

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU'DA BULUNAN STAPHYLINIDAE  
FAMİLYASINA AİT *OCYPUS* CİNSİ ÜYELERİNİN MOLEKÜLER  
SİSTEMATİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha TÜMAY

Balıkesir, Temmuz – 2011

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU'DA BULUNAN STAPHYLINIDAE  
FAMİLYASINA AİT *OCYPUS* CİNSİ ÜYELERİNİN MOLEKÜLER  
SİSTEMATİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha TÜMAY

Balıkesir, Temmuz – 2011

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU'DA BULUNAN STAPHYLINIDAE  
FAMİLYASINA AİT OCYPUS CİNSİ ÜYELERİNİN MOLEKÜLER  
SİSTEMATİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha TÜMAY

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sakin Vural VARLI

Sınav Tarihi: 18.07.2011, saat 14.00

Jüri Üyeleri: Yard. Doç. Dr. Sakin Vural VARLI (Danışman-BAÜ)

Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ)

Yard. Doç. Dr. İsmet BAŞARAN (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2011

**Bu Yüksek Lisans Çalışması Balıkesir Üniversitesi 2011 / 34 No'lu  
Araştırma Projesi İle Desteklenmiştir.**

## ÖZET

### DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU'DA BULUNAN STAPHYLINIDAE FAMILYASINA AİT OCYPUS CİNSİ ÜYELERİNİN MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ

Sabiha TÜMAY

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard.Doç.Dr. Sakin Vural VARLI)

Balıkesir, 2011

Staphylinidae familyası, böcekler hatta hayvanlar alemi içindeki en büyük familyadır, fakat familya üyeleri arasındaki filogenetik ilişkiler hala yeterli bir şekilde aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan Staphylinidae familyasının *Ocypus* cinsine ait yedi taksonun moleküler sistematik analizi yapılmıştır. Yedi *Ocypus* türü için nükleotit dizileri mitokondriyal sitokrom oksidaz (CO) geninin iki bölgesinden (COI,II), 18S çekirdek ribozomal DNA'sından ve 28S çekirdek ribozomal DNA'sından elde edildi. Bunun için yedi böcek türünden genomik DNA saflaştırıldı. İzole edilen genomik DNA örneklerinden bahsedilen üç gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan DNA bölgelerinin dizi analizleri yapıldı ve CLUSTALW programı ile filogenetik ağaç oluşturulup türler arasındaki filogenetik ilişki yorumlandı.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Staphylinidae, *Ocypus*, COI, COII, 18S rDNA, 28S rDNA, Filogenetik analiz, CLUSTALW

## ABSTRACT

### MOLECULAR TAXONOMIC ANALYSIS OF *OCYPUS* MEMBERS STAPHYLINIDAE DISTRIBUTED IN EAST AND SOUTH EAST ANATOLIA

Sabiha TÜMAY

Balıkesir University, Department of Biology

(M.S. Thesis / Advisor : Assistant Prof. Dr. Sakin Vural VARLI)

Balıkesir - Turkey, 2011

The family Staphylinidae is one of the largest family of beetles and indeed of animals, but the phylogenetic relationship among the members of this family are still poorly understood. In this study; seven taxons of Staphylinidae family's *Ocypus* genera which are distributed in East and South-East Anatolia of Turkey has been studied with respect to molecular systematics analysis. Nucleotide sequence were obtained from mitochondrial cytochrome oxidase subunits I, II (COI, COII) and nuclear ribosomal DNA's 18S and 28S genes. Total genomic DNA of seven insect species have been extracted using a commercial kit. Isolated DNA regions have been amplified using three primer pairs with PCR. Amplified DNA samples were sequenced and the aligned sequences were used to construct a phylogenetic tree using CLUSTALW program.

**KEYWORDS:** Staphylinidae, *Ocypus*, COI, COII, 18S rDNA, 28S rDNA, Phylogenetic Analysis, CLUSTALW

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b>	<b>ii</b>
<b>ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
<b>KEY WORDS</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iv</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Böcekler	1
1.2 <i>Ocypus</i> Cinsin Böcek Sistematikindeki Yeri	2
1.3 Staphylinidae Familyasının Morfolojisi	4
1.4 Böcek Taksonomisinde Kullanılan Moleküler Belirteçler	5
1.5 DNA Analizinde Kullanılan Hedef Genler	8

<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>22</b>
2.1 Çalışmada Kullanılan Böcekler	22
2.2 DNA İzolasyonu	22
2.3 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması	23
2.4 Agaroz Jel Elektroforezi	26
2.5 DNA Dizileme	26
2.6 Biyoinformatik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturma	26
<b>3. BULGULAR</b>	<b>27</b>
3.1 DNA İzolasyon Sonucu	27
3.2 Kullanılan Primerlere Göre PCR Sonuçları	27
3.3 Filogenetik Analiz Sonuçları	29
<b>4. SONUÇ ve TARTIŞMA</b>	<b>32</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>34</b>



## KISALTMALAR

<u>Kısaltmanın Adı</u>	<u>Tanımı</u>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
SSR	Simple Sequence Repeat
mtDNA	Mitokondriyal DNA
rDNA	Nükleer Ribozomal DNA
gDNA	Genomik DNA
bp	Base Pair (Baz Çifti)
kb	Kilo base (1000 baz çifti)
rRNA	Ribozomal RNA
tRNA	Transfer RNA (Taşıyıcı RNA)
ATP	Adenosinetriphosphate
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
CO I	Cytochrome Oxidase I
CO II	Cytochrome Oxidase II
CO III	Cytochrome Oxidase III
Cytb	Cytochrome b
ND1	NADH dehydrogenase 1
LSU rDNA	Large subunit ribozomal DNA
SSU rDNA	Small subunit ribozomal DNA
ETS	External transcribed spacer
NTS	Nontranscribed spacer
IGS	Intergenic spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer

<b>Amy</b>	$\alpha$ -amylase
<b>Adh</b>	Alcohol dehydrogenase
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	Elongation factor-1-alpha
<b>g6pdh</b>	Glycerol-6-phosphate dehydrogenase
<b>per</b>	Period
<b>Tipi</b>	Triosephosphate isomerase
<b>Wg</b>	Wingless
<b>Xdh</b>	Xanthine dehydrogenase
<b>RT-PCR</b>	Reverstranskriptaz PCR
<b>cDNA</b>	Complementary Deoxyribonucleic Acid
<b>QTL</b>	Quantitative trait loci
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tag
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile Su
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosid trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetikasit
<b>EtBr</b>	Etidyumbromid
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Trisborateetilendiamintetraasetikasit
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeat

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil Numarası</u></b>	<b><u>Adı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1	Böcek mitokondriyal DNA'sının şematik gösterimi	10
Şekil 2	Ribozomal DNA'ların tekrar bölümlerinin şematik gösterimi	12
Şekil 3	Moleküler belirteç veya gen bölgelerinin kategorik seviyelerde gösterimi	15
Şekil 4	DNA izolasyon sonucunu gösteren jel görüntüsü	27
Şekil 5	<i>Ocypus</i> ait 7 türden elde edilen DNA'ların CO1 - Leu - CO2 bölgelerini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü	28
Şekil 6	<i>Ocypus</i> ait 7 türden elde edilen DNA'ların 18S ribozomal DNA bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü	28
Şekil 7	<i>Ocypus</i> ait 7 türden elde edilen DNA'ların 28S ribozomal DNA bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü	29
Şekil 8	<i>Ocypus</i> 'un 7 türünün mitokondriyal DNA'larındaki CO1-Leu-CO2 bölgesi kullanılarak oluşturulan dal uzunluklarının da gösterildiği dendogram	30
Şekil 9	<i>Ocypus</i> 'un 7 türünün 28S ribozomal DNA bölgesi kullanılarak oluşturulan dal uzunluklarının da gösterildiği dendogram	30
Şekil 10	<i>Ocypus</i> 'un 7 türünün 18S ribozomal DNA bölgesi kullanılarak oluşturulan dal uzunluklarının da gösterildiği dendogram	31

## TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1	PCR'da kullanılan kimyasal maddelerin miktarları ve konsantrasyonları	23
Tablo 2	PCR 'da kullanılan primerler ve nükleotit dizileri	24
Tablo 3	PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri	25
Tablo 4	PCR Reaksiyonları	25

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimime başladığım andan itibaren gerek çalışmalarında gerekse özel yaşamımda ihtiyacım olduğu her anda bütün imkanlarını sunarak benden desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Yard. Doç. Dr. Sakin Vural VARLI'ya,

Resmiyette danışmanım olmasa da bana çalışmanın birçok aşamasında danışmanlık yapan ve her türlü bilgisini ve laboratuvar imkanlarını esirgemedi paylaşan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında sabırla yardımcı olan, bilgilerini hiç çekinmeden paylaşan ve öğrendiklerimde büyük katkısı olan sevgili arkadaşım Şakir AKGÜN'e,

Böcek örneklerini toplayıp çalışmamız için bize veren Dr. Sinan ANLAŞ'a

2011 / 34 No'lu araştırma projesi ile maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a,

Laboratuvar deneyimlerinden faydalandığım hocalarım Öznur SUAKAR ve Görkem DENİZ SÖNMEZ'e,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Aylin TÜVEN, Selin ASLAN, Can ATEŞ ve Gökhan DURSUN'a

Ve bugünlere kadar gelirken her koşulda yanımda olan ve desteklerini her zaman hissettiren canım annem, babam ve kardeşime,

Çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

**Balıkesir, 2011**

**Sabiha TÜMAY**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Böcekler

Böcekler hayvanlar alemi içinde en geniş tür kompozisyonuna sahip gruptur. Bu geniş grubun taksonomik çalışmalarında yaygın olarak morfolojik karakterler kullanılmaktadır. Ancak morfolojik karakterlere göre sınıflandırma her zaman yeterli olamadığı için son zamanlarda taksonomik çalışmalarda moleküler sistematik teknikler kullanılmaya başlanmıştır. DNA markırları kullanılarak yapılan bu sınıflandırma ile böceklerde akrabalık ilişkilerinin belirlenebilmesi için gerekli bilgiler ortaya konulabilmektedir.

Böcekler, Dünya'da önemli bir yaşam şeklini temsil ederler. Şimdiye kadar 900000 kadar tür keşfedilmiştir ki bu da tüm hayvan türlerinin %75'ini kapsar [1]. Bu canlılar, çöllerden Antartika'ya kadar neredeyse tüm ekosistemlerde bulunabilirler. Bu şekilde geniş çaplı dağılım göstermesi onların farklı vücut yapılarına sahip olmaları, büyüklükleri, beslenme ve davranışlarındaki adaptasyon yetenekleri ve iyi bir ekolojik adaptasyona sahip olmalarından kaynaklanmaktadır [2].

Bu hayvanlar bitkilerde tozlaşmayı sağlarlar, zararlı böceklerle karşı doğal düşman olarak görev yaparlar ve insanlar için ipek, bal ve bal mumu gibi faydalı ürünler üretirler. Ancak bunların yanı sıra da tarımsal ürünlere, ormanlara, doğal kaynaklara zarar verirler, ölümcül hastalıkların yayılmasında vektör olarak görev yaparlar. Böylesine geniş çaplı dağılım göstermelerinin nedenleri; yaşam formlarını hangi genlerin ve genetik mekanizmaların kontrol ettiği, insanları doğrudan ya da dolaylı olarak nasıl etkiledikleri bugüne kadar üzerinde çalışılan konular olmuştur. Böceklerin çevreyle olan karmaşık ilişkileri onların davranışlarında ve morfolojilerinde

değişmelere neden olmuştur [3]. Bundan dolayı da bu canlıların değişimini ve dağılımını anlamak için böcek sistematigi çalışmaları önemlidir [4].

Günümüzde böceklerin sınıflandırılması daha çok morfolojik karakterler kullanılarak yapılması ile beraber [1, 5, 6] son yıllarda sınıflandırılmada moleküler tekniklerin kullanımı böcek taksonomisine yeni bir boyut kazandırmıştır [2, 7, 8]. Moleküler sistematik alanda; moleküler biyolojik araçlar arasında olan DNA hibridizasyon, PCR, PCR-RFLP, RAPD gibi tekniklerin hızlı bir şekilde gelişmesiyle birlikte bu teknikler kullanılarak ortaya çıkartılan moleküler bilgiler, taksonlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada kullanılmaktadır [9].

Bu çalışmada Coleoptera takımının Polyphaga alttakımına dahil olan Staphylinidae familyasının Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan *Ocypus* cinsine ait yedi tür üzerine moleküler sistematik teknikler kullanılarak, türler arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenmiş ve bu cinsin revizyonuna katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Yaptığımız literatür çalışması sonucunda *Ocypus* cinsiyle ilgili olarak dünya'da ve ülkemizde herhangi bir moleküler sistematik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda bu çalışmanın bu grup ve bu gruba yakın cinslerle ilgili yapılacak olan morfolojik ve filogenetik çalışmalara katkısı olacağı umudunu taşımaktayız.

## 1.2 *Ocypus* Cinsin Böcek Sistematigindeki Yeri

Alem	:	<i>Animalia</i>
Alt Alem	:	<i>Eumetazoa</i>
Filum	:	<i>Arthropoda</i>
Alt Filum	:	<i>Hexapoda</i>
Sınıf	:	<i>Insecta</i>

Takım	:	<i>Coleoptera</i>
Alt Takım	:	<i>Polyphaga</i>
İç Takım	:	<i>Staphyliniformia</i>
Üst Familya	:	<i>Staphylinioidea</i>
Familya	:	<i>Staphylinidae</i>
Alt Familya	:	<i>Staphylininae</i>
Oymak	:	<i>Staphylinini</i>
Alt Oymak	:	<i>Staphylinina</i>
Cins	:	<i>Ocypus</i>

Coleoptera; yaklaşık 350000 türle, böceklerin %40' ından fazlasını içeren, hayvanlar alemi içindeki en büyük takımdır. Bu büyük takımın Türkiye'de bulunan türlerinin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte yaklaşık olarak 7000 kadar olduğu tahmin edilmektedir. Coleoptera takımının Archostemata, Myxophaga, Adepaga ve Polyphaga olmak üzere 4 alt takımı vardır [10, 11].

Bu takımının Polyphaga alttakımına dahil olan Staphylinidae familyası böcekler, hatta hayvanlar alemi içerisindeki en geniş familyadır [12]. Bu familya, Dünya'da 31 altfamilya ya dahil olan 3847 cins ve yaklaşık 47744 tanımlanmış tür içerir [13, 14]. Türkiye'de ise 22 alt familyada 250 cins ve 1600 tür ve alttür bulunur [15]. Bunlardan Türkiye'de *Ocypus* cinsine ait 28 tür bulunduğu tahmin edilmektedir. *Ocypus* cinsinin, *Matidus*, *Ocypus* ve *Pseudocypus* olmak üzere 3 alt cinsi vardır. Bizim çalışmamızda kullandığımız *Ocypus* cinsine ait 7 türden 2'si (*Ocypus curtipennis* ve *Ocypus olens*) *Ocypus alt cinsine* ve 4'ü (*Ocypus mus*, *Ocypus excisus*, *Ocypus sericeicollis*, *Ocypus orientis*) *Pseudocypus* alt cinslerine dahildir. Staphylinid'lerin, oldukça geniş yayılışlarının bir sonucu çok çeşitli habitatlarda dağılış göstermeleridir. Staphylinidlerin çoğu karasal habitatlarda bulunur ancak 7 altfamilyaya dahil olan 102 cins içerisindeki 442 türün deniz kıyısında yaşadığı bilinmektedir [16, 17].



### 1.3 Staphylinidae Familyasının Morfolojisi

Staphylinidae erginleri 1mm'den 40mm'ye kadar değişin uzunlukta olabilirler ancak genellikle 7mm'nin altında oldukları bilinmektedir [18]. Tipik olarak ince, ve uzunlardır ve elitraları çok kısadır [19]. Güçlü karın kasları vardır ve vücutları çok esnektir; böylelikle de dar yarıklara kolaylıkla girebilmektedirler. Antenleri genellikle moniliform veya filiform tiptedir ve bazı durumlarda antenler zayıf bir topuz oluşturabilir. Baş prognat tiptedir. Gözlerin şekli değişkendir. Prothoraksın şekilleri değişik olup, lateral kenarları keskin veya yuvarlak olabilir [18]. Elitra tipik olarak kare şeklindedir ve elitranın genişliği neredeyse boyu kadardır [19]. Dinlenme halinde arka kanatlar elitranın altında katlanmış olarak bulunmaktadır [19]. Çoğu iyi uçucudur [20]. Uçma durumu dışında elitra tamamen kapalı durumda olmasına rağmen 6-7 abdomen segmenti açıkta kalmaktadır ve bu sebeple Staphylinidae familyasına ait bireylerin vücudu sanki 4 kısma ayrılıyormuş gibi görünmektedir. Baş, thoraks ve elitra ilk üç kısmı oluşturur ve bu kısımların büyüklükleri yaklaşık olarak birbirine eşittir. Dördüncü kısım açıkta kalan abdomendir ve büyüklüğü yaklaşık olarak önceki üç kısmın toplamı kadardır [21]. Abdomen genellikle esnektir ve kıvrılabilir. Bu familya üyeleri genellikle toprak, yaprak döküntüleri, leş, çöp, mantar gibi nemli habitatlarda bulunurlar [18]. Bazıları karınca termit yuvalarında bulunabilir [20]. Genellikle sokma kabiliyetleri yoktur ancak olmasa da sanki varmış gibi abdomenleri yukarıya kıvrık şekilde koşarlar [21].

Staphylinidae larvalarının vücutları genellikle ince, uzun, soluk renklidir ve koyu renkli başa sahiptirler. Larvalarının bazıları alg ve mantarlar üzerinden beslenirler fakat genellikle larvaları diğer eklembacaklılar ve toprak omurgasızları üzerinde predatördür. Bazıları da Diptera pupa ve larvaları üzerinde predatördür [22]. Genellikle erginlerle aynı habitatlarda bulunurlar [18].

#### **1.4 Böcek Taksonomisinde Kullanılan Moleküler Markırlar (Belirteçler)**

Moleküler biyolojik teknikler yirminci yüzyılın sonlarına doğru ortaya çıkmıştır. Özellikle Polymerase Chain Reaction (PCR) kullanılarak DNA çoğaltılmasındaki yenilik [23] ve otomatik DNA dizileme metodlarının kullanılmasının, nükleotit bölgelerinden oluşan moleküler belirteçlere başvurulmasına büyük etkisi olmuştur [24].

Moleküler belirteçler; taksonlar arasındaki varyasyonları ortaya çıkarmak için geliştirilmiş olup populasyon genetiğinden filogenetik yapılandırma ve taksonomiye kadar pek çok biyolojik problemlerin sonuçlandırılmasında etkili olmuştur [24].

Moleküler filogeni, türler arasındaki nükleotit bölge farklılıklarının belirlenmesi üzerine temellenmiştir. Şu anda, DNA bölgelerinin filogeni çalışmalarına en büyük katkıyı sağladığına dair hiçbir şüphe yoktur. Ancak hangi bölgelerin hangi genlerle karşılaştırılabileceği bir sorun olabilmektedir.

Organizmalar arasında kategorik seviyelerdeki problemlerin çözümü için kullanılacak uygun moleküler belirteçleri ya da gen bölgelerini seçmek oldukça zor bir süreçtir. Filogenetik analizlerin belki de en önemli basamağı sistematik problemler için uygun gen bölgesinin seçilmesidir. Moleküler belirteçleri ya da gen bölgelerini seçerken dikkatli davranmak gereklidir. Çünkü uygun olmayan moleküler belirteçlerin seçilmesiyle filogenetik ilişkilerde doğru sonuçlara ulaşılamaz. Yüksek şekilde korunmuş gen bölgeleri yüksek kategorik seviyelerdeki araştırmalar için uygundur. Diğer taraftan düşük kategorik seviyelerdeki filogenetik araştırmalar için ise oldukça fazla değişken gen bölgeleri kullanılmaktadır [25].

Böceklerdeki sistematik çalışmalar daha çok klasik olarak morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya göre yapılmaktadır [26, 27]. Organizmaların teşhislerinde morfolojik ve anatomik özelliklere göre teşhis,

sistemik kategorilerin belirlenmesinde yeterli olmayabileceği gibi bu şekilde yapılan teŖhisle yanlış tanımlamada yapılabilir. Çünkü organizmalar farklı habitatlarda yaŖayınca morfolojik olarak birbirlerinden farklılık göstermeleri sık karŖılaŖılabilen bir durumdur. Bu gibi durumlarda aynı türe ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterebilirler. Bu nedenlerle, son yıllarda sınıflandırma çalışmalarında daha çok moleküler tekniklere ağırlık verilmektedir.

Böcek taksonomisinde kullanılan moleküler belirteçler, protein belirteçleri ve DNA belirteçleri olarak ikiye ayrılabilir. Protein belirteçleri için allozim elektroforezi kullanılırken DNA çalışmaları için RFLP, RAPD, AFLP, SSR ve DNA dizi analizi gibi teknikler kullanılmaktadır.

#### **1.4.1 Protein Belirteçleri**

Protein belirteçleri, DNA teknolojisinin kullanımından önce elektroforetik enzim analizleri, farklı alellerin ortaya çıkartılması, tür içi ve türler arasındaki genetik çeŖitliliğın saptanması çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmıştır [28]. Türler arasında ya da bir türün farklı popülasyonları arasındaki genetik uzaklık, elde edilen alel frekanslarının analiziyle hesaplanabilir [29].

Allozim ve İzozimler 1960 ortalarından itibaren sistemik ve popülasyon genetiğında kullanılmaya baŖlanan protein belirteçleridir [30]. Allozimler, aynı lokus üzerinde farklı aleller tarafından kodlanan farklı formda enzimlerdir; izozimler ise farklı lokuslar üzerinde yer alan genler tarafından kodlanan fakat aynı fonksiyonu gören enzimlerdir.

Bu proteinlerin; Ŗekil, büyüklük, elektrik yükleri birbirinden farklı olduğu için jelde farklı şekilde göç ederler ve farklı şekilde görünürler. Allozimlerin poliakrilamid jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen bantlar belli bir genin farklı allellerini ayırt etmede kullanılır. Aynı şekilde izozimlerin jelde

yürütülmesiyle elde edilen bantların incelenmesiyle de farklı populasyonlar arasındaki genetik varyasyon gözlemlenebilir [31].

#### **1.4.2 DNA Belirteçleri**

DNA temelli marker sistemlerinin gelişmesiyle DNA belirteçlerinin, protein belirteçlerine göre polimorfizmleri ortaya çıkarmada daha iyi sonuç verdiği görülmüştür [32]. DNA bölgesinin intronlarında yer alan mutasyonların DNA seviyesinde protein seviyesinden daha fazla değişiklik göstermesi nedeniyle DNA belirteçleriyle, protein belirteçlerinden daha fazla polimorfizm elde edildiği saptanmıştır [2]. Ayrıca DNA numuneleri, proteinlere göre daha stabildir ve proteinlerden farklı olarak organizmaların bütün dokularında aynıdır. Bu yüzden DNA belirteçleri tür içindeki ya da türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için kullanılan çok yaygın bir belirteç haline gelmiştir.

Modern moleküler biyoloji, özellikle de DNA belirteç sistemlerindeki ilerleme böceklerde, moleküler ekoloji çalışmalarına ait zengin teknik bilgi oluşturmuştur [33]. Son 15 yıldır DNA belirteçleri böceklerde; filogeni, populasyon dinamiği, gen ve genom haritalama çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır [28, 34-37].

Entomolojide DNA markır sistemlerinin uygulanmaya başlanmasından itibaren, daha güçlü ve daha ucuz genotipik metodlar için yeni teknolojiler geliştirilmektedir ve böylelikle entomologlar, daha verimli böcek genleri çalışmaları için, geliştirilen markır sistemleri ve yeni teknikleri uygulamaktadırlar [2].

DNA belirteçleri, böceklerde genetik akrabalıkların belirlenmesi, populasyon dinamiği ve gen haritalama çalışmalarında, çalışmaların hızının artmasını sağlamaktadır. Özellikle eğer elimizde az böcek materyali varsa ya

da numuneler eski ve kuru ise bu gibi durumlar DNA belirteçlerinin kullanılması için uygun durumlardır [2, 28, 38].

Sınıflandırmanın her bir kategorik seviyesine uygun genel bir moleküler belirteç belirlemek zor olmaktadır. Çeşitli filogenetik problemleri aydınlatmak için pek çok moleküler belirteç ve genlerle çalışılmasına rağmen türler arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nükleer ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri kullanılarak yapılan çalışmalar en iyi sonuçları vermektedir (Şekil 3) [25].

Böcek türlerindeki genetik varyasyonları araştırmak için daha çok mtDNA ve nükleer rDNA belirteçleri tercih edilmektedir. Bu belirteçler, yakın zamanda birbirinden ayrılan türlerin fenotipik değişimi ve gelişiminin genetik temelleri ve tarihi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadırlar.

## **1.5 DNA Analizinde Kullanılan Hedef Genler**

- 1-Mitokondriyal DNA
- 2-Ribozomal DNA
- 3-Satellit DNA
- 4-İntronlar
- 5-Nükleer protein kodlayan genlerdir

### **1.5.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA)**

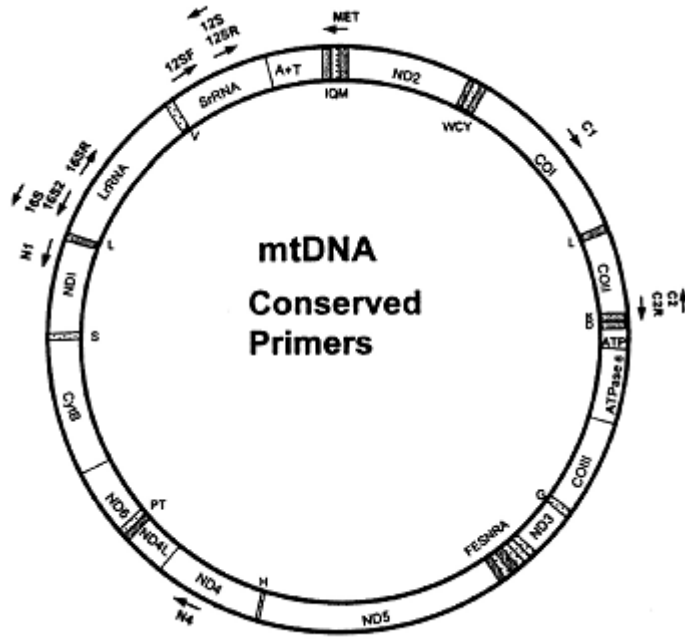
Mitokondriyal DNA (mtDNA), böceklerde genetik varyasyon çalışmaları için tercih edilen bir belirteçtir. Son zamanlarda tür bazında filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. Mitokondriyal gen bölgeleri filogenetik ve popülasyon genetiği çalışmalarında akraba böcek türlerinin tarih içindeki değişimini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu belirteçler, yakın zamanda birbirinden ayrılan türlerin

tarih içinde fenotipik değişimi ve farklılaşmasının genetik temellerinin iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır.

Mitokondriyal DNA, ökaryotlarda dairesel DNA molekülünden oluşmaktadır [39]. Mitokondriyal DNA'nın büyüklüğü genellikle 14kb-17kb arasındadır, fakat 40kb büyüklüğünde olanlarda bilinmektedir [40]. Büyüklüğündeki bu çeşitliliğe rağmen genin içeriğindeki varyasyon oranı oldukça azdır. Araştırmalar, boyutu büyük olanlarda, bu büyüklüğün mitokondriyal gendeki kodlanmayan bölgenin büyük olmasından ya da gendeki tekrarlı kısımların uzun olmasından kaynaklandığını göstermektedir [41, 42].

Hayvanlarda mitokondriyal DNA genellikle 36 ya da 37 gen içermektedir. Bunlardan şekil 1'de görüldüğü gibi 2 geni ribosomal RNA (16S rRNA ve 12S rRNA), 22 geni tRNA ve 12 ya da 13 geni ise mitokondriyal membranın alt üniteleri oluşturmaktadır. Bu alt üniteler; Sitokrom oksidaz I-III (COI-COIII), ATP sentetaz 6 ve ATP sentetaz 8 (A6 ve A8), NADH dehidrogenaz 1-6 ve NADH dehidrogenaz 4L (ND1-6, ND4L) ve sitokrom b apoenzimdir (Cytb) [43].

Ökaryotlarda mitokondriyal DNA'daki mutasyon oranları değişkendir. Mitokondrideki bazı bölgeler hızla değişirken, bazı bölgeler oldukça fazla korunmuştur. İşte bu farklı değişme hızına sahip bölgeler farklı taksonomik kategorilerin çalışılmasına imkan vermektedir [44]. Filogenetik çalışmalarda özellikle birkaç mitokondriyal DNA gen bölgesi (12S rDNA, 16rDNA, Cytb, ND1 ve COI) daha çok tercih edilmektedir. Genel olarak 12S rDNA ve 16S rDNA bölgeleri en korunmuş mitokondriyal gen bölgeleri arasındadır. COI ise, üç sitokrom oksidaz kodlayan gen arasında ve aynı zamanda ND1 ve 7 NADH dehidrogenaz kodlayan genler arasında en korunmuş olanıdır. şimdiye kadar Mitokondriyal DNA'nın en çok çalışılan gen bölgeleri arasında 12S ve 16S rDNA'ları, Cytb, ND1 ve COI bulunmaktadır [25].



**Şekil 1** Böcek mitokondriyal DNA'sının şematik gösterimi [45].

Mitokondriyal DNA'nın kontrol bölgesi değişken olmakla birlikte bu kontrol bölgeleri bireyler arasındaki varyasyonları oluşturur. Bu bölgenin büyüklüğü ve içerdiği tekrarların sayısı da değişkendir. Bu yüzden bu bölge türler, alttürler ya da populasyonlar arasındaki filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır [46, 47]. Mitokondriyal DNA hayvan taksonlarında filogenetik ilişkilerin araştırılmasındaki kullanımı gün geçtikçe artmaktadır [45].

Böceklerde; mitokondriyal belirteç kullanmanın bir avantajı, DNA'nın bu bölgelerde ki korunmuş mitokondriyal genlerden dizayn edilen primerler kullanılarak kolayca çoğaltılabilmesidir [48-52]. Böceklerde COI gen bölgesinin çoğaltılması için çeşitli evrensel primerler dizayn edilmiştir [50, 53]. Yakın zamanlarda 14 böcek takımı tarafından temsil edilen 33 böcek türünden mitokondriyal DNA bölgesini bir kısmının çoğaltılması için kullanılabilecek 12 korunmuş primer dizaynedilmiştir. Taksonların filogeni ve populasyon çalışmalarında primerlerin kullanımı çok faydalı olmaktadır [45]. Taksonlar için evrensel primerler ya da özel primerler geliştirilmektedir.

Böceklerde mitokondriyal DNA çalışmalarında en fazla sekansı çıkarılmış genler sitokrom oksidaz I (COI) ve sitokrom oksidaz II (COII), 12S ve 16S genleridir [8, 54, 55]. Mitokondriyal DNA belirteçlerinin çalışmalarda daha çok tercih edilmesinin çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenlerden bazıları olarak şunlar gösterilebilmektedir [2];

1-Her bir hücredeki mitokondriyal DNA sayısı çok fazladır ve dolayısıyla da elde edilmesi çok kolay olmaktadır.

2-Uygun olmayan koşullarda saklanmış örneklerle dahi mitokondriyal DNA'nın çoğaltılması kolay olmaktadır

3-Mitokondriyal DNA genleri anne tarafından aktarılan genlerdir

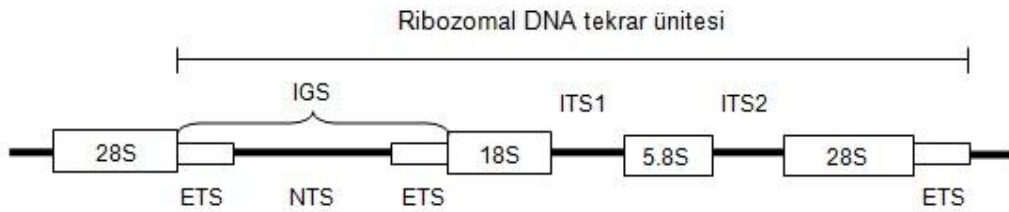
4-Mitokondriyal DNA hızlı gelişme göstermektedir.

### **1.5.2 Nükleer Ribozomal DNA (rDNA)**

Taksonomik çalışmalarda kullanılan bir diğer moleküler belirteç ribozomal DNA (rDNA)'dır. Ribozomlar, ribozomal RNA ve proteinlerden oluşmaktadır. Ökaryotik nükleer rDNA art arda dizilen yaklaşık 5000 kadar kopya sayısı içermektedir. Her bir tekrar ünitesi Şekil 2'de görüldüğü gibi 28S rRNA büyük alt birimi (large subunit ribozomal DNA, LSU rDNA), 18S rDNA küçük alt birimi (small subunit ribozomal DNA, SSU rDNA) ve 5.8S rDNA bölgelerinden oluşmaktadır [56]. Bunlara ilave olarak her tekrarda 5.8S rDNA'dan ayrılan ITS1 ve ITS2 (internal transcribed spacer) bölgeleri bulunur. Ribozomal DNA'nın büyük alt ünitesini (28S rDNA) ve küçük alt ünitesini (18S rDNA) birbirinden ayıran 2 ETS (external transcribed spacer) ve NTS (non-transcribed spacer) bölgeleri bulunmaktadır. ETS ve NTS ara bölgelerinin ikisine birden IGS (intergenic spacer) denilmektedir [25]. Nükleer rDNA çok sayıda tekrarlayan gen bölgesine sahip olmasına rağmen; onlar aynı diziyeye sahip olma eğilimindedir, ancak IGS bölgesi farklılık göstermektedir.



Nükleer rDNA'nın farklı bölgeleri arasındaki nükleotit dizileri, oldukça yakın türlerin ya da populasyonların arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır [25]. rDNA dizisinin her bir üyesinin filogenetik kullanılabilirliği test edilmiştir. IGS bölgesi, büyüklüğü ve yüksek varyasyon içermesinden dolayı filogenetik belirteç olarak daha az tercih edilmektedir. Kısa, korunmuş ve birkaç bilgilendirici karakter taşıyan 5.8 rDNA ise kullanılmamaktadır [57-59]. 18S rDNA geni, ITS1 ve ITS2 genlerinin sistematik çalışmalarda en faydalı ribozomal genler olduğu ispatlanmıştır [60]. Farklı böcek takımlarında ribozomal RNA ile yapılan çalışmalar incelendiğinde en çok 18S rRNA, 28S rRNA, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin kullanıldığı belirlenmiştir [56].



**Şekil 2** Ribozomal DNA'ların tekrar bölümlerinin şematik gösterimi [45].

#### 1.5.2.1 Ribozomal RNA'nın Küçük Alt Birimi (18S rDNA)

18S rDNA, büyüklüğünden ve genellikle yavaş değişme oranına sahip olmasından dolayı moleküler filogeni alanında bütün taksonlarda en çok tercih edilen moleküler belirteçlerden birisidir [61, 62]. Bu gen bölgesi, birbirinden uzak taksonların arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için gerekli karakterleri sağlayabilmektedir [63]. Alem, şube, takım, sınıf gibi filogenetik kategorilerin arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada kullanılan, oldukça fazla korunmuş DNA bölgelerinden birisidir [64-68]. Aynı zamanda bu gen bölgesinin kısa zincir uzunluğuna sahip olması (yaklaşık 1.8 k.b) ve çoklu

kopyalarının bulunması, primerler kullanılarak PCR ile kolayca çoğaltılabilmesini sağlamaktadır [24].

### **1.5.2.2 Ribozomal RNA'nın Büyük Alt Birimi (28S rDNA)**

Ribozomal RNA genleri içinde en uzun zincir uzunluğuna sahip gen bölgesi 28 rDNA'dır (3000-5000 bp) [69]. 28 rDNA'nın organizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri araştırılırken takım ve familya gibi daha düşük kategorik seviyelerdeki incelemeler için faydalı olduğu bilinmektedir [68, 70, 71].

Nükleer 18S ve 28S rDNA bölgeleri kendi içlerinde bölümlerden oluşmaktadırlar. Bu bölümlerden bazıları oldukça fazla korunmuş iken bazıları değişkendir. Hızlı değişim gösteren kısımlar " expansion " segment ya da "variable" segment olarak adlandırılırken korunmuş olan kısımlara "core" segment denilmektedir [71-75]. Expansion segment 10-700 bp uzunluğunda olmakla birlikte core segmente göre 10 kat fazla değişime uğramaktadır. Expansion segment, birbirine yakın taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya çıkarmada başarılı bir şekilde kullanılabilir [24].

Nükleer rDNA'nın diğer bölgelerinden IGS ve ITS; cins, tür ve populasyon gibi daha düşük kategorik seviyelerdeki problemleri çözmek için kullanılmaktadır [47, 76, 77]. IGS bölgesinin büyüklüğü 4-5 kb uzunluğunda iken ITS bölgesi yaklaşık 1 kb uzunluğundadır. Ancak ITS bazı grupta farklı uzunlukta olabilmektedir. Örneğin; insanlarda yaklaşık 2 kb, strepsipteran böceklerde 1.8 kb uzunluğundadır [25]. IGS bölgesinin büyük olmasından dolayı filogenetik araştırmalarda, ITS bölgesi tercih edilmektedir.

### 1.5.3 Satellit DNA

Mikrosatellitler, türlerin genetik analizinde kullanılan DNA'nın kısa tekrarlı dizileridir [78]. Satelit DNA'lar genellikle çok hızlı değişim gösterirler ve hatta satelit DNA yapısının sibling türlerde bile farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bundan dolayı satelit DNA'ların moleküler analizlerde moleküler belirteç olarak kullanımı uygun bulunmamıştır [79].

### 1.5.4 İtronlar

Sistemik çalışmalarda tek kopyalı nükleer genlerdeki intronların kullanılması uygun bulunmuştur. Buna karşın türler arasındaki varyasyonlar intronların taksonomik çalışmalardaki kullanımını sınırlandırmıştır [56].

### 1.5.5 Nükleer Protein Kodlayan Genler

Protein kodlayan lokusların bazıları böcek moleküler sistemik çalışmalarında kullanılmaktadır [56, 80]. Bu genlere örnek olarak  $\alpha$ -amylase (amy), Alcohol dehydrogenase (adh), Arylphorin (hexamerin family) Elongation factor-1-alpha (EF-1 $\alpha$ ), Glycerol-6-phosphate dehydrogenase (g6pdh), Period (per), Triosephosphate isomerase (Tipi), Wingless (wg), Xanthine dehydrogenase (xdh) genleri gösterilebilir [56]. Ancak bu genlerin bazı dezavantajlarının olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadırlar [56]. Bu dezavantajlar;

1-Düşük kopya sayısına sahip olmalarından dolayı PCR yoluyla çoğaltılmaları zordur.

2-Pseudogenler sorun oluşturabilmektedir

3-Bu genlerin büyük bir kısmı büyük intronlar içerirler. Bu nedenle birden fazla ekzon bölgesini çoğaltmak RT-PCR (reverstranskriptaz PCR) tekniğini kullanmayı gerektirir.

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Population
Nuclear rDNA								
SSU (16-18S)	—————				-----			
LSU (23-28S)			—————		-----			
5.8S	—————			-----				
IGS							—————	
ITS						—————	—————	
MtDNA								
rDNA								
12S		—————			-----			
16S					—————	-----		
Protein								
Coding genes								
ND1				-----	—————	—————	-----	
ND2				-----	—————	—————	-----	
COI				-----	—————	—————	-----	
COII				-----	—————	—————	-----	
Cytb				-----	—————	—————	-----	
Control region							—————	
Gene arrangement	-----	—————	-----					

**Şekil 3** Moleküler belirteç veya gen bölgelerinin kategorik seviyelerde gösterimi [45].

### 1.5.6 Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Temel Moleküler Teknikler

Bugün moleküler markır teknolojisi, modern moleküler araçların doğruluğu ve gücüyle çok iyi bir noktaya ulaştı. Genotipik metodların yüksek verimliliği ile yüzlerce hatta binlerce bireyin (300000 genotipe kadar) genomlarındaki yüksek mutasyon taramalarını bir gün kadar kısa bir sürede yapılmasını mümkün kılmaktadır. Genotiplerin tam olarak anlaşılabilmesi için markırların paralelinde yenilikçi deneme metodları ve uygulamaları tasarlandı [81-83]. Bu genotipik teknikler tek alel seviyesindeki varyasyonları dahi ayırt etmek için güvenilir şekilde kullanılabilirler [2].

### **1.5.6.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism): Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi**

RFLP, DNA belirteçleri içerisinde ilk keşfedilendir [84]. RFLP analizi, önceden radyoaktif problr kullanılarak yapılmakta iken günümüzde ise PCR'a dayalı olarak yapılmaktadır [85]. Bu teknik, ilgili DNA molekülünün PCR ile çoğaltılmasından sonra, restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi ve kesilen DNA'nın agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezinde ayrılması sağlanarak farklı büyüklüklerdeki fragmanların incelenmesine dayanmaktadır [86]. Bazı genlerin bazı bölgeleri üzerinde nükleotit dizilerinde farklılıklar görülebilir. Bu farklılıklar tek bir nükleotit dizisindeki değişiklik olabileceği gibi birden fazla nükleotit çiftinin delesyonu ya da insersiyonu şeklinde de olabilmektedir. Bu şekilde nükleotit dizisindeki bir farklılık restriksiyon enziminin tanıma bölgesini etkileyerek kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası meydana getirebilir [87]. Restriksiyon enzimlerinin kesimleri ile oluşan farklı uzunluktaki parçalar türler arasındaki ve tür içindeki farklılıkları kolayca ortaya çıkarılabilmektedir.

Bu tekniğin sonuçları güvenilirdir ancak pahalı bir teknik olduğu gibi fazla zaman harcanır ve yüksek kalite de DNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır [88].

### **1.5.6.2 RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA):Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA**

RAPD-PCR tekniği ilk kez 1990'da iki farklı bilim adamı grubu (Williams ve arkadaşları ve Welsh ve McClelland) tarafından geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (PCR) temel alan ve rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı bir teknik olarak ortaya çıkmıştır [89]. Bu teknik; rastgele seçilmiş tek bir 9-10 bç uzunluğundaki oligonükleotidin düşük bağlanma sıcaklığında, ilgili türün genomik DNA'sı üzerinde komplementeri olan birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması prensibine göre çalışmaktadır.

Tekniğin devamında elde edilen DNA ürünü standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltılan DNA'lar bantlar halinde gözlemlenerek inceleme yapılır [89, 90]. Sonuçta bazı dizilerin çoğaltıldığı bazılarının ise çoğaltılmadığı gözlemlenir. DNA fragmentlerinin varlığına ya da yokluğuna bakılarak polimorfizmler belirlenir. Genom boyunca rastgele olarak polimorfizmlerin tespit edilmesinde oldukça etkili bir tekniktir [91]. Diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil tek bir primer kullanılmaktadır [90].

RAPD primeri genom boyunca komplementeri olan bölgelerle eşleşmektedir. Eğer primer bağlanma bölgelerinde insersiyonlar ya da delesyonlar varsa primerin bağlanma yeri değişebilmektedir. Böylelikle de çoğaltılan DNA parçalarının uzunlukları farklı olmakta ve elektroforezde de ilgili lokusta bandın bulunup bulunmamasına göre polimorfizm belirlenebilmektedir [92].

RAPD tekniğinin en büyük avantajı araştırılan taksonun genomik DNA dizisi ile ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir [89, 90, 92, 93]. Amplifikasyon gerçekleştirilirken aynı primer seti tüm organizmalar için kullanılabilir ve özgün primerler komplementeri olan bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapabilmektedirler [89, 90, 93, 94].

RAPD tekniğinin en önemli dezavantajı ise; belirteçlerinin dominant olması nedeniyle heterozigotları tanımlamanın zorluğudur. Çalışma birbirine bağlı olarak pek çok hassas komponentle yürütüldüğü için çalışma sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliğinin zayıf olması da başka bir dezavantajdır [95-97].

RAPD tekniği ortaya çıktığında; bu belirteçlerle çalışmanın kolay olması ve prosedür basamaklarının kolay uygulanabilmesi gibi nedenlerle ve SSR'in da böcek moleküler çalışmalarındaki eksikliklerinden dolayı, bu teknik böcek çalışmalarında önem kazanmıştır. Fakat RAPD belirteçlerinin çoğaltılabilirliğinin zayıf olması nedeniyle de böcek ekolojik çalışmalarındaki kullanımı sınırlandırılmıştır [98].

### **1.5.6.3 AFLP (Amplified fragment length polimorphism): Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi**

AFLP tekniği, Zabeau ve Vos tarafından 1993 yılında geliştirilen bir tekniktir. Bu teknikte genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle oluşan DNA fragmentlerinin seçici amplifikasyonu temeline dayanmaktadır [99]. Bu teknik üç basamaktan oluşmaktadır; ilk basamakta, DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle oluşan daha küçük DNA fragmentlerin kesim uçlarına oligonükleotit adaptörlerinin bağlanması, daha sonraki basamakta; restriksiyon frangmentlerine oligonükleotit adaptörlerinin bağlanmasıyla meydana gelen dizilere seçici primerlerin bağlanmasıyla dizilerin seçici amplifikasyonu ve son olarak elde edilen PCR ürünlerinin poliakrilamid jelde yürütülmesi ve görüntülenerek değerlendirilmesi basamaklarından oluşmaktadır [99].

AFLP tekniği, RAPD ve RFLP teknikleri ile karşılaştırıldığında daha iyi bir belirteç sistemidir. Bu teknikte RAPD'in kolaylığı ile RFLP'nin güvenilirliğini birleşmiştir. Bu tekniğin en önemli avantajı seçici RCR'la her primer çifti ile her örnekte ortalama 50-100 belirteç üretebilmesidir [2]. AFLP belirteçleri gen haritaları ve genlerin bağlantı haritalarını belirlemek için uygundur [100-102]. Bu tekniğin diğer bir avantajı ise; cDNA için başvurulabilmesi ve bu sonuçların böceklerde ifade edilen genlerin farklı açılardan ortaya çıkartılmasında kullanılabilmesidir [102].

AFLP tekniğinin dezavantajları arasında; tekniğin dizisinin mikrosatellit gibi tekrarlar içerebilmesi [103], yüksek moleköl ağırlığında ve saf DNA'ya ihtiyaç duyulması ve genellikle dominant karakterler vermesi gösterilebilmektedir [104].

#### 1.5.6.4 SSR (Simple sequence repeats): Basit dizi tekrarları

Ökaryotik genom boyunca rastgele olarak dağılmış bulunan SSR ya da mikrosatellitler, ardışık olarak tekrarlanan 2-6 nükleotit gruplarından oluşan kısa DNA segmentleridir [105]. Bu gruplar (AT)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub>, (ATT)<sub>n</sub> şeklinde gösterilmekte olup 'n' ardışık tekrar sayısını ifade etmektedir. Bu tekrarlar içerdikleri nükleotit sayısına göre isimlendirilmektedirler. 11-60 bp uzunluğunda tekrarlarından oluşanlar minisatellit olarak adlandırılırken, DNA segmentlerinin uzunluğu 100-250 bp kadar uzunlukta olanlar ise mikrosatellit olarak adlandırılmaktadır [106, 107].

Mikrosatellit belirteçler, genomik DNA kütüphanelerinden küçük fragmentlerin PCR ile çoğaltılması ve genomik DNA'nın kısmen parçalanmasıyla [108] ve tekrarlanan dizilerin zenginleştirilmesiyle [109, 110] üretilmektedirler.

Bu teknikte DNA'nın farklı uçlarındaki iki mikrosatellit tekrar bölgesi arasında bulunan DNA segmenti çoğaltılmaktadır. Farklı büyüklüklerde SSR bölgelerinin çoğaltılabilmesi için farklı mikrosatellit tekrarlarından oluşan 16-25 bp uzunluğundaki primerler kullanılarak ilgili DNA bölgesi çoğaltılır, çoğaltılan PCR ürünleri jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirilir [2].

Mikrosatellit belirteçler, populasyonlarda genetik ilişkilerin araştırılmasında, ayrıntılı genetik haritalarının oluşturulmasında ve QTL haritalamada başarılı bir şekilde kullanılabilir [107].

SSR'in en önemli dezavantajı ise yeni belirteç geliştirmenin oldukça zor olmasıdır.

Mikrosatellitler, genomda oldukça fazla bulunmaları ve fazla çeşitlilik göstermelerinden dolayı böcek çalışmalarında popüler belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tekniğin böcek çalışmalarında artan popülaritesine rağmen mikrosatellitler henüz entomolojide kullanılan başlıca belirteç sistemi



olamamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mikrosatellitlerin doğru şekilde uzatma yapamadığını göstermektedir. Bu durum da bu belirteç sisteminin kullanımını sınırlandırmıştır [111].

#### **1.5.6.5 ESTs (Expressed sequence tags): İşaretli ifade edilen diziler**

EST'ler, böcek genetik çalışmalarında son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. cDNA kütüphanelerinin ve otomatik dizileme tekniklerinin hazırlanması için kullanılan ticari kitler ile geniş çaplı EST'ler üretilmesi daha hızlı ve daha etkili olmaktadır. EST'ler böceklerde transkriptom analizi [112-114] ve böcek genom haritalarının hazırlanmasında kullanılmaktadır [115-117].

#### **1.5.6.6 PCR (Polymerase Chain Reaction): Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

PCR, 1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik hedef DNA bölgesinin enzimatik olarak in vitro şartlar altında çoğaltılmasını sağlayan moleküler bir tekniktir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için hedef DNA'nın nükleotit dizisi ile ilgili bazı bilgiler gerekmektedir [118]. Bu teknikte 10-25 pb uzunluğunda oligonükleotit olarak adlandırılan primerler kullanılmaktadır.

PCR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sentetik primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon) ve bu aşamaların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır [119].

Bu tekniğin en önemli avantajı çok küçük miktarda DNA ya da RNA'nın belirli bir bölgesi kısa süre içerisinde milyarlarca defa çoğaltılabilmektedir. Aynı zamanda teknik çok hassas, spesifik ve güvenilirdir [120].

Organizmaların tür içi ve türler arası sınıflandırmalarında PCR tekniği kullanıldığı [121] gibi böcek taksonomik çalışmalarında da kullanılan tekniklerden birisi PCR tekniğidir [122].

#### **1.5.6.7 DNA Temelli Analizlerde Kullanılacak Böcek Numunelerinin Muhafaza Edilmesi**

Moleküler çalışmalar için kullanılacak böceklerin uygun olmayan şartlarda tutulması DNA miktarında ve kalitesinde azalmaya neden olacaktır. Bu şekildeki böceklerle yapılacak olan PCR ve diğer çalışmalar istenildiği gibi sonuç vermeyebilir. Böcekler için uygun olan saklama koşulları, böceklerin öncelikle sıvı azot içerisinde öldürülüp deneylerde kullanılacağı zamana kadar -80'de saklanmasıdır. Bu şekilde böceklerin sıvı azotla muamele edilmesiyle moleküler sistematik çalışmalarda kullanılacak olan nükleik asitlerin zarar görmeden muhafazası sağlanmış olacaktır. Ancak arazi koşullarında böcekleri optimal şartlarda öldürüp saklamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle de böcek DNA'sının en az zarar göreceği şekilde saklanması için alternatif saklama koşulları geliştirilmiştir. Bunlardan ilki öldürülen böceğin %95-%100'lük alkol içerisinde saklanmasıdır [122]. Ancak %95 etanolün altındaki durumlarda saklanması çoğunlukla önerilmez çünkü böceğin vücudundaki su etanolü seyrelteceğinden DNA'nın parçalanmasına neden olur. Bunun dışında aseton, 2 propanol, dietil eter, etil asetat içerisinde böceklerin 6 aya kadar muhafaza edilebileceği bildirilmiştir. Kuru numunelerle çalışılacak ise özellikle DNA'nın fazla miktarda bulunduğu ve hedef DNA'nın kısa bölgelerinin çoğaltılacağı durumlarda kullanılabilir. Tek kopyalı genlerin uzun DNA bölgelerini kuru örneklerden çoğaltmak oldukça zor olabilmektedir [123].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Çalışmada Kullanılan Böcekler

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden Dr. Sinan ANLAŞ tarafından toplanan *Ocypus* türleri bu çalışmada kullanılmak üzere temin edilmiştir.

### 2.2 DNA İzolasyonu

%96'lık alkol içinde temin edilen örneklerin bacak ekstremitelerinden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu için QIAGEN Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı ve bu kitin protokolü izlendi. Bacak ekstremiteleri havanda sıvı azot içinde ezildi. Ezilen örnekler santrifüj tüplerine alındı, tüplere alındıktan sonra 180 µL ATL tampon eklendi. Bunun üzerine 20 µL proteinaz K eklendi ve vorteks yapıldı. Örnekler 56°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 4 µL RNaz eklenerek vorteksle karıştırıldı ve 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 15 sn vorteks yapıldıktan sonra 200 µL AL tamponu eklendi ve ardından tekrar vorteks yapıldı. 200 µL etanol ekleyerek tekrar vorteks yapıldı. Bu karışım kitle birlikte temin edilen 2 mL'lik santrifüj tüplerinin içindeki DNeasy Mini spin column içine yerleştirildi ve ardından 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. DNeasy Mini spin column'un alttaki tüp kısmı atılarak yine kit ile beraber temin edilen 2 mL'lik santrifüj tüpüne koyuldu ve içerisine 500 µL AW1 tamponu eklenerek 1 dk 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. DNeasy Mini spin column tekrar 2 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilerek 500 µL AW2 tamponu koyuldu ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı. Tüp atılarak DNeasy Mini spin column 2 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilerek 100

$\mu\text{L}$  AE tamponu kolon içerisine bırakıldı 1 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.

## 2.3 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması

### 2.3.1 PCR'da Kullanılan Kimyasallar

PCR'da kullanılan kimyasallar Fermentas'tan (Fermentas, Vilnius, Litvanya) temin edilmiştir. PCR'da kullanılan bileşenler Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1** PCR'da kullanılan kimyasal maddelerin miktarları ve konsantrasyonları.

Kimyasalın Adı	Miktarı	Konsantrasyon
$\text{NH}_4\text{SO}_4$	2.5 $\mu\text{L}$	10 X
DMSO	1 $\mu\text{L}$	
$\text{MgCl}_2$	1.5 $\mu\text{L}$	25 mM
Primer R	2.5 $\mu\text{L}$	5 pmol/mL
Primer L	2.5 $\mu\text{L}$	5 pmol/mL
dNTP	0.5 $\mu\text{L}$	10 mM
DNA	5 $\mu\text{L}$	
Taq DNA Polimeraz	0.5 $\mu\text{L}$	5 Ünite
dH <sub>2</sub> O	9 $\mu\text{L}$	
<b>Toplam</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>	

### 2.3.2 PCR'da kullanılan Primerler ve Özellikleri

Bu çalışmada moleküler belirteç olarak kullanılan 5 gen bölgesini kapsayan 3 adet primer çifti kullanılmıştır. CO1 – Leu – CO2 bölgesini çoğaltan primer çiftinin dizileri, Simon ve arkadaşlarının çalışmalarından [45], 18S gen bölgesini çoğaltan primer çifti Whiting ve arkadaşlarının çalışmalarından [124], 28S gen bölgesini çoğaltan primer çifti Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarından alınmıştır [125]. Tablo 2'de bu primer çiftlerinin dizileri verilmiştir. Tablo 3'de bu primerlerin özellikleri gösterilmiştir.

**Tablo 2** PCR 'da kullanılan primerler ve nükleotit dizileri.

Primerin Adı	Nükleotit Dizisi (5'- 3')
C1-2441 fa	CCT ACA GGA ATT AAA ATT TTT AGT TGATAAGC
C1-2807fb	TAT TCT GAT TAT CCA GAT GCT TA
C2-N-3661	CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CCA
18S rDNA-F	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT
18S rDNA-R	TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC TAC
28S rDNA-F	GAC TAC CCC CTG AAT TTA AGC AT
28S rDNA-R	GAC TCC TTG GTC CGT GTT TCA A

**Tablo 3** PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri.

5'Primer	3' Primer	Hedef Gen	Parça Büyüklüğü	Hedef DNA
C1-2441 fa	C2-N-3661	CO1 + Leu2 + CO2	1220	mtDNA
C1-2807 fb	C2-N-3661	CO1 + Leu2 + CO2	854	mtDNA
18S rDNA-F	18S rDNA-R	18S rDNA	1917	gDNA
28S rDNA-F	28S rDNA-R	28S rDNA	786	gDNA

### 2.3.3 PCR'lar

PCR'lar için TECHNE (TECHNE, Staffordshire, UK) cihazı kullanıldı. PCR'lar için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4** PCR Reaksiyonları

	Sıcaklık	Süre	Devir Sayısı
Ayrılma	94°C	30 sn	1
Ayrılma	94°C	60 sn	30
Bağlanma	47°C - 50°C - 55°C	30 sn	
Uzama	72°C	2 dk	
Uzama	72°C	10 dk	1

## 2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyon ve PCR sonuçları %0.8'lik Agaroz Jel'de yürütüldü ve sonuçlar Jel Görüntülme Cihazında (Vilber Lourmat, Cedex, Fransa) görüntülendi. Örnekler 6 X Loading Dye (Fermentas, Vilnius, Litvanya) ile karıştırılarak yükleme yapıldı. Elektroforez 0.5 X TBE tamponu kullanıldı. Agaroz jel elektroforezinde ayrılan bantları görüntülemek için EtBr (Etidyumbromid) boyaması yardımıyla Jel Görüntüleme cihazında görüntülendi.

**TBE (5 X):** 54 g Tris-Base, 27.5 g Borik Asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8)

## 2.5 DNA Dizileme

Jel görüntülemesi çıkan sonuçları DNA dizilemesi için RefGen'e (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) gönderildi.

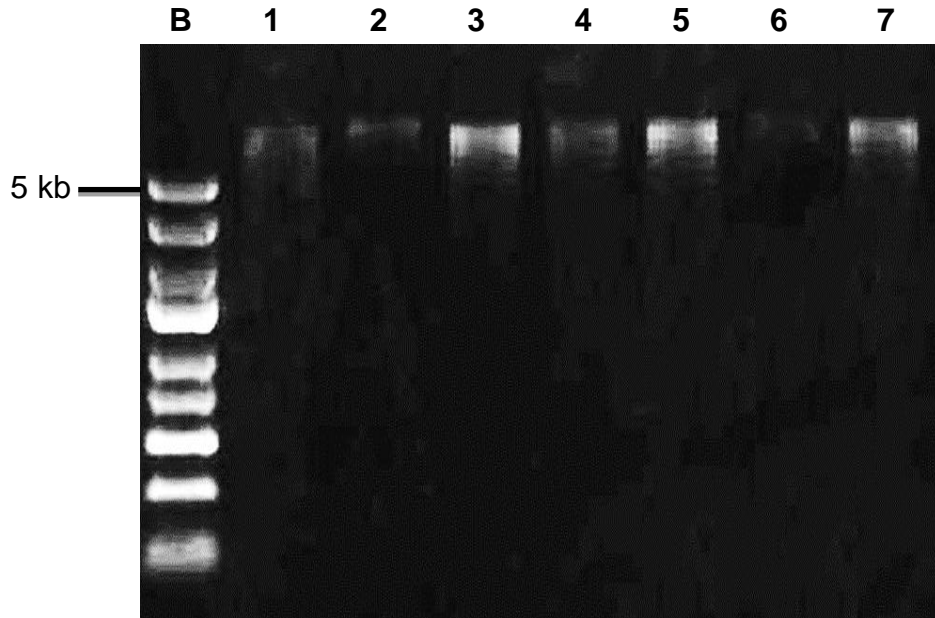
## 2.6 Biyoinformatik Analiz ve Filogenetik Ağaç Oluşturma

Gelen DNA dizileme sonuçları FinchTV v1.4 (Geospiza, Seattle, WA) ve BioEdit (Hall, 1999) gibi programlarda kontrol edildikten sonra filogenetik ağaç oluşturmak için CLUSTAL W (<http://www.clustal.org/>) web tabanlı aracı kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 DNA İzolasyon Sonucu

Çalışmanın materyalini oluşturan *Ocypus*'a ait 7 türün DNA izolasyon sonuçlarını görüntülemek için %0.8'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı (Şekil 4).

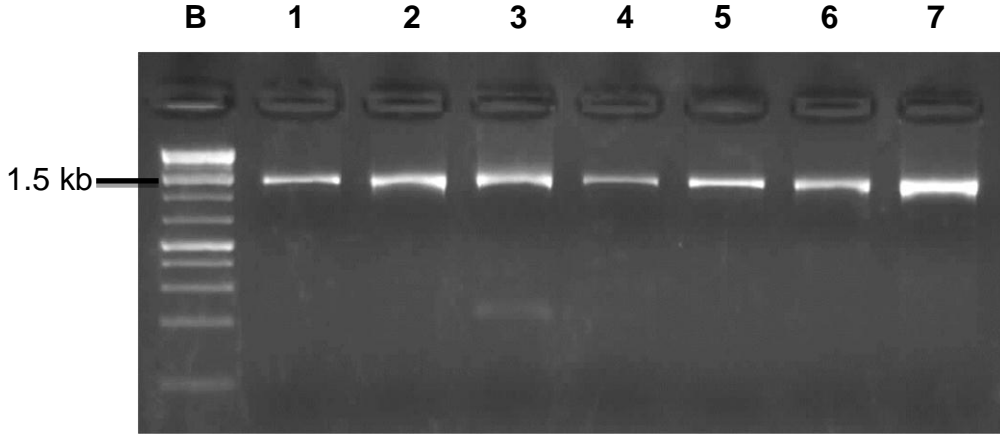


**Şekil 4** Genomik DNA izolasyon sonucunu gösteren jel görüntüsü (B: Belirteç, Numaralar: *Ocypus*'a ait 7 türün DNA'sına ait jel görüntüleri).

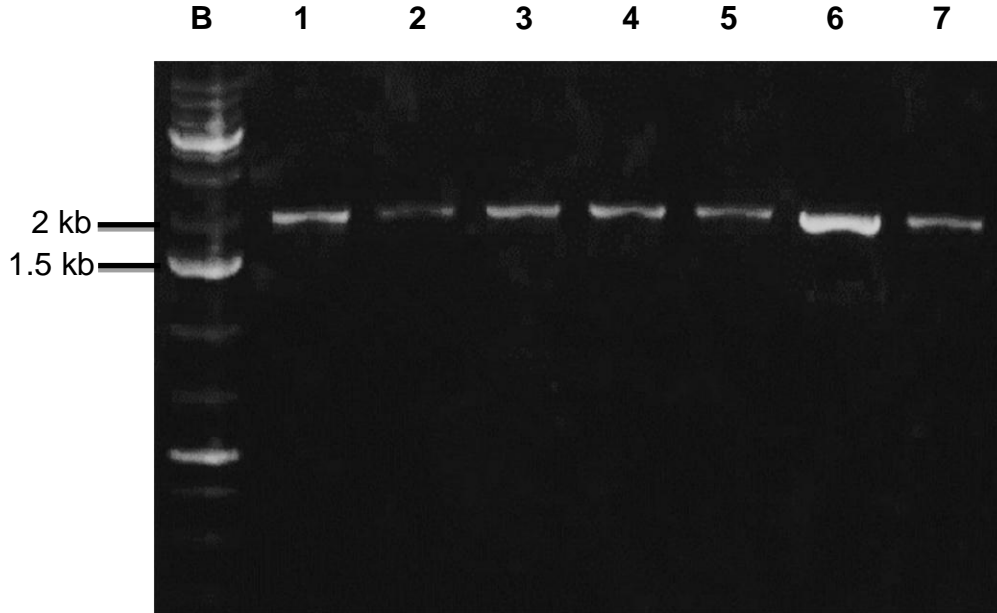
#### 3.2 Kullanılan Primerlere Göre PCR Sonuçları

*Ocypus* cinsine ait 7 türün 3 farklı primer çifti kullanılarak (5 farklı gen bölgesi) çoğaltılan PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7'de verilmiştir.

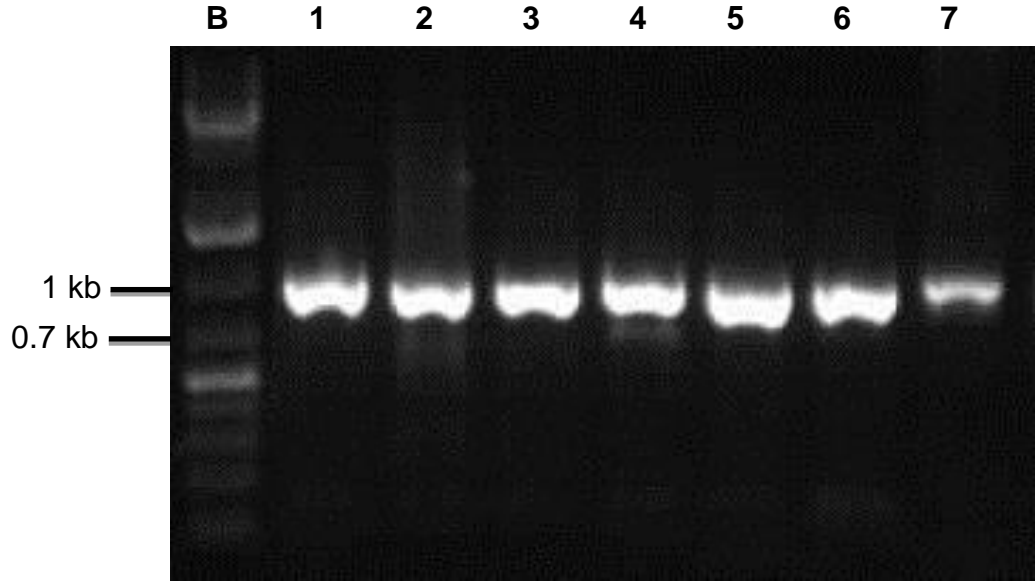




**Şekil 5** *Ocypus* ait 7 türden elde edilen DNA'ların CO1 - Leu - CO2 bölgelerini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü (B: Belirteç, Numaralar: *Ocypus*'a ait 7 türün DNA'sına ait jel görüntüleri).



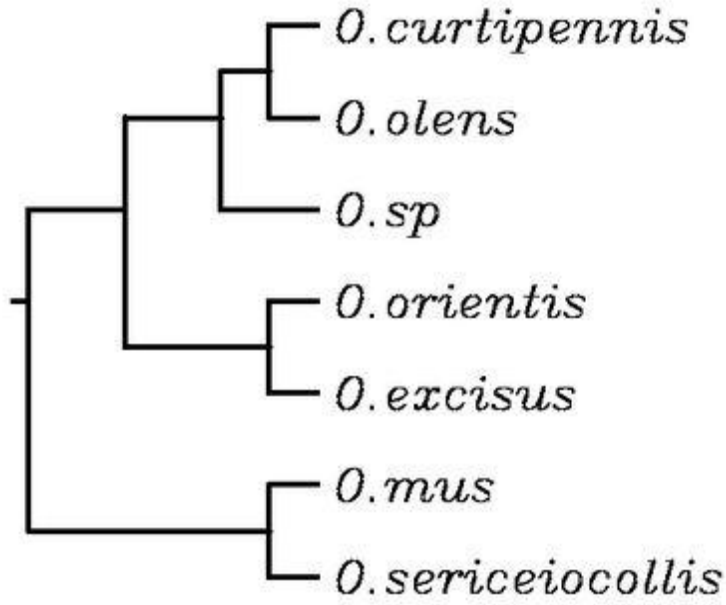
**Şekil 6** *Ocypus* ait 7 türden elde edilen DNA'ların 18S ribozomal DNA bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü (B: Belirteç, Numaralar: *Ocypus*'a ait 7 türün DNA'sına ait jel görüntüleri).



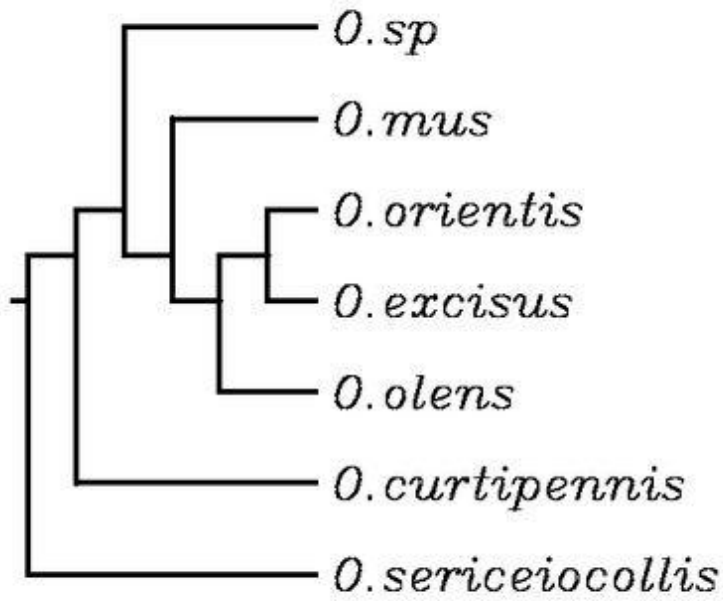
**Şekil 7** *Ocypus* ait 7 türden elde edilen DNA'ların 28S ribozomal DNA bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunu gösteren jel görüntüsü (B: Belirteç, Numaralar: *Ocypus*'a ait 7 türün DNA'sına ait jel görüntüleri).

### 3.3 Filogenetik Analiz Sonuçları

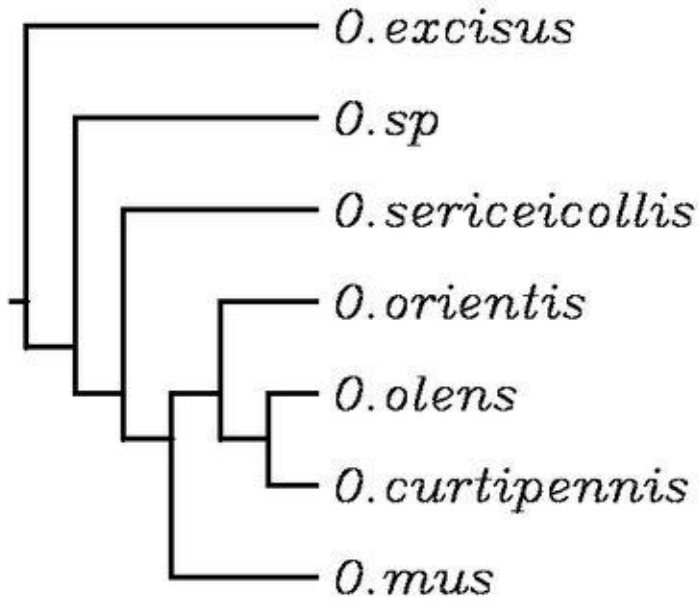
CO1 – Leu – CO2, 18S rDNA, 28S rDNA gen bölgeleri için tasarlanan 3 primer çiftinin çoğalttığı dizilerden web tabanlı CLUSTAL W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) programı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.



**Şekil 8** *Ocypus*'un 7 türünün mitokondriyal DNA'larındaki CO1-Leu-CO2 bölgesi kullanılarak oluşturulan dendrogram.



**Şekil 9** *Ocypus*'un 7 türünün 28S ribozomal DNA bölgesi kullanılarak oluşturulan dendrogram.



**Şekil 10** *Ocybus*'un 7 türünün 18S ribozomal DNA bölgesi kullanılarak oluşturulan dendrogram.

#### 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler belirteçler kullanılarak böcekler arasındaki genetik ilişkiler, gen ya da genom haritalanması gibi konularda yapılan çalışmaların hız kazanmasıyla ve entomolojide kullanılan moleküler belirteçlerin geliştirilmesiyle daha kesin ve daha etkin sonuçlar alınmaktadır. İleri de daha kolay uygulanabilir daha ucuz tekniklerin geliştirilmesiyle taksonomi alanında bu tekniklerin kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda CO1 - Leu - CO2, 18S, 28S gen bölgeleri kullanılarak yapılan analizler sonucu elde edilen veriler ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan *Ocypus* cinsine ait 7 türün filogenetik analizi ClustalW programıyla yapıldı.

Türlerin akrabalık derecelerini belirleyebilmek için 5 gen bölgesine ait 3 primer çifti kullanıldı. Kullanılan primerlere göre 3 filogenetik ağaç oluşturuldu. Bunlardan CO1 – Leu - CO2 gen bölgelerini kapsayan primer çifti kullanılarak oluşturulan ağaca göre *Ocypus curtipennis* ile *Ocypus olens*, *Ocypus orientis* ile *Ocypus excisus* ve *Ocypus mus* ile *Ocypus sericeicollis*'in yakın türler olduğu anlaşıldığı gibi *Ocypus sp.* türünün ise *Ocypus curtipennis* ve *Ocypus olens* ile yakın akraba olduğu görülmektedir.

Nükleer ribozomal DNA'nın 28S gen bölgesi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta *Ocypus orientis* ile *Ocypus excisus* türlerinin yakın olduğu ve *Ocypus olens*'in de bu türlerle yakın akraba olduğu görüldü.

Nükleer ribozomal DNA'nın 18S gen bölgesi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta *Ocypus olens* ile *Ocypus curtipennis* türlerinin kardeş tür

oldukları görüldü. *Ocypus orientis* türünün de *Ocypus olens* ve *Ocypus curtipennis* ile yakın akraba olduğu anlaşılmıştır.

Bu üç filogenetik ağaca genel çerçeveden bakıldığında CO1 –Leu – CO2 ve 18S rDNA bölgelerine göre *O. olens* ve *O. curtipennis*'in yakın akraba olduğu her iki belirteçte gözükmektedir. Filogeni çalışmalarında kullanılan belirteç bölgelerinden olan CO1 ve CO2 familya ve daha alt kategorilerin belirlenmesinde kullanılması ve bu bölgeler baz alındığında buna en yakın ağacın 18S rDNA'ya göre yapılan sınıflandırmadaki olduğu gözükmektedir. Tüm bunların sonucunda CO1 ve CO2 bölgeleri ve 18S rDNA'nın *Ocypus*'un filogenisi açısından 28S rDNA'ya göre daha tutarlı olduğu gözükmektedir.

İlerleyen çalışmalarda bu bölgeler kullanılarak başka böcek türlerinin filogenetik çalışmaları yapılması hedeflenmekte ve bu çalışmalarda yine bu gen bölgelerin kullanılarak çeşitli böcek türlerinin taksonomik karakterizasyonunun yapılması amaçlanmaktadır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Ikawa, T., Onodera, S., Okabe, H., Hoshizaki, S. and Cheng, L., "Occurrence and Density of Halobates Micans (Hemiptera: Gerridae) in the Eastern South Indian Ocean", *Entomological Science*, **10/2**, (2007) 213-215.
- [2] Behura, S.K., "Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues", *Molecular Ecology*, **15/11**, (2006) 3087-3113.
- [3] Dempster, J.P., McLean, I., "Insect Populations in Theory and in Practice: 19th Symposium of the Royal Entomological Society 10-11 September 1997 at the University of Newcastle". Kluwer Academic (1998).
- [4] Speight, M.R., Hunter, M.D. and Watt, A.D., "Ecology of Insects: Concepts and Applications". Blackwell Science (1999).
- [5] Solodovnikov, A. and Schomann, A., "Revised Systematics and Biogeography of 'Quediina' of Sub-Saharan Africa: New Phylogenetic Insights into the Rove Beetle Tribe Staphylinini (Coleoptera: Staphylinidae)", *Systematic Entomology*, **34/3**, (2009) 443-466.
- [6] Weide, D., Thayer, M.K., Newton, A.F. and Betz, O., "Comparative Morphology of the Head of Selected Sporophagous and Non-Sporophagous Aleocharinae (Coleoptera: Staphylinidae): Musculature and Hypopharynx-Prementum Complex", *Journal of Morphology*, **271/8**, (2010) 910-931.
- [7] Chatzimanolis, S., Cohen, I.M., Schomann, A. and Solodovnikov, A., "Molecular Phylogeny of the Mega-Diverse Rove Beetle Tribe Staphylinini (Insecta, Coleoptera, Staphylinidae)", *Zoologica Scripta*, **39/5**, (2010) 436-449.
- [8] Elven, H., Bachmann, L. and Gusarov, V.I., "Phylogeny of the Tribe Athetini (Coleoptera: Staphylinidae) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Sequence Data", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **57/1**, (2010) 84-100.
- [9] Sato, J.J., Wolsan, M., Minami, S., Hosoda, T., Sinaga, M.H., Hiyama, K., Yamaguchi, Y. and Suzuki, H., "Deciphering and Dating the Red Panda's Ancestry and Early Adaptive Radiation of Musteloidea", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53/3**, (2009) 907-922.

- [10] Beutel, R.G., Leschen R., "Handbuch Der Zoologie/Handbook of Zoology, Vol. IV (Arthropoda: Insecta), Part 38 Coleoptera, Beetles. Volume 1: Morphology and Systematics ", *Systematic Entomology*, **33/1**, (2008) 217-218.
- [11] Lodos, N., "Türkiye Entomolojisi Iv (Kısım I)", İzmir. Ege Üniversitesi Yayınları No:493 (1995).
- [12] Smith, E.H. and America, E., "The Entomological Society of America: The First Hundred Years, 1889-1989". Entomological Society of America (1989).
- [13] Herman, L.H., "Catalog of the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera) 1758 to the End of the Second Millennium: Staphylinine Group : Pt. 2, Staphylininae: Diochini, Maorothiini, Othiini, Platyprosopini, Staphylinini (Amblyopinina, Anisolinina, Hyptiomina, Philonthina)". American Museum of Natural History (2001).
- [14] Beutel, R.G., "Coleoptera, Beetles: Handbuch Der Zoologie / Begr. Von Willy Kükenenthal. Fortgef. Von M. Beier Bd. 4. Arthropoda. Morphology and Systematics, (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphga Partim)". de Gruyter (2005).
- [15] Anlaş, S., "Distributional Checklist of the Staphylinidae (Coleoptera) of Turkey, with New and Additional Records", *Linzer Biologie Beiträge*, **41**, (2009) 215-342.
- [16] Ahn, K.J. and Ashe, J.S., "Phylogeny of the Intertidal Aleocharine Tribe Liparocephalini (Coleoptera: Staphylinidae)", *Systematic Entomology*, **21/2**, (1996) 99-114.
- [17] Ahn, K.J. and Ashe, J.S., "Phylogeny of the Myllaenini and Related Taxa (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae)", *Cladistics*, **20/2**, (2004) 123-138.
- [18] Booth, R.G., Cox, M.L. and Madge, R.B, "Iie Guides to Insects of Importanceto Man" (1990).
- [19] Borror, D.J., Triplehorn, A.C. and Johnson, N.F., "An Introduction to the Study of Insects", Philadelphia. Saunnders (1989).
- [20] Demirsoy, A., "Omurgasızlar-Entomoloji (Yaşamın Temel Kuralları) Cilt Ii/Kısım Ii", Ankara. Meteksan Yayınları. (8.Basım), (2003) p. 941.
- [21] Byrd, J.H., Castner, J.L., "Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations.", Boca Raton, Florida. CRC Press (2001).



- [22] Booth, R.G., Cox, M.L. and Madge, R.B., "The Guides to Insects of Importance to Man: Coleoptera". CABI (1990).
- [23] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, (1986) 263-273.
- [24] Dabert, M.A., "DNA Markers in the Phylogenetics of the Acari", Poznań, Poland (2006).
- [25] Hwang, U.W. and Kim, W., "General Properties and Phylogenetic Utilities of Nuclear Ribosomal DNA and Mitochondrial DNA Commonly Used in Molecular Systematics", *Korean J Parasitol*, **37/4**, (1999) 215-228.
- [26] Herman, L.H., "Nomenclatural Changes in the Staphylinidae (Insecta: Coleoptera)", *Bulletin of the American Museum of Natural History*: 1-82 (2001).
- [27] Frank, J.H., "A New Species of *Proteinus* Latreille (Coleoptera: Staphylinidae) from Florida", *The Florida Entomologist*, **62/4**, (1979) 329-340.
- [28] Loxdale, H.D. and Lushai, G., "Molecular Markers in Entomology", *Bulletin of Entomological Research*, **88/6**, (1998) 577-600.
- [29] Loxdale, H.D., Weber C.P. et al., "Bulletin of Entomological Research". p. 121 (1985).
- [30] Hubby, J.L. and Lewontin, R.C., "A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations I. The Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila Pseudoobscura*", *Genetics*, **54/2**, (1966) 577-94.
- [31] Gómez, A., "Allozyme Electrophoresis: Its Application to Rotifers", *Hydrobiologia*, (1998) 385-393.
- [32] Richardson, B.J., Brian, P., Adams, M., "Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies", London. Academic Press. (1986) p. 420.
- [33] Hoy, M.A., *Insect Molecular Genetics*, in *Insect Molecular Genetics*. Academic Press. (2003) p. 350-399.
- [34] Avise, J.C.A., "Molecular Markers, Natural History, and Evolution," Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates. (2004) p. 684.

- [35] Severson, D.W., Brian, S., Knudson, D.L., "Genetic and Physical Mapping in Mosquitoes: Molecular Approaches", *Annual Review of Entomology*, **46**, (2001) 183-219.
- [36] Heckel, D., "Genomics in Pure and Applied Entomology", *Annual Review of Entomology*, **48**, (2003) 235-260.
- [37] Arbogast, B.S., "Phylogeography: The History and Formation of Species", *American Zoologist*, **41/1**, (2001) 134-135.
- [38] Hoy, M.A., "Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications", San Diego, CA. Academic Press (2003).
- [39] Warrior, R., Gerard, J., "The Mitochondrial DNA Hydra Attenuata and Hydra Littoralis Consists of Two Linear Molecules", **38**, (1985) 439-445
- [40] Wolstenholme, D., "Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution.", **141**, (1992) 173-216.
- [41] Moritz, C. and Brown, W.M., "Tandem Duplications in Animal Mitochondrial DNAs: Variation in Incidence and Gene Content among Lizards", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84/20**, (1987) 7183-7187.
- [42] Staton, J.L., Daniel, L., Moritz, Clair, C., Brown, W.M., "Staton, J.L., Daehler, L.I., Moritz, C.C., Brown, W.M., (1994) Sequences with Thepotential Stem-and-Loop Structures Are Associated with Coding-Region Duplications in Animal Mitochondrial DNA. *Genetics* ", **137**, (1994) 233-241.
- [43] Hwang, U., The Complete Nucleotide Sequence of Mitochondrial DNA of a Centipede Lithobius Forficatus and Its Application to Arthropod Phylogeny. , Published PhD Thesis, National University Seoul, Korea. (1998).
- [44] Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flok, P., "Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers", *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, (1994) 651-701.
- [45] Roehrdanz, R.L., Degrugillier, M.E., "Long Sections of Mitochondrial DNA Amplified from Fourteen Orders of Insects Using Conserved Polymerase Chain Reaction Primers.", *Annals Entomol Soc America*, **91**, (1998) 771-777.

- [46] Zhang, D.X. and Hewitt, G.M., "Insect Mitochondrial Control Region: A Review of ITS Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies", *Biochemical Systematics and Ecology*, **25/2**, (1997) 99-120.
- [47] Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. and Boursot, P., "Species-Wide Homogeneity of Nuclear Ribosomal ITS2 Sequences in the Spider Mite *Tetranychus Urticae* Contrasts with Extensive Mitochondrial *CoI* Polymorphism", *Heredity*, **80/6** (1998) 742-752.
- [48] Roehrdanz, R.L., "An Improved Primer for PCR Amplification of Mitochondrial DNA in a Variety of Insect Species", *Insect Molecular Biology*, **2/2** (1993) 89-91.
- [49] Kambhampati, S. and Smith, P.T., "PCR Primers for the Amplification of Four Insect Mitochondrial Gene Fragments", *Insect Molecular Biology*, **4/4** (1995) 233-236.
- [50] Lunt, D.H., Zung, D., Szymura, J.M., "The Insect Cytochrome Oxidase I Gene: Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies", *Insect Molecular Biology*, **5**, (1996) 153-165.
- [51] Zhang, D.X., Gemit, H.W., "Assessment of the Universality and Utility of a Set of Conserved Mitochondrial *COI* Primers in Insects", *Insect Molecular Biology*, **6**, (1997) 143-150.
- [52] Lanave, C., De Robertis, M. et al., "Update of Ammtdb: A Database of Multi-Aligned Metazoa Mitochondrial DNA Sequences", *Nucleic Acids Research*, **30**, (2002) 174-175.
- [53] Zhang, D.X., Hewitt, G.M., "Assessment of the Universality and Utility of a Set of Conserved Mitochondrial *Col* Primers in Insects. ", **6**, (1996) 143-150.
- [54] Clark, T.L., Meinke, L.J. and Foster, J.E., "Molecular Phylogeny of *Diabrotica* Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) Inferred from Analysis of Combined Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences", *Insect Molecular Biology*, **10/4**, (2001) 303-314.
- [55] Barker, J.E., Holaschke, M., Fulton, A., Evans, K.A. and Powell, G., "Effects of Kaolin Particle Film on *Myzus Persicae* (Hemiptera: Aphididae) Behaviour and Performance", *Bulletin of Entomological Research*, **97/5**, (2007) 455-460.
- [56] Caterino, M.S., Cho, S. and Sperling, H., "The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel", *Annual Review of Entomology*, **45**, (2000) 1-54.
- [57] Rokas, A., Nylander, J., Ronquist, F. and Stone, G.N., "A Maximum-Likelihood Analysis of Eight Phylogenetic Markers in Gallwasps

(Hymenoptera: Cynipidae): Implications for Insect Phylogenetic Studies", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22/2**, (2002) 206-219.

- [58] LI, W.H., "Molecular Evolution", Sinauer, Sunderland, MA (1997).
- [59] Hillis, D.M., "Ribosomal DNA : Molecular Evolution and Phylogenetic Inference", *The Quarterly Review of Biology*, **66**, (1991) 411-453.
- [60] Doolittle, W.F., "Phylogenetic Classification and the Universal Tree", *Science (New York, N.Y.)*, **284/5423**, (1999) 2124-9.
- [61] Olsen, G. and Woese, C., "Ribosomal RNA: A Key to Phylogeny", *The FASEB Journal*, **7/1**, (1993) 113-123.
- [62] Van de Peer, Y., Baldauf, S.L., Doolittle, W.F., "An Updated and Comprehensive Rrna Phylogeny of (Crown) Eukaryotes Based on Rate-Calibrated Evolutionary Distances", *Journal of Molecular Evolution*, **51/6**, (2000) 565-576.
- [63] Ouvrard, D., Campbell, B.C., Bourgoin, T. and Chan, K.L., "18S rRNA Secondary Structure and Phylogenetic Position of Peloridiidae (Insecta, Hemiptera)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16/3**, (2000) 403-417.
- [64] Field, K., Olsen, G., Lane, D., Giovannoni, S., Ghiselin, M., Raff, E., Pace, N. and Raff, R., "Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom", *Science*, **239/4841**, (1988) 748-753.
- [65] Friedrich, M. and Tautz, D., "Ribosomal DNA Phylogeny of the Major Extant Arthropod Classes and the Evolution of Myriapods", *Nature*, **376/6536**, (1995) 165-167.
- [66] Abele, L., Kim, W. and Felgenhauer, B., "Molecular Evidence for Inclusion of the Phylum Pentastomida in the Crustacea", *Molecular Biology and Evolution*, **6/6**, (1989) 685.
- [67] Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., and Lake, J.A., "Evidence for a Clade of Nematodes, Arthropods and Other Moulting Animals", *Nature*, **387/6632**, (1997) 489-493.
- [68] Whiting, M.F., "Phylogenetic Position of the Strepsiptera: Review of Molecular and Morphological Evidence", *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **27/1**, (1998) 53-60
- [69] Hancock, J.M., Tautz, D. and Dover, G.A., "Evolution of the Secondary Structures and Compensatory Mutations of the Ribosomal

RNAs of *Drosophila Melanogaster*", *Molecular Biology and Evolution*, **5/4**, (1988) 393-414.

- [70] Friedrich, M. and Tautz, D., "Evolution and Phylogeny of the Diptera: A Molecular Phylogenetic Analysis Using 28s rDNA Sequences", *Systematic Biology*, **46/4**, (1997) 674-698.
- [71] Hwang, U.W., Kim, W., Tautz, D. and Friedrich, M., "Molecular Phylogenetics at the Felsenstein Zone: Approaching the Strepsiptera Problem Using 5.8s and 28s rDNA Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9/3**, (1998) 470-480.
- [72] Vogler, A.P., Welsh, A. and Hancock, J.M., "Phylogenetic Analysis of Slippage-Like Sequence Variation in the V4 Rna Expansion Segment in Tiger Beetles (Cicindelidae)", *Molecular Biology and Evolution*, **14/1**, (1997) 6-19.
- [73] Hwang, U.W., Ree, H.I. and Kim, W., "Evolution of Hypervariable Regions, V4 and V7, of Insect 18s Rna and Their Phylogenetic Implications", *Zoological Science*, **17/1**, (2000) 111-121.
- [74] Choe, J.P., Hwang, U.W., Kim, W., "Analysis of the Primary Sequence and Secondary Structure of the Unusually Long Ssu Rna of the Soil Bug, *Armadillidium Vulgare* ", *Journal of Molecular Evolution*, **49/6**, (1999) 798-805.
- [75] Choe, J.P., Kim, W., "Putative Secondary Structures of Unusually Long Strepsipteran Ssu Rnas and Its Phylogenetic Implications", *Molecular Evolution*, **9**, (1999) 191-199.
- [76] Morgan, J. and Blair, D., "Relative Merits of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacers and Mitochondrial Co1 and Nd1 Genes for Distinguishing among *Echinostoma* Species (Trematoda)", *Parasitology*, **116/3**, (1998) 289-297.
- [77] Perera, O.P., Cockburn, A.F., Mitchell, S.E., Conn, J. and Seawright, J.A., "Species-Specific Repeat Units in the Intergenic Spacer of the Ribosomal Rna Cistron of *Anopheles Aquasalis* Curry", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59/5**, (1998) 673-8.
- [78] Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.R., "Microsatellites and Kinship", *Trends in Ecology & Evolution*, **8/8**, (1993) 285-288.
- [79] Bachmann, L., Schibel, J.M., Raab, M. and Sperlich, D., "Satellite DNA as a Taxonomic Marker", *Biochemical Systematics and Ecology*, **21/1**, (1993) 3-11.

- [80] Friedlander, T.P., Regier, J.C. and Mitter, C., "Nuclear Gene Sequences for Higher Level Phylogenetic Analysis: 14 Promising Candidates", *Systematic Biology*, **41/4**, (1992) 483-490.
- [81] Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T., Kwiatkowski, R.W., Sander, T.J., de Arruda, M., Arco, D.A., Neri, B.P. and Brow, M., "Polymorphism Identification and Quantitative Detection of Genomic DNA by Invasive Cleavage of Oligonucleotide Probes", *Nat Biotech*, **17/3**, (1999) 292-296.
- [82] Kwok, P.Y., "Methods for Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **2/1**, (2001) 235-258.
- [83] Tsuchihashi, Z. and Dracopoli, N.C., "Progress in High Throughput Snp Genotyping Methods", *Pharmacogenomics J*, **2/2**, (2002) 103-110.
- [84] Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H., "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase", *Science*, **239/4839**, (1988) 487-491.
- [85] Ozkose, E., Davies, D.R., Ekinci, M.S., Theodorou, M.K. and Griffith, G.W, "Molecular Ecology of Anaerobic Fungi", *Reproduction Nutrition Development*, **42**: (2002) 83.
- [86] Ozkose, E., Davies, D.R., Ekinci, M.S., Theodorou, M.K. and Griffith, G.W. , "Molecular Ecology of Anaerobic Fungi." *Reproduction Nutrition Development*, **42**, (2002) 83.
- [87] Jones, N., Ougham, H. and Thomas, H., "Markers and Mapping: We Are All Geneticists Now", *New Phytologist*, **137/1**, (1997) 165-177.
- [88] Meredith, C.P., "Grapevine Genetics: Probing the Past and Facing the Future", *international Conference Prospects for Viticulture and Enology*, (2000).
- [89] Williams, J., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, **18/22**, (1990) 6531-6535.
- [90] Welsh, J. and McClelland, M., "Fingerprinting Genomes Using Pcr with Arbitrary Primers", *Nucleic Acids Research*, **18/24**, (1990) 7213-7218.
- [91] Antoni Rafalski, J. and Tingey, S.V., "Genetic Diagnostics in Plant Breeding: Rapds, Microsatellites and Machines", *Trends in Genetics*, **9/8**, (1993) 275-280.

- [92] Basibuyuk, H.H., Bardakci, F., Belshaw, R., Quice, D.L.J., *Phylogenetic Systematics, "a Practical Guide to Theory and Practice"*. Önder Matbaa, sivas, 2000,
- [93] Hillis, D., Moritz, C. and Mable, B.K., "Molecular Systematics". Sinauer Associates (1996).
- [94] Welsh, J., Petersen, C. and McClelland, M., "Polymorphisms Generated by Arbitrarily Primed Pcr in the Mouse: Application to Strain Identification and Genetic Mapping", *Nucleic Acids Research*, **19/2**, (1991) 303-306.
- [95] Taylor, G.R., "Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA", Boca Raton. CRC Press (1997).
- [96] Tingey, S.V. and del Tufo, J.P., "Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers", *Plant Physiology*, **101/2**, (1993) 349-352.
- [97] Bardakçı, F., "Genetic Analyses with Random Amplified Polymorphic DNA (Rapid) Markers", *Turk J Bio*, **25**, (2001) 185-196.
- [98] Black, W.C., "Pcr with Arbitrary Primers: Approach with Care", *Insect Molecular Biology*, **2/1**, (1993) 1-6.
- [99] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., "Aflp: A New Technique for DNA Fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, **23/21**, (1995) 4407-4414.
- [100] Heckel, D.G., Gahan, L.J., Liu, Y.B. and Tabashnik, B.E., "Genetic Mapping of Resistance to *Bacillus Thuringiensis* Toxins in Diamondback Moth Using Biphasic Linkage Analysis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96/15**, (1999) 8373-8377.
- [101] Behura, S.K., Valicente, F.H., Rider, S.D., Shun-Chen, M., Jackson, S. and Stuart, J.J., "A Physically Anchored Genetic Map and Linkage to Avirulence Reveals Recombination Suppression over the Proximal Region of Hessian Fly Chromosome A2", *Genetics*, **167/1** (2004) 343-355.
- [102] Reineke, A., Schmidt, O. and Zebitz, C.P.W., "Differential Gene Expression in Two Strains of the Endoparasitic Wasp *Venturia Canescens* Identified by Cdna-Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis", *Molecular Ecology*, **12/12**, (2003) 3485-3492.

- [103] Wong, A., Smith, M.L., "Characterization of Aflp Markers in Damsselflies: Prevalence of Codominant Markers and Implications for Population Genetic Applications", *Genome*, **44**, (2001) 677-684.
- [104] Walton, M., "Molecular Markers: Which Ones to Use? Seed World" (1993).
- [105] Bishop, M.D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.T., Sunden, S., Hawkins, G.A., Toldo, S.S., Fries, R., Grosz, M.D., Yoo, J. and Beattie, C.W., "A Genetic Linkage Map for Cattle", *Genetics*, **136/2**, (1994) 619-639.
- [106] Kabaloğlu, A., Türkiye'de Bulunan Hypogymnia (Nyl.) Nyl. Türlerinde rDNA ITS Bölgesi Dizi Analizi ile Çeşitliliğin Tanımlanması [Identification of Variation in Hypogymnia (Nyl.) Nyl. Species by Rdna Its Region Sequence Analysis], Published Ph. D. Thesis, Ankara. (2007).
- [107] Kiraz, S., Özköse, E., Akyol, I., "Genetik Polimorfizmin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler": (2007).
- [108] Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M. and Hewlitt, O.M., "The Insect Cytochrome Oxidase I Gene: Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies", *Insect Molecular Biology*, **5/3**, (1996) 153-165.
- [109] Kandpal, R.P., Kandpal, G. and Weissman, S.M., "Construction of Libraries Enriched for Sequence Repeats and Jumping Clones, and Hybridization Selection for Region-Specific Markers", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91/1**, 88-92 (1994).
- [110] Ostrander, E.A., Jong, P.M., Rine, J. and Duyk, G., "Construction of Small-Insert Genomic DNA Libraries Highly Enriched for Microsatellite Repeat Sequences", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89/8**, (1992) 3419-3423.
- [111] Schlötterer, C., "Geneological Inference of Closely Related Species Based on Microsatellites", *Genetical Research*, **78/3**, (2001) 209-212.
- [112] Whitfield, C.W., Band, M.R., Bonaldo, M.F., Kumar, C.G., Liu, L., Pardinias, J.R., Robertson, H.M., Soares, M.B. and Robinson, G.E., "Annotated Expressed Sequence Tags and Cdna Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee", *Genome Research*, **12/4**, (2002) 555-566.
- [113] Pedra, J., Brandt, A., Westerman, R., Lobo, N., Li, H.M., Romero-Severson, J., Murdock, L.L. and Pittendrigh, B.R., "Transcriptome Analysis of the Cowpea Weevil Bruchid: Identification of Putative



Proteinases and A-Amylases Associated with Food Breakdown", *Insect Molecular Biology*, **12/4**, (2003) 405-412.

- [114] Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Ishikawa, H., Kudo, T. and Fukatsu, T., "Transcriptome Analysis of the Aphid Bacteriocyte, the Symbiotic Host Cell That Harbors an Endocellular Mutualistic Bacterium, *Buchnera*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102/15**, (2005) 5477-5482.
- [115] Fulton, R.E., Salasek, M.L., DuTeau, N.M. and Black, W.C., "Scp Analysis of Cdna Markers Provides a Dense Linkage Map of the *Aedes Aegypti* Genome", *Genetics*, **158/2**, (2001) 715-726.
- [116] Severson, D.W., Meece, J.K., Lovin, D.D., Saha, G. and Morlais, I., "Linkage Map Organization of Expressed Sequence Tags and Sequence Tagged Sites in the Mosquito, *Aedes Aegypti*", *Insect Molecular Biology*, **11/4**, (2002) 371-378
- [117] Graham, D.H., Holmes, J.L. and Black, W.C., "Identification of Quantitative Trait Loci Affecting Sex Determination in the Eastern Treehole Mosquito (*Ochlerotatus Triseriatus*)", *Journal of Heredity*, **95/1**, (2004) 35-45.
- [118] Türkyılmaz, S., Esenal, M. Ö., "Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları", *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **8/1**, (2002) 71-76.
- [119] Özmen, M., Tavuk Trakelerinde *Mycoplasma Gallisepticum*'un Real-Time Pcr Tekniği ile Saptanması Ve İstatistik Analizi, Published PhD Thesis, Çukurova Üniversitesi Adana, (2011).
- [120] Yılmaz, S., Devran, Z., "Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları", *Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya*, (2003).
- [121] Milligan, B.G., Leebens-Mack, J. and Strand, A.E., "Conservation Genetics: Beyond the Maintenance of Marker Diversity", *Molecular Ecology*, **3/4**, (1994) 423-435.
- [122] Austin, A.D. and Dillon, N., "Extraction and Pcr of DNA from Parasitoid Wasps That Have Been Chemically Dried", *Australian Journal of Entomology*, **36/3**, (1997) 241-244.
- [123] Fukatsu, T., "Acetone Preservation: A Practical Technique for Molecular Analysis", *Molecular Ecology*, **8/11**, (1999) 1935-1945.
- [124] Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D. and Wheeler, W.C., "The Strepsiptera Problem: Phylogeny of the Holometabolous Insect

Orders Inferred from 18s and 28s Ribosomal DNA Sequences and Morphology", *Systematic Biology*, **46/1**, (1997) 1-68.

- [125] Kim, C., Imura, Y., Tominaga, O., Su, Z.H., Osawa, S., "Pattern of Morphological Diversification in the Leptocarabus Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae) as Deduced from Mitochondrial Nd5 Gene and Nuclear 28s Rdna Sequences", *Mol. Biol. Evol.*, **17**, (2000) 137–145.