

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ ANADOLU'DA DAĞILIM GÖSTEREN PATATES BÖCEĞİ *Leptinotarsa*  
*decemlineata*, Say (Coleoptera: Chrysomelidae) POPULASYONLARINDA  
MİKROSATELLİT VARYASYONU

Salih Berkay BERKCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2018

Her Hakkı Saklıdır

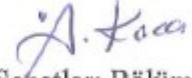
## TEZ ONAYI

Salih Berkay BERKCAN tarafından hazırlanan “İç Anadolu’da Dağılım Gösteren Patates Böceği *Leptinotarsa decemlineata*, Say (Coleoptera: Chrysomelidae) Populasyonlarında Mikrosatellit Varyasyonu” adlı tez çalışması 26/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. İrfan KANDEMİR  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



**Eş Danışman** : Dr. Öğr. Üyesi Ayça ÖZKAN KOCA  
Maltepe Üniversitesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü



**Jüri Üyeleri** :

**Başkan** : Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR  
Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. İrfan KANDEMİR  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

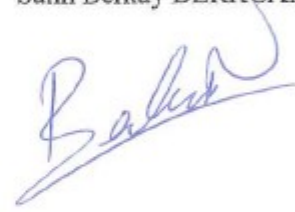
**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**  
Enstitü Müdürü

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

26.12.2018

Salih Berkay BERKCAN



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### İÇ ANADOLU'DA DAĞILIM GÖSTEREN PATATES BÖCEĞİ *Leptinotarsa decemlineata*, Say (Coleoptera: Chrysomelidae) POPULASYONLARINDA MİKROSATELLİT VARYASYONU

Salih Berkay BERKCAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayça ÖZKAN KOCA

Colorado Patates Böceği olarak bilinen *Leptinotarsa decemlineata*, patates ekimi yapılan yerlerde ürün kaybına neden olan en önemli zararlıdır. Bu tez çalışması kapsamında İç Anadolu Bölgesinden 29 lokaliteden toplanan *Leptinotarsa decemlineata* populasyonlarında genetik varyasyonları belirlemek için çekirdek DNA belirteçleri (mikrosatellit) kullanılmıştır. Toplam 11 mikrosatellit lokusu (LdA11b, LdB8b, LdD4h, LdE10e, LdE11c, LdAC5-2, LdAC5-22, LdGA4-5, LdGA5-11, LdGA4-18 ve LdGA5-30) fragment analizi ile çalışılmış ve toplam 145 örneğin genotipleri bu lokuslar açısından tespit edilmiştir. Bu lokuslara ait alel sayıları 4 ile 11 arasında değişmekte, en düşük alel LdE10e lokusunda ve en yüksek alel ise LdD4h lokusunda bulunmuştur. *Leptinotarsa decemlineata*'nın il bazında populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik parametreleri (Fst, F<sub>1s</sub>, Nm, Heterozigotluk, Genetik uzaklık) belirlenmiştir. Yapılan populasyon genetiği analiz sonuçlarına göre; İç Anadolu bölgesi populasyonları kendi içinde üç farklı gruba oluşturmaktadır. Faktoriyel Korrespondans Analizi dağılım grafiği ve Komşu bağlama yöntemi ile elde edilen ağaçta Konya tek başına bir grup oluştururken, Niğde, Eskişehir, Kayseri, Aksaray, Nevşehir, Ankara ve Karaman ikinci gruba, Sivas ve Yozgat ise üçüncü gruba oluşturmaktadır. Bu durum örneklerin toplandığı lokasyonlar göz önüne alındığında coğrafik konumların birbirine olan uzaklıklarıyla (FKA) tutarlılık göstermektedir. Populasyonlar bölge bazında değerlendirildiğinde ise populasyonlar arasında genetik varyasyonun düşük olduğu, var olan varyasyonların çoğunun populasyon içindeki bireyler arasında olduğu görülmektedir. Patates böceğinin ülkemizde son 50 yılda görülüyor olması, genetik varyasyonun düşük olması sonucunu desteklemektedir.

**Aralık 2018, 58 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Leptinotarsa decemlineata*, mikrosatellit, genetik varyasyon, populasyon genetiği

## ABSTRACT

Master Thesis

MICROSATELLITE VARIATION IN POTATO BEETLE *Leptinotarsa decemlineata*, Say  
(Coleoptera: Chrysomelidae) POPULATIONS DISTRIBUTED IN CENRAL ANATOLIA

Salih Berkay BERKCAN

Ankara Universtiy  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR

Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Ayça ÖZKAN KOCA

*Leptinotarsa decemlineata*, known as Colorado Potato beetle is the most important pests that cause the loss of product in the potato cultivation areas. Nuclear DNA markers (microsatellites) were used to determine genetic variations in *Leptinotarsa decemlineata* populations collected from 29 localities in Central Anatolia region within the scope of this thesis. A total of 11 microsatellite loci (LdA11b, LdB8b, LdD4h, LdE10e, LdE11c, LdAC5-2, LdAC5-22, LdGA4-5, LdGA5-11, LdGA4-18, and LdGA5-30) were studied by using fragment analyses and genotypes of 145 samples with respect to these loci were determined. The allele sizes of these loci were ranged between 4 and 11, the smallest allele size was found in LdE10e, and the largest allele size was obtained in LdD4h locus. With respect to *Leptinotarsa decemlineata* populations in Central Anatolia, within and among populations, genetic variation parameters (Fst, F1s, Nm, Heterozygosity, Genetic distance) were determined. According to the population genetic analysis; Populations of Central Anatolia divided into three groups. Factorial Correspondance Analyses (FCA) scatter plot and Neighbor-Joining tree resulted in similar outcome. According to the results of the analysis, Konya is formed a single group alone, Niğde, Eskişehir, Kayseri, Aksaray, Nevşehir, Ankara, and Karaman are clustered together and formed the second group, Sivas and Yozgat are included in the third group. The distances of geographical locations are well reflected to the FCA groupings. Low level of genetic variation was found among the populations in Central Anatolia and most of the variation was within the populations. Provided that the presence of Colorado Potato Beetle is not more than 50 years, the low level of genetic variation is expected.

December 2018, 58 pages

**Key Words:** *Leptinotarsa decemlineata*, microsatellite, genetic variation, population genetics

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ders dönemi ve tez yazım süreci boyunca gerek laboratuvar içinde, gerek sosyal hayattaki manevi yardımlarıyla desteğini esirgemeyen, bütün bilgi birikimini paylaşıp beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İrfan KANDEMİR'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), tezimin konusunun belirlenmesinde yardımcı olan, deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında bana fikirleriyle yön veren proje yürütücüsü hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayça ÖZKAN KOCA'ya (Maltepe Üniversitesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü), deneylerin gerçekleştirildiği laboratuvarın işleyişi konusunda beni bilgilendirip yönlendiren sayın Öğr. Gör. Engin SELVİ'ye (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), manevi desteklerini eksik etmeyen Müge KOCAAY ve Mahir Can ŞENKUŞ'a, ortak yaptığımız deneylerde karşılaştığımız zorlukların üstesinden beraber geldiğimiz laboratuvar arkadaşım Burcu LAÇIN'a, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen lisans ve yüksek lisans arkadaşım Tuna TEKME'ne, görsellerin düzenlenmesi konusunda yardımcı olan Gamze Zeynep BAYIN'a, zaman zaman çevirilerde bana yardımcı olan arkadaşım Nur ÇINAR'a en içten saygılarımı sunar ve teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca hayallerimi gerçekleştirmek konusunda maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, babam Cevat BERKCAN'a, annem Nuraygöl BERKCAN'a, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını, bursiyer öğrenci olarak çalıştığım "Patates Zararlısı *Leptinotarsa decemlineata*, Say ( Coleoptera: Chrysomelidae ) Populasyonlarının mtDNA (Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi *COI+COII*) & n DNA (Mikrosatellit) Karakterizasyonu ve İnsektisit Direnci İle İlişkili Asetilkolinesteraz 2 (*AChE2*) Genindeki Mutasyon Frekansı Farklılığı-Proje No: 114Z945" isimli proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Salih Berkay BERKCAN

Ankara, Aralık 2018

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|   |     |
|---|-----|
| ETİK .....  | i   |
| ÖZET.....   | ii  |
| ABSTRACT .....  | iii |
| TEŞEKKÜR .....  | iv  |
| SİMGELER DİZİNİ .....   | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | ix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....   | x   |
| 1. GİRİŞ .....  | 1   |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....   | 7   |
| 2.1 <i>Leptinotarsa decemlineata</i> İle İlgili Genel Bilgiler .....      | 7   |
| 2.1.1 Sistematikteki yeri.....  | 7   |
| 2.1.2 Order: Coleoptera.....  | 8   |
| 2.1.3 Family: Chrysomelidae ve Subfamily: Chrysomelinae .....             | 9   |
| 2.1.4 Genus: <i>Leptinotarsa</i> (Chevrolat in Dejean, 1836) .....        | 9   |
| 2.1.5 Species: <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say, 1824) .....         | 10  |
| 2.2 Populasyon Genetiği ve Populasyon Genetiğinin Temel Prensipleri ..... | 14  |
| 2.2.1 Hardy-Weinberg kuralı.....  | 15  |
| 2.2.2 Doğal seçim .....   | 17  |
| 2.2.3 Genetik sürüklenme .....  | 17  |
| 2.2.4 Mutasyon.....   | 17  |
| 2.2.5 Gen akışı.....  | 18  |
| 2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....                                      | 18  |
| 2.3.1 PZR bileşenleri .....   | 19  |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.2 PZR basamakları .....                                  | 20 |
| 2.4 DNA Belirteçleri.....                                    | 21 |
| 2.4.1 RAPD (Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA).....         | 21 |
| 2.4.2 AFLP (Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi)..... | 21 |
| 2.4.3 RFLP (Kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi).....    | 22 |
| 2.4.4 SSR (Basit dizi tekrarları).....                       | 22 |
| 2.4.5 SNP (Tek nükleotid polimorfizmi) .....                 | 22 |
| 2.4.6 Belirteç olarak kullanılan DNA bölgeleri .....         | 23 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                   | 26 |
| 3.1 Örneklerin Toplanması .....                              | 26 |
| 3.2 Total DNA İzolasyonu .....                               | 28 |
| 3.2.1 Kullanılan tamponlar .....                             | 28 |
| 3.2.2 CTAB DNA izolasyon prosedürü .....                     | 29 |
| 3.3 DNA Miktarının Tayini.....                               | 30 |
| 3.4 Mikrosatellitler ve Kullanılan Primerler .....           | 31 |
| 3.5 PZR Amplifikasyonu .....                                 | 31 |
| 3.6 PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforeziyle Tayini.....     | 33 |
| 3.7 Fragment Analizi ve Okunması .....                       | 35 |
| 3.8 Filogenetik Analizler .....                              | 36 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                  | 39 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                    | 50 |
| KAYNAKLAR .....  | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ.....  | 58 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| %                 | Yüzde              |
| Mg <sup>+2</sup>  | Magnezyum          |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnezyum diklorür |
| °C                | Santigrat derece   |
| +                 | Artı               |
| &                 | Ve                 |
| β                 | Beta               |
| -                 | Eksi               |
| μl                | Mikrolitre         |

### Kısaltmalar

|                   |  |
|-------------------|--|
| A                 | Adenin   |
| A                 | Ortalama alel sayısı                                       |
| AChE2             | Asetilkolinesteraz 2                                       |
| AFLP              | Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi                 |
| AMOVA             | Analysis of Molecular Variance (Moleküler varyans analizi) |
| BAPS              | Bayesian Analysis of Population Structure                  |
| C                 | Sitozin  |
| C:IAA             | Kloroform: izoamil alkol                                   |
| COI               | Sitokrom oksidaz altünite I                                |
| COII              | Sitokrom oksidaz altünite II                               |
| CPB               | Colorado Patates Böceği                                    |
| CTAB              | Setil trimetil amonyum bromür                              |
| Da                | Populasyonlar arası genetik uzaklık                        |
| dATP              | Deoksiribo adenin trifosfat                                |
| dCTP              | Deoksiribo sitozin trifosfat                               |
| dGTP              | Deoksiribo guanin trifosfat                                |
| dH <sub>2</sub> O | Distile su   |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                                     |
| dNTP              | Deoksiribo nükleotid trifosfat                             |
| dTTP              | Deoksiribo timin trifosfat                                 |
| E                 | Doğu   |
| EDTA              | Etilendiamin tetraasetik asit                              |
| EtBr              | Etidyum bromür   |
| FAO               | Food and Agriculture Organization                          |
| FCA               | Faktöriyel benzerlik analizi                               |
| Fct               | Gruplar arası varyans                                      |
| F <sub>is</sub>   | Tür içi üreme miktarı ölçümü                               |
| F <sub>sc</sub>   | Populasyonlar arası varyans                                |
| F <sub>st</sub>   | Gruplar ve populasyonlar arası fiksasyon indeksi           |

|          |  |
|----------|--|
| G        | Guanin   |
| H        | Ortalama heterozigotluk                          |
| HCl      | Hidroklorik asit                                 |
| He       | Beklenen heterozigotluk                          |
| Ho       | Gözlenen heterozigotluk                          |
| H-W      | Hardy-Weinberg                                   |
| Ld       | Linkage Disequilibrium                           |
| M        | Molar  |
| mm       | Milimetre  |
| mtDNA    | Mitokondriyal DNA                                |
| n        | Ardışık tekrar sayısı                            |
| N        | Kuzey  |
| <i>N</i> | Örnek sayısı                                     |
| NaCl     | Sodyüm Klorür                                    |
| ng       | Nanogram   |
| NJ       | Neighbour-Joining                                |
| Nm       | Gen akışı değeri                                 |
| nm       | Nanometre  |
| P        | Önem derecesi                                    |
| <i>P</i> | Polimorfizm gösteren lokusların yüzdesi          |
| pmol     | Pikomol  |
| Pop      | Populasyon                                       |
| PZR      | Polimeraz zincir reaksiyonu                      |
| RAPD     | Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA               |
| RFLP     | Kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi          |
| Rpm      | Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı) |
| SNP      | Tek nükleotid polimorfizmi                       |
| SSR      | Basit dizi tekrarları                            |
| T        | Timin  |
| Ta       | Primer bağlanma sıcaklığı                        |
| TAE      | Tris asetik asit EDTA                            |
| TE       | Tris EDTA  |
| TÜİK     | Türkiye İstatistik Kurumu                        |
| UV       | Ultraviyole                                      |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

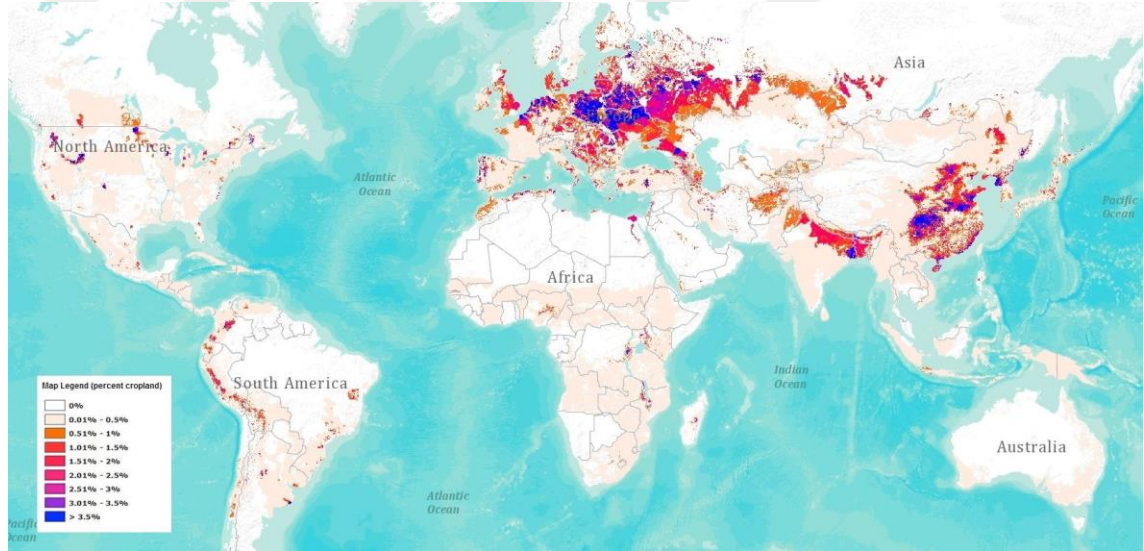
|  |    |
|--|----|
| Şekil 1.1 Dünyada patates ekimi yapılan yerler .....   | 1  |
| Şekil 1.2 Türkiye’de ekilen patates bitkisinin illere göre üretim miktarları .....                                 | 4  |
| Şekil 2.1 Coleoptera takımına ait filogeni diyagramı .....   | 8  |
| Şekil 2.2 Ergin Patates böceği.....  | 11 |
| Şekil 2.3 Patates böceği yumurtaları.....  | 12 |
| Şekil 2.4 Patates böceği larvaları .....   | 12 |
| Şekil 2.5 Patates bitkisinin yapraklarıyla beslenen larvalar.....  | 13 |
| Şekil 2.6 Üreme davranışı gösteren ergin patates böcekleri .....   | 14 |
| Şekil 2.7 Evrim mekanizmalarının özeti (Freeman ve Herron 2009) .....  | 15 |
| Şekil 2.8 PZR yönteminin genel basamakları ( <a href="https://www.ck12.org/">https://www.ck12.org/</a> 2012) ..... | 19 |
| Şekil 2.9 Kayma mekanizmasıyla oluşan mutasyon .....   | 24 |
| Şekil 2.10 Eşit olmayan crossing-over .....  | 25 |
| Şekil 3.1 Çalışmada toplanan <i>Leptinotarsa decemlineata</i> örneklerinin alındığı lokasyonlar .....              | 28 |
| Şekil 3.2 PZR ürünlerinin jele yüklenmesi .....  | 34 |
| Şekil 3.3 UV ışığı altında görüntülenen jel.....   | 35 |
| Şekil 3.4 a. LdE11c lokusu için okunan aleller, b. Her lokus için okunan alellerin pikleri.....                    | 36 |
| Şekil 4.1 Her bir lokus için belirlenen toplam alel sayıları.....  | 39 |
| Şekil 4.2 Nei (1972) genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan mikrosatellit NJ ağacı.....                       | 47 |
| Şekil 4.3 Populasyonlar arasındaki ilişkileri gösteren üç boyutlu FCA grafiği.....                                 | 48 |
| Şekil 4.4 Populasyonlara katkı yapan bireylerin genetik yapılanmalarını gösteren BAPS görseli .....                | 49 |
| Şekil 4.5 Populasyonların genetik yapılanmasını gösteren BAPS görseli.....   | 49 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 1.1 FAO 2015 verilerine göre dünyada en yüksek miktarda patates üretimi yapan ülkeler .....  | 2  |
| Çizelge 1.2 TÜİK 2017 verilerine göre İç Anadolu bölgesinde patates üretimi yapılan illerde ve Türkiye genelinde patates üretim miktarları ..... | 3  |
| Çizelge 3.1 Çalışma için toplanan patates böceği örneklerinin toplandığı iller, ilçeler, köy/mahalleler ve örnek sayıları .....                  | 26 |
| Çizelge 3.2 8 örneğe ait DNA miktarları ve kirlilik oranları .....   | 30 |
| Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primer çiftleri .....   | 31 |
| Çizelge 3.4 LdE11c, LdGA4-5, LdGA5-11 ve LdGA4-18 lokusları için kullanılan PZR programı .....   | 32 |
| Çizelge 3.5 LdD4h lokusu için kullanılan PZR programı .....  | 32 |
| Çizelge 3.6 LdAC5-2 lokusu için kullanılan PZR programı .....  | 32 |
| Çizelge 3.7 LdA11b, LdB8b, LdE10e, LdAC5-22 ve LdGA5-30 lokusları için kullanılan PZR programı .....   | 33 |
| Çizelge 3.8 PZR amplifikasyonu için hazırlanan karışım oranları .....  | 33 |
| Çizelge 4.1 Her bir populasyon ve lokus için belirlenen alel sayıları .....  | 39 |
| Çizelge 4.2 Her bir populasyon ve lokus için hesaplanan ortalama alelik zenginlik değerleri .....  | 40 |
| Çizelge 4.3 Her bir populasyon için hesaplanan heterozigotluk değerleri .....  | 41 |
| Çizelge 4.4 AMOVA analiz değerleri .....   | 42 |
| Çizelge 4.5 Her bir populasyon için hesaplanan $F_{IS}$ değerleri .....  | 42 |
| Çizelge 4.6 Linkage Disequilibrium (Ld) ve Hardy-Weinberg Eşitliği test sonuçları ...  | 44 |
| Çizelge 4.7 Tüm populasyonlar için hesaplanan $F_{ST}$ değerleri ve populasyon farklılaşmalarının önem dereceleri .....                          | 45 |
| Çizelge 4.8 Tüm populasyonlar için hesaplanan genetik mesafe ( $D_A$ ) değerleri .....   | 46 |

## 1. GİRİŞ

Dünyada “Colorado Patates Böceği (CPB)”, ülkemizde de patates böceği olarak bilinen *Leptinotarsa decemlineata* ilk kez patates bitkisinin yabancı türü olan (*Solanum rostratum*) üzerinde görülmüştür. Günümüzde ise CPB Dünya’da yaygın olarak *Solanum tuberosum* ile beslenmektedir. Meksika’da yaygın olarak bulunur ve oraya özgü bir türdür. Patates bitkisi 1860’larda Amerika’nın Midwest bölgesine yayılmıştır. Patates böceği de 1880 yılında Amerika’nın doğu kıyılarına ulaşmış, 1920’lerde ise Avrupa’da Fransa’nın batısında görülmeye başlamıştır ve yaklaşık 30 yıl içerisinde tüm Avrupa’ya yayıldığı tespit edilmiştir (Grapputo vd. 2005), (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Dünyada patates ekimi yapılan yerler (<https://www.potatopro.com/> 2012)

Patatesin Türkiye’de ilk olarak yetiştirilmeye başlaması ile ilgili birçok farklı görüş mevcuttur. Bunlardan ilki Zhukovsky (1933)’e göre patates, ülkemize 1853 yılında girmiş ve 19. yüzyılda tüketilmeye başlanmıştır. Tarımına ise ilk defa Sakarya nehri vadisinde, Karadeniz boğazı yakınlarında ve Adapazarı bölgesinde başlanmış, daha sonra tüm ülkeye yayılmıştır. İkinci olarak İpek 1938 yılında, patatesin Türkiye’de ilk defa, 1876 yılında Adapazarı ovasında yetiştirildiğini bildirmiştir (Onaran vd. 2000). İlisulu (1957)’nin yaptığı araştırmaya göre ise patatesin 1850 yılında Rusya’dan Kafkasya

üzerinden Türkiye'ye girdiğini ve ilk olarak Doğu Anadolu ve Karadeniz'in bazı yaylalarında yetiştirilmeye başlanmış olabileceğini bildirmiştir.

Patates dünyada ve ülkemizde temel besin kaynaklarından sayılmaktadır. FAOSTAT 2015 verilerine göre dünya üzerinde patates üreten ülkelerin başında 95.987.500 ton ile Çin Halk Cumhuriyeti gelmektedir. Bunu takip eden ülkeler yaklaşık 20.000.000 ton ve üzerinde üretim yapan Hindistan (45.343.600 ton), Rusya (30.199.100), Ukrayna (22.258.600 ton) ve ABD (19.843.900)'dir. Türkiye patates yetiştiriciliğinde on dokuzuncu sırada yer almakta olup üretim 3.948.000 ton civarındadır (Çizelge 1.1).

Türkiye patates üretimi için uygun coğrafik şartlara sahiptir. Buna bağlı olarak ülke genelinde 81 ilden 75'inde patates üretimi yapılmaktadır (Şekil 1.2). Patates üretiminde İç Anadolu bölgesi Türkiye genelinde üretilen toplam patatesin büyük bir kısmını (%61) üstlenmektedir. Niğde ve Nevşehir illerinde gerçekleştirilen toplam üretimler ise İç Anadolu bölgesinin toplam üretiminin %23'ünü üstlenmektedir (Çalışkan vd. 2010). TÜİK 2017 verilerine göre Türkiye'de en fazla patates üreten ilk üç il sırasıyla Niğde (835.200 ton), Konya (567.076 ton) ve Kayseri (351.270 ton)'dir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1 FAO 2015 verilerine göre dünyada en yüksek miktarda patates üretimi yapan ülkeler

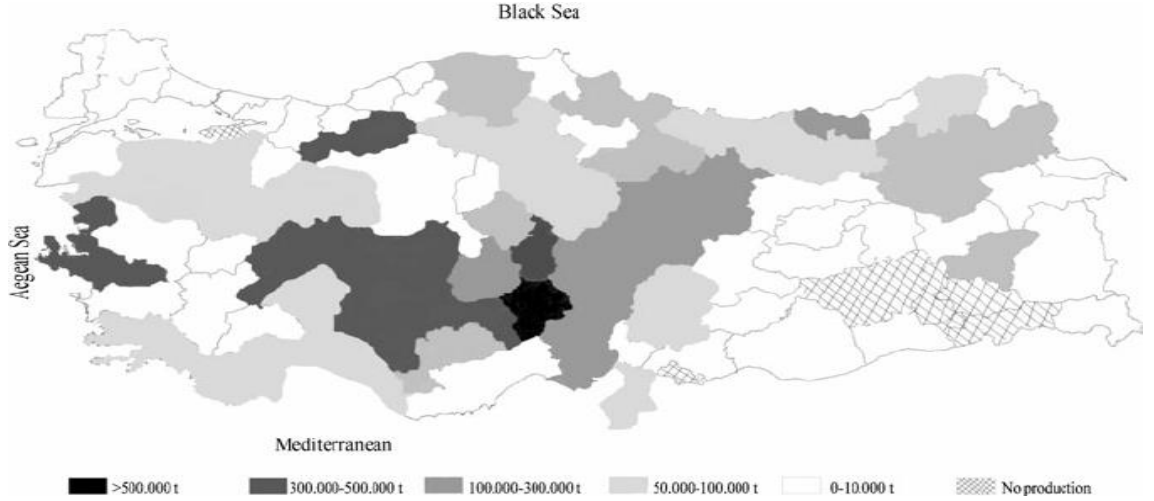
| Sıralama | Ülke      | Üretim Miktarı (Ton) |
|----------|-----------|----------------------|
| 1        | Çin       | 95.987.500           |
| 2        | Hindistan | 45.343.600           |
| 3        | Rusya     | 30.199.100           |
| 4        | Ukrayna   | 22.258.600           |
| 5        | ABD       | 19.843.900           |
| 6        | Almanya   | 9.669.700            |
| 7        | Bangladeş | 8.603.000            |
| 8        | Fransa    | 6.975.000            |
| 9        | Hollanda  | 6.801.000            |

Çizelge 1.1 FAO 2015 verilerine göre dünyada en yüksek miktarda patates üretimi yapan ülkeler (devam)

|    |                  |           |
|----|------------------|-----------|
| 10 | Polonya          | 6.334.200 |
| 11 | Belarus          | 5.913.710 |
| 12 | Birleşik Krallık | 5.580.000 |
| 13 | İran             | 5.560.000 |
| 14 | Cezayir          | 4.928.030 |
| 15 | Mısır            | 4.800.000 |
| 16 | Kanada           | 4.620.000 |
| 17 | Peru             | 4.570.670 |
| 18 | Malavi           | 4.535.960 |
| 19 | Türkiye          | 3.948.000 |
| 20 | Pakistan         | 3.802.200 |

Çizelge 1.2 TÜİK 2017 verilerine göre İç Anadolu bölgesinde patates üretimi yapılan illerde ve Türkiye genelinde patates üretim miktarları

| Sıralama | İller     | Üretim Miktarı (Ton) |
|----------|-----------|----------------------|
| -        | Türkiye   | 4.800.000            |
| 1        | Niğde     | 835.200              |
| 2        | Konya     | 567.076              |
| 3        | Kayseri   | 351.270              |
| 4        | Nevşehir  | 249.626              |
| 5        | Aksaray   | 207.810              |
| 6        | Sivas     | 182.149              |
| 7        | Eskişehir | 86.542               |
| 8        | Karaman   | 31.067               |
| 9        | Yozgat    | 27.600               |
| 10       | Ankara    | 18.595               |



Şekil 1.2 Türkiye’de ekilen patates bitkisinin illere göre üretim miktarları (Çalışkan vd. 2010)

Patates böceğinin Türkiye’de ilk olarak 1963 yılında Trakya bölgesinde Edirne-Yunanistan sınır bölgesinde görüldüğü bildirilmiştir (Atak 1973). Bu bilginin dışında, başka yolla patates böceğinin Türkiye’ye girişi veya böceğin Türkiye coğrafyasında nasıl dağıldığı ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Patates böceğinin ilk kez Türkiye-Yunanistan sınırında görülmüş olduğu bilgisi, ülkemizdeki popülasyonların Avrupa kökenli olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Patates’in Türkiye’ye girişi ile ilgili olarak ortaya atılan görüşler değerlendirildiğinde, böceğin farklı bölgelerde de ilk olarak görülmüş olabileceği söz konusudur. Ayrıca böceğin uçma kabiliyeti her ne kadar zayıf olsa da kuvvetli rüzgarların yardımıyla uzun mesafelere göç ederek diğer bölgelere yayıldığı bilinmektedir. Bu açılarından bakıldığında, araştırmalarımız dahilinde bildiğimiz, Türkiye’deki patates zararlılarının başında yer alan patates böceği popülasyonlarının durumu, genetik yapısı, Türkiye’deki göç yolu ve kolonizasyonu ile ilgili genetik temellere dayanan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Dünya çapında yaygın olarak her bölgede patates ekimi yapıldığı bilinmesine rağmen bu ekim alanlarında patates ürününde büyük ekonomik kayıplara yol açan patates böceği popülasyonlarının genetik yapısını anlamaya yönelik çalışmalar oldukça azdır. Yapılan sitogenetik çalışmalarla patates böceği popülasyonlarında 3 farklı kromozomal ırkın varlığı gösterilmiş (Hsiao ve Hsiao 1983), fakat bu çalışmalar patates böceği

populasyonlarının yapısını çözmek için yeterli olmamıştır. Jacobson (1983) 11 Amerika ve 1 Avrupa populasyonunda, 11 genetik lokustaki (ACPH, EST-1, EST-2, FUM, G-6PDH, GOT,  $\alpha$ -GPDH, IDH, MDH, ME, SOD) enzim ürünleri bakımından varyasyonu incelemek için nişasta jel elektroforezi metodunu kullanarak çalışma yapmış ve Amerika - Avrupa populasyonlarının genetik olarak benzer olduğunu; ancak SOD lokusunun Meksika populasyonlarını ayırmada tanımlayıcı olduğunu bulmuş ve burada yaşayan bireylerdeki heterozigotluğun diğer popülasyonlara göre daha düşük olduğunu saptamıştır. Azeredo-Espin vd. (1996), Kuzey Amerika'da farklı eyaletlerden elde ettiği 4 lokal populasyonunda RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) metodunu kullanarak mitokondriyal DNA (mtDNA)'da 3 kesim enzimi (*EcoRI*, *HpaI*, *PstI*) ile patates böceği populasyonları içindeki varyasyonun, populasyonlarının orjininin ve türün Kuzey Amerika'ya yayılmasının belirlenmesinde bu yöntemin kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca aynı kesim enzimleri ve RFLP yöntemi ile bu defa 10 farklı populasyonda genetik varyasyonu, populasyonlar içindeki ve arasındaki polimorfizmi ve populasyon yapısını belirlemede bu yöntemi kullanmıştır. Bu yöntemler ile coğrafik bölgeler boyunca önemli farklılıklar gösteren 16 haplotip bulunmuştur (Azeredo-Espin vd. 1991). Sidorenko ve Berezovska (2002) Ukrayna'nın Kiev şehrindeki lokal populasyonların genetik yapısını ortaya çıkarmak için farklı bir yöntem olan RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) metodu ile 3 lokal populasyonda çalışma yapmış ve elde edilen bulgular populasyon yapılanmasının tam olduğunu göstermiştir. Bunun populasyonların büyüklüğünün kontrolünde kullanılan insektisitlere adaptasyon ile açıklanabileceği belirtilmiştir.

mtDNA gen bölgesi dizisini ve AFLP (çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) belirtecini kullanarak Kuzey Amerika'da 5 populasyon ve Avrupa'da 8 populasyon ile populasyonların genetik yapısını ve genetik çeşitliliğini araştırılmıştır. Kuzey Amerika populasyonlarında yüksek düzeyde mitokondriyal ve nükleer değişkenlik ve Orta Amerika'daki populasyonlarda yüksek genetik değişkenlik bulunmuştur (Grapputo vd. 2005). Avrupa populasyonlarında hem AFLP belirteci hem de mtDNA gen bölgesi analizi sonucu genetik çeşitlilikte önemli düşüş görülmüştür. Tek bir haplotipten Avrupa populasyonlarının orjin aldığı belirtilmiştir. AFLP belirteciye göre oluşturulan neighbour-joining ağacında her iki kıta populasyonları 2 küme şeklinde ayrılmış ve

Avrupa populasyonları da tek kümede batı ve doğu populasyonları olarak 2 kola ayrılmıştır. Grapputo (2006) tarafından daha sonra patates böceğinde mikrosatellit belirteçleri geliştirilmiş ve bu belirteçler karakterize edilmiştir. Grapputo (2006) 4 *Leptinotarsa decemlineata* populasyonundan toplanan 54 bireyde 11 mikrosatellit lokusu ile çalışmış ve bu karakterize ettiği mikrosatellit belirteçlerini genetik çeşitlilik, populasyon yapısı ve ebeveyn analizi hesaplamalarında kullanılabileceğini belirtmiştir. Çin patates üretiminde ilk sırada yer alan ülkedir. Patates böceği Çin’de ilk kez 1993 yılında bulunmuş ve Xinjiang’da Uygur Bölgesi’ne yayılmıştır. Zhang vd. (2013) bu bölgedeki genetik varyasyonu ve göç şeklini daha iyi anlamak için daha önceden Grapputo (2006)’nun patates böceğinde karakterize ettiği 11 mikrosatellit belirtecinden 7 tanesini kullanmıştır. Xinjiang boyunca 10 populasyondaki genetik ilişkiyi ve gen akışını aydınlatmaya çalışmıştır. Genetik çeşitliliğin dünyadaki diğer populasyonlardan az olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada özellikle patates böceğinin kolonize olduğu alanlarda düşük genetik çeşitlilik gösterse de yeni bölgelere adapte olmada yeterli genetik çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir.

Bu verilere dayanarak ülkemizin dünya çapında patates üretimi yapan ülkeler arasında üst sıralarda yer alması, bölgeler bazında üretimde İç Anadolu bölgesinin ilk sırada yer alması ve burada bulunan illerde yapılan patates üretim miktarının çok yüksek olması nedeniyle bu tez çalışmasında, İç Anadolu Bölgesi ekim alanlarında patates bitkisine zarar veren patates böceği *Leptinotarsa decemlineata*, Say (Coleoptera: Chrysomelidae) populasyonlarında, moleküler belirteçlerinden biri olan mikrosatellit lokusları (LdA11b, LdB8b, LdD4h, LdE10e, LdE11c, LdAC5-2, LdAC5-22, LdGA4-5, LdGA5-11, LdGA4-18, LdGA5-30) kullanılarak genetik varyasyonun ortaya çıkarılması ve elde edilen genotip verilerinden populasyon genetiği istatistiksel analizleri ile genetik çeşitlilik, populasyon yapısı ve populasyon genetik parametrelerinin belirlenmesi amaç edinilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 *Leptinotarsa decemlineata* İle İlgili Genel Bilgiler

Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata*), ülkemizde patates bitkisi üzerinde zararlı olan ve mücadele edilmediği takdirde ciddi ürün kaybına neden olan ana zararlıdır. Patates Böceği, Coleoptera takımından Chrysomelidae familyası içinde bulunur.

#### 2.1.1 Sistematikteki yeri

Patates Böceği ilk olarak 1811'de Thomas Nuttall tarafından gözlemlenmiş ve 1824'te Amerikalı Entomolog Thomas Say tarafından resmen açıklanmıştır. Thomas Say tarafından açıklanan patates böceğinin sistematik olarak yeri;

**Kingdom:** Animalia

**Phylum:** Arthropoda

**Class:** Insecta

**Order:** Coleoptera (Linnaeus, 1758)

**Family:** Chrysomelidae (Latreille, 1802)

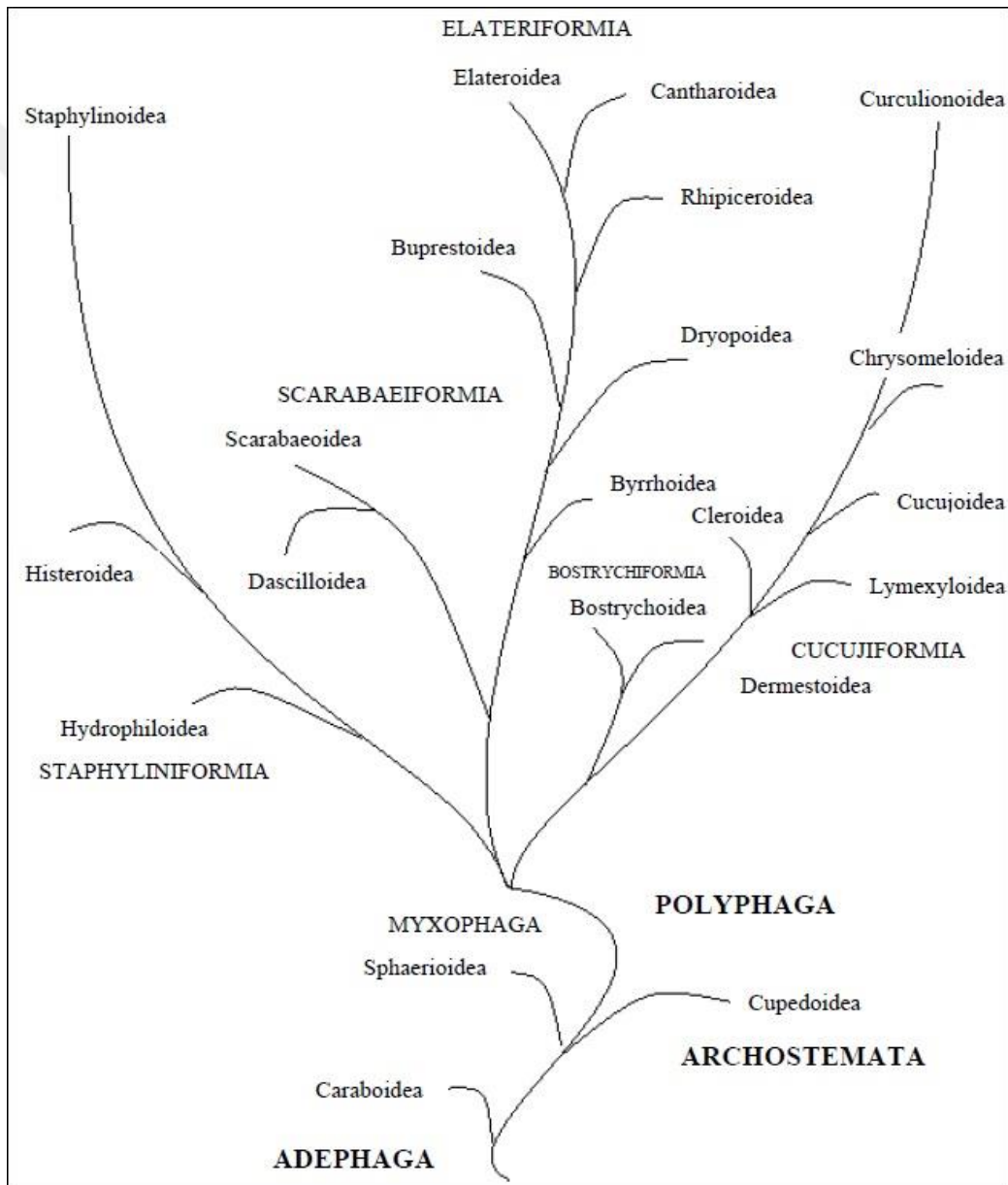
**Subfamily:** Chrysomelinae (Latreille, 1802)

**Genus:** *Leptinotarsa* (Chevrolat in Dejean, 1836)

**Species:** *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824)

## 2.1.2 Order: Coleoptera

Coleoptera; Archostemata, Myxophaga, Adephaga ve Polyphaga alttakımlarıyla tanımlanan ve yaklaşık 350.000 tür ile en büyük böcek takımıdır (Şekil 2.1) (Caterino vd. 2002, Gullan ve Cranston 2010). Coleoptera takımına bağlı üyelere ait en eski fosiller alt Permiyen dönemine aittir. Alt Permiyenden sonra takım birçok farklı formlara ayrılmıştır (Ponomarenko 1995).



Şekil 2.1 Coleoptera takımına ait filogeni diyagramı (Gillot 1982)

Coleoptera takımının en karakteristik özelliği ön kanatların sertleşip elitrayı oluşturmasıdır. Elitra arka kanatları örterek arka kanatları korur ve hareketi sadece uçuş öncesi ve sonrasında açılıp kapanmayla sınırlıdır. Ayrıca göğüs iskeletinin basit şekilde olması ve göğüs kaslarının sayısının az olması da diğer bir ayırt edici özelliğidir.

Bunun dışında vücutları genellikle çok sertleşmiştir. Çiğneyici ağız tipine sahiptirler. Anten segmentleri genellikle 11'i geçmez. Bacaklar kazıcı bacak, yüzücü bacak ve sıçrayıcı bacak gibi değişik şekillerde olabilir. Abdomen dişilerde 9, erkeklerde ise 10 segmentlidir. Holometabol gelişim gösterirler (Gullan ve Cranston 2010).

### **2.1.3 Family: Chrysomelidae ve Subfamily: Chrysomelinae**

Chrysomelidae familyası yaprak böcekleri olarak bilinir ve 19 altfamilya, 2000'den fazla sayıda cins ve yaklaşık 50.000 tür ile temsil edilirler (Lopatin 1977). Bu familyanın üyeleri dünya genelinde tarımda ürün kayıplarına neden olduğu bilinmektedir.

Chrysomelinae büyük bir altfamilyadır. Dünyada 130 cins ve yaklaşık 3000 türü Lopatin (1977) tarafından tespit edilmiştir. Türler boy, şekil ve renk olarak çok fazla farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla 2-30 mm uzunlukta, oval ve parlak renklidirler (Wilcox 1954, Booth vd. 1990). Jolivet vd. (1988) araştırmalarına göre Chrysomelinae altfamilyasına ait türlerin %40'ının bireyleri ergin ve larval dönemde 47 bitki familyasında ciddi ürün kayıplarına neden olduğu bilinmektedir. Bazı türlerin viral bitki hastalıklarının vektörü olmasına rağmen bazı türler de yabancı otlara karşı biyolojik mücadelede kullanıldıkları tespit edilmiştir (Booth vd. 1990, Aslan 1994).

### **2.1.4 Genus: *Leptinotarsa* (Chevrolat in Dejean, 1836)**

*Leptinotarsa*, aktif spekülasyon sürecinde olan evrimsel olarak yeni bir cins olarak kabul edilmektedir. Orijini büyük olasılıkla Güney Meksika'dır (Medvedev 1981). Jacques (1988) bu cinse ait toplam 41 türü listelemiştir. *Leptinotarsa* cinsine ait 20 tür için konakçı

bitkiler bilinmektedir (Hsiao ve Hsiao 1983). Bu konakçı bitkilerin 9 tanesi *Solanaceae*, 9 tanesi *Compositae* ve 1 tanesi *Zygophyllaceae* familyaları olmak üzere 10 tür vardır.

*Leptinotarsa* türlerinin yaşam döngüleri veya biyolojileri oldukça benzerlik göstermektedir. *Leptinotarsa* türleri yumurtalarını herhangi bir koruma olmaksızın konukçunun yapraklarına veya yaprak saplarına bırakırlar. Bazı türler yumurtalarını kümeler halinde yaprağın üst kısmına bırakırken, bazı türler ise yaprağın alt kısımlarını tercih ederler (Jacques 1988).

*Leptinotarsa juncta* gibi bazı türler birkaç tane yumurta bırakırken, *Leptinotarsa lineolata* 20-40 arası düzensiz küme halinde, *Leptinotarsa decemlineata* ise yine küme halinde yaklaşık 100 tane yumurta bırakır. Larvalar 7 gün içinde yumurtadan çıkar ve hemen konukçunun yapraklarıyla beslenmeye başlarlar. Larvaların beslenme davranışları bazı *Leptinotarsa* türleri için toplu şekilde olduğu gözlemlenmiştir (Jacques 1988).

Genellikle 4 larval dönem geçirirler. Larva dönemleri iklim koşullarına bağlı olarak 15 gün kadar sürebilir. Beslenmesini tamamlayan larvalar toprak altına girerek prepupa aşamasına geçerler. Prepupa aşaması larvalar için aktif bir dönem değildir ve dördüncü larval dönem olarak görülür. Papatasyon yine toprak altında gerçekleşir ve ergin bireyin pupadan çıkışı yaklaşık 10 gün kadar sürer (Jacques 1988).

### **2.1.5 Species: *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824)**

Patates böceği ilk olarak Thomas Say tarafından 1824 yılında *Chrysomela* cinsinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra morfolojik özelliklere dayanarak *Doryphora* cinsine taşınmıştır (Alyokhin vd. 2012). Son olarak Stål 1865 yılında bu türün yeni tanımlanmış bir cins olan *Leptinotarsa*'da yer almasını sağlamıştır.

Patates böceği Thomas Nuttall tarafından ilk olarak 1811'de Amerika Birleşik Devletleri'nde toplanmıştır. Daha sonra Thomas Say 1819 ve 1820'de Iowa – Nebraska

sınırının yakınında ek koleksiyonlar yapmış ve bunu bilim için tarif etmiştir (Casagrande 1985, Jacques 1988).

Günümüzde Patates böceği tüm Avrupa, Türkiye, İran, Orta Asya ve Batı Çin'de yetiştirilen patates bitkilerine zarar vermektedir (Jolivet 1991, Weber 2003). Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da yaklaşık 16 milyon kilometre karelik alanı kaplamakta ve popülasyonlarını genişletmeye devam etmektedirler (Weber 2003). Ayrıca potansiyel olarak Doğu Asya, Hint Yarımadası, Güney Amerika, Afrika, Yeni Zelanda ve Avustralyanın ılıman bölgelerine yayılabileceği bildirilmiştir (Worner 1988, Jolivet 1991, Weber 2003).

Erginler şekil olarak ovaldir ve yaklaşık 10 mm uzunluğunda 7 mm genişliğindedir. Renkleri soluk sarıdır. Elitranın tüm uzunluğu boyunca 5 şerit siyah çizgileri vardır. Baş ve pronotumda siyah noktalar vardır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Ergin Patates böceği

Yumurtalar yaklaşık 1.5 mm uzunluğundadır ve sarı renklidir. Yumurtadan çıkmaya hazır olan larvalar olduğu zaman renk sarıdan turuncuya d6nmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Patates b6ceği yumurtaları

Larvalar siyah kafalı, siyah bacaklı ve her iki tarafta sıralı siyah renkte erikiform tiptedir. Papatasyon 6ncesi 4 instar d6nem ge6irmektelerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Patates b6ceği larvaları

Patates böceği Solanaceae familyasından yaklaşık 10 türü istila edebilirler. Bunların arasında patates (*Solanum tuberosum*), domates (*Solanum lycopersicum*) ve patlıcan (*Solanum melongena*) en önemli konaklardır (Hare 1990). Erginler ve larvalar bu yaprakları yiyerek beslenmekte ve en fazla zararı son dönem larvaları oluşturmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Patates bitkisinin yapraklarıyla beslenen larvalar

Patates böceğinin yüksek populasyon yoğunluğuna ulaştığı yıllarda larvaların verdiği zarar bitkilerin erken dönemlerinde herhangi bir mücadele yapılmaması durumunda % 100'e kadar çıkabilmektedir. Patates böceği aynı zamanda bakteriyel ring rot hastalığının vektörüdür ve iklimsel koşullar uygun olduğu takdirde patateslerde yüksek oranda ürün kaybına neden olabilmektedir (Christie vd. 1991).

Diyapoz, Patates böceğinin çevreye uyumunda çok önemli bir rol oynar ve ekili patateslere zarar vermede önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Diyapozdaki bireyler

kullanılan insektisitlerin etkilerinden kaçarak ve koşullar elverişli hale geldiğinde diyapozdan çıkarak eski nüfus yoğunluklarına ulaşabilirler. Bu da böceğin çok daha soğuk iklimlerde kolonileşmesine olanak sağlamaktadır (Biever ve Chauvin 1990).

Patates böceği'nde üreme davranışı, yavruların genetik çeşitliliğini en üst düzeye çıkarmaya yöneliktir. Hem erkek hem de dişi erginler farklı partnerlerle çoklu eşleşmeler gerçekleştiren ve oldukça sık görülebilen bir türdür (Szentesi 1985) (Şekil 2.6).

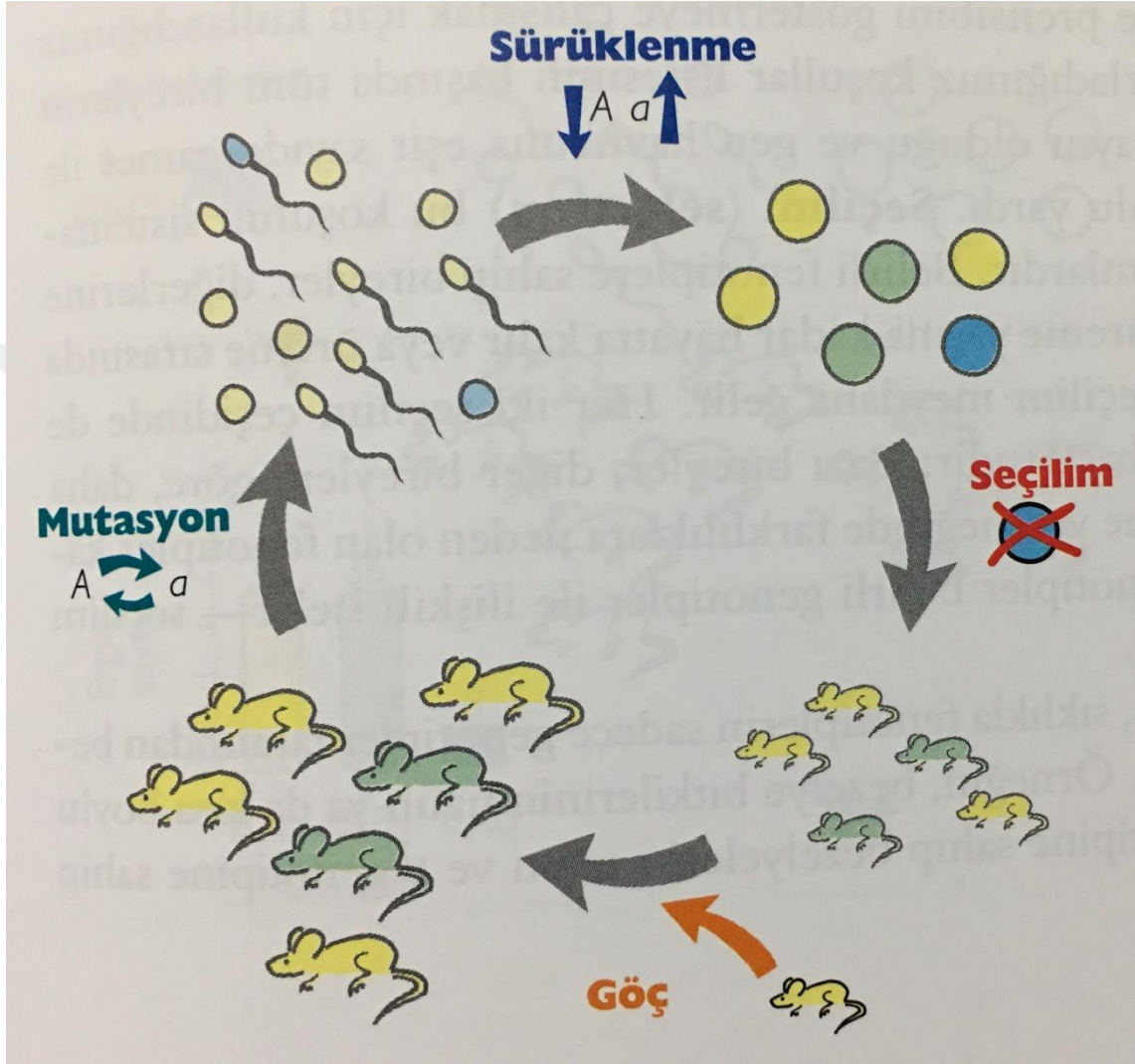


Şekil 2.6 Üreme davranışı gösteren ergin patates böcekleri

## 2.2 Populasyon Genetiği ve Populasyon Genetiğinin Temel Prensipleri

Populasyon, belirli bir coğrafik alanda yayılış gösteren ve aralarında çiftleşerek verimli döller oluşturabilen aynı türün bireylerinin oluşturduğu topluluktur. Populasyon genetiği, bir populasyondaki kalıtsal değişikliklerin çalışılması; populasyondaki mikroevrimsel değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır (Reece vd. 2016). Hardy, Weinberg, Castle ve Yule gibi araştırmacılar populasyon genetiğinin temel prensiplerini yirminci yüzyılın

başlarında formülize etmişlerdir. Bu konuda, dört temel evrimsel mekanizma ve bunların etkilerinden yola çıkarak araştırmalar yapmışlardır. Bahsedilen bu dört temel mekanizma, doğal seçim, genetik sürüklenme, mutasyon ve gen akışıdır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Evrim mekanizmalarının özeti (Freeman ve Herron 2009)

### 2.2.1 Hardy-Weinberg kuralı

Hardy-Weinberg kuralı; sınırsız büyüklükte ve rastgele eşleşme olduğu teorik olarak kabul edilen, mutasyon, göç ve doğal seçim gibi evrimsel süreçlerin göz önüne alınmadığı hipotetik populasyonda alel ve genotiplere ne olacağını matematiksel olarak tanımlar. Bu kural 1908 yılında birbirinden habersiz ve bağımsız olarak aynı sonuçlara

ulaşan İngiliz matematikçi Godfrey H. Hardy ve Alman hekim Wilhelm Weinberg tarafından geliştirilmiş matematiksel bir modeldir. Bu modelde tanımlanan hipotetik popülasyonun özellikleri şunlardır:

- Seçilim yoktur. Tüm bireylerin hayatta kalmaları eşit oranda ve eşit miktarda gamet ile gen havuzuna katkıda bulunmuşlardır.
- Mutasyon yoktur. Popülasyonda mevcut olan alellerin hiç biri mutasyon ile var olan diğer bir alele dönüşmemiştir ve herhangi yeni bir alel oluşumu gözlenmemiştir.
- Göç yoktur. Popülasyondan hiçbir birey ayrılmamıştır ve popülasyona dışarıdan hiçbir birey dahil olmamıştır.
- Popülasyon sınırsız büyüklüktedir. Rastgele etkiler ve örneklem hataları ihmal edilir.
- Bireyler eşlerini rastgele seçerler.

Bu şartlar altında Hardy-Weinberg kuralı iki sonuç ortaya koyar:

- 1) Popülasyondaki alel frekansları nesilden nesile değişmeden kalır.
- 2) Eğer bir lokusta bulunan  $A$  ve  $a$  gibi iki alel göz alınacak olursa, rastgele eşleşme sonucunda popülasyonda bulunan  $AA:Aa:aa$  genotiplerinin sıklığı ( $p = A$  alelinin,  $q = a$  alelinin sıklığı olmak üzere)  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  şeklinde hesaplanır. Bu eşitliği sağlayan her iki alele ait  $p$  ve  $q$  sıklıkları için popülasyon Hardy-Weinberg dengesindedir. İncelenilen lokuslar için popülasyonda herhangi bir evrimleşme görülmez.

Hipotetik popülasyonun özellikleri sağlandığında popülasyonların evrimleşmeyecekleri spesifik ideal koşulların bir listesini vererek, aslında gerçekte dünyada evrime neden olabilecek güçlerin bir setini tanımlar. Hardy-Weinberg kuralını bir sıfır model (null model) haline getiren şey tam olarak budur. Bu sayede doğal popülasyonlarda alel ve genotip frekansları hesaplanabilir ve popülasyonun evrim geçirip geçirmediği belirlenebilir (Freeman ve Herron 2009).

### **2.2.2 Doğal seçim**

Hardy-Weinberg dengesinin korunabilmesi için popülasyondaki bireylerin tamamının yaşamını sürdürme yeteneği ve verimli döller oluşturma yeteneği eşit olmalıdır. Böyle bir durum doğal popülasyonlarda çok büyük olasılıkla ortaya çıkmayacaktır. Çünkü popülasyonlar çeşitli tipte bireylerden oluşur ve bunların bazıları diğerlerine göre daha fazla yavru meydana getirirler. Üreme becerisindeki bu farklılık doğal seçim olarak ifade edilir. Seçim, alellerin bir kısmının bir sonraki kuşağa mevcut kuşaktaki oranlarıyla orantısız bir şekilde aktarmasıyla sonuçlanır. Bir gen havuzunu değiştirebilen tüm mikroevrim faktörleri arasında yalnızca doğal seçim popülasyonun çevresine uyumunu sağlar ve doğal seçim bu popülasyondaki uygun genotipleri korur ve çoğaltır (Reece vd. 2016).

### **2.2.3 Genetik sürüklenme**

Bir popülasyonda üreyebilen bireylerin sayısı azaldığı zaman, bu üreyebilen bireylerin sahip olduğu alellerin tamamının mevcut frekanslarıyla birlikte gelecek nesile aktarılmasıyla ortaya çıkan durumdur. Sürüklenme, bireylerin rastgele gamet dağılımı sonucunda alel frekansındaki değişiklik olarak tanımlanır. Küçük popülasyonlarda yüksek, büyük popülasyonlarda düşük oranda gözlenir (Reece vd. 2016).

### **2.2.4 Mutasyon**

DNA dizisindeki değişiklikler mutasyon olarak adlandırılır. DNA molekülü üzerindeki herhangi bir baz değişimi, DNA molekülleri arasındaki koparak parça değişimleri (insersiyon), DNA molekülünde oluşan parça kayıpları (delesyon) mutasyonların gerçekleşme şekilleridir.

Bir DNA molekülü üzerinde sadece bir nükleotid çiftinin değişmesi nokta mutasyon olarak adlandırılır. Eğer bu değişim protein kodlayan bir bölge üzerindeyse, farklı bir

aminoasit oluşumuna neden olabilir, ve bu da dolaylı yoldan üçüncül ve dördüncül protein yapısında değişikliklere neden olabilir. Bu durum yanlış anlamlı mutasyon olarak adlandırılır. Orak hücre anemisi nokta mutasyona verilebilecek örneklerden biridir. Diğer bir olasılıkta ise bu değişim protein kodlayan bölge üzerinde olmayabilir. Bu duruma sessiz mutasyon adı verilir.

Mutasyonların birden fazla sebebi olabilir. Replikasyon sırasında gerçekleşen hatalar en büyük sebeplerden biridir. Replikasyon sırasında DNA polimeraz kalıp zincirin karşısına yanlış nükleotid yerleştirebilir. Eğer bu hata DNA tamir mekanizmaları tarafından fark edilmezse replikasyon mutasyonla sonuçlanır.

Mutasyonlar somatik ya da germ hücrelerinde meydana gelebilir. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar lokal hücre ölümlerine, hücresel fonksiyon değişikliklerine ya da kontrolsüz hücre bölünmelerine neden olabilir. Germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar kalıtlıdır ve genetik hastalıkların, genetik varyasyonun ve evrimin temelini oluşturabilirler (Klug vd. 2011).

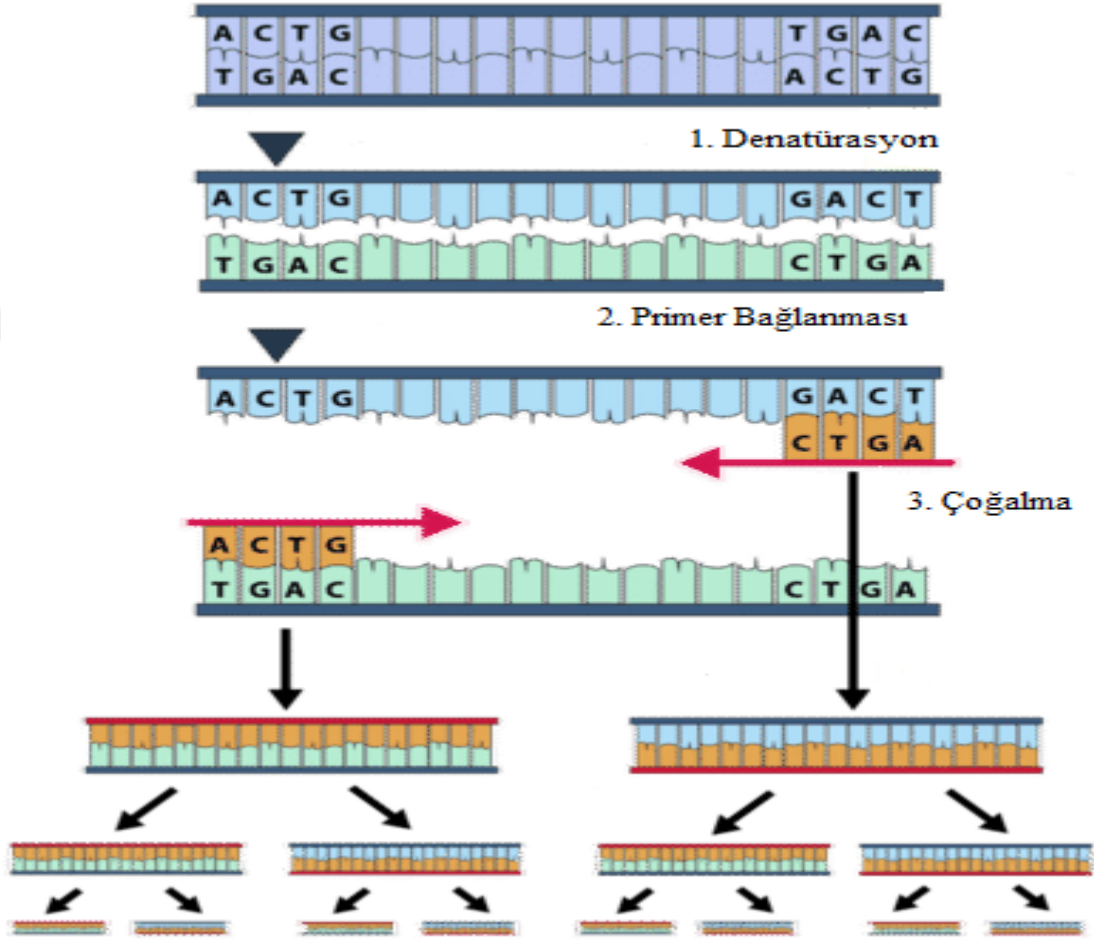
### **2.2.5 Gen akışı**

Bir popülasyonda üreme yeteneğine sahip olan bireyler ya da gametlerin popülasyonlar arasında göç etmesi sonucunda alel kazanımı ya da kaybı meydana gelebilir. Bu durum gen akışı olarak ifade edilir. Gen akışı popülasyonlar arasındaki farklılıkları azaltır. Gen akışı yeterince fazlaysa popülasyonlar arası ortak bir gen havuzu oluşur veya bu popülasyonlar tek bir popülasyon haline gelebilir (Reece vd. 2016).

### **2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin enzimlerle çoğaltılmasını ve kısa sürede bu bölgenin milyonlarca kopyasını oluşturmaya olanak sağlayan in vitro bir yöntemdir. Bu yöntem ilk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir (Mullis 1990).

PZR yönteminin prensibi, çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu, primerin hedef bölgeye bağlanması ve primerlerin bağlandığı yerden DNA'nın uzamasını kapsayan üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 PZR yönteminin genel basamakları (<https://www.ck12.org/> 2012)

### 2.3.1 PZR bileşenleri

1) DNA polimeraz enzimi: Reaksiyonda kullanılan DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* adlı sıcak kaynak sularında yaşayan bakterilerden elde edilir. Bu enzim termostabil özelliğinden dolayı yüksek ısılarda kararlılığını korumaktadır.

2) Magnezyum: Magnezyum iyonları ( $Mg^{+2}$ ) primerlerin denatüre olmuş DNA zincirlerine yapışmasını, ürün kalitesini, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir. Reaksiyona  $MgCl_2$  olarak katılırlar. Düşük konsantrasyonda ürün azlığına, yüksek konsantrasyonda spesifik olmayan bileşiklerin çoğalmasına neden yol açarlar (Devrim ve Kaya 2004).

3) Deoksiribonükleozid Trifosfat molekülleri (dNTP): dNTP'ler (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) polimerizasyonda görev almaktadırlar. Primerler kalıp DNA'ya bağlandıktan sonra DNA polimeraz enzimi bu serbest molekülleri uygun bazın karşısına dizerek uzamayı oluşturmaktadır.

4) Primer: Primerler yaklaşık 18-28 baz çiftinden oluşan oligonükleotidlerdir. Çoğaltılmak istenen her gen bölgesi için özgül olarak tasarlanırlar. Primerler denatürasyon sonrasında kalıp DNA zincire bağlanarak uzama evresini başlatırlar. Tipik olarak primerlerin yapısında % 50-60 oranında G+C bileşeni bulunmaktadır (Türkyılmaz ve Esendal 2002).

5) PZR tamponu: PZR tamponu DNA polimeraz için uygun kimyasal ortamı ve pH derecesini sağlamaktadır. *Taq* DNA polimeraz ile birlikte kullanılan en yaygın PZR tamponu Tris-HCl'dir (pH = 8,3 – 8,6) (Devrim ve Kaya 2004).

### 2.3.2 PZR basamakları

1) DNA zincirinin açılması (Denatürasyon): İlk adımda amaç çoğaltılacak olan çift iplikçikli DNA'yı denatüre ederek tek iplikçikli hale getirmektir. 90-95 °C'de yaklaşık 5 dakika tutularak iplikçikleri bir arada tutan hidrojen bağları kırılmaktadır.

2) Bağlanma (Annealing): İkinci adımda özgül olarak tasarlanan primer çiftlerinin tek iplikçikli kalıp DNA üzerine bağlanmasını sağlamaktır. Bunun için sıcaklık 37-65 °C arası bir sıcaklığa düşürülür ve 30-60 saniye bu sıcaklıkta bekletilir. Ancak kullanılan

primer çiftinin baz uzunluğu, çalışılan gen bölgesi gibi değişkenlere bağlı olarak sıcaklık değeri ve süre uzunluğu optimize edilebilir.

3) Uzama (Extension): Üçüncü adımda Taq DNA polimeraz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta DNA sentezi gerçekleşir. Bu adım için sıcaklık 70-75 °C'dir ve polimeraz enzimi dNTP'leri 5'-3' yönünde ekleyerek zincirin uzamasını sağlayarak DNA'nın çift zincirli kopyasını oluşturur.

## **2.4 DNA Belirteçleri**

DNA belirteçleri böcekler için son 20 yılda filogeni, populasyon dinamiği, gen ve genom haritalama çalışmalarında kullanılmışlardır (Avice 2004). DNA örneklerinin proteinlere göre daha stabil olması ve organizmaların tüm dokularında aynı olması nedeniyle DNA temelli belirteçler tür içi ya da türler arası genetik uzaklığı belirlemek için tercih edilmektedir (Hoy 2003, Behura 2006). DNA belirteçlerinde sıklıkla kullanılan moleküler teknikler RAPD (Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA), AFLP (Çoğaltılan Parçaların Uzunluk Polimorfizmi), RFLP (Kesilen Parçaların Uzunluk Polimorfizmi), SSR (Basit Dizi Tekrarları) ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi)'dir.

### **2.4.1 RAPD (Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA)**

DNA parçaları rastgele nükleotid dizilimine sahip olan tek bir primerin kullanılmasıyla çoğaltılır ve oluşan bant desenlerinin farklılıklarıyla polimorfizm tespit edilebilmektedir. RAPD ile yapılan çalışmalarda belirli büyüklükteki bantların varlığı ya da yokluğuyla aynı lokusta bulunan aleller ayırt edilebilmektedir (Liu 1998).

### **2.4.2 AFLP (Çoğaltılan parçaların uzunluk polimorfizmi)**

DNA'lar restriksiyon enzimiyle kesilerek oluşan yeni DNA parçacıklarının adaptörlerle birleştirilmesi ve radyoaktif veya flüoresan ile işaretli primerler ile PZR yöntemiyle çoğaltılır. PZR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirilir. Bu

teknikle tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmektedir (Vos vd. 1995, Ridout ve Donini 1999).

#### **2.4.3 RFLP (Kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi)**

RFLP ilk olarak keşfedilen moleküler belirteç sistemidir. DNA çeşitli restriksiyon enzimleriyle kesilir ve agaroz jelde yürütülür. Ardından DNA'lar blotlama tekniğiyle nitroselüloz membrana aktarılır. Belirteç olarak kullanılan DNA parçacıkları biotin veya P<sup>32</sup> ile işaretlenerek nitroselüloz membranda bulunan kesilmiş DNA'lar ile hibridizasyona tabi tutulur (Tanksley vd. 1992, Staub vd. 1996).

#### **2.4.4 SSR (Basit dizi tekrarları)**

SSR'lerin yüksek polimorfizim göstermeleri bunları populasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında kullanılmasını sağlamaktadır (Holton 2001). SSR analizinde tekrarlanan bölgeler için özgün primerler geliştirilir ve DNA'lar bu primerler ile PZR'a tabi tutulurlar. PZR ürünleri elektroforeze tabi tutulduktan sonra görüntülenmek için ethidium bromide kullanılarak boyanırlar ve değişiklikler kayıt altına alınır (Rangwen vd. 1995).

#### **2.4.5 SNP (Tek nükleotid polimorfizmi)**

SNP'ler bir populasyondaki bireylerin genomlarında tek nükleotid seviyesinde olan varyasyonlar olarak bilinmektedir ve genomda en bol miktarda bulunan moleküler belirteçlerdir. SNP'ler genomda yaygın olarak kodlanamayan gen bölgelerinde bulunmalarına karşın kodlanabilen gen bölgelerinde de görülebilirler. SNP genotipleme çalışmaları, alel spesifik hibridizasyon, primer uzatma, oligonükleotid ligasyonu ve invaziv yarıлма mekanizmalarının biri veya ikisine dayanarak yapılmaktadır. DNA çipleri, alele özgü multipleks PZR gibi genotipleme yöntemlerinin varlığı SNP'leri moleküler belirteç olarak çekici kılmaktadır. Bu teknolojik gelişmelerin varlığıyla

SNP'ler otomasyona oldukça uygunluk göstermektedir ve çok yüksek yoğunluklu genetik haritalama işlemlerinde kullanılmaktadır (Boopathi 2012).

#### **2.4.6 Belirteç olarak kullanılan DNA bölgeleri**

İntronlar, ribozomal DNA, nükleer protein kodlayan genler, mitokondriyal DNA ve satellit DNA'lar olmak üzere beş çeşit bölge bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında satellit DNA'lar belirteç olarak kullanılan DNA bölgesidir.

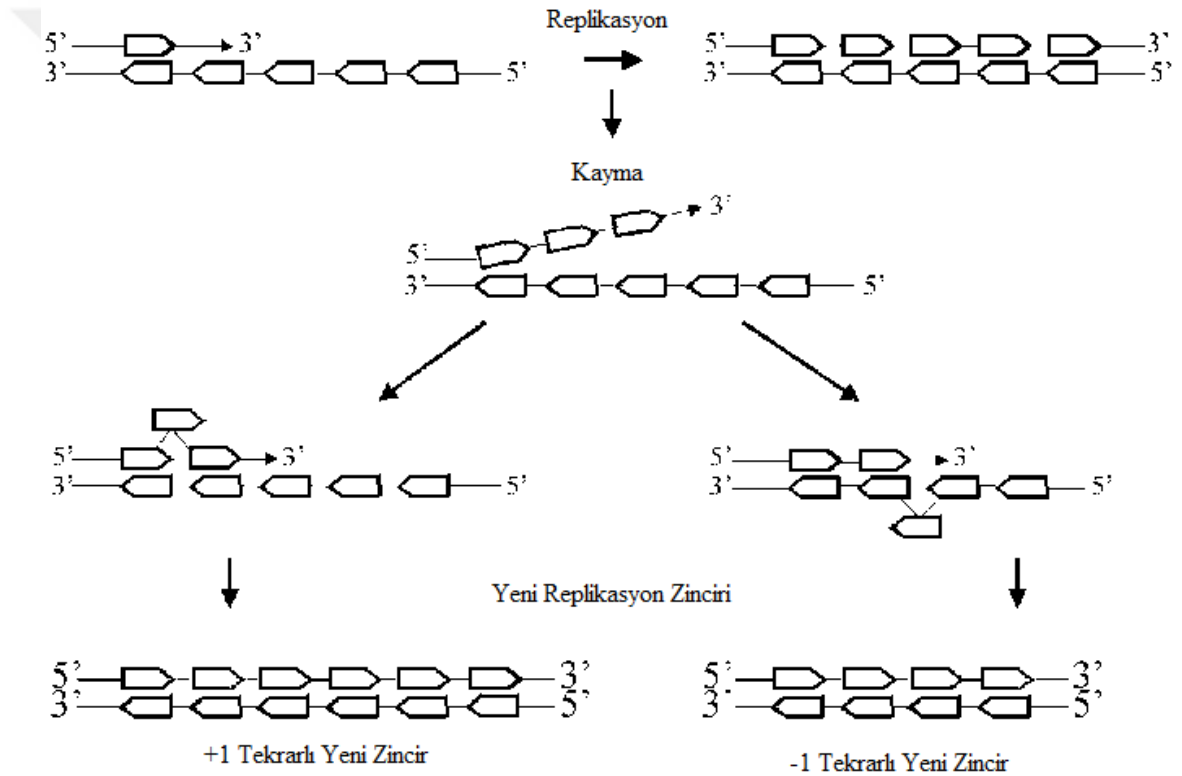
Mikrosatellitler, evrimsel olarak birbirine yakın olan canlı gruplarının karşılaştırılmasında, populasyonlarda meydana gelen darboğaz etkileri, genetik sürüklenme ve kendi arasında eşleşme gibi olayların izlerinin aranacağı durumlarda belirteç olarak kullanılan DNA bölgesidir (Bruford vd. 2003).

Üç tip satellit DNA bulunmaktadır. Bunlardan ilki 100-6500 baz çiftlik tekrarlardan oluşan klasik satellit DNA, 10-20 baz çiftlik tekrarlardan oluşan minisatellitler ve 2-6 baz çiftlik tekrarlardan oluşan ve genellikle kodlanmayan bölgelerde bulunan mikrosatellitlerdir (Passarge 1995).

Mikrosatellitler ökaryotik genomlarda yaygın şekilde bulunmaktadır. Mikrosatellitlerde bulunan tekrar grupları  $(AT)_n$ ,  $(GT)_n$ ,  $(ATT)_n$  veya  $(GACA)_n$  motifleri şeklinde olabilmektedir ve n ardışık tekrar sayısını belirtir. Bu tekrarların sayısı polimorfik bir lokusta 5-100 arası değişiklik göstermektedir ve bu tekrar sayılarının farklılığı mikrosatellitleri yüksek derecede polimorfik yapmaktadır (Saghai vd. 1994).

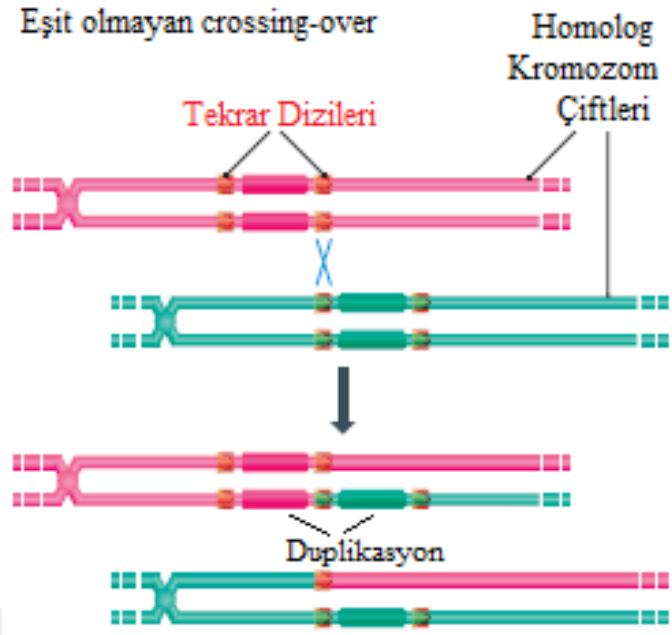
Mikrosatellitlerin yüksek oranda polimorfizm göstermesinin sebebi genomun diğer kısımlarına göre daha yüksek oranda mutasyona uğramasıdır (Allendorf ve Luikart 2007). Bu yüksek oranda gerçekleşen mutasyonun sebebi tekrar bölgelerinin büyüklüğü, DNA tekrar bölgelerindeki transkripsiyon sıklığı ve tekrar sayılarından dolayıdır (Eisen 2000).

Bilindiği üzere genomda mutasyona neden olan iki önemli mekanizma DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar ve eşit olmayan crossing-over'lardır. Mikrosatellitlerde de bu iki mekanizma yüksek oranda mutasyona neden olmaktadır (Allendorf ve Luikart 2007). Henderson ve Petes (1992)'in maya ve *E.coli* üzerinde yaptıkları çalışmalarda mikrosatellitlerde oluşan mutasyonların ana kaynağının kayma olduğunu ortaya koymuşlardır. Replikasyon sırasında oluşan bu kaymanın sonucu olarak çoğalan DNA kalıp DNA'ya göre daha kısa ya da daha uzun olur. Sonuçta bu kaymayla birlikte mikrosatellitler tekrarlar kazanır ya da kaybederler (Eisen 2000, Karhu 2001) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Kayma mekanizmasıyla oluşan mutasyon

Eşit olmayan crossing-over homolog kromozomlardaki mikrosatellit tekrarlarında mutasyona neden olmaktadır (Eisen 2000) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Eşit olmayan crossing-over

Mikrosatellitler işaretli primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılabilirler. PZR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle yürütülerek bantlar elde edilir (Butler 2005). Daha sonra bu PZR ürünleri dizi analizi cihazlarında fragment analizi yapılarak çeşitli bilgisayar programlarıyla uzunluğu bilinen standart örnek yardımıyla analiz edilebilirler. Bu teknikte kapiller elektroforez yöntemi kullanılır ve sonuçlar alel uzunluklarını gösteren pikler şeklinde elde edilirler (Butler 2005).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması için kullanılan örnekler, 114Z945 numaralı ve “Patates Zararlısı *Leptinotarsa decemlineata*, Say (Coleoptera: Chrysomelidae) Populasyonlarının mtDNA (Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi *COI* + *COII*) & n DNA (Mikrosatellit) Karakterizasyonu ve İnsektisit Direnci İle İlişkili Asetilkolinesteraz 2 (*AChE2*) Genindeki Mutasyon Frekansı Farklılığı” başlıklı TÜBİTAK projesi kapsamında toplanan İç Anadolu bölgesi örnekleridir. Örneklemeye yapılan illerdeki *Leptinotarsa decemlineata* populasyonlarında mikrosatellit varyasyonunu değerlendirmek için 145 örnek ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Örneklerin Toplanması

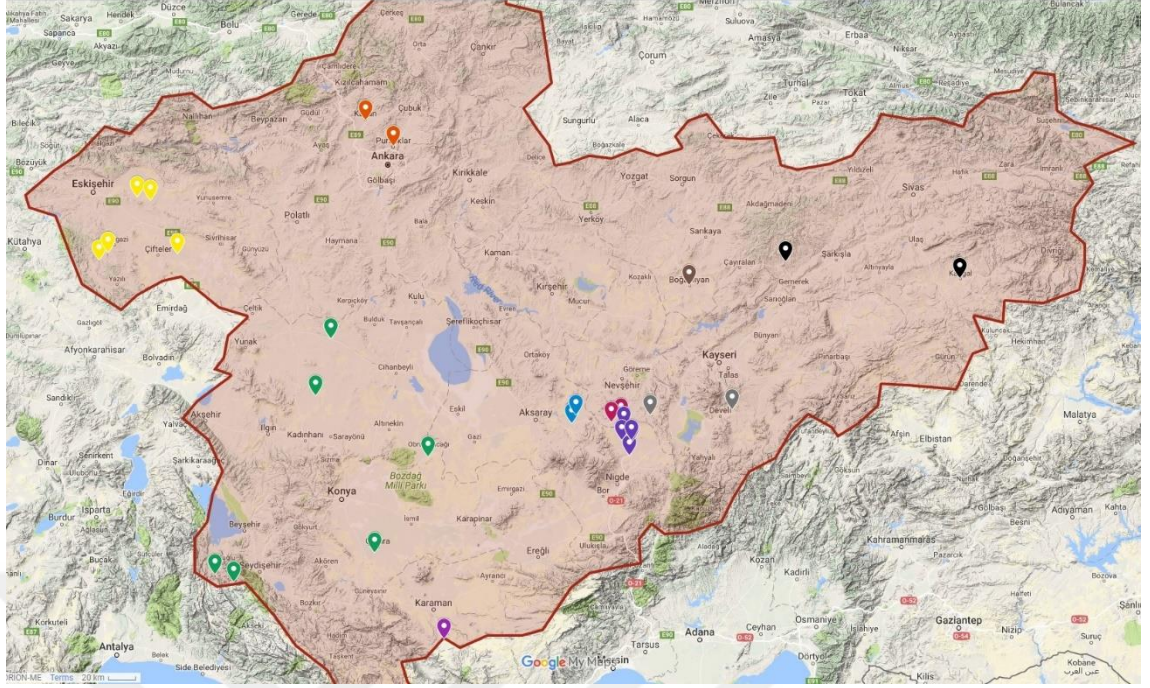
Bahsedildiği üzere bu çalışmada kullanılan örnekler 114Z945 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında toplanmış olan örneklerdir. Çizelge 3.1 ve şekil 3.1’de örneklerin toplandığı iller, bu illere bağlı ilçeler ve örnek sayıları gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışma için toplanan patates böceği örneklerinin toplandığı iller, ilçeler, köy/mahalleler ve örnek sayıları

| Lokasyonlar      |                       | Koordinantlar           | Örnek Sayısı (N) |
|------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|
| <b>Aksaray</b>   |                       |                         |                  |
| 1                | Gülağaç               | 38°22'10''N 34°16'21''E | 5                |
| 2                | Alanyurt Köyü         | 38°20'23''N 34°18'53''E | 5                |
| <b>Ankara</b>    |                       |                         |                  |
| 3                | Kazan                 | 40°10'39''N 32°42'31''E | 5                |
| 4                | Pursaklar             | 40°00'44''N 32°50'00''E | 5                |
| <b>Eskişehir</b> |                       |                         |                  |
| 5                | Alpu - Gökçeoğlu Köyü | 39°42'12''N 30°53'10''E | 5                |
| 6                | Alpu - Aktepe Köyü    | 39°41'25''N 30°57'33''E | 5                |
| 7                | Çifteler - Körhasan   | 39°41'25''N 30°57'33''E | 5                |
| 8                | Seyitgazi             | 39°26'25''N 30°40'55''E | 5                |

Çizelge 3.1 Çalışma için toplanan patates böceği örneklerinin toplandığı iller, ilçeler, köy/mahalleler ve örnek sayıları (devam)

|                 |                            |                           |   |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|---|
| 9               | Seyitgazi - Sancar Köyü    | 39°23'45''N 30°38'45''E   | 5 |
| <b>Karaman</b>  |                            |                           |   |
| 10              | Lale Köyü                  | 36°59'33''N 33°18'08''E   | 5 |
| <b>Kayseri</b>  |                            |                           |   |
| 11              | Yeşilhisar - Başköy Köyü   | 38°22'58''N 34°55'56''E   | 5 |
| 12              | İncesu - Beylik            | 38°36'33.2"N 35°15'31.6"E | 5 |
| <b>Konya</b>    |                            |                           |   |
| 13              | Karatay - Kızören Köyü     | 38°08'04''N 33°10'28''E   | 5 |
| 14              | Kadınhanı - Kolukısa Mah.  | 38°31'32''N 32°15'53''E   | 5 |
| 15              | Cihanbeyli - Zaferiye Köyü | 38°51'38''N 32°23'48''E   | 5 |
| 16              | Çumra                      | 37°34'13''N 32°46'24''E   | 5 |
| 17              | Derebucak - Kuyuyası       | 37°23'00''N 31°31'11''E   | 5 |
| 18              | Derebucak - Çamlık Mah.    | 37°21'36''N 31°39'00''E   | 5 |
| <b>Nevşehir</b> |                            |                           |   |
| 19              | Ürgüp                      | 38°38'14''N 34°55'22''E   | 5 |
| 20              | Derinkuyu                  | 38°22'31''N 34°44'03''E   | 5 |
| 21              | Derinkuyu - Yazıhüyük      | 38°20'39''N 34°38'08''E   | 5 |
| <b>Niğde</b>    |                            |                           |   |
| 22              | Merkez                     | 38°07'58''N 34°50'32''E   | 5 |
| 23              | Yeşilgölcük                | 38°13'11''N 34°47'42''E   | 5 |
| 24              | Yeşilgölcük - Yukarı Mah.  | 38°14'10.7"N 34°47'26.3"E | 5 |
| 25              | Tırhan - Çiftlik Yolu      | 38°14'41''N 34°41'38''E   | 5 |
| 26              | Ağcaşar Köyü               | 38°19'09''N 34°46'18''E   | 5 |
| <b>Sivas</b>    |                            |                           |   |
| 27              | Gemerek                    | 39°10'12''N 36°06'09''E   | 5 |
| 28              | Kangal                     | 39°11'57''N 37°23'48''E   | 5 |
| <b>Yozgat</b>   |                            |                           |   |
| 29              | Boğazlıyan                 | 39°08'31''N 35°12'08''E   | 5 |



Şekil 3.1 Çalışmada toplanan *Leptinotarsa decemlineata* örneklerinin alındığı lokasyonlar

### 3.2 Total DNA İzolasyonu

Arazi çalışmaları sonrasında % 70 etil alkol bulunan sintilasyon ve falkon tüpleri içerisinde laboratuvara getirilen örneklerden her lokasyon için beşer tane ergin birey seçilmiştir. Seçilen örnekler numaralandırıldıktan sonra total DNA izolasyonu için CTAB prosedürü (Doyle ve Doyle 1991) izlenmiştir.

#### 3.2.1 Kullanılan tamponlar

##### 1. C:IAA Tamponu

Bu tampon 24/1 oranında hazırlanır (24 birim kloroform (C) ve 1 birim İzöamilalkol (IAA))

##### 2. $\beta$ - Mercaptoethanol

Bu tampon hazır olarak alınır.

### 3. İzopropanol

Bu tampon hazır olarak alınır ve -20 °C’de muhafaza edilir.

### 4. CTAB Tamponu

Hazırlanışı (100 ml için);

- 2 g CTAB
- 10 ml 1M Tris-HCl pH: 8.0
- 4 ml 0,5M EDTA pH: 8.0
- 28 ml 5M NaCl
- 58 ml dH<sub>2</sub>O

Maddeleri sıcak manyetik karıştırıcıda tamamen çözününceye kadar karıştırılır.

### 5. TE Tamponu pH: 8.0

Hazırlanışı (100 ml için)

- 1 ml 1M Tris-HCl pH: 8.0
- 2 ml 0,5M EDTA pH: 8.0
- 97 ml dH<sub>2</sub>O

Maddeleri karıştırılarak hazırlandıktan sonra otoklavda en az 1 tutulur ve ardından kullanılır.

### 3.2.2 CTAB DNA izolasyon prosedürü

1. Küçük parçalara ayrılmış olan doku parçaları ependorf tüplere konulur. Üzerine 300 µL CTAB tamponu eklenir ve buz kalıpları üzerinde homojenizatör yardımıyla iyice ezilir.
2. Homojenat üzerine 300 µL CTAB tamponu, 50 µL β- Mercaptoethanol eklenerek ependorf tüpü hafifçe karıştırılır.
3. Elde edilen karışım 65 °C’lik su banyosunda bir saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra karışıma 500 µL C: IAA (24:1) ilave edilir ve süte benzer bir renge gelinceye kadar alt üst edilerek karıştırılır.
5. 13.000 rpm’de +4 °C’de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj edilen dokuların içinde olduğu ependorf tüpleri aynı eğik açıda kara yerleştirilir. DNA üst fazdaki sıvı tabakada bulunur.

6. Üst tabaka yavaşça pipetle çekilir ve temiz ependorf tüpün içine konulur. Bu işlem sırasında kloroformun karışmamasına özen gösterilir.
7. 500 µL -20 °C'de soğutulmuş izopropanol tüplere yavaşça eklenir ve tüpler yavaşça karıştırılır.
8. -80°C'de 45 dakika inkübe edilir.
9. Donan sıvı eritilmeden 13.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir.
10. Süpernatant dökülür ve ependorf dibinde kalan pellet 2-3 kere % 70 etil alkol ile yıkanır. Yıkanan pelletler laminar flowda kurutmaya bırakılır.
11. Kuruyan pellet 100 µL TE tamponda çözülür ve -20 °C'de daha sonra kullanılmak üzere saklanır.

### 3.3 DNA Miktarının Tayini

Kuantitatif olarak DNA miktarlarının ölçümü spektrofotometrik olarak nanodrop ile 20 ve 280 nm'de ölçülerek yapılmıştır. 280 nm'de yapılan ölçümler ile 260 nm'de elde edilen ölçümler arasındaki oran, izole edilen DNA'nın ne kadar temiz olarak elde edildiğine dair bir bilgi vermektedir. Bu değer 1,8 – 2,0 arasında olması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerden rastgele seçilen 8 örneğin DNA miktarları ve kirlilik oranları çizelge 3.2'de verilmiştir. Geri kalan tüm örneklerin DNA miktarları ve kirlilik oranları bu değerler arasındadır.

Çizelge 3.2 8 örneğe ait DNA miktarları ve kirlilik oranları

| Örnek Numarası | DNA Miktarı | A260  | A280  | 260/280 | Birim |
|----------------|-------------|-------|-------|---------|-------|
| 1              | 101,36      | 2,027 | 1,039 | 1,95    | ng/µl |
| 2              | 102,33      | 2,047 | 1,057 | 1,94    | ng/µl |
| 3              | 105,99      | 2,12  | 1,113 | 1,91    | ng/µl |
| 4              | 106,84      | 2,137 | 1,139 | 1,88    | ng/µl |
| 5              | 134,20      | 2,684 | 1,464 | 1,83    | ng/µl |
| 6              | 137,59      | 2,752 | 1,524 | 1,81    | ng/µl |
| 7              | 144,94      | 2,899 | 1,537 | 1,89    | ng/µl |
| 8              | 158,93      | 3,179 | 1,634 | 1,95    | ng/µl |

### 3.4 Mikrosatellitler ve Kullanılan Primerler

Bu çalışmada *Leptinotarsa decemlineata*'nın genetik çeşitliliği ve populasyon yapısını tahmin etmek için kullanılan 11 adet lokus belirlenmiştir (Grapputo 2006). Çizelge 3.3'te bu lokuslara ait primerler gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primer çiftleri

| Lokus    | Primer (5'-3') Dizisi                                  | İşaretleme de kullanılan floresan boya | Ta    | Büyüklik / PZR ürününün büyüklik aralığı |
|----------|--|--|-------|--|
| LdA11b   | F: CAACGTACAGTGTGCTTCATTG<br>R: TCAAGATTTGTTGCAGACATCA | HEX                                    | 50    | 170/<br>163-169                          |
| LdB8b    | F: TGCTCATTCAAATATGGTTTGG<br>R: CCAACAGGTATCCAACAAACG  | HEX                                    | 50    | 106/<br>94-104                           |
| LdD4h    | F: GGAAAAATGTGTGGTTCAAGG<br>R: ACTTATGTGATACACTAATA    | HEX                                    | 55-45 | 272/<br>251-289                          |
| LdE10e   | F: ACAGCGTCCCTGCTCACTTCT<br>R: CCCAGCGAGGTTTATTAGGA    | 6-FAM                                  | 50    | 127/<br>115-132                          |
| LdE11c   | F: GCGGCCAGATGTTATCAGTT<br>R: CACCGCGACTTCAAAGGTAT     | 6-FAM                                  | 60-50 | 151/<br>138-160                          |
| LdAC5-2  | F: CACTCTGGGGTCAAATAGAG<br>R: TTCGAGTGACTGTGTGTGT      | 6-FAM                                  | 52    | 231/<br>208-231                          |
| LdAC5-22 | F: CGTTTATGATTAGCATTCTGA<br>R: ACTTCAATAAAAAGGTCGAT    | TAMRA                                  | 50    | 155/<br>147-160                          |
| LdGA4-5  | F: CCAGTTGATATTGAGAGAGA<br>R: CAAACGCACTCAGTACAAAA     | TAMRA                                  | 60-50 | 215/<br>208-230                          |
| LdGA5-11 | F: TTTGGTGGGTGTTTCTATTC<br>R: AAATGCGCCTGATGATAG       | TAMRA                                  | 60-50 | 182/<br>175-189                          |
| LdGA4-18 | F: GCTCGTCAAATCTAGGAAGA<br>R: AAGAATGAAATCCAGGAGAA     | HEX                                    | 60-50 | 212/<br>204-212                          |
| LdGA5-30 | F: GTTTTCCATCATGATCCATT<br>R: ATAGGAAGCAACGACCATC      | 6-FAM                                  | 50    | 179/<br>173-182                          |

### 3.5 PZR Amplifikasyonu

Araştırmada kullanılan örneklerin PZR ile belirlenen mikrosatellit lokusları PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR koşulları Grapputo (2006) tarafından belirtilen PZR döngü programı ve kimyasal karışımı tercih edilmiştir. Çizelge 3.4 – 3.7'de kullanılan programlar, çizelge 3.8'de hazırlanan kimyasalların oranı gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 LdE11c, LdGA4-5, LdGA5-11 ve LdGA4-18 lokusları için kullanılan PZR programı

| İşlem Basamakları | Sıcaklık (°C)                                | Süre      | Döngü Sayısı |
|-------------------|--|-----------|--------------|
| Ön Denatürasyon   | 94°C   | 5 dakika  | 1 döngü      |
| Denatürasyon      | 94°C   | 30 saniye | 10 döngü     |
| Bağlanma          | 60°C ile başlar ve her döngüde 1°C düşürülür | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C   | 45 saniye |              |
| Denatürasyon      | 94°C   | 30 saniye | 30 döngü     |
| Bağlanma          | 50°C   | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C   | 45 saniye |              |
| Son Uzama         | 72°C   | 5 dakika  | 1 döngü      |

Çizelge 3.5 LdD4h lokusu için kullanılan PZR programı

| İşlem Basamakları | Sıcaklık (°C)                                | Süre      | Döngü Sayısı |
|-------------------|--|-----------|--------------|
| Ön Denatürasyon   | 94°C   | 5 dakika  | 1 döngü      |
| Denatürasyon      | 94°C   | 30 saniye | 10 döngü     |
| Bağlanma          | 55°C ile başlar ve her döngüde 1°C düşürülür | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C   | 45 saniye |              |
| Denatürasyon      | 94°C   | 30 saniye | 30 döngü     |
| Bağlanma          | 45°C   | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C   | 45 saniye |              |
| Son Uzama         | 72°C   | 5 dakika  | 1 döngü      |

Çizelge 3.6 LdAC5-2 lokusu için kullanılan PZR programı

| İşlem Basamakları | Sıcaklık (°C) | Süre      | Döngü Sayısı |
|-------------------|---------------|-----------|--------------|
| Ön Denatürasyon   | 94°C          | 5 dakika  | 1 döngü      |
| Denatürasyon      | 94°C          | 30 saniye | 40 döngü     |
| Bağlanma          | 52°C          | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C          | 45 saniye |              |
| Son Uzama         | 72°C          | 5 dakika  | 1 döngü      |

Çizelge 3.7 LdA11b, LdB8b, LdE10e, LdAC5-22 ve LdGA5-30 lokusları için kullanılan PZR programı

| İşlem Basamakları | Sıcaklık (°C) | Süre      | Döngü Sayısı |
|-------------------|---------------|-----------|--------------|
| Ön Denatürasyon   | 94°C          | 5 dakika  | 1 döngü      |
| Denatürasyon      | 94°C          | 30 saniye | 40 döngü     |
| Bağlanma          | 50°C          | 30 saniye |              |
| Uzama             | 72°C          | 45 saniye |              |
| Son Uzama         | 72°C          | 5 dakika  | 1 döngü      |

Çizelge 3.8 PZR amplifikasyonu için hazırlanan karışım oranları

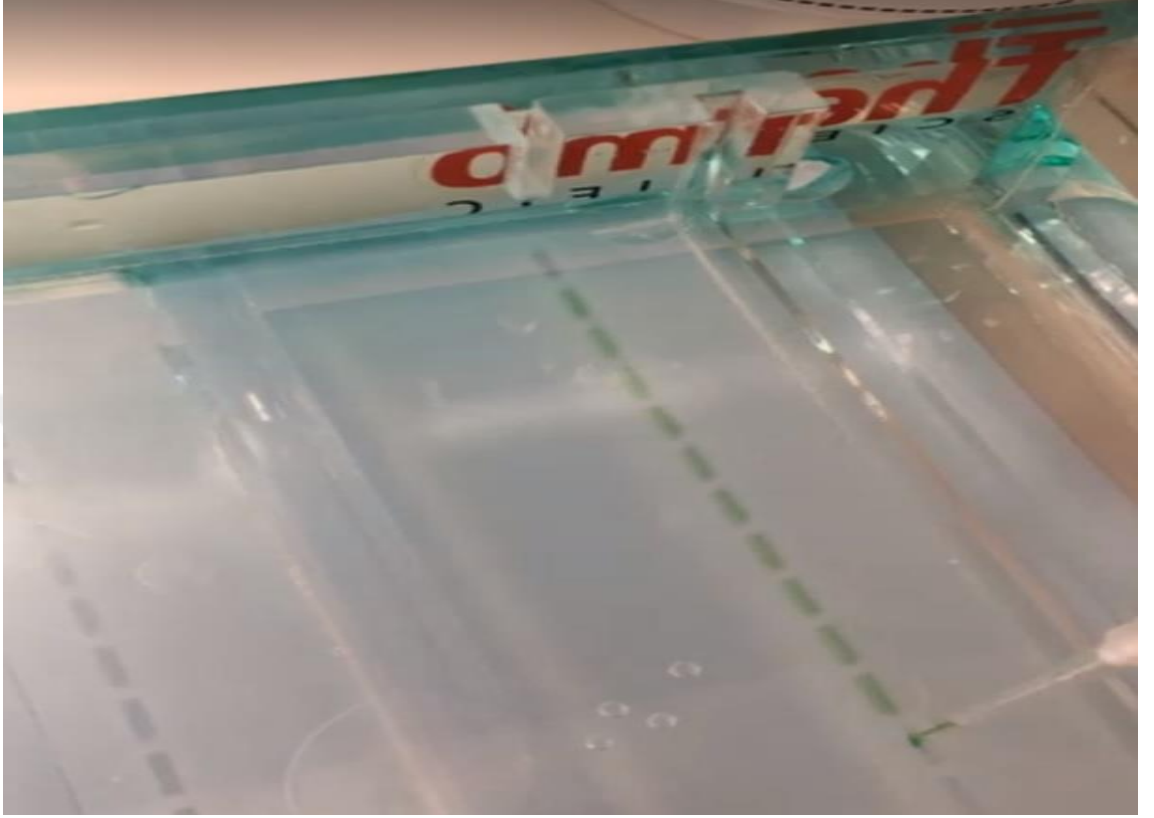
| Kullanılan Kimyasallar                  | Kullanılan Hacim |
|---|------------------|
| DreamTaq Polymerase (Thermo Scientific) | 7,5 µl           |
| dH <sub>2</sub> O                       | 5,3 µl           |
| Forward Primer (20 pmol)                | 0,6 µl           |
| Reverse Primer (20 pmol)                | 0,6 µl           |
| DNA                                     | 1 µl             |
| <b>Toplam</b>                           | <b>15 µl</b>     |

### 3.6 PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforeziyle Tayini

Kualitatif olarak DNA miktarlarının tespiti agaroz jelde görüntülenerek yapılmıştır. LdB8b lokusu için %2'lik, geri kalan 10 lokus için %1,5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Erlen içerisine 100 ml 1X TAE (Merck) ve 1,5 g agaroz (Prona) eklenmiştir. Bu karışım mikrodalga fırında belirli aralıklarla kontrol edilmek suretiyle yaklaşık 40-45 saniye kadar kaynatılmıştır. Solüsyon içerisinde agaroz partikülleri kalmadığına emin olduktan sonra soğumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan karışım ılık iken elektroforez küvetine dökülmüştür. Dökülen karışımın yürütülmeye hazır olması için yaklaşık yarım saat oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Ardından her kuyucuğa 3 µl PZR ürünü yüklenmiştir. PZR ürünlerinin

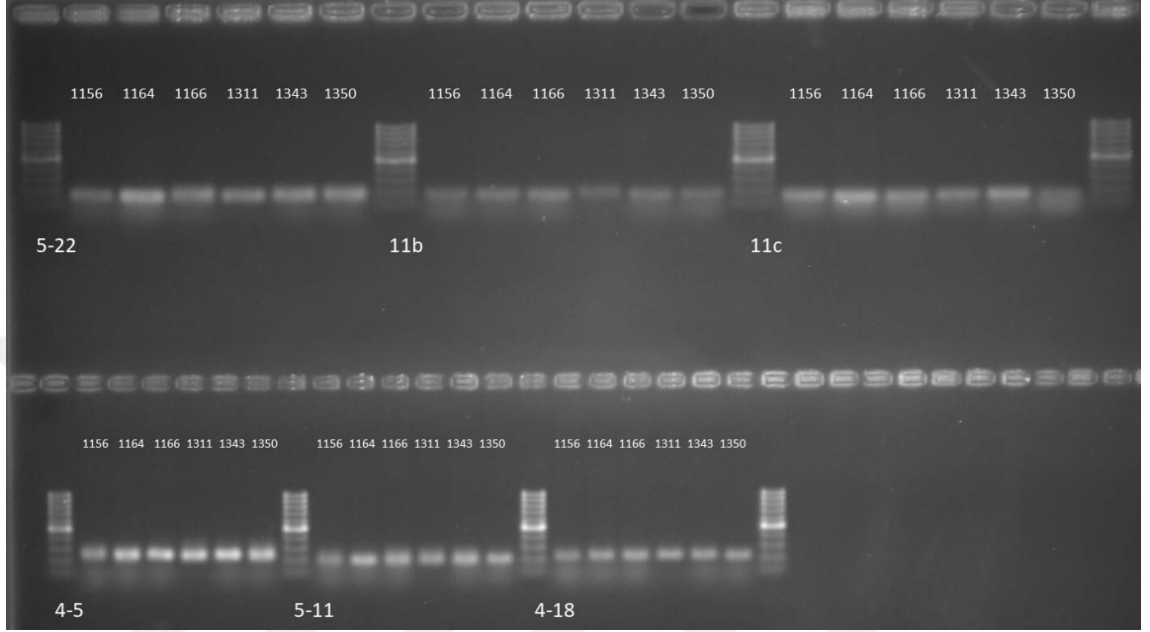
büyükliğini tespit etmek için her ilk ve son kuyucuğa 5 µl DNA Ladder yüklenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 PZR ürünlerinin jele yüklenmesi

Jel yükleme işlemi tamamlandıktan sonra ilk 45 dakika 70 Voltta, sonraki 50 dakika 90 Voltta yürütme işlemi tamamlanmıştır. Yürütme işlemi biten jel 15 dakika boyunca EtBr içeren solüsyonda boyanıp, 5 dakika dH<sub>2</sub>O'da bekletilmiştir. Bu işlemin sonrasında sonuç UV ışığı altında (Major Science Jel Görüntüleme Sistemi) görüntülenmiş ve anlık fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.3). UV ışığı altında pozitif bant veren örnekler her lokus için tek tek ayrılmış ve fragment analizine gönderilmeden önce üç farklı grup olarak birleştirilmiştir. Birleştirme işlemi yaparken işaretlemeye kullanılan floresan boyanın türü ve PZR ürününün büyüklüğüne dikkat edilmiştir. Birleştirilen lokus grupları aşağıda belirtilmiştir.

- LdD4h – LdE11c – LdGA4-5 – LdGA5-11 – LdGA4-18
- LdA11b – LdB8b – LdGA5-30
- LdE10e – LdAC5-2 – LdAC5-22

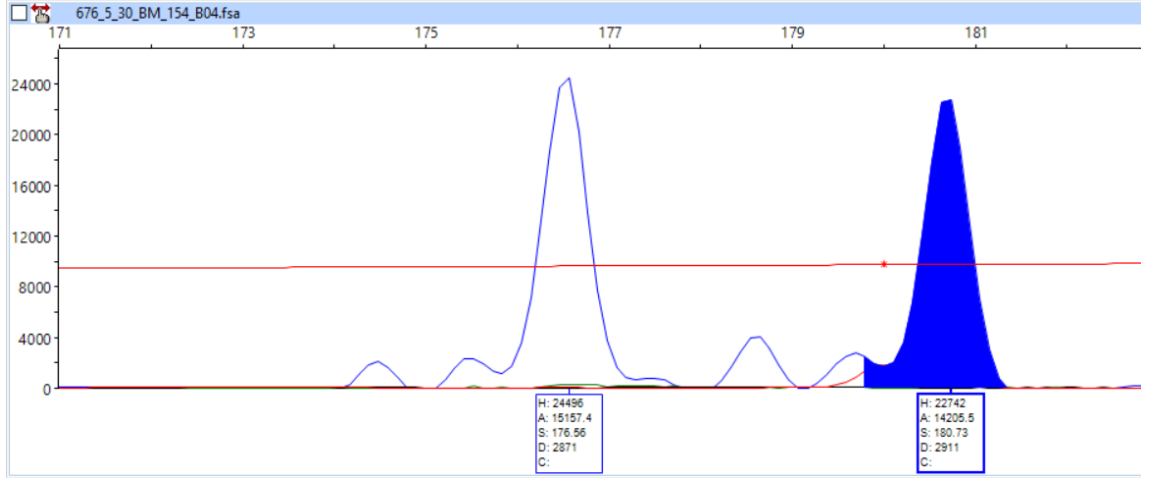


Şekil 3.3 UV ışığı altında görüntülenen jel

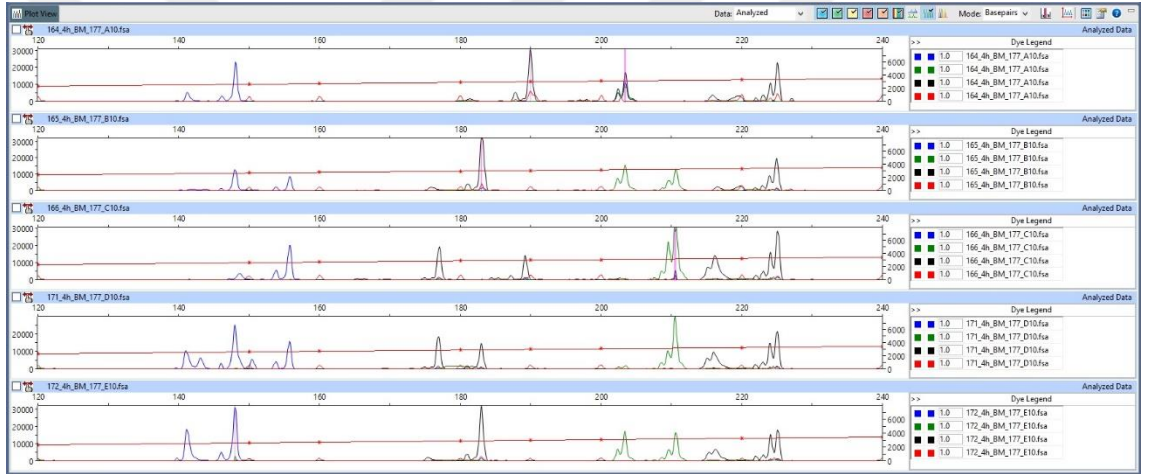
### 3.7 Fragment Analizi ve Okunması

PZR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle tespit edildikten sonra fragment büyüklükleri tespit edilecek olan örnekler BM Labosis firmasına gönderilip hizmet alımı yapılmıştır. Söz konusu fragment analizi kılcal analiz cihazı (ABI3730XL) ile yapılmıştır. Fragment analiz sonuçları BM Labosis tarafından e-posta yoluyla tarafımıza iletilmiştir.

Tarafımıza ulaşan analiz dosyaları Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems 2012) programı kullanılarak her bir lokus için alel değerleri Excel tablosuna kaydedilmiştir (Şekil 3.4a-b).



(a)



(b)

Şekil 3.4 a. LdE11c lokusu için okunan aleller, b. Her lokus için okunan alellerin pikleri

### 3.8 Filogenetik Analizler

Çalışılan 10 *Leptinotarsa decemlineata* popülasyonuna ait toplam 11 mikrosatellit lokusundan elde edilen fragment sonuçları istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde popülasyon içi, popülasyonlar arası ve gruplar arası genetik varyasyonlar ölçülmüştür. Genetik varyasyon ölçülürken alellerin toplam sayıları belirlenmiştir. Alel sayılarının belirlenmesinin nedeni, popülasyonun uzun vadeli

evrimsel potansiyelinin anlaşılması içindir. Alelik varyasyon hesaplamaları GENETIX 4.05.2 (Belkhir vd. 2004) ile yapılmıştır.

İstatistiki analizlerden önce mikrosatellit verilerinin güvenilir olup olmadığını tespit etmek amacıyla null alel testi yapılması gerekmektedir. Null alellerin varlığı yapılacak olan analizlerde popülasyon içi genetik varyasyonun, popülasyonlar arası genetik mesafe değerlerinin ve fiksasyon indeksinin ( $F_{ST}$ ) yanlış hesaplanmasına yol açabilir (Paetkau vd. 1997). Bunun önüne geçmek için mikrosatellit veri seti FreeNA programı kullanılarak null alel testine tabi tutulmuştur (Chapuis ve Estoup 2007).

Popülasyonlarda bulunan birey sayılarının farklılık göstermesi alel sayısının değerlendirilmesinde probleme yol açabilmektedir. Bunun üstesinden gelmek için alelik zenginlik testi uygulanmaktadır. Alelik zenginlik hesaplamaları Fstat 2.9.3.2 ile gerçekleştirilmiştir (Goudet 2002).

Moleküler varyans analizi (AMOVA) ile toplamda üç seviyede olmak üzere gruplar arası ( $F_{CT}$ ), popülasyonlar arası ( $F_{SC}$ ) ve popülasyon içi ( $F_{ST}$ ) olarak hesaplanmıştır. AMOVA analizi Arlequin 3.5.2.2 ile yapılmıştır (Excoffier ve Lischer 2010).

Genetik farklılaşma hesaplamaları için Wright'ın (1965) oluşturduğu  $F$  istatistikleri kullanılmıştır. Fiksasyon indeksi ( $F_{ST}$ ), tür içi üreme miktarı ölçümü ( $F_{IS}$ ) ve gen akışı ( $N_m$ ) değerleri GENETIX 4.05.2 ile hesaplanmıştır. Ayrıca popülasyonlar arası genetik uzaklık ( $D_A$ ) (Nei vd. 1972) Populations 1.2.32 programı ile hesaplanmış ve tüm popülasyonlar ile Neighbour-Joining (NJ) ağacı oluşturulmuştur (Langella 1999).

Slatkin (1994)'in bağlantı dengesizliği hesaplamaları (Pairwise Linkage Disequilibrium) ve Guo ve Thompson (1992)'in Hardy-Weinberg eşitliği testleri Arlequin 3.5.2.2 ile gerçekleştirilmiştir (Excoffier ve Lischer 2010).

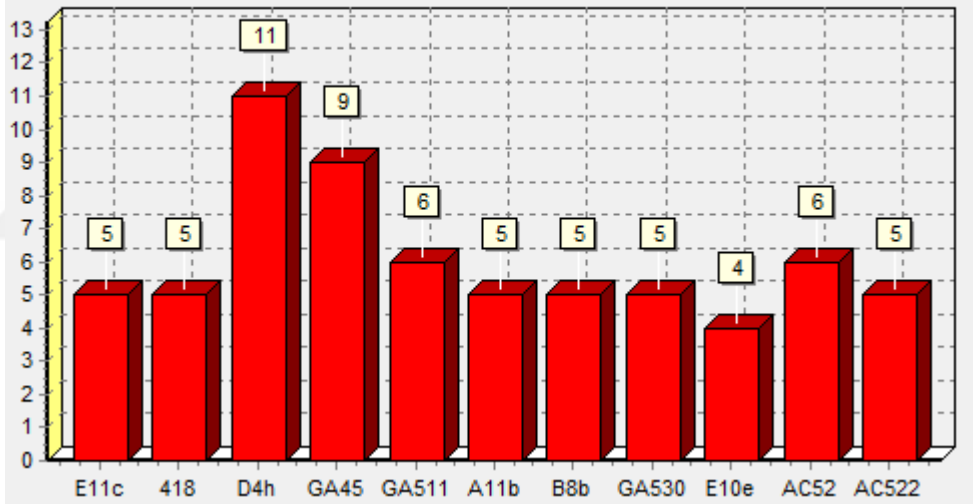
Faktöriyel Benzerlik Analizi (FCA), popülasyonlar arasındaki ilişkiyi üç boyutlu düzlemde görselleştirmesi için GENETIX programıyla oluşturulmuştur (Lebart 1984).

BAPS 6 (Bayesian Analysis of Population Structure) ile populasyonlar ve populasyonları oluşturan bireylerin arasında bulunan genetik farklılaşmalar görsel olarak belirlenmiştir (Corander vd. 2012).



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Genetik varyasyon hesaplamaları için ilk olarak her bir lokus için alel sayıları belirlenmiş olup şekil 4.1’de gösterilmiştir. Ayrıca çizelge 4.1’de her bir populasyon ve lokus için belirlenen alel sayıları gösterilmiştir. Yapılan hesaplamalarda en yüksek alel sayısı LdD4h lokusunda (11 alel) belirlenirken en düşük alel sayısı LdE10e (4 alel) lokusundadır. Lokuslara ait gözlenen aleller populasyon düzeyinde değerlendirildiğinde en yüksek alel sayısı Niğde populasyonunda (LdD4h lokusunda 7 alel), en düşük alel sayısı Yozgat populasyonunda (LdE10e lokusunda 1 alel) ve Karaman populasyonunda (LdGA4-5 lokusunda 1 alel) gözlenmiştir.



Şekil 4.1 Her bir lokus için belirlenen toplam alel sayıları

Çizelge 4.1 Her bir populasyon ve lokus için belirlenen alel sayıları

| Lokus/<br>Populasyon | LdE<br>11c | LdGA<br>4-18 | Ld<br>D4h | LdGA<br>4-5 | LdGA<br>5-11 | LdA<br>11b | Ld<br>B8b | LdGA<br>5-30 | LdE<br>10e | LdAC<br>5-2 | LdAC<br>5-22 |
|----------------------|------------|--------------|-----------|-------------|--------------|------------|-----------|--------------|------------|-------------|--------------|
| AKSARAY              | 3          | 2            | 2         | 3           | 4            | 2          | 4         | 4            | 2          | 2           | 3            |
| ANKARA               | 3          | 3            | 3         | 3           | 4            | 2          | 4         | 3            | 2          | 3           | 3            |
| ESKİŞEHİR            | 3          | 3            | 3         | 5           | 5            | 3          | 4         | 3            | 2          | 3           | 4            |
| KAYSERİ              | 3          | 3            | 2         | 5           | 5            | 3          | 4         | 4            | 2          | 3           | 4            |
| KONYA                | 4          | 4            | 3         | 6           | 4            | 4          | 5         | 5            | 2          | 4           | 5            |

Çizelge 4.1 Her bir populasyon ve lokus için belirlenen alel sayıları (devam)

| Lokus/<br>Populasyon | LdE<br>11c | LdGA<br>4-18 | Ld<br>D4h | LdGA<br>4-5 | LdGA<br>5-11 | LdA<br>11b | Ld<br>B8b | LdGA<br>5-30 | LdE<br>10e | LdAC<br>5-2 | LdAC<br>5-22 |
|----------------------|------------|--------------|-----------|-------------|--------------|------------|-----------|--------------|------------|-------------|--------------|
| NEVŞEHİR             | 3          | 4            | 5         | 3           | 5            | 3          | 4         | 4            | 3          | 4           | 4            |
| NİĞDE                | 5          | 5            | 7         | 4           | 6            | 4          | 4         | 4            | 3          | 3           | 4            |
| SİVAS                | 4          | 3            | 4         | 4           | 4            | 2          | 4         | 4            | 2          | 3           | 3            |
| YOZGAT               | 2          | 2            | 2         | 2           | 4            | 2          | 2         | 2            | 1          | 3           | 2            |
| KARAMAN              | 2          | 2            | 4         | 1           | 4            | 3          | 4         | 3            | 2          | 4           | 3            |

Çizelge 4.2’de alelik zenginlik hesaplaması populasyonda bulunan ve hesaplanabilen en az birey sayısı (4) dikkate alınarak yapılmıştır. Hesaplama sonuçlarına göre alelik zenginlik değerleri 1,000 ile 3,978 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2 Her bir populasyon ve lokus için hesaplanan ortalama alelik zenginlik değerleri

| Lokus/<br>Populasyon | LdE<br>11c   | LdGA<br>4-18 | Ld<br>D4h    | LdGA<br>4-5  | LdGA<br>5-11 | LdA<br>11b   | Ld<br>B8b    | LdGA<br>5-30 | LdE<br>10e   | LdAC<br>5-2  | LdAC<br>5-22 |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AKSARAY              | 2,874        | 1,999        | 1,996        | 2,642        | 3,772        | 1,990        | 3,567        | 3,281        | 1,999        | 1,989        | 2,890        |
| ANKARA               | 2,412        | 2,956        | 2,267        | 2,412        | 3,146        | 1,999        | 3,408        | 2,802        | 1,706        | 2,556        | 2,443        |
| ESKİŞEHİR            | 2,421        | 2,402        | 2,164        | 3,123        | 3,580        | 2,494        | 3,503        | 2,884        | 1,599        | 2,644        | 3,048        |
| KAYSERİ              | 2,614        | 2,783        | 1,949        | 3,007        | 3,980        | 2,390        | 3,650        | 3,562        | 1,807        | 2,415        | 3,328        |
| KONYA                | 2,263        | 2,607        | 2,297        | 2,570        | 3,644        | 2,482        | 3,971        | 3,083        | 1,836        | 2,819        | 3,369        |
| NEVŞEHİR             | 2,614        | 3,199        | 3,150        | 2,354        | 3,767        | 2,259        | 3,251        | 3,514        | 2,183        | 2,983        | 3,170        |
| NİĞDE                | 2,925        | 2,886        | 3,978        | 2,545        | 3,883        | 2,437        | 3,573        | 2,564        | 2,027        | 2,134        | 3,136        |
| SİVAS                | 3,297        | 2,648        | 2,607        | 2,705        | 3,650        | 1,989        | 3,744        | 2,878        | 1,653        | 2,376        | 2,897        |
| YOZGAT               | 2,000        | 2,000        | 1,978        | 1,800        | 3,956        | 2,000        | 2,000        | 1,978        | 1,000        | 2,978        | 1,800        |
| KARAMAN              | 2,000        | 2,000        | 3,600        | 1,000        | 3,756        | 2,800        | 3,956        | 3,000        | 2,000        | 3,778        | 2,800        |
| ORTALAMA             | <b>2,542</b> | <b>2,548</b> | <b>2,599</b> | <b>2,416</b> | <b>3,713</b> | <b>2,284</b> | <b>3,462</b> | <b>2,955</b> | <b>1,781</b> | <b>2,667</b> | <b>2,888</b> |

Her populasyon için genetik varyasyonlar hesaplanmıştır. Tüm lokuslar için gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) ve ortalama heterozigotluk ( $H$ )

değerleriyle birlikte polimorfizm gösteren lokusların yüzdesi ( $P$ ) ve son olarak lokus başına gözlenen ortalama alel sayısı ( $A$ ) Çizelge 4.3'te verilmiştir. Polimorfizm gösteren lokusların yüzdesinin ( $P$ ) en yüksek olduğu iller Aksaray, Ankara, Eskişehir, Kayseri, Konya, Nevşehir, Niğde ve Sivas (% 100), en düşük olduğu iller ise Yozgat ve Karaman (% 90.91) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3 Her bir populasyon için hesaplanan heterozigotluk değerleri

| Populasyon | $H_e$        | $H$          | $H_o$        | $P$          | $A$          |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AKSARAY    | 0,573        | 0,603        | 0,533        | 1,000        | 2,818        |
| ANKARA     | 0,488        | 0,517        | 0,464        | 1,000        | 3,000        |
| ESKİŞEHİR  | 0,548        | 0,560        | 0,498        | 1,000        | 3,455        |
| KAYSERİ    | 0,544        | 0,573        | 0,540        | 1,000        | 3,455        |
| KONYA      | 0,541        | 0,551        | 0,427        | 1,000        | 4,182        |
| NEVŞEHİR   | 0,582        | 0,601        | 0,549        | 1,000        | 3,818        |
| NİĞDE      | 0,577        | 0,590        | 0,489        | 1,000        | 4,455        |
| SİVAS      | 0,529        | 0,558        | 0,481        | 1,000        | 3,364        |
| YOZGAT     | 0,384        | 0,426        | 0,418        | 0,909        | 2,182        |
| KARAMAN    | 0,532        | 0,593        | 0,550        | 0,909        | 2,909        |
| ORTALAMA   | <b>0,529</b> | <b>0,557</b> | <b>0,495</b> | <b>0,982</b> | <b>3,364</b> |

AMOVA analizi için gruplar belirlenirken patates böceğinin göç etme kapasitesi de göz önüne alınarak İç Anadolu bölgesinde bulunan plato ve dağların konumu dikkate alınmıştır. Buna göre gruplar:

1. Grup, Ankara, Eskişehir, Konya, Karaman;
2. Grup Sivas, Yozgat;
3. Grup Aksaray, Kayseri, Nevşehir, Niğde

şeklinde belirlenmiştir. Yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) ile gruplar arası ( $F_{CT}$ ), grup içindeki populasyonlar arası ( $F_{SC}$ ) ve populasyon içi ( $F_{ST}$ ) olmak üzere üç seviyede hesaplanan değerler çizelge 4.4'te verilmiştir. Populasyon içinde hesaplanan genetik varyasyon en yüksek olarak (% 96.51) bulunurken, en düşük gruplar arasında (% 0.96) bulunmuştur. Elde edilen fiksasyon değerleri ise anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.4 AMOVA analiz değerleri

| Varyasyon Kaynağı                    | Serbestlik Derecesi               | Kareler Toplamı | Varyans Bileşenleri | % Varyasyon |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|---------------------|-------------|
| Gruplar arası                        | 2                                 | 13.104          | 0.02472 Va          | 0.96        |
| Gruplar içindeki populasyonlar arası | 7                                 | 29.991          | 0.06549 Vb          | 2.53        |
| Populasyon içi                       | 280                               | 689.753         | 2.49555 Vc          | 96.51       |
| <b>Toplam</b>                        | <b>289</b>                        | <b>741.848</b>  | <b>258.576</b>      |             |
| <b>Fiksasyon indeksleri</b>          |                                   |                 |                     |             |
| <b>Fst</b>                           | 0.03489 Vc (P = 0.00000+-0.00000) |                 |                     |             |
| <b>Fsc</b>                           | 0.02557 Vb (P = 0.00782+-0.00280) |                 |                     |             |
| <b>Fct</b>                           | 0.00956 Va (P = 0.06061+-0.00831) |                 |                     |             |

Genetik farklılaşma hesaplamaları için Wright'ın  $F$  istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Soy içi üreme miktarlarının ölçümü  $F_{IS}$  değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Hesaplanan  $F_{IS}$  değerlerinin 0,02128 ile 0,22904 arasında olduğu görülmüştür.  $F_{IS}$  değerleri istatistiki olarak negatif değerler heterozigotluk fazlalığını, pozitif değerler ise heterozigotluk eksikliğini ifade etmektedir. Buradan yola çıkarak yapılan tez çalışmasının tamamında heterozigotluk eksikliği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Her bir populasyon için hesaplanan  $F_{IS}$  değerleri

| Populasyon | Birey Sayısı | $F_{IS}$ |
|------------|--------------|----------|
| AKSARAY    | 10           | 0,121    |
| ANKARA     | 10           | 0,107    |
| ESKİŞEHİR  | 25           | 0,113    |

Çizelge 4.5 Her bir populasyon için hesaplanan  $F_{IS}$  değerleri (devam)

|          |    |       |
|----------|----|-------|
| KAYSERİ  | 10 | 0,056 |
| KONYA    | 30 | 0,229 |
| NEVŞEHİR | 15 | 0,091 |
| NİĞDE    | 25 | 0,174 |
| SİVAS    | 10 | 0,145 |
| YOZGAT   | 5  | 0,021 |
| KARAMAN  | 5  | 0,083 |

Pairwise Linkage Disequilibrium testi veri setinin tamamı için yapılmıştır. Her populasyon için 1000 permutasyonlu toplam 55 karşılaştırma yapılmış olup 0.05 anlamlılık düzeyinde elde edilen tablolar değerlendirilmiştir. Buna göre en yüksek sayıda anlamlı lokus sayısı Niğde populasyonunda (18), en az olan ise Karaman populasyonunda (1) olduğu görülmüştür. Hardy-Weinberg eşitliği testi de yapılmış olup populasyonlarda dengede olmayan lokus sayıları belirtilmiştir. Hardy-Weinberg dengesinde olmayan lokus sayısı en fazla Konya populasyonunda (5) iken, en düşük Yozgat populasyonunda (0) gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Populasyonlar arasında bulunan genetik ilişkiler yani  $F_{ST}$  değerleri ise çizelge 4.7’de verilmiştir. Elde edilen  $F_{ST}$  değerleri -0,023 (Eskişehir – Kayseri) ile 0,196 (Ankara – Yozgat) arasında bulunmuştur.

Populasyonlar arası gen akışı ( $Nm$ ) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre gen akışının en yüksek olduğu iller Niğde – Sivas ( $Nm = 2,715$ ) iken en düşük olan iller Yozgat – Karaman ( $Nm = 0,061$ ) olarak bulunmuştur.

Genetik farklılaşma hesaplamalarından sonra populasyonlar arasındaki genetik mesafe ( $D_A$ ) değerleri Nei (1972)’ye göre hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Populasyonlar arası en yakın mesafe Eskişehir – Kayseri (0,020) arasında iken, en uzak mesafe ise Aksaray – Yozgat (0,328) arasında bulunmuştur.

Hesaplanan genetik mesafe değeri kullanarak tüm populasyonlar için oluşturulan Neighbour-Joining (NJ) ağacına göre populasyonlar üç ana kola ayrılmıştır. Konya populasyonu tek başına bir kolu oluştururken, Niğde, Eskişehir, Kayseri, Aksaray, Nevşehir, Ankara ve Karan ikinci kolu, Sivas ve Yozgat ise üçüncü kolu oluşturmaktadır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.6 Linkage Disequilibrium (Ld) ve Hardy-Weinberg Eşitliği test sonuçları

| Lokasyonlar | Karşılaştırma Sayısı | Anlamli Ld Lokus Sayısı | H-W Eşitliğinde Olmayan Lokus Sayısı |
|-------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Aksaray     | 55                   | 7                       | 2                                    |
| Ankara      | 55                   | 16                      | 1                                    |
| Eskişehir   | 55                   | 5                       | 3                                    |
| Kayseri     | 55                   | 5                       | 1                                    |
| Konya       | 55                   | 12                      | 5                                    |
| Nevşehir    | 55                   | 4                       | 2                                    |
| Niğde       | 55                   | 18                      | 4                                    |
| Sivas       | 55                   | 12                      | 1                                    |
| Yozgat      | 55                   | 2                       | 0                                    |
| Karaman     | 55                   | 1                       | 1                                    |

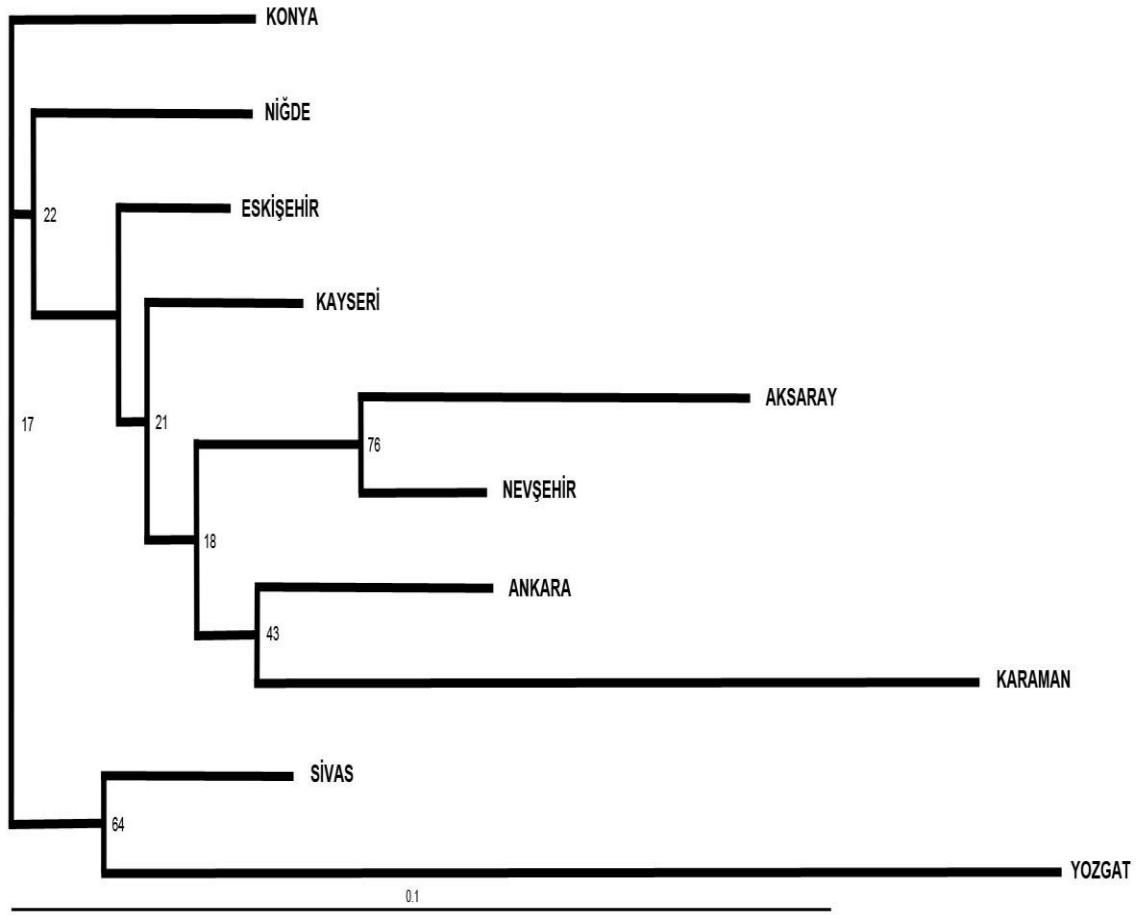
Çizelge 4.7 Tüm populasyonlar için hesaplanan  $F_{ST}$  değerleri ve populasyon farklılaşmalarının önem dereceleri

|           | AKSARAY    | ANKARA     | ESKİŞEHİR  | KAYSERİ  | KONYA      | NEVŞEHİR   | NİĞDE    | SİVAS    | YOZGAT   | KARAMAN |
|-----------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|----------|----------|----------|---------|
| AKSARAY   | 0.00000    |            |            |          |            |            |          |          |          |         |
| ANKARA    | 0.04909    | 0.00000    |            |          |            |            |          |          |          |         |
| ESKİŞEHİR | 0.08636*** | 0.00759    | 0.00000    |          |            |            |          |          |          |         |
| KAYSERİ   | 0.04915*   | 0.00188    | -0.02333   | 0.00000  |            |            |          |          |          |         |
| KONYA     | 0.07886*** | 0.00433    | -0.00131   | -0.01120 | 0.00000    |            |          |          |          |         |
| NEVŞEHİR  | 0.03355    | 0.01632    | 0.04367*** | 0.03659* | 0.03662*** | 0.00000    |          |          |          |         |
| NİĞDE     | 0.07928*** | 0.04795*** | 0.00894    | -0.00781 | 0.00540    | 0.03863*   | 0.00000  |          |          |         |
| SİVAS     | 0.07044*** | 0.05340*   | 0.01156    | -0.00265 | 0.01792    | 0.01417    | -0.00509 | 0.00000  |          |         |
| YOZGAT    | 0.18755*** | 0.19619*** | 0.11284*** | 0.08586* | 0.10478*** | 0.14794*** | 0.06877* | 0.06966* | 0.00000  |         |
| KARAMAN   | 0.08363*   | 0.02762    | 0.02814    | 0.01099  | 0.02006    | 0.04258    | 0.05260* | 0.04972  | 0.22078* | 0.00000 |

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.0001$

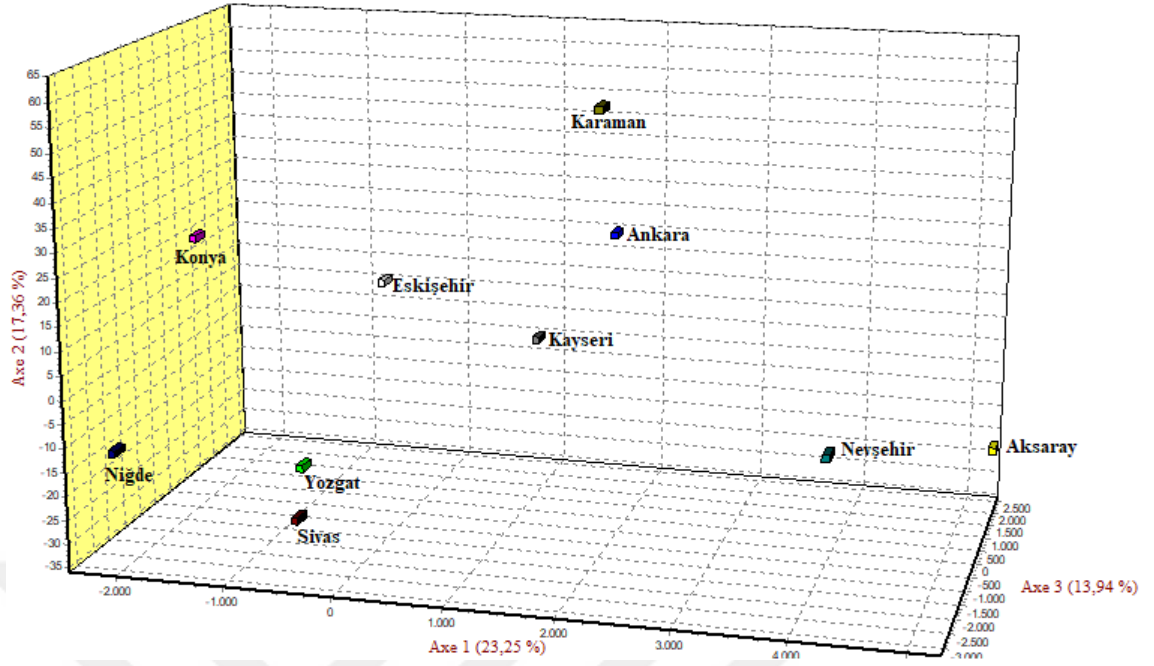
Çizelge 4.8 Tüm populasyonlar için hesaplanan genetik mesafe ( $D_A$ ) değerleri (Nei 1972)

|           | AKSARAY | ANKARA | ESKİŞEHİR | KAYSERİ | KONYA | NEVŞEHİR | NİĞDE | SİVAS | YOZGAT | KARAMAN |
|-----------|---------|--------|-----------|---------|-------|----------|-------|-------|--------|---------|
| AKSARAY   | 0.000   |        |           |         |       |          |       |       |        |         |
| ANKARA    | 0.134   | 0.000  |           |         |       |          |       |       |        |         |
| ESKİŞEHİR | 0.160   | 0.057  | 0.000     |         |       |          |       |       |        |         |
| KAYSERİ   | 0.129   | 0.060  | 0.020     | 0.000   |       |          |       |       |        |         |
| KONYA     | 0.170   | 0.046  | 0.035     | 0.037   | 0.000 |          |       |       |        |         |
| NEVŞEHİR  | 0.102   | 0.080  | 0.090     | 0.102   | 0.090 | 0.000    |       |       |        |         |
| NİĞDE     | 0.161   | 0.116  | 0.046     | 0.046   | 0.052 | 0.090    | 0.000 |       |        |         |
| SİVAS     | 0.169   | 0.117  | 0.068     | 0.062   | 0.065 | 0.081    | 0.056 | 0.000 |        |         |
| YOZGAT    | 0.328   | 0.261  | 0.183     | 0.161   | 0.163 | 0.246    | 0.137 | 0.131 | 0.000  |         |
| KARAMAN   | 0.233   | 0.136  | 0.120     | 0.132   | 0.133 | 0.148    | 0.154 | 0.190 | 0.357  | 0.000   |



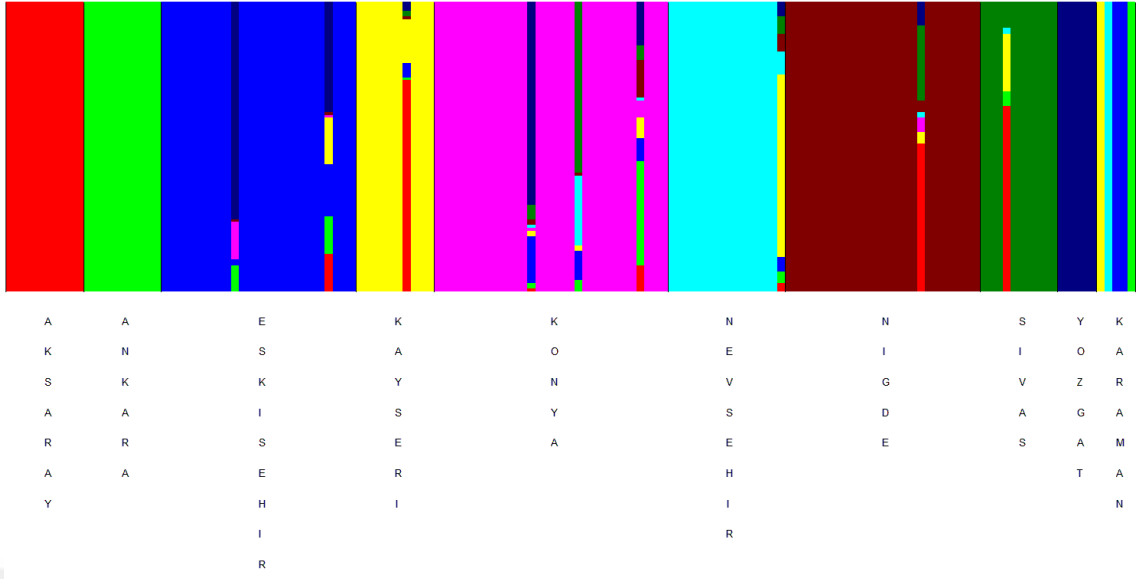
Şekil 4.2 Nei (1972) genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan mikrosatellit NJ ağacı

Faktöriyel Benzerlik Analizi (FCA) ile populasyonlar arasındaki ilişkilerin üç boyutlu düzlemde oluşturulan görsel şeması şekil 4.3'te verilmiştir. Faktöriyel benzerlik analizlerinin sonuçlarıyla Nei (1972)'ye göre oluşturulan NJ ağacı birbirleriyle örtüşmektedir. Buna göre İç Anadolu populasyonları temel olarak üç gruba ayrılma eğilimi göstermektedir.

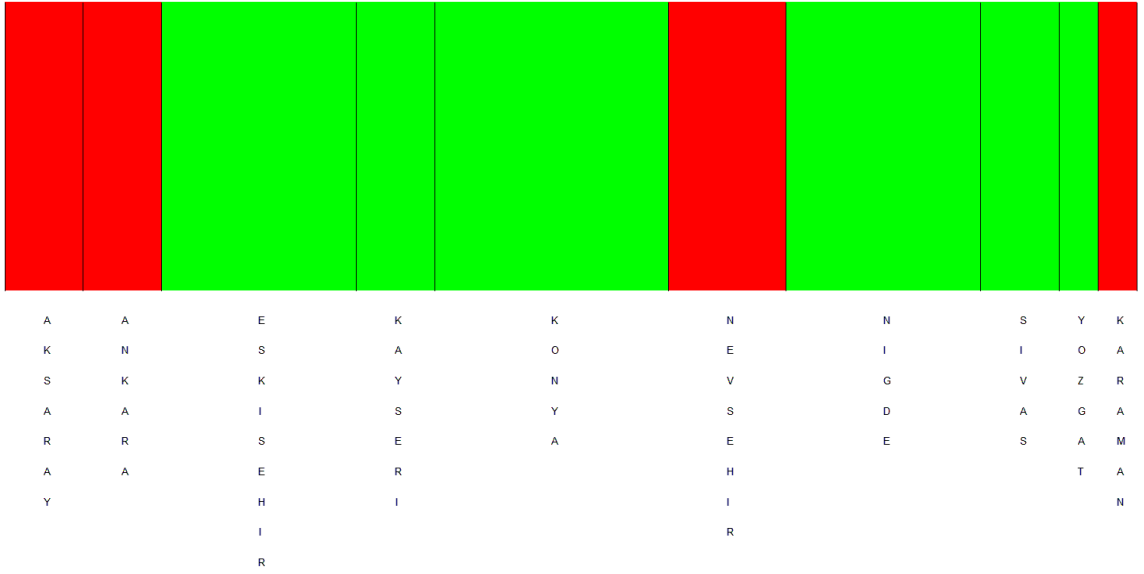


Şekil 4.3 Populasyonlar arasındaki ilişkileri gösteren üç boyutlu FCA grafiği

BAPS programı ile populasyona katkı yapan bireylerin genetik yapılanmaları görsel olarak şekil 4.4'te verilmiştir. Bu görsele göre Aksaray ve Ankara populasyonlarına ait bireyler diğer populasyonlardan tamamen farklıdır. Ayrıca Karaman populasyonu Nevşehir, Eskişehir ve Ankara populasyonlarına ait bireylerle benzerlik göstermektedir. Sadece populasyonların bazında elde edilen görsel ise Şekil 4.5'te verilmiştir. Bu görsele göre Aksaray, Ankara, Nevşehir ve Karaman kendi aralarında benzerlik gösterirken, Eskişehir, Kayseri, Konya, Niğde, Sivas ve Yozgat kendi aralarında benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.4 Populasyonlara katkı yapan bireylerin genetik yapılanmalarını gösteren BAPS görseli



Şekil 4.5 Populasyonların genetik yapılanmasını gösteren BAPS görseli

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Moleküler belirteçler, biyolojik bilimler araştırmalarının her alanında, özellikle evrimsel süreçleri aydınlatılabilmek için gün geçtikçe daha fazla kullanılmaktadır (Singh vd. 2017). Özel olarak karakterize edilen belirteçlerden olan mikrosatellitler ekonomik veya tıbbi önemi olan çok sayıda böcek türü için populasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Bruvo-Madaric 2009). Mikrosatellitlerin, diğer belirteç sistemlerine kıyasla polimorfik durumda olması böcek – bitki etkileşimlerini incelemek için en iyi seçimdir. Genomların ekonomik olarak çoğaltılabilmesi, türlerin içerisinde bol miktarda bulunmaları gibi özellikler mikrosatellitleri genetik çeşitlilik, populasyon çalışmaları ve evrimsel süreçleri açıklamak için seçilebilecek en iyi belirteçler yapmaktadır (Wang vd. 2009).

Bu çalışmada kullanılan mikrosatellit belirteçleri, Grapputo (2006) tarafından Kentucky (15 birey), Estonya (24 birey) ve Rusya (15 birey) populasyonlarındaki toplam 54 bireyle yapılan çalışma sonucu geliştirilip karakterize etmiştir. Karakterize edilen bu belirteçlerin genetik çeşitlilik, populasyon yapısı ve ebeveyn analizi hesaplamalarında kullanılabileceğini belirtmiştir. Zhang vd. (2013) patates üretiminde ilk sırada olan Çin’de patates böceğinin ilk olarak ortaya çıktığı Xinjiang’da 10 popülasyondaki genetik ilişkiyi aydınlatmaya çalışmış ve genetik varyasyonun düşük olduğunu ortaya koymuştur. Izzo vd. (2018) Kuzey Amerika’da kültüre edilmemiş *Solanum* konakçı bitkilerinden ve diğer popülasyonlardan patates böceği örneği alarak yaptığı çalışmada mikrosatellit belirteçlerine bağlı olarak genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu belirtmiştir. Bu Amerika popülasyonları ile yapılan diğer çalışmalardan elde edilen bulguları desteklemektedir (Grapputo vd. 2005). Avrupa popülasyonlarında mikrosatellit belirteçlerinin kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada birçok genetik analizler yapılmıştır. Yapılan analizlerden biri her popülasyonun genetik varyasyonlarının hesaplanmasıdır. Elde edilen verilere göre ortalama gözlenen heterozigotluk (0,495) ortalama beklenen heterozigotluğun (0,529) altında çıkmıştır. Bu durumun nedeni akrabalar arası üreme veya popülasyon içinde

bulunan yüksek genetik çeşitliliğin homojen olarak dağılmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Gerçekleştirilen AMOVA analiziyle gruplandırılan popülasyonların gruplar arası, gruplar içerisinde bulunan popülasyonlar arası ve popülasyonların kendi içinde değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4). Analiz sonuçları varyasyonun en az gruplar arasında (% 0.96) en fazla ise popülasyonların kendi içerisinde (% 96.51) görülmüştür. Gruplar arasında gözlemlenen varyasyonun düşük olması patates böceğinin ülkemizde yeni yeni yayılmaya başladığının ya da gen akışının sürdüğünün somut kanıtı niteliğindedir.

Pairwise Linkage Disequilibrium ve Hardy-Weinberg Eşitliği testleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.6). Linkage Disequilibrium (bağlantı dengesizliği) testi Hardy-Weinberg dengesinin lokuslar üzerinde uygulanan şeklidir. Elde edilen bulgulara göre anlamlı LD lokus sayısı Niğde (18), Ankara (16), Konya ve Sivas (12) illerinde göze çarpmaktadır. Hardy-Weinberg eşitliğinde olmayan lokus sayısı yine Konya (5) ve Niğde (4) illerinde diğerlerine göre daha fazladır. Konya ve Niğde illeri patates üretiminin en fazla yapıldığı ve örnek sayısının en fazla olduğu illerdir ve bulgular yorumlandığı zaman bu illerde genetik sürüklenmenin ve popülasyonların diğer popülasyonlara göre daha fazla göç aldığı düşünülebilir.

Popülasyonlar arasında bulunan genetik ilişkiler ve farklılaşmalarını belirlemek amacıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde  $F_{ST}$  değerleri bulguları çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Elde edilen  $F_{ST}$  değerlerinin ortalaması 0.06 olarak bulunmuştur. Yani popülasyonlar arası farklılaşmanın İç Anadolu bölgesindeki illerde yaklaşık % 6 civarında olduğu görülmektedir.

Yapılan mikrosatellit analizleri sonucunda elde edilen veriler iki temel sonucu ortaya çıkarmıştır. Birincisi, İç Anadolu bölgesinde bulunan patates böceği popülasyonlarında genetik varyasyon düşüktür ve genetik varyasyonun üzerindeki temel katkı bireyler arasında gözlenen varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. İkincisi ise, yapılan farklı analizler sonucu elde edilen bulgular il bazında benzer sonuçların varlığını göstermiştir.

Bu çalışmada İç Anadolu bölgesinin farklı illerinden toplanan örnekler, 11 polimorfik mikrosatellit lokusu kullanılarak analizi yapılan patates böceği populasyonları arasında düşük seviyede genetik varyasyon olduğunu göstermiştir. BAPS 6 (Bayesian Analysis of Population Structure) ile yapılan analizler bu sonucu desteklemektedir. Buna göre populasyonlara katkı yapan bireyler arasında gözlenen düşük miktardaki varyasyonlar (Şekil 4.4) populasyon bütünlüğünde incelendiğinde çok fazla etkili olmadığı görülmektedir (Şekil 4.5).

Bu durumu açıklamak için patates bitkisinin Türkiye’de ne zamandan beri yetiştirildiğini ve patates böceğinin Türkiye’deki geçmişine bakmak faydalı olacaktır. Patatesin Türkiye’ye girişiyle ilgili farklı görüşler olmakla birlikte çok eski dönemlerde tarımına başladığı bilinmektedir (Onaran vd. 2000). Fakat bu dönemler için patates bitkisi zararlısı hakkında herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Patates böceği populasyonlarının Avrupa’ya 1920’lerde Fransa’dan girmesi ve Avrupa’ya 30 yıl boyunca yayılması sonucu, patates böceğinin Türkiye’ye girişi 1970’li yılları bulmaktadır (Atak 1973). Bu bilgiler ışığında İç Anadolu bölgesi populasyonları için genetik varyasyonun düşük olması, patates böceğinin ülkemizde yaklaşık son 50 yılda görülüyor olması düşünüldüğünde beklenen bir sonuçtur.

Populasyonlar arası genetik uzaklık ( $D_A$ ) verileriyle oluşturulan Neighbour-Joining ağacı (Şekil 4.2) Faktöriyel Benzerlik Analizi (FCA) sonuçlarıyla (Şekil 4.3) karşılaştırıldığında birbiriyle örtüşmektedir. Bu sonuçlara göre Konya ili tek başına bir grubu temsil ederken, Niğde, Eskişehir, Kayseri, Aksaray, Nevşehir, Ankara ve Karaman ikinci grubu, Sivas ve Yozgat ise üçüncü bir grubu oluşturmuştur. Patates böceğinin uçuş kapasitesinin sınırlı olması, ergin dönemde yaşamını genellikle toprak altında geçirmesi ve örneklerin toplandığı tarlalar arası mesafeler göz önüne alındığında birbirine yakın olan illere ait populasyonların genetik uzaklığının az olması, coğrafik olarak uzak konumlarda bulunan populasyonların genetik uzaklığının yüksek olması görüşünü desteklemektedir.

## KAYNAKLAR

- Allendorf, F.W. and Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. First Edition. Wiley- Blackwell. MA, USA.
- Alyokhin, A., Udalov, M. and Benkovskaya, G. 2012. Insect Pests of Potato. Academic Press, 11, USA.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: <https://www.ck12.org/biology/pcr/lesson/>, Erişim Tarihi: 19.04.2018.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: <https://www.potatopro.com/world/potato-statistics>, Erişim Tarihi: 14.05.2018.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: <http://www.appliedbiosystems.com>, Erişim Tarihi: 10.02.2018.
- Atak, U. 1973. Trakya bölgesinde Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say)'nin morfolojisi, bio-ekolojisi ve savaş metodları üzerinde araştırmalar, T.C.Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları Teknik Bülteni, 6, 63.
- Aslan, İ. 1994. Erzurum İlindeki Chrysomelinae ve Clytrinae (Coleoptera: Chrysomelidae) Türleri Üzerinde Faunistik ve Sistematik Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Atatürk Üniv. Fen Bil. Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı, 52, Erzurum.
- Avise, J.C.A. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Sinauer Associates, 648, Massachusetts.
- Azeredo-Espin, A.M.L., Schroder, R.F.W., Huettel, M.D. and Sheppard, W.S. 1991. Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Exprientia*, 47(5), 483-485.
- Azeredo-Espin, A.M.L., Schroder, R.F.W., Roderick, G.K. and Sheppard, W.S. 1996. Intraspecific Mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Biochemical Genetics*, 34(7-8), 253-268.
- Behura, S.K. 2006. Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues. *Molecular Ecology*. 15 (11): 3087-3113.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F. 1996-2004. GENETIX 4.05.2, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Biever, K.D. and Chauvin, R.L. 1990. Prolonged dormancy in a Pacific Northwest population of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Entomologist*. 1/2, 175–177.

- Boopathi, N.M. 2012. Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits, Springer Science and Business Media, 61, London.
- Booth, R. G., Cox, M.L. and Madge, R.B. 1990. Lie Guides to Insects of Importance to Man, 3. Coleoptera. Printed in the UK at the University Press, 384, Cambridge.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G. and Luikart, G. 2003. DNA Markers Reveal The Complexity Of Livestock Domestication. *Nat Genet.* 4: 2-12.
- Bruvo-Madaric, B. 2009. Molecular phylogenetic methods in entomology – new insights on the evolutionary relationships of hexapods and arthropods. *Znanstveno Popularni Clanci.* 2: 69-84.
- Butler, J.M. 2005. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, (2nd Edition). Elsevier Academic Press, New York.
- Casagrande, R.A. 1985. The “Iowa” potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 31, 27–29.
- Caterino, M. S., Shull, V. S., Hammond, P. M. and Volger, A. P. 2002. Basal relationships of Coleoptera inferred from 18s rDNA sequences, *Zoologica Scripta*, 31, 41-49.
- Chapuis, M.P. and Estoup, A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-631.
- Christie, R.D., Sumalde, A.C., Schutz, J.T. and Gudmestad, N.C. 1991. Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen. *American Potato Journal*, 68: 363-372.
- Corander, J., Cheng, L., Marttinen, P., Siren, J. and Tang, J. 2012. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure v. 6.0. Department of Mathematics and Statistics, University of Helsinki.
- Çalışkan, E.M., Onaran, H. and Arıoğlu, H. 2010. Overview of the Turkish Potato Sector: Challenges, Achievements and Expectations, *Potato Research*, 53, 255-266.
- Devrim, A.K. ve Kaya, N. 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(2), 209-214.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15.
- Eisen, J.A. 2000. Mechanistic basis for microsatellite instability in: *Microsatellites Evolution and Applications*, Oxford University Press, 34-36, New York.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Freeman, S. ve Herron, J. C. 2009. Evrimsel Analiz (Çıplak, B., Başbüyük, H.H., Karaytuğ, S. ve Gündüz, İ. Çev.). *Palme Yayınları*, 798, Ankara.
- Gillott, C. 1982. *Classification and Identification Entomology*. Plenum Press, 692, New York.

- Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Institut of Ecology, Department of Biology, University of Lausanne, Switzerland.
- Grapputo, A., Boman, S., Lindström, L., Lyytinen, A. and Mappes, J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations, *Molecular Ecology*, 14, 4207-4219.
- Grapputo, A. 2006. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Molecular Ecology Notes*, 6, 1177-1179.
- Gullan, P.J. ve Cranston P. S. 2010. Böcekler Entomolojinin Ana Hatları (Gök, A. Çev.). Nobel yayınevi, 487, Ankara.
- Guo, S.W. and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48(2): 361-72.
- Hare, J.D. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annual Review of Entomology*. 35, 81–100.
- Henderson, S.T. and Petes, T.D. 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biology*. 12: 2749- 2757.
- Holton, T.A. 2001. Plant Genotyping The DNA Fingerprinting of Plants. CAB International, 333, Australia.
- Hoy, M.A. 2003. Insect Molecular Genetics, in *Insect Molecular Genetics*. Academic Press, 399, Massachusetts.
- Hsiao, T.N. and Hsiao, C. 1983. Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* Species (Coleoptera, Chrysomelidae), *Genetics* 60, 139–150.
- Izzo, V.M., Chen, Y.H., Schoville, S.D., Wang, C. and Hawthorne, D.J. 2018. Origin of pest lineages of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 20(10), 1-11.
- İlisulu, K. 1957. Türkiye’de Yetiştirilen Patates Çeşitlerinin Başlıca Vasıfları Üzerinde Araştırmalar, Ankara Üniv.Ziraat Fak.Yayın NO: 118, S:248, Ankara.
- Jacobson, J.J. 1983. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae), *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2), 162-166.
- Jacques, R.L. 1988. *The Potato Beetles*. E. J. Brill, Leiden, The Netherlands.
- Jolivet, P., Petipierre, E. and Hasiao, T.H. 1988. *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, 606, England.
- Jolivet, P. 1991. The Colorado beetle menaces Asia (*Leptinotarsa decemlineata* Say 1824)(Col. Chrysomelidae). *L’Entomologiste* 47, 29–48.
- Karhu, A. 2001. Evolution and applications of pine microsatellites. Academic Dissertation, Faculty of Science, University of Oulu, Finland.

- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. and Palladino, M. A. 2012. Concepts of Genetics. Pearson, 742, United States of America.
- Langella, O. 1999. Populations 1.2.32: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). Free Software Foundation, Boston, USA.
- Lebart, L., Morineau, A. and Warwick, K.M. 1984. Multivariate descriptive analysis: Correspondence analysis and related techniques for large matrices. Wiley, 304 p., Chichester.
- Liu, B.H. 1998. Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press LLC. Boca Raton New York.
- Lopatin, I. 1977. Leaf-beetles (Chrysomelidae) of Middle Asia and Kazakhstan. Nauka, 268, Leningrad.
- Medvedev, L.N. 1981. Systematic status of *Leptinotarsa decemlineata* Say within the family Chrysomelidae, phylogeny, evolution of the species, Nauka, 27-34, Moscow.
- Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American, 4:56-61.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106, 283-292.
- Onaran, H., Ünlenen, A.L. ve Doğan, A. 2000. Patates Tarımı, Sorunları ve Çözüm Yolları. Niğde: T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Niğde Patates Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
- Paetkau, D., Waits, L.P., Clarkson, P.L., Craighead, L. and Strobeck, C. 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. Genetics, 147(4), 1943-57.
- Passarge, E. 1995. Color Atlas of Genetics. (Second Edition). Thieme Press, New York.
- Ponomarenko, A. G. 1995. The geological history of beetles, Pakaluk and Slipinski, 155-171.
- Rangwen, R., Akkaya, M.S., Bhagwar, A.A., Lavi, U. and Cregan P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90:43-48.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A. and Minorsky, P.V. 2016. Campbell Biology (11th Edition). Pearson, 1284, USA.
- Ridout, C.R. and Donini, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. Trends in Plant Science, 4:76-79.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W. 1994. Extraordinarily Polymorphic Microsatellite DNA in Barley: Species Diversity, Chromosomal Locations and Populations Dynamics. P Natur Ac Scien. 91: 5466-5470.

- Sidorenko, A.P. and Berezovska, O.P. 2002. Genetic structure of populations of the Colorado potato beetles *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), Russian Journal of Genetics, 38(11), 1256-1261.
- Singh, S., Mishra, V.K. and Bhoi, T. K. 2017. Insect Molecular Markers and its Utility- A Review. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 10(4): 469-479.
- Slatkin, M. 1994. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. Genetics. 137(1): 331-6.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 31: 729-740.
- Szentesi, A. 1985. Behavioral aspects of female guarding and inter-male conflict in the Colorado potato beetle. In: Ferro, D.N., Voss, R.H. (Eds.), Proceedings, Symposium on the Colorado Potato Beetle. XVIIth International Congress of Entomology, Research Bulletin 704, 127–137.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.V., Prince, J.P., Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Roder, M.S. and Young, N.D. 1992. High density molecular maps of the tomato and potato genomes. Genetics. 132: 1141-1160.
- Türkyılmaz, S. ve Esendal, Ö. M. 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 8(1), 71-76.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnhabs, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 21: 4407-4414.
- Wang, L. W., Barkley, N. A. and Jenkins, T. M. 2009. Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. Genes, Genomes and Genomics. 54-67.
- Weber, D. 2003. Colorado beetle: Pest on the move. Pesticide Outlook 14, 256–259.
- Wilcox, J.A. 1954. Leaf beetles of Ohio (Chrysomelidae: Coleoptera), Bull. Ohi. Biol. Sor., 8 (3): 353-506.
- Worner, S.P. 1988. Ecoclimactic assessment of potential establishment of exotic pests. J. Econ. Entomol. 81, 973–983.
- Wright, S. 1965. The Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 19(3), 395-420.
- Zhang, J., Yang, J., Li, Y., Liu, N. and Zhang, R-Z. 2013. Genetic relationships of introduced Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* populations in Xinjiang, China, Insect Science, 20, 643-654.
- Zhukovsky, P.M. 1933. Zemledel'cheskaya Turtsiya (Aziatskaya chast' – Anatoliya). Moscow, Leningrad [Agricultural Turkey (Asian part – Anatolia)].

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Salih Berkay BERKCAN

Doğum Yeri : YENİMAHALLE

Doğum Tarihi : 13.08.1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Ufuk Arslan Anadolu Lisesi (2010)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı  
(Eylül 2016 – Ocak 2019)

### Uluslararası Kongre Sunum

Koca, A. Ö., **Berkcan, S. B.**, Laçın, B. ve Kandemir, İ. 2018. Preliminary analysis on the colonization of the potato beetle populations in Turkey using microsatellite markers. XI European Congress of Entomology, 2-6 July 2018. Abstract Book, p. 110, İtalya (Sözlü sunum)

Koca, A. Ö., Laçın, B., **Berkcan, S. B.** ve Kandemir, İ. 2018. Genetic variation in the invasive potato beetle populations in Turkey based on nuclear (ACHE2 gene) and mitochondrial DNA (Cytochrome Oxidase I and II Subunits) markers. XI European Congress of Entomology, 2-6 July 2018. Abstract Book, p. 295, İtalya (Poster sunumu)

Koca, A. Ö., Laçın, B., **Berkcan, S. B.** ve Kandemir, İ. 2018. Nükleer ve mitokondriyal DNA belirteçlerine bağlı olarak Türkiye'deki istilacı patates böceği populasyonlarının genetik karakterizasyonu. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 14-17 Kasım 2018. Özet Bildiri Kitabı, s. 49, Muğla (Sözlü sunum)