. and Hardie, J., Genotypic variation among different phenotypes within aphid clones, 264, 725-730, 1997.

[23] Angela, C., Mazzoni, E., Pecchioni, N., Rau, D., Cassanelli, S., Bizzaro, D. and Manicardi, G., Genetic variability among different Italian populations of the aphid Myzus persicae, 59,326-333, 2006.

[24] Mezghani-Khemakhem, M., Bouktila, D., Kharrat, I., Makni, M. and Makni, H., Genetic variability of gren citrus aphid populations from Tunisia, assessed by RAPD markers and mitocondrial DNA sequences, 1479-8298, 2011.

[25] Öz Aydın, S., RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği, DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6, 2004.

[26] Yılmaz, S., Devran, Z., Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları, Narenciye ve seracılık araştırma enstitüsü, Antalya.

[27] Pike, N. and Foster, W., Fortress repair in the social aphid species *Pemphigus spyrothecae*, 67, 909-914, 2004.

[28] Balcıoğlu, M. S., Şahin, E., Karabağ, K., Karslı, T., Alkan, S., Türkiye yağlı kuyruklu koyun ırklarında DNA parmak izinin RAPD-PCR yöntemi kullanılarak saptanması, Araştırma makalesi, Tarım bilimleri dergisi, 2010.